



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN
INGENIERÍA**

FACULTAD DE QUÍMICA

**REOLOGÍA Y ULTRAESTRUCTURA DE PASTAS Y
GELES DE κ -CARRAGENINA Y ALMIDÓN DE MAÍZ
CEROSO RETICULADO**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN INGENIERÍA

INGENIERÍA QUÍMICA – BIOINGENIERÍA

PRESENTA:

M. en C. MARÍA DEL CARMEN NÚÑEZ SANTIAGO

TUTOR:

DR. ALBERTO TECANTE CORONEL

AÑO 2007





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.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la **Universidad Nacional Autónoma de México** y a su **Facultad de Química** la oportunidad invaluable de formarme dentro de su posgrado en Ingeniería.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) la beca otorgada para la realización de estudios de doctorado (2003 a 2005) así como mi participación como estudiante de doctorado en el proyecto 36119B *“Reología y estructura de pastas y geles de almidón de maíz en presencia de polisacáridos espesantes y gelificantes”*. Agradezco también a la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP) por la beca complementaria para la realización de mis estudios de doctorado (2003 a 2005).

Agradezco a la Coordinación del Programa de Maestría y Doctorado en Ingeniería el apoyo económico para la asistencia al 4th Pacific Rim Conference on Rheology del 7 al 11 de agosto de 2005. Así como el apoyo económico para la realización de una estancia de investigación en el Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) en Nantes, Francia del 5 de marzo al 5 de julio de 2005 para la capacitación de estudios de microscopia confocal láser y las mediciones de reología de κ -carragenina en conformación ordenada bajo la dirección del Dr. Jean Louis Doublier.

Agradezco el apoyo de la Dra. Araceli Patrón, jefa de la Unidad de Microscopia del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, por su apoyo y consejos durante las observaciones en Microscopia Confocal de Barrido Láser.

Mi agradecimiento al Dr. Eduardo Vivaldo Lima, responsable del equipo de difracción láser por las facilidades otorgadas para las mediciones de distribución de tamaño de partícula, y especialmente a los M. en C. Martha Roa y Gabriel Jaramillo por su tiempo y disposición durante las determinaciones.

Mi agradecimiento a la Dra. Ruth Pedroza Islas, Jefa del Laboratorio de Biopolímeros de la Universidad Iberoamericana, por su disponibilidad y facilidades otorgadas para las determinaciones en microDSC, particularmente a la I.Q. Guadalupe Franco Rodríguez.

Agradezco al Laboratorio de Físicoquímica de Macromoléculas, INRA-Nantes, las facilidades otorgadas durante mi estancia de investigación. Particularmente agradezco al Dr. Jean Louis Doublier, la Dra. Catherine Garnier y a Sylvie Durand sus valiosas asesorías, su disponibilidad y su gentileza.

Mi más sincero agradecimiento al Dr. Alberto Tecante Coronel por su atinada dirección, sus consejos, su tiempo y confianza y por su apoyo incondicional para la realización del presente trabajo.

Agradezco a la Comisión de Operaciones y Fomento de Actividades Académicas (COFAA) del **Instituto Politécnico Nacional**, el permiso para la realización de mis estudios de doctorado, así como a todo el personal del Departamento de Desarrollo Tecnológico del CeProBi por su apoyo durante la realización del mismo.

Agradezco en forma muy especial a los miembros de jurado:

Dr. Angel Enrique Chávez Castellanos, FQ, UNAM

Dr. Eduardo Vivaldo Lima, FQ, UNAM

Dr. Jaime Eduardo Vernon Carter, IQ, UAM-I

Dr. Fernando Martínez Bustos, CINVESTAV, IPN

Dr. Jorge Fernando Vélez Ruíz, IQyA, UDLA.

Dra. Adriana Inés Rodríguez Hernández, CICYTA, UAEH

Dr. Joaquín Palacios Alquisira, FQ, UNAM

Por sus valiosas sugerencias para el mejoramiento de este trabajo.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio L-313 del Departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química de la UNAM, y en el Laboratorio de Físicoquímica de Macromoléculas del Instituto Nacional de Investigación Agronómica INRA), en Nantes. La dirección estuvo a cargo del Dr. Alberto Tecante Coronel.

CONTENIDO

Índice de Cuadros

Índice de Figuras

Nomenclatura

INTRODUCCIÓN

CARRAGENINA

- 1.1 κ -carragenina
 - 1.1.1 Estructura cristalina y conformación en solución
 - 1.1.2 Transición sol – gel
 - 1.1.3 Mecanismo de gelificación
 - 1.1.4 Comportamiento reológico de soluciones de κ -carragenina
 - 1.1.5 Comportamiento reológico de geles de κ -carragenina
 - 1.1.6 Comportamiento reológico de la κ -carragenina con otros polisacáridos
 - 1.1.7 Microestructura de la κ -carragenina
 - 1.1.8 Medición de temperaturas de transición sol–gel con métodos reológicos
- 1.2 Discusión

ALMIDÓN

- 2.1. Aspectos generales
- 2.2 Composición del almidón
- 2.3 Organización del gránulo
- 2.4 Gelatinización del almidón y microDSC
- 2.5 Modificaciones químicas en el almidón
- 2.6 Pruebas reológicas en pastas y geles de almidones
- 2.7 Pruebas reológicas en mezclas almidón - hidrocoloides
- 2.8 Discusión

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

- 3.1 Hipótesis
- 3.2 Objetivo general
- 3.3 Objetivos particulares

MATERIALES Y MÉTODOS

- 4.1 Materiales
- 4.2 Métodos
 - 4.2.1 Cocción de las pastas y geles de κ -carragenina–almidón–KCl
 - 4.2.2 Preparación de muestras para microscopía confocal de barrido láser (CLSM)
 - 4.2.2.1 Reacción RITC- κ -carragenina
 - 4.2.2.2 Grado de sustitución (g.s) de RITC- κ -carragenina
 - 4.2.2.3 Marcado del almidón
- 4.3 Mediciones
 - 4.3.1 Hinchamiento, solubilidad y fracción volumen
 - 4.3.2 Distribución de tamaño de partícula
 - 4.3.3 Microcalorimetría de barrido diferencial
 - 4.3.4 Microscopía
 - 4.3.4.1 Microscopía de luz transmitida y polarizada
 - 4.3.4.2 Microscopía confocal de barrido láser

- 4.3.5 Cizalla estacionaria y cizalla oscilatoria de baja amplitud
 - 4.3.5.1 Propiedades reologicas del almidon de maiz
 - 4.3.5.2 CINETICAS de gelificacion de κ -carragenina
 - 4.3.5.3 Viscosidad intrinseca y masa molecular promedio
 - 4.3.5.4 Cizalla estacionaria y mediciones oscilatorias de baja amplitud en soluciones de κ - carragenina a 9 °C
 - 4.3.5.5 Propiedades reologicas de mezclas κ -carragenina–almidon–KCl

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- 5.1 Propiedades de la κ -carragenina
 - 5.1.1 MicroDSC
 - 5.1.1.1 Concentracion ionica total superior a la concentracion ionica critica ($C_T > C^*$)
 - 5.1.1.2 Concentracion ionica total cercana a la concentracion ionica critica ($C_T \approx C^*$)
 - 5.1.1.3 Concentracion ionica total inferior a la concentracion ionica critica ($C_T < C^*$)
 - 5.1.2 Determinacion de la temperatura de gelificacion de κ -carragenina por diversos metodos reologicos
 - 5.1.2.1 Analisis de la variacion de G' y G'' con la frecuencia y la temperatura
 - 5.1.2.2 Analisis del angulo de fase critico ($\tan \delta_c$)
 - 5.1.2.3 Barridos de temperatura
 - a) Sistemas con concentracion ionica total mayor que la concentracion ionica critica ($C_T > C^*$)
 - b) Sistemas con concentracion ionica total menor que la concentracion ionica critica ($C_T < C^*$)
 - 5.1.2.4 Diagrama de transicion
 - 5.1.3 Efecto de la concentracion de K^+ sobre el comportamiento reologico de 0.5% de κ -carragenina a 60 y 25 °C
 - 5.1.3.1 Temperatura superior a la temperatura critica ($T > T^*$)
 - 5.1.3.2 Concentracion ionica total inferior a la concentracion critica y temperatura inferior a la temperatura de fusion ($C_T > C^*$ y $T < T_{fus}$)
 - 5.1.3.3 Efecto de la concentracion de κ -carragenina y de K^+ en los geles a 25 °C
 - 5.1.4 Efecto de la concentracion ionica total en disoluciones de κ -carragenina para temperaturas inferiores a la temperatura critica ($T < T^*$)
 - 5.1.4.1 Efecto de la concentracion de K^+ en las disoluciones de κ -carragenina cuando la concentracion ionica total es superior a la concentracion ionica critica ($C_T > C^*$)
 - 5.1.4.2 Efecto de la concentracion ionica total en disoluciones de κ -carragenina cuando la concentracion ionica total es inferior a la concentracion critica ($C_T < C^*$)
 - a) *Viscosidad intrinseca*
 - b) *Dependencia de la viscosidad de κ -carragenina con la concentracion ionica total*
 - c) *En pruebas de cizalla oscilatoria*
 - 5.1.5. Ultraestructura
 - 5.1.5.1 Efecto de la concentracion de κ -carragenina sobre la conformacion de la red tridimension
 - 5.1.5.2 Efecto de la concentracion de K^+ sobre la formacion de la red tridimensional
 - 5.1.6 Discusion

- 5.2 Propiedades del almidon
 - 5.2.1 Comportamiento durante la coccion
 - 5.2.2 Caracteristicas ante la coccion
 - 5.2.2.1 Hinchamiento y solubilidad
 - 5.2.2.2 Fraccion volumen
 - 5.2.2.3 Efecto de la concentracion de K^+ en el tamaño de los granulos de almidon
 - 5.2.3 Microcalorimetria de barrido diferencial
 - 5.2.3.1 Propiedades termicas del almidon de maiz ceroso modificado quimicamente
 - 5.2.3.2 Efecto de la concentracion de K^+ sobre la temperatura de gelatinizacion de almidon de maiz ceroso modificado quimicamente
 - 5.2.4 Comportamiento reologico
 - 5.2.4.1 Cizalla estacionaria
 - 5.2.4.2 Estudio de la anisotropia y el deslizamiento en pastas de almidon a 25 °C
 - 5.2.4.3 Efecto de la concentracion de K^+ sobre las propiedades reologicas de almidon de maiz ceroso modificado quimicamente
 - 5.2.4.4 Cizalla oscilatoria
 - 5.2.5 Ultraestructura
 - 5.2.5.1 Luz transmitida y luz polarizada
 - 5.2.5.2 Microscopia confocal de barrido laser
 - 5.2.6 Discusion
- 5.3 Mezclas κ -carragenina - almidon - KCl
 - 5.3.1 Tamaño de particula y fraccion volumen
 - 5.3.1.1 En ausencia de K^+
 - 5.3.1.2 Efecto de la presencia de K^+
 - 5.3.2 MicroDSC
 - 5.3.2.1 Analisis de la presencia de almidon en la κ -carragenina
 - 5.3.2.2 Analisis de la presencia de KCl en mezclas κ -carragenina-almidon
 - 5.3.3 Cizalla oscilatoria en mezclas almidon- κ -carragenina-KCl
 - 5.3.3.1 Efecto de la concentracion de almidon y de KCl en geles con 0.5% de κ -carragenina a 25 °C
 - 5.3.3.2 Efecto de la concentracion de almidon y de KCl en pastas con 0.5% de κ -carragenina a 60°C
 - 5.3.3.3 Efecto de la concentracion de almidon en pastas con κ -carragenina a 9 °C
 - 5.3.4 Ultraestructura
 - 5.3.4.1 Efecto de la concentracion de κ -carragenina sobre el almidon
 - 5.3.4.2 Efecto de la concentracion de κ -carragenina sobre almidon y 40 mM de KCl
 - 5.3.5 Discusion

Conclusiones generales y recomendaciones para trabajos futuros

Referencias bibliograficas

Apendice A. Viscosidad de soluciones de κ -carragenina a diferentes concentraciones ionicas totales, C_T y 9 °C.

INDICE DE CUADROS

		pagina
Cuadro 1.	Composicion y localizacion de algas rojas que contienen carrageninas (Stanley,1980).	
Cuadro 2.	Parametros de gelatinizacion de almidones de diversas fuentes botanicas obtenidos por microDSC.	
Cuadro 3.	Contenido de sales de la κ -carragenina usada en este estudio.	
Cuadro 4.	Temperaturas de fusion y de gelificacion de κ -carragenina 0.5% cuando la concentracion ionica total es muy proxima a la concentracion ionica critica.	
Cuadro 5.	Temperaturas de transicion orden-desorden de κ -carragenina cuando la concentracion ionica total es inferior a la concentracion ionica critica.	
Cuadro 6.	Efecto de la concentracion de K^+ sobre el tiempo de cruce de los modulos G' y G'' para 0.5% de κ -carragenina a 9 °C y 1 Hz en la zona de viscoelasticidad lineal.	
Cuadro 7.	Efecto de la concentracion de K^+ adicionado sobre los valores de G' y G'' , ω , tiempos de relajacion y coeficientes a y b para κ -carragenina 0.5% a 9 °C.	
Cuadro 8.	Efecto de la C_T en disoluciones de K^+ - κ -carragenina a 9 °C.	
Cuadro 9.	Efecto de C_T en la concentracion critica en K^+ - κ -carragenina a 9 °C.	
Cuadro 10.	Resumen de pendientes y calores de reaccion de la ecuacion: $\log C_T = -\Delta H / 2.303 RT + \text{constante}$	
Cuadro 11.	Hinchamiento y solubilidad de almidon cocido a 92 °C.	
Cuadro 12.	Diametro mediano $D[v, 0.5]$ y poder de hinchamiento de almidon cocido a 92 °C.	
Cuadro 13.	Efecto del KCl sobre la temperatura de gelatinizacion del almidon de maiz ceroso modificado quimicamente.	
Cuadro 14.	Constantes del modelo Herschel-Bulkley ($\sigma = \sigma_0 + k \gamma^n$) en pastas de almidon a 25 y 60 °C.	
Cuadro 15.	Efecto de la concentracion de almidon en κ -carragenina 0.5%.	
Cuadro 16.	T_{max} y ΔH para κ -carragenina y sus mezclas con almidon 4% en ausencia de KCl.	
Cuadro 17.	T_{max} y ΔH de mezclas 4% de almidon-0.5% de κ -carragenina con diferentes concentraciones de KCl.	

INDICE DE FIGURAS

		pagina
Figura 1.	Unidad repetitiva ideal de las carrageninas.	
Figura 2.	Estructura cristalina de la κ -carragenina.	
Figura 3.	Diagrama de transicion sol-gel de κ -carragenina en presencia de K^+ .	
Figura 4.	Modelo de gelificacion de la κ -carragenina.	
Figura 5.	Representacion esquematica de la interaccion K^+ - κ -carragenina.	
Figura 6.	Evolucion del modulo G' de K^+ - κ -carragenina 1% purificada.	
Figura 7.	Imagen de (a) una red local de helices de κ -carragenina en KCl, (b) helices de κ -carragenina formadas en dilucion con KCl a 85 °C.	
Figura 8.	Imagenes de SEM de redes de κ -carragenina 1%. (a) con 10 mM KCl, (b) con Ca^{2+} en una proporcion 1:1.	
Figura 9.	Imagenes de SEM de redes de κ -carragenina con: (a) algarrobo (4:6) en presencia de 10 mM KCl, (b) alginato (4:6) con entrecruzamientos de $CaCl_2$.	
Figura 10.	Ruta basica de la sintesis de ADP-glucosa.	
Figura 11.	Estructura del amilosa.	
Figura 12.	Representacion esquematica del amilopectina.	
Figura 13.	Representacion esquematica del amilopectina indicando el patron de ramificaciones de las unidades de cadenas α -1 \rightarrow 4 (A, B1-B3) unidas por enlaces α -1 \rightarrow 6 (puntos de ramificacion).	
Figura 14.	Representacion esquematica de amilosa en almidones Tipo A y Tipo B.	
Figura 15.	Representacion del arreglo cristalino de las dobles helices de amilosa a partir de (a) almidon tipo A; (b) almidon tipo B.	
Figura 16.	Representacion de la estructura laminar de los granulos de almidon.	
Figura 17.	Curva de calentamiento en microDSC para almidon de maiz 20%. Tasa de calentamiento = 1 °C/min.	
Figura 18.	Esquema de la estructura de un granulo de almidon entrecruzado.	
Figura 19.	Reaccion quimica para entrecruzamiento de almidon por una mezcla de anhidos adipico y acetico.	
Figura 20.	Reaccion quimica para el entrecruzamiento de almidon con oxiclورو de fosforo en medio alcalino.	
Figura 21.	Reaccion quimica para entrecruzamiento de almidon con trimetafosfato de sodio.	
Figura 22.	Representacion esquematica de los grupos bloqueadores en	

almidones estabilizados.

- Figura 23. Representación de las condiciones experimentales de concentración iónica total y de temperatura usadas en este trabajo para κ -carragenina 0.5% y κ -carragenina sola sin KCl en el diagrama de transición sol-gel de la sal de potasio de la κ -carragenina.
- Figura 24. Termogramas de calentamiento (a) y de enfriamiento (b) de disoluciones con 0.5% de κ -carragenina con diferentes concentraciones de KCl. Tasa de calentamiento = 1 °C/min.
- Figura 25. Variación de la temperatura (a) y de la entalpía de transición (b) con la concentración de KCl durante la fusión y la gelificación de disoluciones con 0.5% de κ -carragenina.
- Figura 26. Efecto de la concentración de ion K^+ sobre la transición sol-gel de κ -carragenina 0.5% cuando C_T es muy próxima a C^* .
- Figura 27. Transición orden-desorden de κ -carragenina cuando $C_T < C^*$. Tasa de calentamiento = 1 °C/min.
- Figura 28. Variación con la frecuencia de los módulos dinámicos a diferentes temperaturas (a) 0.5% de κ -carragenina + 40 mM KCl, (b) 1.0 % κ -carragenina sin KCl añadida.
- Figura 29. Variación del exponente del modelo ley de la potencia con la temperatura para (a) 0.5% de κ -carragenina + 40 mM de KCl y (b) 1.0% de κ -carragenina sin sal añadida.
- Figura 30. Dependencia de la $\tan \delta$ con la frecuencia y la temperatura para (a) 0.5% de κ -carragenina + 40 mM de KCl y (b) 1.0% de κ -carragenina sin sal añadida.
- Figura 31. Cinética de gelificación-fusión de 0.5% de κ -carragenina + 40 mM de KCl a 1 Hz y 10% de deformación en enfriamiento y calentamiento.
- Figura 32. Cinética de transición orden-desorden en sistemas con (a) 0.3% de κ -carragenina y (b) 0.4% de κ -carragenina sin la adición de KCl durante el enfriamiento y el calentamiento.
- Figura 33. Espectros mecánicos de sistemas con 0.3% y con 0.4% de κ -carragenina a 9 °C, con 60 y 50% de deformación respectivamente.
- Figura 34. Diagrama de transición sol-gel para κ -carragenina con y sin adición de KCl. (a) Reología: enfriamiento y calentamiento para 0.1, 0.5, 1% y regresión. microDSC: enfriamiento y calentamiento para 0.5% de polímero y regresión. (b) Datos reportados.
- Figura 35. Espectros mecánicos a 60 °C de 0.5% de κ -carragenina.
- Figura 36. Efecto de la concentración de K^+ sobre η^* de 0.5% de κ -carragenina a (a) 60 y (b) 25 °C.
- Figura 37. Efecto de la concentración de K^+ sobre el comportamiento

reologico de geles con 0.5% de κ -carragenina a 25°C.

- Figura 38. Espectro mecanico de 0.5% de κ -carragenina + 40 mM de KCl a 25 °C y 10% de deformacion. Inserto: barrido de deformacion a 1 Hz y 25 °C.
- Figura 39. Efecto de la concentracion de κ -carragenina y de KCl sobre el modulo de almacenamiento G' a 25 °C y 1 Hz: 0.1%, 0.5% y 1%.
- Figura 40. Evolucion de los modulos G' y G'' con el tiempo en 0.5% de κ -carragenina + 1 y 3 mM de KCl a 9 °C y 1 Hz.
- Figura 41. Efecto de la concentracion de K^+ sobre la evolucion de (a) G' y G'' , (b) $\tan \delta$ en 0.5% de κ -carragenina a 9 °C y 1 Hz.
- Figura 42. Efecto de la concentracion de K^+ en barridos de frecuencia de 0.5% de κ -carragenina a 9 °C en la zona de viscoelasticidad lineal. (a) G' y G'' , (b) $\tan \delta$.
- Figura 43. Viscosidad intrinseca de κ -carragenina en 0.1 N de NaCl + 0.005 M de EDTA a 25 °C.
- Figura 44. Viscosidad intrinseca de κ -carragenina a $C_T = 0.0058$ eq/L a 9 °C en presencia de K^+ .
- Figura 45. Efecto de C_T en la $[\eta]$ de κ -carragenina a 9 °C.
- Figura 46. Variacion de la viscosidad especifica (η_{sp}) con el volumen efectivo de κ -carragenina para $C_T = 0.0058$ eq/L a 9 °C.
- Figura 47. Efecto de C_T sobre la c^* en K^+ - κ -carragenina en una conformacion de dobles helices a 9 °C.
- Figura 48. Efecto de C_T en curvas maestras de K^+ - κ -carragenina a 9 °C a: $C_T =$ (a) 0.0058, (b) 0.0043 y (c) 0.0029 eq L⁻¹.
- Figura 49. Efecto de C_T en los factores de sobreposicion a_c y b_c en soluciones de K^+ - κ -carragenina a 9 °C a: $C_T =$ (a) 0.0058, (b) 0.0043 y (c) 0.0029 eq/L.
- Figura 50. Curvas de flujo de una disolucion 0.5% de κ -carragenina sin marcar y marcada a 25 °C.
- Figura 51. Microscopia confocal de barrido laser de RITC- κ -carragenina a $\lambda = 580$ nm. Efecto de la concentracion de κ -Carragenina en la formacion de una red tridimensional en presencia de 40 mM de KCl: (a) 1.0, (b) 0.5, (c) 0.25, (d) 0.10, (e) 0.05, y (f) 0.01% masa de polimero.
- Figura 52. Microscopia confocal de barrido laser de RITC- κ -carragenina en presencia de 40 mM KCl a $\lambda=580$ nm. Concentracion de κ -carragenina: (a) y (b) 0.1%, (c) 0.05% y (d) 0.01%.
- Figura 53. Microscopia confocal de barrido laser de 0.5% de κ -carragenina con diferentes concentraciones de KCl: (a) y (b) 5 mM, (c) y (d) 3 mM.
- Figura 54. Evolucion del torque durante el cocimiento de almidon a diferentes

concentraciones.

- Figura 55. Distribucion de tamaños de particula de almidon cocido a 92 °C.
- Figura 56. Fraccion volumen de pastas de almidon cocido a 92°C.
- Figura 57. Efecto de la concentracion de KCl sobre el D [v, 0.5] de almidon 4% cocido a 92 °C.
- Figura 58. Termograma de gelatinizacion de almidon de maiz ceroso modificado quimicamente.
- Figura 59. Efecto del K⁺ sobre la gelatinizacion de almidon de maiz ceroso modificado quimicamente.
- Figura 60. Cizalla estacionaria a 25 °C: (a) 3 y 4%, (b) 1 y 2 % almidon. (c) curva de flujo despues del segundo ciclo de cizalla y (d) relacion entre el esfuerzo y la velocidad de deformacion en dispersiones con 1, 2, 3 y 4% almidon.
- Figura 61. Cizalla estacionaria a 60 °C: (a) 3 y 4 % ; (b) 1 y 2 % almidon, (c) curva de flujo despues del segundo ciclo de cizalla y (d) relacion entre el esfuerzo y la velocidad de deformacion en dispersiones con 1, 2, 3 y 4% almidon.
- Figura 62. Efecto del sentido de giro sobre el flujo de suspensiones de almidon de maiz ceroso modificado quimicamente en pruebas de cizalla angular estacionaria a 25 °C: (a) 1, (b) 2, (c) 3 y (d) 4 % masa.
- Figura 63. Efecto de la geometria sobre el comportamiento reologico de almidon de maiz a 25 °C: (a) 3 y (b) 4%.
- Figura 64. Efecto de la concentracion de K⁺ sobre el comportamiento reologico de almidon de maiz modificado quimicamente a 25 °C. (a)1, (b)2, (c)3 y (d) 4% masa.
- Figura 65. Efecto de la temperatura sobre los espectros mecanicos: (a) y (d) 25; (b) y (e) 60; (c) y (f) 9 °C, de dispersiones de almidon: 4%, 3%, 2% y 1%.
- Figura 66. Imagenes de almidon de maiz ceroso modificado quimicamente nativo en (a) luz transmitida, (b) luz polarizada y (c) cocido a 92 °C en luz transmitida.
- Figura 67. Distribucion de tamaños de particula de almidon de maiz ceroso 1% sin marcaje y con FITC (12.5 mL/g).
- Figura 68. Almidon de maiz ceroso entrecruzado 1%, marcado con FITC (12.5 µL/g) (a) nativo, (b) y (c) cocido a 92 °C por 10 min.
- Figura 69. Distribucion y tamaños de particula en mezclas κ-carragenina-almidon cocidas a 92 °C. (a) Efecto de la concentracion de almidon en 0.5% de κ-carragenina. (b) Efecto de la concentracion de κ-carragenina en el D[v, 0.5] de almidon 4%.
- Figura 70. Efecto del uso de los diametros de la distribucion de tamaños de particula en el calculo de la ϕ en mezclas κ-carragenina-almidon 4%: D[v, 0.1], D[v, 0.5] y D[v, 0.9].

- Figura 71. Efecto de la concentración de KCl en: (a) el diámetro mediano y (b) la fracción volumen de mezclas almidón 4%- κ -carragenina 0.2 y 0.5%.
- Figura 72. Termogramas de mezclas con 4% de almidón y κ -carragenina: (a) 0.3%, (b) 0.4%, (c) 0.5%, (d) 0.7%, (e) 1.0% y (f) 2.0%.
- Figura 73. Termogramas de mezclas 4% de almidón-0.5% de κ -carragenina: (a) 1, (b) 3, (c) 5 y (d) 40 mM KCl.
- Figura 74. Efecto de la concentración de almidón sobre el comportamiento viscoelástico a 25 °C en sus mezclas con 0.5% de κ -carragenina. (a) G' y G'' , (b) $\tan \delta$.
- Figura 75. Barrido de frecuencia a 25 °C para un gel con 0.5% de κ -carragenina-3% de almidón-40 mM de KCl a 0.5% de deformación (a) G' y G'' , (b) $\tan \delta$.
- Figura 76. Efecto de la concentración de KCl y almidón en G' a 1 Hz y 25 °C para geles de κ -carragenina y mezclas 0.5% de κ -carragenina-KCl-almidón.
- Figura 77. Efecto de la concentración de KCl sobre los módulos dinámicos de mezclas 0.5% de κ -carragenina-2% de almidón a 60 °C. (a) Viscosidad compleja (b) G' y G'' (c) $\tan \delta$.
- Figura 78. Efecto de la concentración de KCl sobre los módulos dinámicos de mezclas 0.5% de κ -carragenina-4% de almidón a 60 °C (a) η^* , (b) G' y G'' , (c) $\tan \delta$.
- Figura 79. Efecto de la concentración de almidón sobre los módulos dinámicos de mezclas con 0.4% de κ -carragenina-almidón a 9 °C. (a) η^* , (b) G' y G'' .
- Figura 80. Microscopia confocal de barrido láser de 0.5% de κ -carragenina-1% de almidón sin KCl. (a) $\lambda = 488$, (b) $\lambda = 540$ nm, (c) colocalización de imágenes y (d) colocación de imágenes de una mezcla de almidón de maíz-FITC + dextrana-FITC
- Figura 81. Colocalización en microscopia confocal de barrido láser en mezclas de almidón- κ -carragenina.
- Figura 82. Figuras complementarias de colocalización en microscopia confocal de barrido láser en mezclas de almidón- κ -carragenina (κ C)
- Figura 83. Colocalización en microscopia confocal de barrido láser de mezclas con 1% de almidón-40 mM de KCl- κ -carragenina.
- Figura 84. Colocalización en microscopia confocal de barrido láser de mezclas con 1 % de almidón – 40 mM de KCl y 0.1% κ -carragenina

NOMENCLATURA

a	Constante de la ecuación de Mark – Houwink: $[\eta]=kM_v^a$	
a_c	Factor de sobreposición de frecuencia	
b_c	Factor vertical de sobreposición	
c	Concentración	% masa
C^*	Concentración iónica crítica	eq/ L
c_{ad}	Concentración de azul dextrana	% m/v
CC	Concentración crítica a la cual se obtiene una G'_{max}	%
$C_{polímero}$	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	μm
D_0	Diámetro mediano del almidón nativo sin cocer	μm
D_i	Diámetro de las partículas de almidón	μm
D_{max}	Diámetro máximo de las partículas de almidón	μm
$G(t)$	Módulo de relajación	Pa
G^* datos originales	Módulo complejo	Pa
G^* sobreposición	Módulo complejo en la sobreposición	Pa
G'	Módulo elástico	Pa
G'_{max}	G' máximo en enfriamiento	Pa
G''	Módulo viscoso	Pa
H	Hinchamiento	%
H_{d-o}	Entalpía desorden – orden	(J/g)
H_{fus}	Entalpía de fusión	(J/g)
H_{gel}	Entalpía de gelificación	(J/g)
H_{gelat}	Entalpía de gelatinización	(J /g)
H_{o-d}	Entalpía de transición orden – desorden	(J/g)
k	Constante de la ecuación de Mark – Houwink	
k_1	Constante de Huggins	Adimensional
k_2	Constante de Kraemer	g/dL
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
M_w	Masa molecular promedio	g/mol
PH	Poder de hinchamiento calculado como $(D/D_0)^3$	
PH _{AD}	Poder de hinchamiento determinado por el método de azul dextrana	
S	Resistencia del gel en el punto de gelificación	Pa•s ⁿ
S	Solubilidad	%
T*	Temperatura crítica en el diagrama de transición sol-gel	(°C)
tan δ	Tangente del ángulo de pérdida o desfaseamiento	
T _{d-o}	Temperatura de transición desorden – orden	(°C)
T _{final}	Temperatura final	(°C)
T _{fus}	Temperatura de fusión	(°C)
T _g	Temperatura de transición vítrea	(°C)
T _{gel}	Temperatura de gelificación	(°C)
t _{gel}	Tiempo de gelificación	(min)
T _{gelat}	Temperatura de gelatinización	(°C)
T _{ini}	Temperatura inicial (T _{onset})	(°C)
T _{max}	Temperatura máxima (T _{peak})	(°C)
T _{o-d}	Temperatura de transición orden – desorden	(°C)
	Letras griegas	
Δ	Diferencia de entalpías	
ϕ	Fracción volumen $\phi = (1 - S/100) cH$	
γ	Coeficiente de actividad promedio = 0.55	
[η]	Viscosidad intrínseca	dL/g
η	Viscosidad de cizalla rotacional	Pa•s
η^*	Viscosidad compleja	Pa•s
η_0	Viscosidad del disolvente	Pa•s
η_{rel}	Viscosidad relativa	
η_{sp}	Viscosidad específica	Pa•s
ω	Frecuencia	rad/s
$\omega_{sobreposición}$	Frecuencia angular de sobreposición	rad/s
$\omega_{datos\ originales}$	Frecuencia angular original	rad/s

RESUMEN

En la industria de alimentos los almidones se emplean comúnmente en combinación con otras macromoléculas. Entre éstas está la κ -carragenina, la cual es un polielectrolito capaz de formar redes tridimensionales debido a su sensibilidad a la presencia de iones, principalmente monovalentes.

El mecanismo de gelificación de la κ -carragenina se ve afectado tanto por la concentración iónica total como por la temperatura. Por esta razón, el objetivo principal del presente trabajo fue estudiar la relación entre la reología y la ultraestructura de sistemas formados por almidón de maíz ceroso reticulado químicamente y κ -carragenina. Para ello se hicieron pruebas reológicas, microscopia confocal de barrido láser, microcalorimetría de barrido diferencial y difracción láser (microDSC por sus siglas en inglés). Se usó almidón de maíz ceroso reticulado químicamente en concentraciones de 1 a 4% masa y κ -carragenina en concentraciones de 0.1 a 1% con 0 a 300 mM de KCl como sal promotora de su gelificación. Se trabajaron tres diferentes temperaturas con el objetivo de inducir diferentes conformaciones en la κ -carragenina: hebra aleatoria, dobles hélices sin agregación y gel.

Los resultados de microcalorimetría de barrido diferencial y microscopia confocal de barrido láser mostraron que la formación de gel de la κ -carragenina no sólo depende de la concentración iónica total, C_T , y la temperatura, sino también de la cantidad de iones K^+ presentes. Cuando estos últimos son insuficientes, coexisten en la misma solución dobles hélices agregadas en una red tridimensional y pequeñas cantidades de dobles hélices sin agregar, sin que se forme un gel completamente.

En las mezclas se observó un aumento en la rigidez de los geles por efecto de la concentración de almidón, de la κ -carragenina y del KCl. Sin embargo, para concentraciones de iones K^+ superiores a 100 mM existe una sobresaturación de la κ -carragenina con los iones, misma que se reflejó en un bajo incremento de la rigidez de los geles. La κ -carragenina se adhiere a la superficie del almidón, saturándola para una concentración de alrededor de 0.7% de κ -carragenina. Por otro lado, cuando la carragenina se encuentra en una conformación de hebra aleatoria o de doble hélice, el comportamiento reológico de la mezcla se ve afectado por la fracción volumen (ϕ) de los gránulos de almidón hinchados. Cuando $\phi < 0.4$, el comportamiento reológico está gobernado por la fase continua y cuando $\phi > 0.4$, lo está por la fase dispersa.

ABSTRACT

In the Food Industry, starches are commonly employed in combination with other macromolecules. Among these large molecules, κ -carrageenan, a polyelectrolyte able to form three-dimensional networks due to its sensitivity to ions, occupies an important place.

The total ionic concentration and temperature are the dominant factors in κ -carrageenan gelation. For such reasons, this work was aimed at finding the relationship between rheology and ultrastructure of carrageenan-crosslinked waxy corn starch mixtures. Techniques used involved rheometry, confocal laser scanning microscopy, micro differential scanning calorimetry and laser diffraction. Starch was used in concentrations of 1 to 4 wt% and κ -carrageenan in concentrations of 0.1 to 1 wt%. Carrageenan gelation was induced with KCl in the range 0 to 300 mM. Three different temperatures were examined as a way of inducing different conformations of carrageenan, i.e. random coil, double helix with and without aggregation.

MicroDSC and confocal microscopy showed that gel formation of κ -carrageenan depends not only on the total ionic concentration and temperature but also on the amount of added salt. When ion concentration was insufficient, aggregated double helices coexisted with three-dimensional networks and low quantities of non-aggregated double helices without complete gel formation.

In the mixtures, the rigidity of the gels increased as an effect of starch, carrageenan and salt concentrations. However, salt concentrations above 100 mM led to a marginal increase in rigidity suggesting ion supersaturation. Carrageenan adhered onto the surface of the starch granules when its concentration was around 0.7 %. On the other hand, when carrageenan was in a random coil or double helix state, the rheological behavior of the mixture was affected by the volume fraction of swollen starch granules. When the volume fraction was below 0.4, the rheological behavior was governed by the continuous phase, while above 0.4 the disperse phase dominated the rheological behavior.

INTRODUCCIÓN

Conjuntamente con el desarrollo de la industria de alimentos, el empleo del almidón en la misma se ha favorecido considerablemente por su capacidad de espesamiento e incremento de la viscosidad así como la de formar geles en los alimentos. El almidón presenta una gran variedad de propiedades reológicas y de textura como consecuencia de las diversas fuentes botánicas de donde es extraído. Sin embargo, en muchos casos los almidones nativos no son resistentes a los tratamientos térmicos y mecánicos a que son sometidos en los procesos de transformación. Algunas alternativas que se han implementado para salvar este inconveniente incluyen el desarrollo de variedades de almidón mejoradas genéticamente, la modificación química de los almidones y el uso combinado de los almidones con otras macromoléculas (grasas, hidrocoloides, y proteínas).

Las mezclas de almidones con otros hidrocoloides se caracterizan por presentar un efecto sinérgico, lo que significa una mejora en las propiedades de las mezclas con relación a las propiedades individuales de cada componente. Reológicamente, el efecto sinérgico se traduce en un incremento de la viscosidad de las pastas o bien de la rigidez de los geles formados por las mezclas con respecto a las propiedades reológicas y de textura de los componentes individuales. Existen diversos trabajos en la literatura sobre el comportamiento reológico de mezclas almidón – hidrocoloides, sin embargo, existe divergencia en la explicación del efecto sinérgico. Las mezclas almidón – hidrocoloide son empleadas en una amplia gama de productos alimenticios. El caso particular de la mezcla almidón - κ -carragenina es usada principalmente en el área de alimentos tipo postre de bajo contenido calórico, ya que pequeñas cantidades de estos componentes proveen la consistencia necesaria para sustituir las grasas contenidas en los mismos. Una de las complejidades de este sistema es que la κ -carragenina presenta diferentes conformaciones en solución (hebra aleatoria, doble hélice y gel), por lo que la interpretación del comportamiento reológico del mismo debe considerar aspectos como la concentración iónica total, la temperatura y el contenido de iones en el sistema.

La revisión bibliográfica se orientó, por un lado, a los trabajos relacionados con el estudio del mecanismo de transición sol – gel de la κ -carragenina, y a la influencia que algunos factores externos ejercen sobre este: temperatura, concentración del polisacárido y presencia de contraiones, así como su interacción con otros hidrocoloides. En cuanto al almidón se refiere, se presenta un panorama general sobre su estructura y

conformación, algunos de los cambios químicos a que puede ser sometido para mejorar sus propiedades, los cambios que sufre durante el proceso de gelatinización y la revisión de algunos trabajos sobresalientes sobre la interpretación del comportamiento reológico de los mismos. En este contexto, la complejidad de los sistemas con almidón, mismos que se consideran como un sistema bifásico con una fase dispersa formada por gránulos de almidón hinchados y una fase continua formada por el disolvente, produce la necesidad de recurrir a otras técnicas, como la microscopía confocal de barrido láser, la calorimetría de barrido diferencial y la difracción de rayo láser, como soporte para la comprensión del comportamiento reológico.

En el presente trabajo se observó y analizó la ultraestructura de mezclas almidón de maíz reticulado- κ -carragenina-KCl y se relacionó con el comportamiento reológico de las mismas a diferentes condiciones de temperatura y concentración iónica total para tener diferentes conformaciones del hidrocoloide. Entre los resultados más sobresalientes fue la observación de la adhesión de la κ -carragenina sobre la superficie de los gránulos de almidón, así como la posible saturación de la κ -carragenina con KCl para producir una red tridimensional.

CAPÍTULO I

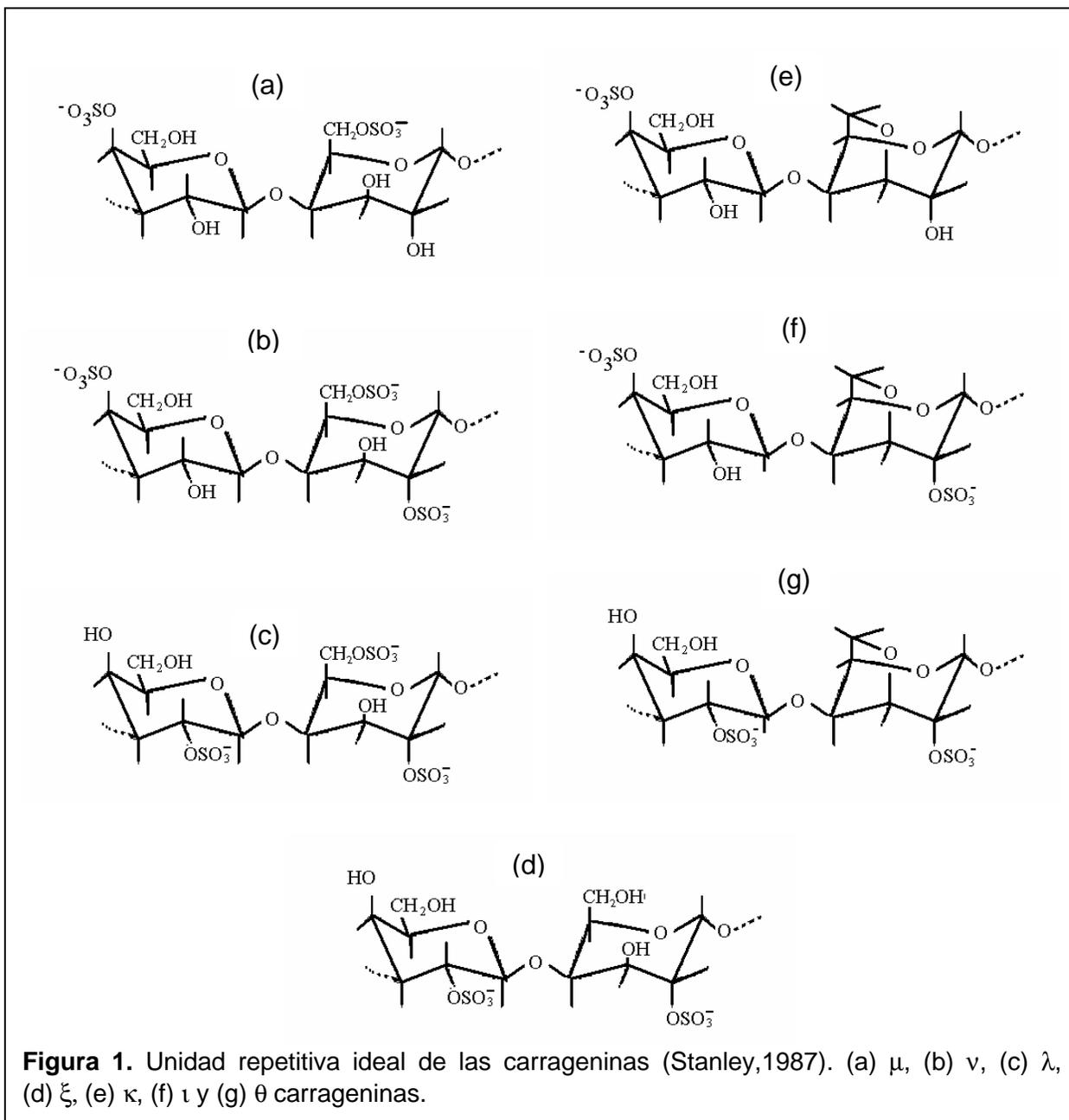
CARRAGENINA

Las carrageninas son polímeros sulfatados formadores de geles que se encuentran en las algas rojas marinas de la familia *Rhodophyceae* (Snoeren, 1976; Chen *et al.*, 2002). La principal fuente es *Chondrus crispus*, obtenida a lo largo de las costas de Norte América desde Boston hasta Halifax y las especies *Euचेuma*, obtenidas principalmente de su cultivo en aguas bajas alrededor de Filipinas (Whistler y BeMiller, 1997). Las carrageninas constituyen entre 30 y 80% de la pared celular de estas algas, y el rendimiento depende de la especie, la estación y las condiciones de crecimiento.

Estos polisacáridos están constituidos por cadenas lineales de unidades D-galactopiranosilo unidas mediante enlaces (1→3)-β-D- y (1→4)-α-D-glucosídicos alternados (Chandrasekaran, 1998), en las cuales, la mayoría de las unidades de azúcar tienen uno o dos grupos sulfato. Algunas unidades contienen un anillo 3,6-anhidro. Esto proporciona un contenido en sulfato de 15 a 40% (Fennema, 2002). Dependiendo de la cantidad y posición de los grupos $-\text{SO}_3^-$, las carrageninas se clasifican en μ , ν , λ , ξ , κ , ι y θ -carragenina (Stanley, 1987) (Figura 1). Se ha considerado que la μ y la ν -carrageninas son precursores de la κ y ι -carrageninas durante la biosíntesis de estas últimas, por lo que existen pocos estudios en la literatura sobre estas estructuras. Las propiedades químicas y funcionales de cada carragenina son diferentes debido a la presencia de los grupos sulfatados, por ejemplo, la ι y la κ -carragenina son capaces de formar geles en presencia de iones, mientras que la λ -carragenina no. Las carrageninas disponibles en el mercado se utilizan para formar una gran variedad de tipos de geles: claros o turbios, rígidos o elásticos, duros o blandos, estables al calor o termorreversibles y susceptibles o no de sufrir sinéresis (Whistler y BeMiller, 1997). Los geles de carrageninas no requieren refrigeración puesto que no funden a temperatura ambiente.

La proporción de los diferentes tipos de carrageninas depende de la especie de algas de donde fueron colectadas o sembradas. El Cuadro 1 resume el contenido de carrageninas en algunas de las especies de algas rojas. En 1984, la mayor cantidad de carrageninas se produjeron a partir de las especies *Euचेuma cottoni* y *Euचेuma spinosum* en Filipinas e Indonesia con 25 000 toneladas métricas (Stanley, 1987), lo que representó 57% de la producción mundial. La ι , λ y la κ -carrageninas son las más producidas y más importantes en la industria de alimentos, por lo que la mayoría de las

preparaciones disponibles en el comercio contienen una mezcla con diferentes proporciones de estos tres polisacáridos.



En general, las carrageninas son solubles en agua caliente (> 75 °C) y forman soluciones de alta viscosidad aun a bajas concentraciones (0.1 a 0.5%) de polisacárido. La viscosidad alcanzada es muy estable en un amplio intervalo de pH, puesto que los grupos semiéster de sulfato están siempre ionizados, incluso en condiciones de fuerte acidez, lo que proporciona a las moléculas una carga neta negativa (Whistler y BeMiller, 1997; Fennema, 2002). Debido a su carácter hidrofílico, las carrageninas son empleadas

como agentes espesantes (λ -carragenina principalmente), gelificantes (ι y κ -carragenina), estabilizantes o combinación de esas funciones, en un sinnúmero de productos alimenticios, cuyo uso se encuentra estandarizado por las cantidades necesarias de sacarosa, glucosa, sales o coadyuvantes de la gelificación, como el KCl. Entre los productos se encuentran: los congelados debido a la alta estabilidad a la congelación – descongelación, las salsas, postres y productos lácteos por su alta capacidad de interacción con las proteínas de la leche, los productos cárnicos (Whistler y BeMiller, 1997; Baeza *et al.*, 2002) y en la industria de la repostería (Reginald, 1998). Entre los atributos organolépticos que proporciona el empleo de carrageninas en alimentos se encuentran la suavidad, la cremosidad y el cuerpo de los productos que las contienen. En su uso en mezclas con almidón, permiten reducir hasta en 50% el uso de éste, derivando su empleo en postres dietéticos (Descamps *et al.*, 1986). Actualmente se realizan estudios en el área farmacéutica para emplear la κ -carragenina como vehículo para la liberación lenta de compuestos activos (Maleki *et al.*, 2005; Nerurkar *et al.*, 2005).

Cuadro 1. Composición y localización de algas rojas que contienen carrageninas (Stanley, 1987).

Especie	Localización	Tipo de carragenina
<i>Eucheuma cottoni</i>	Filipinas e Indonesia	κ
<i>Eucheuma spinosum</i>	Filipinas e Indonesia	ι
<i>Chondrus crispus</i>	Canadá, USA, Francia	λ , κ
<i>Chondrus ocellatus</i>	Corea	λ , κ
<i>Gigartina stellata</i>	Francia y España	λ , κ
<i>Gigartina acicularis</i>	Francia, España, Portugal y Marruecos	λ
<i>Gigartina pistillata</i>	Francia, España, Portugal y Marruecos	λ
<i>Gigartina canaliculata</i>	México	λ , κ
<i>Gigartina chamissoi</i>	México	λ , κ
<i>Gigartina radula</i>	Chile	λ , κ
<i>Gigartina skottsbergii</i>	Chile	λ , κ
<i>Furcellaria fastigiata</i>	Dinamarca y Canadá	λ , κ
<i>Hypnea musciformis</i>	Carolina del Norte, Brasil	κ

Dada la importancia económica de la fracción κ -carragenina, el presente trabajo se circunscribe al estudio de este polisacárido partiendo de una preparación comercial obtenida de *Eucheuma cottoni*, que está formada en su mayoría (> 98%) por esta fracción, con una mínima (< 1%) fracción de λ -carragenina (Marrs, 1986).

1.1 κ -carragenina

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) (Figura 1e). Debido a que las moléculas tienen una carga neta negativa, se le clasifica como un polielectrolito y la hace sensible a las interacciones iónicas con aniones y cationes.

1.1.1 Estructura cristalina y conformación en solución

Estructura cristalina

Con el objetivo de comprender la interacción de la κ -carragenina con diversos iones (Chandrasekaran, 1998) se han estudiado las fibras de una sal de potasio de κ -carragenina mediante difracción de rayos X. Las fibras de κ -carragenina son menos orientadas y menos cristalinas que las sales de ι -carragenina, sin embargo, al igual que la ι -carragenina, también se encuentra en una conformación de doble hélice. Como lo muestra la Figura 2, 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 la otra molécula, existe un puente de hidrógeno. En un giro entre los residuos de la molécula de galactosa anhidra existen tres puentes de hidrógeno que estabilizan la hélice (líneas punteadas en la Fig. 2). Los grupos sulfato se ubican en la periferia de la doble hélice, y son los que interactúan con otros iones.

Conformación en solución

El tipo de contraiones empleados en soluciones de κ -carragenina juega un papel muy importante en su conformación, como consecuencia de la disminución de la densidad de carga efectiva del polímero (Takemesa y 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 efecto de 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 (Harding *et al.*, 1996). En esta conformación, las cadenas son flexibles y sensibles a

la presencia de iones. Durante algún tiempo, existió la controversia sobre si la conformación helicoidal ordenada está constituida por una o dos hélices (Slootmaekers *et al.*, 1988), sin embargo observaciones con difracción de luz, mostraron que la conformación ordenada tiene el doble de la masa molecular de una hebra aleatoria, hecho que se interpreta como la adopción de una conformación de 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 \rightleftharpoons 1 doble hélice

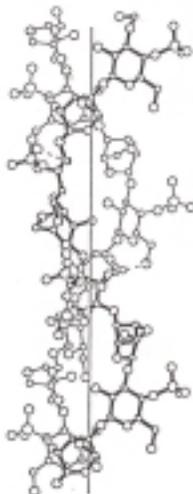
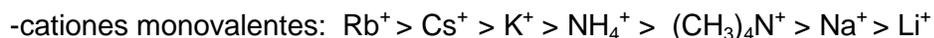


Figura 2. Estructura cristalina de la κ -carragenina (Chandrasekaran, 1998). Una molécula se representa clara y la otra obscura para diferenciarlas entre sí. Las líneas punteadas representan los puentes de hidrógeno.

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 y Nishinari, 2004). De igual manera que en otros polielectrolitos, como la gelana (Milas *et al.*, 1990) 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 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 las repulsiones electrostáticas entre éste y el sulfato de la κ -carragenina, sin que exista una agregación de las dobles hélices, precursora 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 y 1998; Meunier *et al.*, 2001; Takemesa y Nishinari, 2004), asegurando así que la transición desorden-orden es precursora de la formación de geles.

1.1.2 Transición sol–gel

Rochas (1982) propuso el diagrama de transición sol-gel para una sal de K^+ - κ -carragenina usando polarimetría y conductividad iónica durante tratamientos de calentamiento-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 (K^+) (Figura 3).

Entre los aspectos que se observan en el diagrama de transición sol - gel, se encuentra que éste es termorreversible, sin embargo, 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^* , a la cual le corresponde una temperatura crítica, T^* , ($C_T < 0.007$ eq/L, según la Figura 3), la histéresis térmica no existe.

La concentración iónica total se calcula como:

$$C_T = C_{sal} + \gamma C_{polímero} \quad (1)$$

Donde C_T es la concentración iónica total (eq/L), C_{sal} es la concentración iónica debido a la sal (contenida en el polisacárido + sal añadida) (eq/L), $C_{polímero}$ es la concentración iónica debida al polímero en solución (eq/L) y γ es el coeficiente de actividad promedio (0.55). De acuerdo con la ecuación (1) y el diagrama de transición sol – gel, T_{gel} es

afectada tanto por la concentración del polímero como de la sal total contenida en solución, obteniendo geles a bajas concentraciones de κ -carragenina con altas concentraciones de K^+ y viceversa, lo que deriva en diferentes comportamientos reológicos en ambos casos. El modelo de cálculo para C_T , propuesto por Rochas (1982), considera la temperatura de gelificación, T_{gel} , como aquella para la cual 50% del polímero se encuentra en forma de hebra aleatoria y el otro 50% en forma de hélices. El coeficiente de actividad promedio se calculó bajo la consideración de una transición de dos hebras aleatorias \rightleftharpoons una doble hélice obteniéndose un valor de $\gamma = 0.55$ (Rochas, 1982).

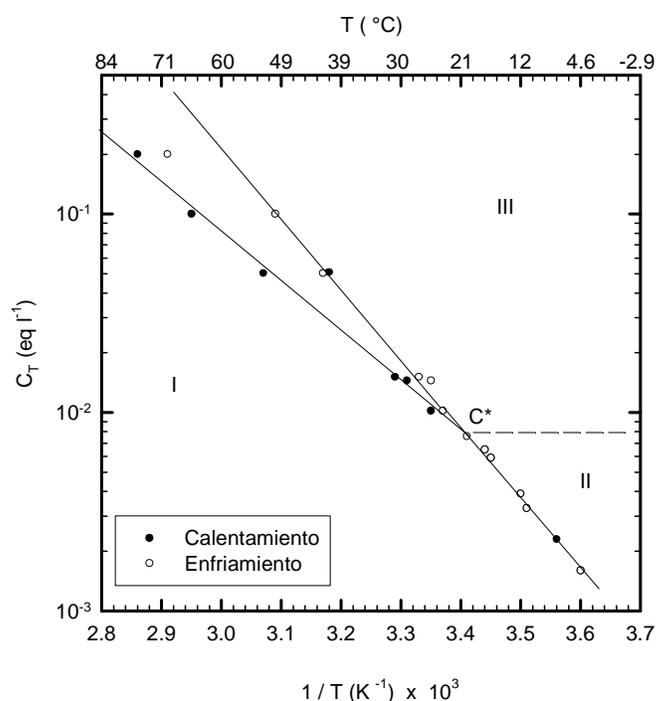


Figura 3. Diagrama de transición sol-gel de κ -carragenina en presencia de K^+ . (Rochas, 1982). El significado de C^* , I, II y III se explican en el texto. La línea punteada representa la división entre la zona I y II.

A pesar de la información reportada por Rochas, se desconoce todavía el límite entre las regiones II y III (Fig. 3). 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 dímeros helicoidales sin que exista una agregación de éstos. La temperatura es inferior a T_{gel} y C_T es inferior a C^* .
- III: Región de conformación de dímeros helicoidales agregados formando una red tridimensional, donde C_T es superior a C^* y T es inferior a T_{gel} .

De acuerdo con lo anterior, es posible mantener condiciones que favorezcan la formación de dobles hélices sin que exista agregación. Cuando las cadenas poliméricas se encuentran en esta condición, la formación de las dobles hélices no depende de la concentración de polímero (Mangione *et al.*, 2003), siempre y cuando C_T sea inferior a C^* . En este tipo de polisacáridos, la transición se caracteriza por una relación lineal entre el inverso de T_{gel} y el log C_T (Rinaudo, 2001), misma que depende de la naturaleza de cada polisacárido y de la sal añadida para promover la formación de gel, lo que permite diseñar las condiciones de uso y empleo de estos polisacáridos en aplicaciones muy específicas.

1.1.3 Mecanismo de gelificación

El mecanismo de gelificación de la κ -carragenina se reporta como un proceso dividido en etapas (Figura 4): partiendo de la existencia de una conformación de hebra aleatoria, el polímero está en solución para una concentración inferior a C^* y una temperatura superior a T_{fus} (**a** en la Figura 4) que corresponde a la región I en el diagrama de transición sol-gel (Figura 3). Una disminución de temperatura por abajo de T_{gel} para una concentración constante o un aumento de concentración a temperatura constante conducen a la formación de un dímero helicoidal (**c** en la Figura 4) que corresponde a la región II en la Figura 3. Para una temperatura dada, un aumento de la concentración iónica total por arriba de C^* , conduce a la agregación de los dímeros helicoidales (**d** en la Figura 4) y a la formación de una red tridimensional (**e** en la Figura 4) cuya formación puede también depender del tiempo (Rochas, 1982; Chen *et al.*, 2002; Takemesa y Chiba, 2001; Yoshiaki *et al.*, 2002). Esta condición corresponde a la región III en la Figura 3. Es posible pasar de esta condición a una en la cual ya no exista una red tridimensional sino una solución semidiluida de hebras aleatorias (**b** en la Figura 4), para ello hay que aumentar la temperatura o disminuir la concentración manteniéndola por arriba de C^* . Así, una posterior disminución de C_T conducirá al punto de partida (**a** en la Figura 3).

El modelo propuesto por Bayley (1955) (citado por Rochas, 1982) de la interacción entre la κ -carragenina y el K^+ , Figura 5, muestra que la parte iónica de la κ -carragenina,

constituida por el grupo $-\text{SO}_3^-$, interactúa con el K^+ a través de enlaces iónicos. Este modelo considera la interacción de una galactosa anhidra por dos de sulfato-galactosa, de tal forma que un ión K^+ interactúa con dos grupos $-\text{SO}_3^-$ simultáneamente.

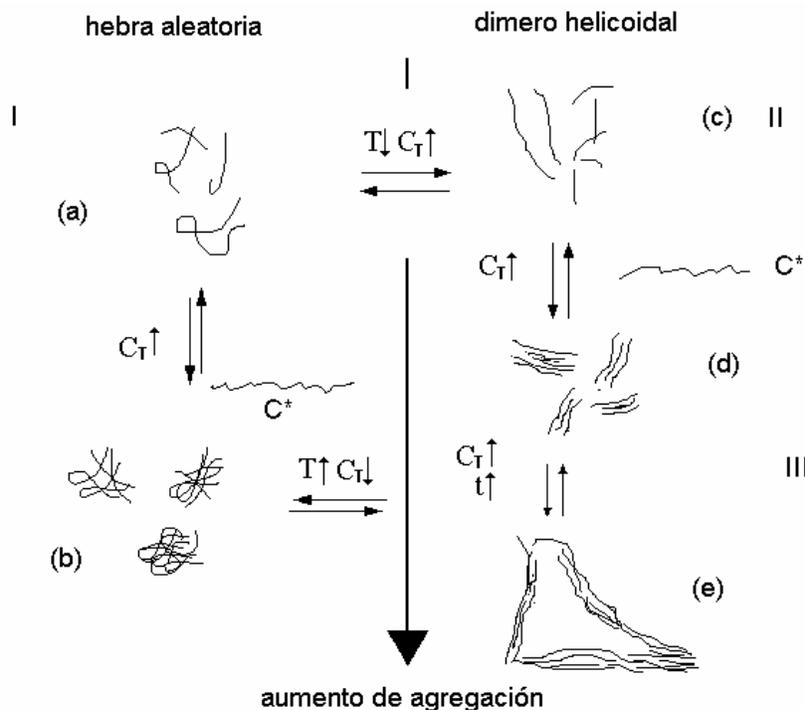


Figura 4. Modelo de gelificación de la κ -carragenina. (Rochas, 1982).

En los últimos años, el desarrollo de nuevos equipos y sistemas de medición ha permitido estudiar el mecanismo de gelificación de los biopolímeros, permitiendo conocer de mejor manera los cambios asociados con dicho fenómeno. En el caso específico de la κ -carragenina, la transición de hebra aleatoria a doble hélice produce cambios en las propiedades físicas y ópticas del sistema, lo que permite el empleo de técnicas como: Reología (Takemasa y Chiba, 2001; Chen *et al.*, 2002; Nishinari y Takahashi, 2003; Mangione *et al.*, 2003), polarimetría (Mangione *et al.*, 2003), dispersión de luz (Mangione *et al.*, 2003), transmisión de fotones (Kara *et al.*, 2003), espectrofotometría (MacArtain *et al.*, 2003), dispersión de rayos X de baja amplitud (Yuguchi *et al.*, 2002; Yuguchi *et al.*, 2003), calorimetría de barrido diferencial (Nayouf, 2003) y dispersión de rayo láser durante la deformación (Takemasa y Chiba, 2001). Todas éstas técnicas han corroborado la asociación de dos cadenas lineales de κ -carragenina para formar una doble hélice durante la gelificación, fortaleciendo el mecanismo de gelificación propuesto por Rochas (1982): la transición de hebra aleatoria a dobles hélices, siendo esta etapa

extremadamente rápida (Norton *et al.*, 1983), y la posterior agregación de las dobles hélices en pequeños dominios de agregados para conformar una red tridimensional, siguiendo el modelo del dominio (Mangione *et al.*, 2003). Con el seguimiento de la evolución del módulo de almacenamiento, G' , se ha estimado que el tiempo para la estabilización de la formación de agregados en la κ -carragenina es entre 12 (Meunier *et al.*, 2002) a 15 horas (Tecante y Doublier, 1999).

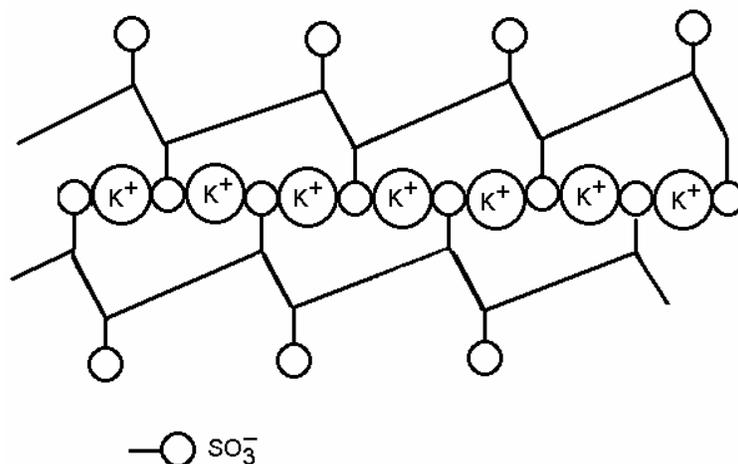


Figura 5. Representación esquemática de la interacción K^+ - κ -carragenina (Bayley, 1955, citado por Rochas, 1982).

Entre las aportaciones más relevantes al estudio del mecanismo de gelificación se encuentra la realizada por Yuguchi *et al.* (2002), quienes utilizaron la difracción de rayos X de baja amplitud en soluciones de κ -carragenina a diferentes concentraciones y temperaturas y analizaron sus resultados por modelado molecular de las dobles hélices o asociaciones entre éstas. Ellos reportaron la asociación de dos o tres dobles hélices en un arreglo lateral en una unidad trigonal, donde el dominio de los entrecruzamientos de la red se considera en una forma específica de un cilindro. Esta agregación múltiple ocurre cuando existen sales que promueven la gelificación con excepción de las sales del polisacárido con Li^+ y Na^+ (Yuguchi *et al.*, 2003). Trabajos apoyados en la microscopía electrónica de transmisión y de barrido (Borström *et al.*, 1996; Ikeda *et al.*, 2001) han mostrado que varias dobles hélices se asocian para formar la red, hasta alcanzar una concentración donde comienza a formarse la red tridimensional. Esta concentración se conoce como “concentración helicoidal supercrítica”.

1.1.4 Comportamiento reológico de soluciones de κ -carragenina

Sin duda, el interés científico en la κ -carragenina ha ido en aumento por sus nuevas aplicaciones en la industria farmacéutica. De ahí que exista un creciente interés en el estudio de las propiedades reológicas de ésta en solución, en forma de geles o en mezclas con otras macromoléculas empleadas en la industria, principalmente la de alimentos.

Al igual que otros polielectrolitos en solución, tal como la gelana (Miyoshi y Nishinari, 1999), la κ -carragenina, en conformación desordenada, exhibe una gran sensibilidad a los iones. La presencia e incremento de la concentración de éstos escuda las repulsiones electrostáticas entre las moléculas del polímero y tiende a reducir el volumen hidrodinámico ocupado por una molécula, o viscosidad intrínseca, $[\eta]$, produciendo una disminución en la viscosidad de la solución en pruebas de cizalla angular (Snoeren, 1976, Vreeman *et al.*, 1980).

Se ha documentado que la κ -carragenina no sólo interactúa con cationes. En presencia del anión I^- , las repulsiones entre las cargas negativas obligan a la κ -carragenina a formar asociaciones intermoleculares, adoptando una conformación ordenada de dobles hélices (Takemesa y Nishinari, 2004). Cuando la κ -carragenina se encuentra en altas concentraciones ($> 0.9\%$) en presencia de I^- , sus soluciones han sido denominadas “gel débil” (Chonakis *et al.*, 1996). Esta condición se caracteriza por el predominio del módulo elástico sobre el módulo viscoso con ambos dependientes de la frecuencia (Chen *et al.*, 2002). Sin embargo, pruebas reológicas complementarias de fluencia (creep) (Chonakis *et al.*, 2000) y el seguimiento de los módulos dinámicos con la temperatura (Ikeda y Nishinari, 2001) demostraron que se trata de una solución polimérica concentrada con bajas velocidades de relajación. Si bien se ha obtenido una caracterización reológica de la conformación ordenada en presencia de I^- , no se ha estudiado la conformación ordenada en presencia de K^+ , cuando C_T es inferior a C^* para T inferior a T^* .

1.1.5 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, que pueden contener una pequeña cantidad energética aunque

con un valor finito o un tiempo de vida finito. Entre las interacciones tenemos 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 no covalentes pueden estar formados por uno o más de los mecanismos listados previamente, combinados con mecanismos más específicos y complejos implicando zonas de interacción (Kavanaugh y Ross-Murphy, 1998; Morris, 1990).

La presencia de sinéresis es uno de los problemas que se ha observado durante el estudio reológico de geles de κ -carragenina (Chen *et al.*, 2002). Esta situación ha producido que diversos trabajos encontrados en la literatura reporten valores muy diversos de G' en pruebas reológicas de κ -carragenina. Por ejemplo, Hermansson *et al.* (1991) reportaron un valor de $G' = 300$ Pa en una solución 1% κ -carragenina + 25 mM KCl, mientras que Chen *et al.* (2001) reportaron $G' \approx 10000$ Pa en un gel de 1% κ -carragenina, ambos a 25 °C. Para resolver este problema, se han desarrollado diferentes geometrías de medición para evitar el deslizamiento de los geles durante las pruebas reológicas. En este contexto, Richardson y Goycoolea (1994) demostraron que un sistema de cilindros concéntricos, con el cilindro interno perforado, evita el deslizamiento de los geles. Por su parte Chen *et al.* (2002) emplearon una geometría de cono y plato sin observar sinéresis en soluciones de concentraciones mayores de 1.4% de κ -carragenina purificada.

Como es de esperarse, los contraiones juegan un papel muy importante en la gelificación de los polielectrolitos. Entre los cationes monovalentes inductores de la gelificación de la κ -carragenina se encuentran el K^+ , el Rb^+ el Cs^+ , altas concentraciones de Na^+ y el Li^+ (MacArtain *et al.*, 2003), siendo los geles de K^+ los más fuertes y más estables (Chen *et al.*, 2002). Los cationes divalentes como el Ca^{2+} y Cu^{2+} también tienen la capacidad de formar geles con κ -carragenina con el mismo nivel de rigidez que con los cationes monovalentes (Michel *et al.*, 1997). En este tipo de sistemas la relación estequiométrica es de un mol de calcio por cada sulfato de κ -carragenina (MacArtain *et al.*, 2003).

Los estudios reológicos (Chronakis *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 2002) al igual que pruebas de compresión uniaxial (MacArtain *et al.*, 2003) relacionados con el efecto de las concentraciones de cationes sobre la rigidez de los geles, muestran un incremento progresivo de los módulos con el aumento de la concentración de sal. El incremento de la rigidez de los geles tiene su base en la neutralización de las cargas electrostáticas de las

cadena de κ -carragenina favoreciendo la asociación de éstas. Sin embargo, también existe el efecto inverso cuando hay una concentración elevada de iones, como el caso del Ca^{2+} (Lai *et al.*, 2000). Esta disminución se atribuye a que el Ca^{2+} induce un gran incremento en el número de ramificaciones formadas por los agregados durante la gelificación de κ -carragenina, provocando una agregación extensa y la formación de precipitados, lo cual explicaría la disminución de los módulos al incrementar la concentración del ión existente en el medio (MacArtain *et al.*, 2003).

En forma general, los estudios reológicos de κ -carragenina se han realizado con altas concentraciones de polisacárido (0.5 a 2%) y concentraciones de K^+ que aseguran la formación de un gel (> 10 mM KCl). Sin embargo, estudios reológicos de κ -carragenina en concentraciones moderadas (0.7 a 1.4%) en ausencia de iones mostraron que ésta puede formar “geles débiles” cuya rigidez depende de la temperatura (Figura 6). Pese a que estos geles fueron incapaces de mantener su forma física por sí mismos (Chen *et al.*, 2002) fueron capaces de recuperar su estructura cuando fueron reenfriados. En estas condiciones, si bien $G' > G''$, ambos módulos dependen de la frecuencia. De este modo, observamos que el término “gel débil” se emplea en diversos sistemas invariablemente cuando $G' > G''$, sin hacer o incluir pruebas complementarias para definir este tipo de geles, como el análisis de la dependencia del ángulo de fase con la frecuencia, por ejemplo.

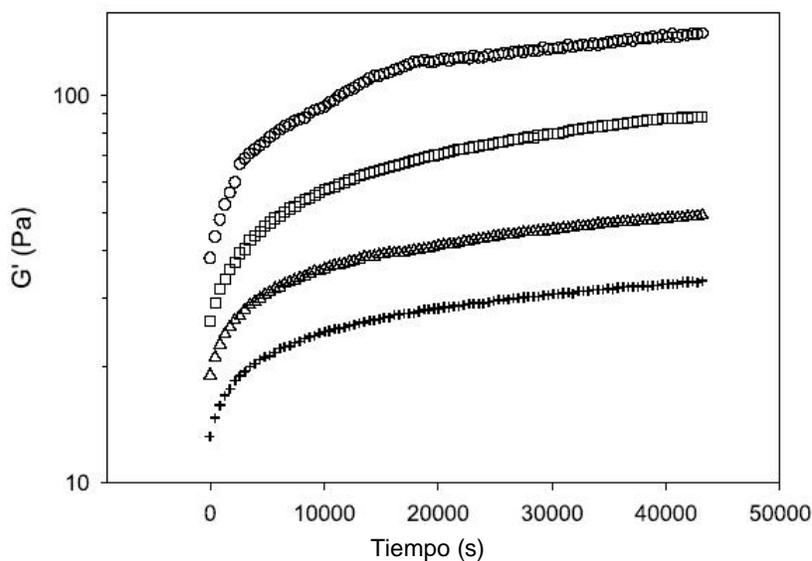


Figura 6. Evolución del módulo G' de K^+ - κ -carragenina 1% purificada (Chen *et al.*, 2002). + 20, Δ 15, \square 10, \circ 5 °C.

1.1.6 Comportamiento reológico de la κ -carragenina con otros polisacáridos

En general, los polisacáridos no se emplean en forma aislada en la industria porque las mezclas de éstos amplían la gama de posibilidades para obtener diferentes propiedades reológicas y de textura, mejorando las propiedades de los sistemas. Algunas mezclas binarias de hidrocoloides gelificantes proporcionan geles más resistentes que los polímeros individuales o producen geles con la misma resistencia a concentraciones totales menores, con una obvia ventaja económica, lo que conduce a un mayor interés en el estudio de las mezclas κ -carragenina–polisacárido/proteína, que en los sistemas formados por κ -carragenina únicamente.

Las mezclas más simples son las de dos componentes donde uno de ellos puede ser un agente gelificante, como la κ -carragenina, y el otro un agente no gelificante. Estos sistemas producen geles más resistentes con una disminución de la sinéresis y la fragilidad. En este contexto, diversos estudios reológicos en pruebas de cizalla oscilatoria han mostrado el incremento del módulo de almacenamiento, G' , debido a la presencia de galactomananos, como el algarrobo (Standing y Hermansson, 1993; Lundin y Hermanson, 1997; Dunstan *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2001), o bien un incremento en el esfuerzo máximo de ruptura de los geles (Dunstan *et al.*, 2001). Otras mezclas estudiadas son κ -carragenina-guar (Damasio *et al.*, 1990) y κ -carragenina–mucílago de nopal (Medina-Torres *et al.*, 2003). Sin embargo, este fenómeno sólo ocurre en condiciones muy específicas. El examen de la viscoelasticidad realizado por Standing y Hermansson (1993) con diversas sales de κ -carragenina y la sustitución de la misma por guar, en una concentración total de polímero de 1%, mostraron que las sales de Na^+ y la de Ca^{2+} no producen ningún efecto sinérgico, mientras que las sales de K^+ - κ -carragenina sólo producen un efecto sinérgico para concentraciones inferiores de 100 mM KCl. Sin embargo, las mezclas con 1% κ -carragenina en forma de Na^+ - κ -carragenina produjeron un incremento en G' de quince veces su valor en presencia 0.5% de algarrobo con 0.25 M NaCl, y de diez veces en una sal de Ca^{2+} con 0.3% algarrobo y 30 mM CaCl_2 (Lundin y Hermansson, 1997). Chen *et al.* (2001), a partir de pruebas de compresión y deformación, sugirieron un efecto más de “interacción” que sinérgico cuando se trata de sales de Ca^{2+} - κ -carragenina.

El efecto sinérgico entre la κ -carragenina y el algarrobo se puede revertir cuando se usan concentraciones elevadas de los galactomananos produciendo una disminución de la rigidez a partir de ciertas concentraciones o proporciones entre los polisacáridos que

forman la mezcla. Dunstan *et al.* 2001, mantuvieron una concentración total de polímero constante (1%) y sustituyendo gradualmente la κ -carragenina por algarrobo, encontraron un máximo en el esfuerzo de ruptura en pruebas de compresión para una relación 30/70 y 40/60 de algarrobo/ κ -carragenina. Damasio *et al.* (1990) encontraron un esfuerzo máximo de ruptura de 13 N en pruebas de penetración de geles de 0.5 y 0.75% κ -carragenina con una sustitución de 60% por algarrobo y una mezcla de éste con guar. Medina-Torres *et al.* (2003) mostraron un efecto sinérgico con mucílago de nopal mediante pruebas de textura. Ellos utilizaron un total de 2 % de concentración de biopolímeros y encontraron un esfuerzo máximo de ruptura en geles de 50 kPa para una relación mucílago/ κ -carragenina de 80/20 y con 120 mM KCl.

Pese a los estudios realizados en estas mezclas, no existe un criterio general para explicar la sinergia desde un punto de vista fisicoquímico. Una de las explicaciones se basa en la presencia del efecto de exclusión de volumen entre los polisacáridos que provoca un incremento de la concentración efectiva de los hidrocoloides, así como de las interacciones electrostáticas entre ambos polímeros en solución. Otra explicación se basa en la existencia de interacciones de atracción entre los componentes que dirigen el acoplamiento en la red y que provoca un efecto sinérgico debido a la asociación del algarrobo con las dobles hélices estabilizando las “varillas” rígidas de la κ -carragenina en presencia de Na^+ y Ca^{2+} (Lundin y Hermansson, 1997). En una mezcla de algarrobo- λ -carragenina (Camacho *et al.*, 2005), la presencia del primero produjo una mayor viscosidad intrínseca de la λ -carragenina en las mezclas, sin embargo en altas proporciones de algarrobo se produjo un antagonismo entre los polisacáridos, lo que se reflejó en una disminución de la viscosidad intrínseca. Sin lugar a dudas, un factor importante en la sinergia entre las macromoléculas es la presencia de los grupos sulfato en la κ -carragenina, la sal iónica de la κ -carragenina (K^+ , Na^+ o Ca^{2+}), la relación de galactomananos cuando estos están presentes, la presencia de iones externos al sistema, la temperatura, el aporte iónico del otro polisacárido, la capacidad de absorción de agua y el tamaño de las moléculas.

Otro tipo de mezcla es la de la κ -carragenina con otro agente gelificante. La mezcla de κ -carragenina con alginato mejoró la estructura de películas formadas con una proporción alginato- κ -carragenina de 6 a 4, respectivamente, generando intersticios más pequeños que a su vez mejoraron las propiedades mecánicas y la estabilidad de la red (Roh y Shin, 2006). En este tipo de sistemas el efecto sinérgico se ha atribuido a la interpenetración entre ambos polisacáridos, como es el caso de la mezcla agarosa- gelana (Amici *et al.*,

2001), en la cual la arquitectura de un biopolímero pasa a través de la del otro en una escala de distancia comparable con su tamaño intersticial, produciendo un reforzamiento de la red tridimensional, lo que se refleja en valores de G' mayores que los de sus componentes individuales.

También es posible la incompatibilidad de la κ -carragenina con otros polisacáridos. En este contexto, Lai *et al.* (1999) estudiaron el efecto de la incorporación de κ -carragenina al almidón, durante su proceso de cocción y gelificación, a través de sus propiedades reológicas así como el grado de gelatinización, hinchamiento y solubilidad de los gránulos de almidón. Estos autores concluyeron que el tipo de interacción entre la κ -carragenina y el almidón está gobernado por el efecto de exclusión de los gránulos hinchados y una incompatibilidad en la matriz formada por el gel debido a interacciones de acoplamiento entre la κ -carragenina y la parte soluble del almidón: amilosa. En una mezcla de Ca^{2+} - κ -carragenina con almidón de alto contenido de amilosa (70%) encontraron que a bajas concentraciones de κ -carragenina (0.3%) el módulo G' aumenta debido a la presencia del amilosa, sin embargo con altas concentraciones de κ -carragenina (1%) no se presentó ningún cambio en las propiedades reológicas, lo que mostró que a altas concentraciones de κ -carragenina, ésta predominó sobre el almidón y determinó el comportamiento reológico. Estos resultados son congruentes con los obtenidos por Tecante y Doublier (2002), quienes mediante la medición del cambio de la turbidez y G' con el tiempo durante la gelificación del amilosa y κ -carragenina, encontraron la existencia de una inversión de fases entre ambos polisacáridos, la cual depende de la relación entre estos biopolímeros: para concentraciones inferiores de 0.3% de κ -carragenina, el amilosa forma la fase continua y la carragenina la fase dispersa. Para concentraciones superiores de 0.5% de carragenina, la fase continuas estuvo constituida por κ -carragenina y la fase dispersa por el amilosa. La κ -carragenina siempre se encontró en forma de solución macromolecular cuando no se adicionó KCl, y en forma de red tridimensional cuando se incorporó K^+ .

1.1.7 Microestructura de la κ -carragenina

La mayoría de los productos alimenticios son mezclas de varios componentes. Por lo tanto, la observación microscópica del arreglo estructural de los elementos nos ayuda a comprender las posibles interacciones entre ellos. Entre las diversas técnicas para observar sistemas alimenticios, el principal problema es la preparación de las muestras (Heertje y Pâkes, 1995). En la microscopia de barrido electrónico (SEM por sus siglas en

inglés), existen métodos químicos y físicos para preparar las muestras. Los métodos químicos se emplean para deshidratar y solidificar muestras líquidas o semilíquidas mediante el empleo de agentes químicos que pueden inducir cambios en las estructuras de las mismas. Los métodos físicos consisten en solidificar las muestras mediante congelación y siempre existe la posibilidad de formación de pequeños cristales que puedan romper su estructura.

Entre las nuevas técnicas de la microscopia se encuentra la microscopia de fuerza atómica (AFM por sus siglas en inglés). La AFM se ha empleado para estudiar moléculas individuales y sus interacciones, particularmente polisacáridos de estructuras complejas. Entre ellos, se ha incluido el estudio del efecto de las sales promotoras de la gelificación de κ -carragenina (Ikeda *et al.*, 2001). Las imágenes para una concentración iónica suficiente para la gelificación de la κ -carragenina, (100 mg/mL de κ -carragenina en 100 mM de KCl), muestran la existencia de hélices agregadas en forma de redes locales que pueden estar compuestas de filamentos tenues con cierto grado de ramificación y agregaciones lado a lado de las hélices (Figura 7a), o bien por un manojo denso de hélices agregadas, conocida como “concentración helicoidal supercrítica”. Estos agregados no muestran un patrón de orientación de las hélices como las hélices formadas por dilución en solución caliente a 85 °C (Figura 7b), donde las fibras no sólo se orientan, sino que se entrecruzan una sobre otra y muestran un patrón similar a las hélices formadas en una solución con NaI. A partir de sus observaciones, Ikeda *et al.* (2001) sugirieron que la κ -carragenina en presencia de NaI puede formar redes locales sin una agregación lado a lado de hélices, sin embargo esta red no se forma sólidamente ni es tan rígida como una formada en presencia de sales agregadas.

Como se citó previamente, la κ -carragenina tiene la capacidad de formar una red tridimensional en presencia de iones monovalentes y divalentes. Sin embargo, al analizar la conformación estructural de ésta en presencia de dos cationes diferentes, K^+ y Ca^{2+} , se ha observado que la estructura de la red es diferente. La Figura 8a muestra la imagen de κ -carragenina en presencia de 10 mM KCl (Dunstan *et al.*, 2001) y la Figura 8b es la imagen de κ -carragenina en presencia de Ca^{2+} en una relación molar estequiométrica de un calcio por un sulfato de κ -carragenina (MacArtain *et al.*, 2003). En ambas imágenes la concentración de polisacárido es 1% y se obtuvieron por SEM. La imagen con K^+ muestra una estructura densa, semejante al corte transversal de varias estructuras tubulares en el gel, con un diámetro característico de los espacios entre 10 y 20 μm de diámetro. La red con Ca^{2+} es fina con filamentos delgados de κ -carragenina unidos entre sí para formar

una red continua. Las imágenes ayudan a comprender que los geles formados con el K^+ son más fuertes al poseer estructuras más densas y continuas que los formados con Ca^{2+} .

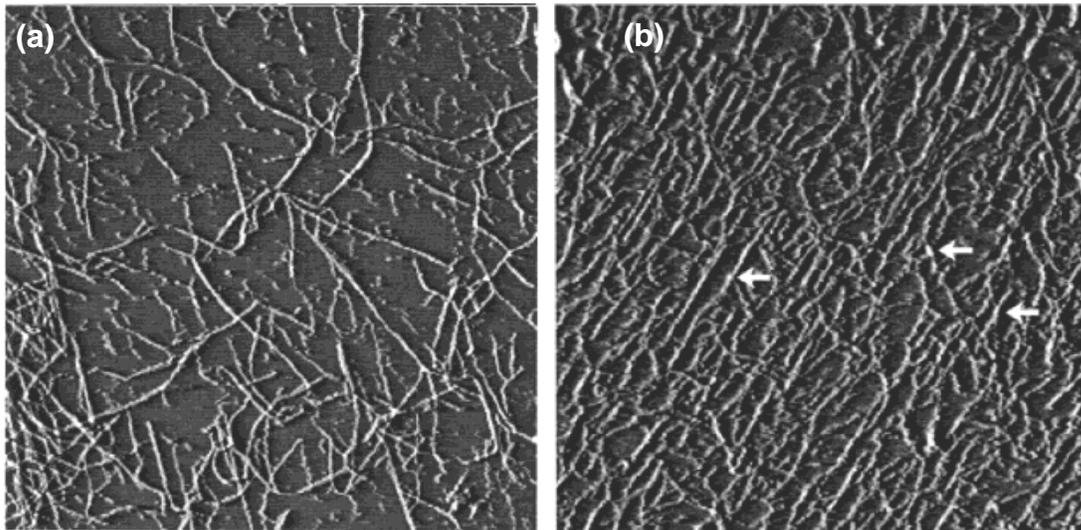


Figura 7. Imagen de (a) una red local de hélices de κ -carragenina en KCl, (b) hélices de κ -carragenina formadas en dilución con KCl a 85 °C. Las flechas indican los puntos de ramificación de las hélices. El tamaño de las imágenes es 2 μ m x 2 μ m (Ikeda *et al.*, 2001).

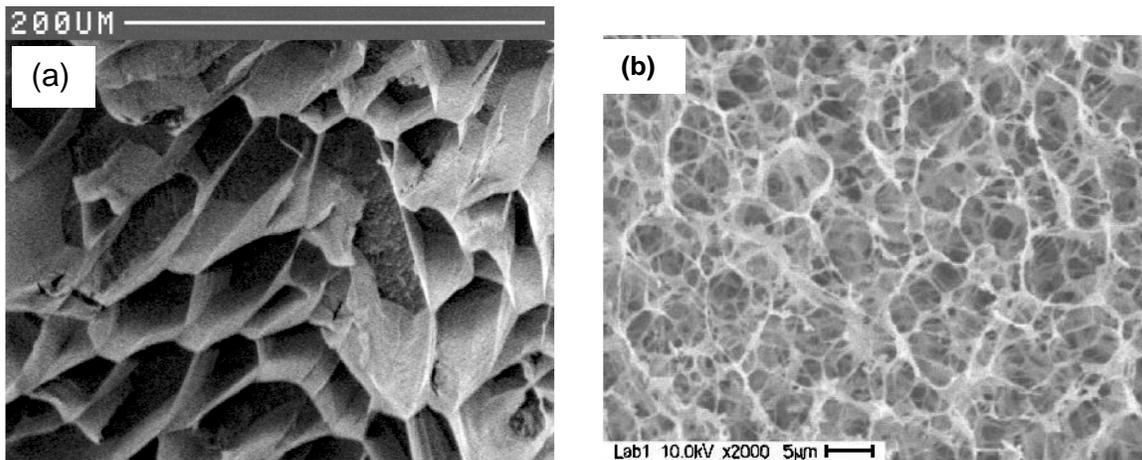


Figura 8. Imágenes de SEM de redes de κ -carragenina 1%. (a) con 10 mM KCl (Dunstan *et al.*, 2001), (b) con Ca^{2+} en una proporción 1:1 (MacArtain *et al.*, 2003).

La estructura macromolecular de κ -carragenina–algarrobo observada con SEM muestra la saturación de los canales de la red de κ -carragenina con el algarrobo, haciéndola visiblemente más densa y saturada. Conforme el algarrobo sustituye a la κ -carragenina, el diámetro de las estructuras disminuye considerablemente, e incluso forma algunas imperfecciones en la red, lo que se manifestó en la formación de geles más débiles (Figura 9a) (Dunstan *et al.*, 2001).

Roh y Shin (2006) emplearon SEM para observar la estructura de las mezclas y para analizar la sustitución de alginato por κ -carragenina así como el efecto de dos agentes para entrecruzar los polisacáridos. Las imágenes muestran que la asociación entre ambos polisacáridos es a nivel de interpenetración entre ambas estructuras (Figura 9b). Contrario a lo sucedido con el algarrobo, la sustitución del alginato por κ -carragenina produjo una estructura con tamaños de poro más pequeños en relación con la red de alginato solo, lo que se reflejó en una mejora de las propiedades mecánicas de la red. Un comportamiento similar se observa en mezclas alginato–gelana, donde la interpenetración existe y el comportamiento reológico está regido por el polisacárido en mayor concentración (Amici *et al.*, 2001).

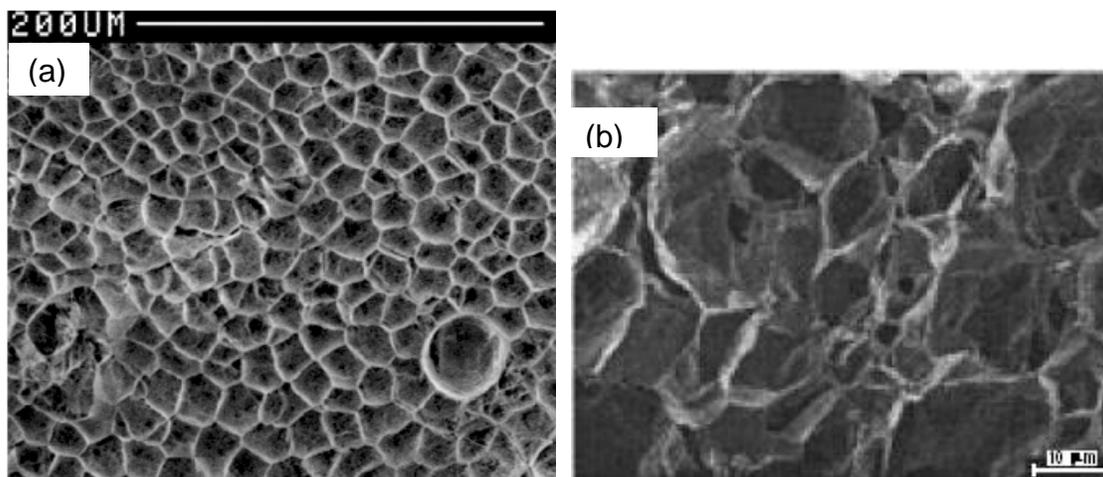


Figura 9. Imágenes de SEM de redes de κ -carragenina con: (a) algarrobo (4:6) en presencia de 10 mM KCl (Dunstan *et al.*, 2001); (b) alginato (4:6) con entrecruzamientos de CaCl_2 (Roh y Shin, 2006)

1.1.8 Medición de temperaturas de transición sol – gel con métodos reológicos

La temperatura de gelificación, T_{gel} , se puede determinar a partir de datos reológicos por varios procedimientos. Dos de ellos surgieron a partir del trabajo de Winter y Chambon (1986) y Chambon y Winter (1987) con geles químicos. Ellos encontraron que en el punto de gelificación G'' y G' fueron proporcionales a ω^n sobre un amplio intervalo de temperaturas y frecuencias. Ellos también demostraron que $G(t) = St^{-n}$, donde $G(t)$ es el módulo de relajación, t es el tiempo, S la resistencia del gel (definida como la oposición de un material al flujo plástico o a la fractura), y n el exponente de relajación. Esto implica que en el punto de gelificación el ángulo de fase entre el esfuerzo y la deformación, δ , es independiente de la frecuencia y proporcional a n , por ejemplo $\delta = n\pi/2$. Inicialmente, ellos

encontraron que $n = 0.5$ para geles de polidimetilsiloxano entrecruzado en condiciones estequiométricas. Sin embargo n varía de 0.19 a 0.92 para polímeros de polidimetilsiloxano preparado con varias relaciones estequiométricas, longitudes de cadena y concentraciones (Scanlan y Winter, 1991). El exponente n presenta variación para cada sistema: de 0.62 a 0.69 en geles de proteína de trigo (Labropoulos y Hsu, 1996), 0.13 en geles de proteína de soya (Hsu, 1999) y 0.56 para geles de huevo (Cordobés *et al.*, 2004). El análisis de Winter también se ha empleado para estudiar geles de polisacáridos cerca del punto de gelificación (Nishinari, 1997). En este tipo de sistema, el exponente, n , cambia de 0.18 a 0.21 y de 0.17 a 0.24 en la transición sol gel de ι -carragenina con y sin la presencia de ión K^+ (Hossain *et al.*, 2001) y es de 0.5 para geles de almidón (Hsu *et al.*, 2000). Así, el valor de n depende en gran medida del biopolímero en particular así como de la condición del medio acuoso.

En nuestro caso, el punto de gelificación, T_{gel} , se puede determinar cuando el ángulo de fase es independiente de la frecuencia (Chambon y Winter, 1987). Este tratamiento, en lo sucesivo llamado el procedimiento de ángulo de fase crítico, se ha utilizado en las condiciones críticas, por ejemplo, tiempo, temperatura y concentración del polímero durante la gelificación o fusión de ι -carragenina, mezclas xantana – algarrobo, gelatina Ca^{2+} – pectina (Doublier y Cuvelier, 1996). La dependencia de la ley de la potencia de G'' y G' con la frecuencias y el ángulo de fase crítico se originaron con el mismo principio, sin embargo la manipulación de los datos reológicos es diferente. Esta diferencia en el tratamiento de los datos ha permitido a diferentes autores determinar el valor de n para un sistema dado. Por ejemplo en geles de gelatina, Michon *et al.* (1993) determinaron primero el tiempo de gelificación y el exponente, n , a través de la independencia de $\tan \delta$ con la frecuencia y lo compararon con el valor determinado a partir de los barridos de frecuencia a diferentes tiempos de curado del gel cercanos al punto de gelificación, tal y como originalmente lo reportaron Winter y Chambon (1986). Por otro lado, Ross-Murphy (1991) describió cuatro procedimientos para establecer el tiempo de gelificación, mismos que son: (1) cuando la viscosidad tiende a ser infinita en una prueba de cizalla estacionaria, (2) cuando G' diverge del “ruido característico de la señal”, (3) cuando G'' muestra un máximo y (4) cuando $G' = G''$ ($\tan \delta = 1.0$) durante la evolución de ambos módulos en un experimento de curado de gel. El primer experimento es excluido porque es irrealizable en la práctica y solamente los otros tres parecen factibles.

La pregunta es si los procedimientos previamente citados se pueden aplicar a la κ -carragenina para estudiar el efecto de la concentración del polímero y del contra ión en la temperatura de transición sol –gel en la κ -carragenina.

1.2 Discusión

Los estudios de la estructura cristalina de la κ -carragenina muestran una conformación helicoidal en estado sólido. Sin embargo, una vez disuelta puede llegar a formar geles. El proceso de gelificación consta principalmente de dos etapas:

- i) 2 hebras aleatorias \rightleftharpoons 1 doble hélice;
- ii) Agregación de dobles hélices.

Debido a que la κ -carragenina es un polielectrolito, puede interactuar con iones monovalentes y divalentes. Un caso muy particular lo constituye su interacción con iones que inducen la transición de hebra aleatoria a dobles hélices sin formar agregados.

Desde 1982 se propuso el diagrama de transición sol–gel (DTSG) para la sal de potasio. De acuerdo con dicho diagrama, la κ -carragenina puede adoptar diversas conformaciones mismas que dependen de la concentración iónica total y la temperatura. Sin embargo, pese a la existencia de diversos reportes en la literatura sobre el estudio de dicha transición y de su mecanismo de gelificación, son muy pocas las referencias cuyas conclusiones están apoyadas por el DTSG. Una de las aportaciones más importantes establece la formación de la doble hélice como una etapa extremadamente rápida y su posterior agregación en pequeños dominios, cuya estabilización toma entre 12 y 15 horas, así como la asociación de 2 o 3 dobles hélices en un arreglo lateral inmerso en una unidad trigonal (Yuguchi *et al.*, 2002). En el mecanismo de gelificación, se ha observado la asociación de varias dobles hélices para formar la red para una “concentración helicoidal supercrítica” (Ikeda *et al.*, 2001).

Los iones pueden tener distintos efectos sobre las propiedades reológicas de la κ -carragenina aunque los efectos dependen a su vez de la conformación del hidrocólide. Por ejemplo, en conformación desordenada los contraiones disminuyen el volumen hidrodinámico de la macromolécula, mientras que cuando hay agregación, los iones incrementan la rigidez de los geles. Sin embargo, un exceso puede conducir a la disminución de G' por la extensa formación de agregados así como a la precipitación. En presencia de aniones, en particular de yoduro (I^-), la κ -carragenina puede formar dobles hélices que no se agregan y que han sido descritas como “geles débiles” porque $G' > G''$,

no obstante son incapaces de mantener su forma por sí mismos. En esta condición se tiene más bien una solución polimérica concentrada con bajas velocidades de relajación. De hecho el término “gel débil” se emplea en diversos sistemas invariablemente cuando $G' > G''$ sin incluir pruebas complementarias para definir este tipo de geles. De acuerdo con el DTSG, existe una pequeña zona donde hay una conformación ordenada sin agregación de dobles hélices cuyas características reológicas y estructurales no han sido aún estudiadas o documentadas en la literatura.

Las mezclas de κ -carragenina con otros biopolímeros muestran un efecto sinérgico en sus propiedades reológicas que depende de la presencia de los grupos sulfato, la relación de galactomananos, cuando se mezcla con guar o algarrobo, la presencia de iones externos, la temperatura, el aporte iónico del otro polisacárido, la capacidad de absorción de agua y el tamaño de las macromoléculas involucradas en las mezclas. Hasta la fecha, no existe un criterio general para explicar la sinergia desde un punto de vista fisicoquímico. Inclusive, la interacción con otras moléculas formadoras de geles, tiene una cinética de interacción diferente. Por ejemplo, con el alginato, existe una interpenetración entre ambos polisacáridos, en el cual la arquitectura de un biopolímero pasa a través de la del otro reforzando la red tridimensional y reflejándose en valores de G' mayores que los de sus componente individuales.

Una de las mejores herramientas que ayudan a comprender el comportamiento reológico de los polisacáridos, y de los materiales en general, es la microscopia. Existen diversas técnicas como la SEM y la AFM que permiten la observación de las microestructuras de los materiales. Algunas otras, como la microscopia confocal de barrido láser (CLSM por sus siglas en inglés) que permiten la observación de la ultraestructura de los materiales, definida esta última como la observación de la estructura de los materiales en una escala menor a un micrómetro. Con AFM se ha mostrado la formación de redes locales constituidas por filamentos tenues con cierto grado de ramificación y agregación lateral de las hélices por enfriamiento rápido mientras que en un enfriamiento lento se obtienen filamentos alineados y ordenados (Ikeda *et al.*, 2001). La SEM de κ -carragenina en presencia de un ion monovalente y otro divalente ha mostrado que la estructura de la red formada es muy diferente. La red que se forma en presencia de K^+ es más cerrada y compacta que la formada en presencia de Ca^{2+} que es de poros más abiertos. Esto puede ayudar a explicar desde el punto de vista físico, por qué los geles en presencia de K^+ son más rígidos, aunque no el aspecto fisicoquímico.

CAPÍTULO II

ALMIDÓN

2.1 Aspectos generales

El almidón es el mayor componente de la reserva alimenticia de las plantas y provee entre 70 y 80% de las calorías consumidas por los humanos. El almidón, sus derivados y la sacarosa constituyen los carbohidratos más digeribles de la dieta humana (Whistler y BeMiller, 1997).

El almidón espesa a una gran diversidad de alimentos preparados, tales como sopas, bebidas, salsas, alimentos procesados, entre otros. Presenta una gran variedad de propiedades reológicas y de textura como consecuencia de las diversas fuentes botánicas de donde es extraído, así como de las modificaciones químicas a que es sometido. Otros factores que pueden tener influencia durante su procesamiento, son la presencia de componentes como grasas, azúcares, hidrocoloides, proteínas y las condiciones del tratamiento térmico y mecánico a que son sometidos, por ejemplo, la temperatura superior a la de cocción, condiciones de deformación y velocidad de calentamiento.

En forma natural, es un polisacárido que se encuentra en plantas verdes donde se acumula en partículas discretas conocidas como *gránulos*. Los gránulos de almidón son sintetizados en una matriz amplia de tejido vegetal que varía con las especies de las plantas. El tamaño del gránulo varía de 0.5 a 175 μm de diámetro y puede presentar diversas formas geométricas como esferas, lentejas o tubos irregulares. La distribución de su tamaño puede ser mono o bimodal. Los gránulos pueden encontrarse en forma individual o bien asociados en forma de bloques y su agregación puede variar de acuerdo con su composición química, principalmente lípidos, humedad, proteínas y sales. Los gránulos de almidón pueden estar localizados en la semilla (granos de cereal), en raíces y el tubérculos (yuca y papa), en el tallo (sago) y en la fruta de las plantas (plátano).

La biosíntesis del almidón es un proceso complejo. Ésta ocurre a nivel de los amiloplastos, que son los organelos intracelulares responsables de la biosíntesis de las macromoléculas componentes del almidón a partir de glucosa, proveyendo los residuos de glucosa en la síntesis de amilosa y amilopectina. Durante la síntesis de almidón existen dos grupos primarios de enzimas que participan en el proceso: las amilo-sintetasas y las amilo-ramificadoras, ambos grupos con múltiples isoformas (Smith, 2001). Los dos grupos enzimáticos actúan cooperativamente en la adición de unidades de glucosa hacia las terminales no reductoras de las moléculas de amilosa y amilopectina

(Gérard *et al.*, 2001). Las amilo-sintetasas son las enzimas responsables de la síntesis del amilosa y las amilo-ramificadoras son las responsable de la síntesis del amilopectina (Tester *et al.*, 2004).

En los tubérculos, el almidón es sintetizado a partir de la sacarosa proveniente de los organelos donde ésta se produce durante la fotosíntesis. La Figura 10 muestra la ruta básica de la síntesis de ADP-glucosa a partir de la sacarosa. A pesar de que el metabolismo inicial de la sacarosa ocurre en el citosol, la síntesis del almidón ocurre exclusivamente en el amiloplasto (representado por el cuadro de línea gruesa en la Figura 10). En acuerdo con la figura, la sacarosa se convierte en glucosa 6-fosfato, o quizá en glucosa 1-fosfato, en el citosol y entra al amiloplasto vía un transportador. Una vez en los amiloplastos, la glucosa 6-fosfato se convierte en glucosa 1-fosfato y entonces, vía la enzima ADP-glucosa pirofosforilasa al azúcar ADP-glucosa nucleótido. La ruta de la síntesis de ADP-glucosa en el endospermo de granos de cereal, es diferente debido a que el ADP-glucosa se produce principalmente en el citosol, por acción de una isoforma de ADP-glucosa pirofosforilasa, y el ADP-glucosa entra al amiloplasto via un transportador (representado por la línea punteada en la Figura 10). La razón por la que los cereales y las hierbas han desarrollado una ruta diferente para la síntesis de ADP-glucosa aún es tema de especulación. La ADP-glucosa es el substrato para las amilo-sintetasas y las amilo-ramificadoras (Smith, 2001). A pesar de las investigaciones realizadas, no existe un modelo aceptable que explique las interacciones de todas las enzimas para producir el amilosa y el amilopectina, sin embargo, una teoría bastante aceptada, es que la síntesis del amilopectina forma la matriz semicristalina de los gránulos en un proceso físico, implicando la existencia de interacciones complejas entre procesos biológicos y físicos en la superficie de los gránulos desarrollados (Smith, 2001).

A pesar de que la naturaleza provee una gran variedad de dimensiones y distribuciones en el tamaño de los gránulos de almidón, la existencia de materiales transgénicos hace que la variación de los tamaños y las características de los gránulos de almidón sean más extensas. Por otro lado, los almidones pueden ser modificados por métodos químicos, enzimáticos o físicos, para conferirles nuevas características. La estructura del almidón puede ser descrita en términos de las propiedades fisicoquímicas de sus constituyentes moleculares, de la variación en su composición, de las interacciones a nivel molecular y a nivel macroscópico entre los gránulos por sí mismos.

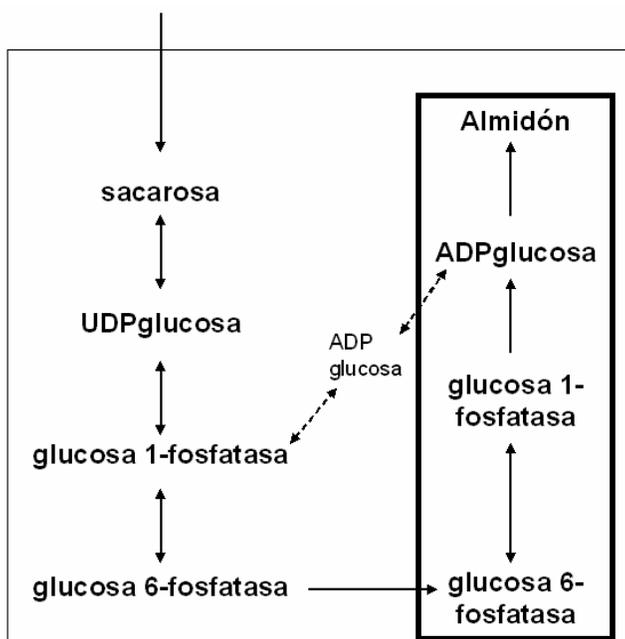


Figura 10. Ruta básica de la síntesis de ADP-glucosa (Smith, 2001), donde se citan las enzimas relacionadas con la síntesis de la ADP-glucosa. El cuadro de línea delgada representa una célula y el cuadro de línea gruesa representa un amiloplasto.

2.2 Composición del almidón

El almidón está compuesto por dos tipos de α – glucanos: amilosa y amilopectina (ver Figuras 11 y 12 respectivamente). En ambos polisacáridos la 1→4 α -D-glucosa es la unidad fundamental. La principal diferencia entre estas dos macromoléculas es que el amilosa es prácticamente lineal, mientras que el amilopectina está formada principalmente por cadenas ramificadas. La proporción de estos dos polímeros y su organización física dentro de la estructura granular le confieren propiedades fisicoquímicas y funcionales características de los diferentes almidones. Se denominan almidones normales aquellos que contienen alrededor de 25% de amilosa (Fennema, 2002; Tester *et al.*, 2004), sin embargo, existen variedades seleccionadas de maíz, ricas con alto contenido de amilosa, que llegan a tener hasta 85% (por ejemplo, amilomaize), mientras que en el extremo contrario, algunos almidones están constituidos esencialmente por amilopectina: el almidón de maíz, cebada y arroz céreos o glutinosos, con contenidos de hasta 98 a 99% de este componente.

Amilosa

El amilosa (Figura 11) es una cadena relativamente larga, lineal de α -glucano que contiene alrededor de 99% de enlaces α - (1 \rightarrow 4) y diferentes tamaños y estructuras dependiendo del origen botánico. En general, tiene un peso molecular promedio de 1×10^5 a 1×10^6 (Buléon *et al.*, 1998a), con un grado de polimerización por número (DP_n) de 324 a 4920 y alrededor de 9 a 20 puntos ramificados que pueden no tener la misma distancia entre ellos y que equivalen a 3 a 11 cadenas por molécula (Mizukami *et al.*, 1999; Yoshimoto *et al.*, 2002), que no obligadamente pueden tener la misma distancia entre ellas. Cada cadena contiene aproximadamente 200 a 700 residuos de glucosa equivalentes a un peso molecular de 32400 a 113400 (Tester *et al.*, 2004). En soluciones acuosas el amilosa adopta una conformación de hebra flexible con cierta rigidez con un radio hidrodinámico característico de 7 a 22 nm (Buléon *et al.*, 1998b).

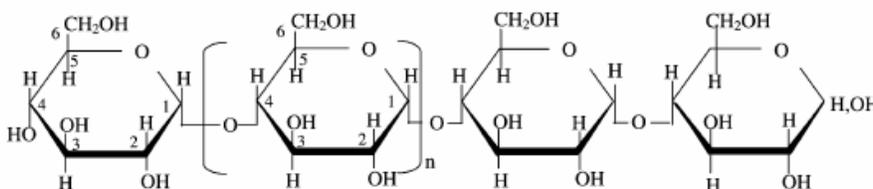


Figura 11. Estructura del amilosa (Tester *et al.*, 2004). Valor promedio de $n = 1000$.

Amilopectina

El amilopectina se diferencia del amilosa debido a que contiene ramificaciones que le dan una forma molecular similar a la de un árbol. El peso molecular del amilopectina es mucho mayor que el del amilosa y va de 1×10^7 a 1×10^9 y una estructura pesada construida con alrededor de 95% de enlaces α - (1 \rightarrow 4) y el restante 5% de enlaces α (1 \rightarrow 6) (Figura 12). Las ramificaciones se encuentran unidas al tronco central por enlaces α -(1-6), 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 se encuentra 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 el amilosa, el peso y el tamaño molecular al igual que la estructura de la molécula varían con el origen de la especie botánica. Una diferencia fundamental con el 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 de amilosa (Jane *et al.*, 1999). Sin embargo, este tipo de almidones contienen una proporción bastante alta de cadenas muy cortas.

En estudios de hidrólisis enzimática del amilopectina con isoamilasa seguida por cromatografía de exclusión de tamaños (Hizukiri, 1986) se ha propuesto la existencia de cierta periodicidad en el tamaño y en la distribución de los constituyentes de las cadenas con enlaces 1→4, y se ha postulado que esas cadenas lineales se localizan en un racimo. Se pueden conectar dos o más racimos y esto ha servido como base para el modelo de ramificaciones.

El modelo de ramificaciones se puede concebir de dos maneras: (1) las regiones lineales exteriores de amilopectina en forma de dobles hélices cristalinas; y (2) los 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 del amilopectina.

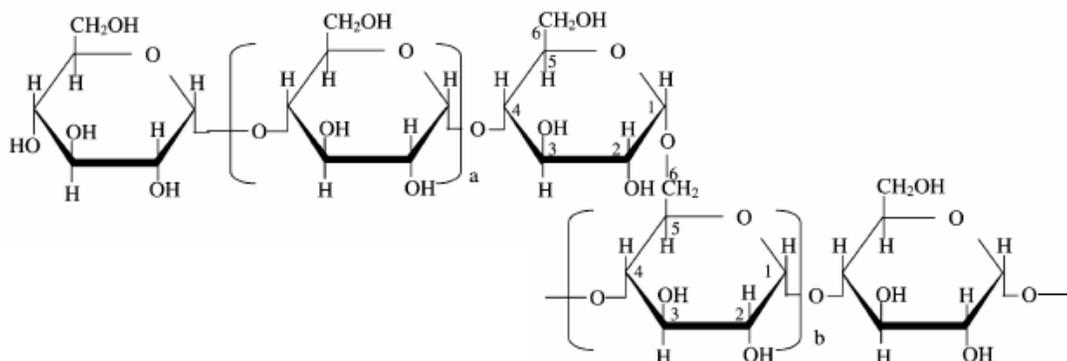


Figura 12. Representación esquemática del amilopectina (Tester *et al.*, 2004). Para cadenas exteriores $a = 12$ a 23 . Para cadenas interiores $b = 20$ a 30 .

En relación con la estructura del amilopectina, (Figura 13), 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).

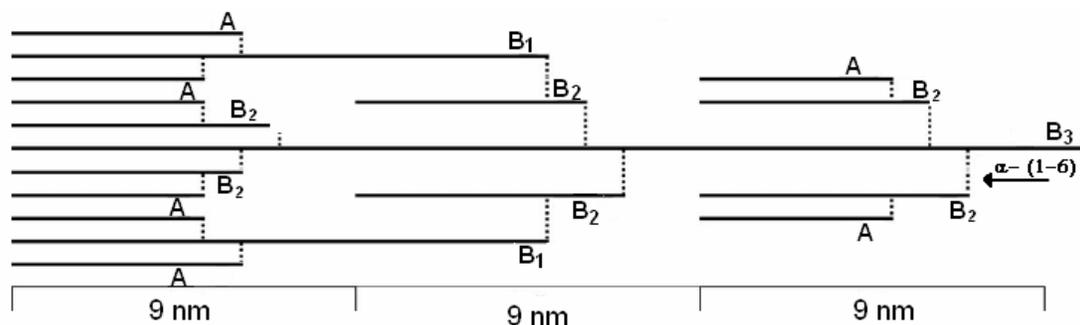


Figura 13. Representación esquemática del amilopectina indicando el patrón de ramificaciones de las unidades de cadenas α -1 \rightarrow 4 (A, B₁-B₃) unidas por enlaces α -1 \rightarrow 6 (puntos de ramificación). (Hizukuri 1986).

2.3 Organización del gránulo

En todos los patrones, las cadenas de amilosa y de amilopectina existen en forma helicoidal, sin embargo, producen arreglos de empaquetamiento diferentes. Las proporciones de las dobles hélices en los gránulos nativos varían con la fuente botánica sin que exista un patrón establecido sobre éstos. No toda la fracción de amilopectina forma dobles hélices, sin embargo es importante diferenciar entre las cadenas exteriores las cuales tienen la capacidad de formar dobles hélices y otras regiones que no forman dobles hélices con el amilopectina. La importancia de conocer el patrón de difracción de rayos X permite reconocer que el arreglo de las dobles hélices con un arreglo polimórfico tipo A es relativamente compacto con una pequeña cantidad de agua, mientras que los polimorfos tipo B tienen una estructura más abierta conteniendo un núcleo helicoidal hidratado (Figura 14).

En general, los almidones extraídos a partir de cereales generan un patrón de difracción de rayos X tipo A, y las leguminosas, raíces, tallos y frutas un patrón tipo B. El patrón de difracción tipo C, es una combinación polimórfica del arreglo tipo A y B. Las dobles hélices formadas, principalmente por las cadenas exteriores de amilopectina, tienen un arreglo ordenado donde las estructuras ordenadas son entidades cristalinas. La estructura del amilosa de almidón tipo A (Figura 15a) corresponde a una doble hélice paralela con seis dobleces siguiendo la regla de la mano izquierda con una altura de 21.38 Å. El diámetro interior y exterior de la hélice es de 3.4 y 10.4 Å, respectivamente. En la estructura helicoidal del amilosa en un almidón tipo B, la amplitud de medio escalón es de 20.8 Å (Figura 15b), la conformación es paralela con seis dobleces que siguen la regla

de la mano izquierda. Los diámetros interno y externo de las hélices son de 3.0 y 10.6 Å, respectivamente (Chandrasekaran, 1998).

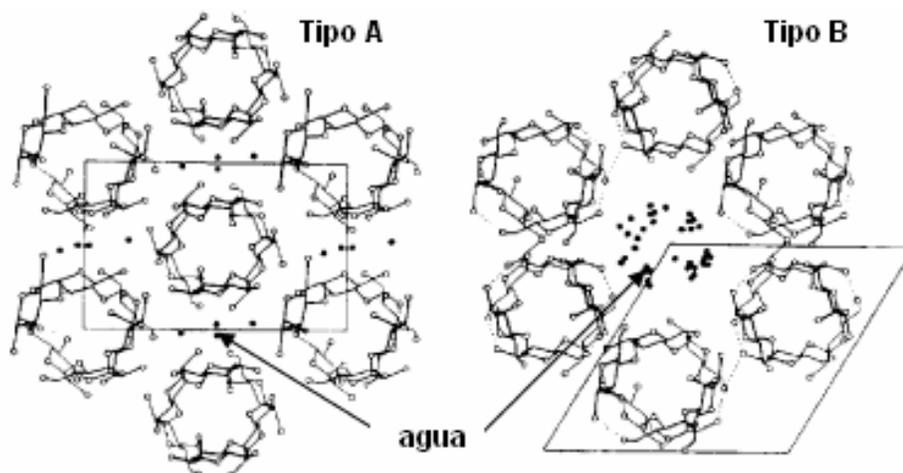


Figura 14. Representación esquemática del amilosa en almidones Tipo A y Tipo B. (Tester *et al.*, 2004).

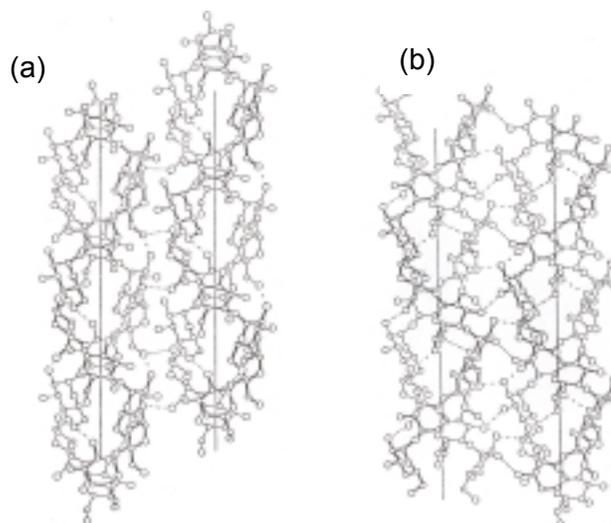


Figura 15. Representación del arreglo cristalino de las dobles hélices del amilosa a partir de (a) almidón tipo A; (b) almidón tipo B. Para mayor claridad, los dos filamentos de cada hélice son delgados y gruesos, mientras que el eje x de la hélice es vertical (Chandrasekaran, 1998).

La presencia de estructuras helicoidales al interior de los gránulos de almidón (u glucanos disueltos y dispersados) ha sido investigada extensivamente con el empleo de la resonancia magnética nuclear (NMR por sus siglas en inglés) con ^{13}C . Lo que ha revelado la presencia de (Tester *et al.*, 2004):

- i) Dobles hélices del amilopectina.

- ii) Regiones espaciales entre las hélices y la conformación estructural ramificada.
- iii) Dobles hélices entre amilosa / α -glucano.
- iv) Hélices simples entre el material amorfo y el amilopectina.
- v) Hélices simples entre el material amorfo y el amilosa.
- vi) Co-complejos entre las hélices de amilosa y amilopectina y
- vii) Complejos entre el amilosa y grasas tipo V.

Cuando se observan los gránulos de almidón bajo un microscopio de luz polarizada, muestran una sombra oscura conocida como “cruz de malta”, la cual es característica de las sustancias cristalinas cuyo índice de refracción varía en la dirección de paso de la luz a través de la sustancia (Gallant *et al.*, 1997).

La naturaleza microcristalina de los gránulos de almidón ha sido objeto de numerosos estudios desde los años treinta. Inicialmente, el carácter cristalino de los almidones se atribuyó completamente al amilopectina y los estudios se enfocaron a la deposición de sus moléculas en los gránulos (Tester *et al.*, 2004). Las ramificaciones de éste se proyectan en forma radiada a partir del *hilum*, o centro de crecimiento, hacia la periferia del gránulo. El amilosa no parece tener un efecto significativo en la cristalinidad de los almidones normales y cerosos (virtualmente libres de amilosa) los cuales presentan una fuerte birrefringencia (Whistler y BeMiller, 1997). Sin embargo, en almidones con alto contenido de amilosa, éste puede contribuir fuertemente al carácter cristalino a pesar de que la naturaleza exacta de los cristales polimorfos puede ser diferente.

En los almidones ricos en amilopectina es comprensible que el origen del carácter cristalino sea debido al entrelazado de las cadenas externas de amilopectina (cadenas exteriores o externas representadas por el tipo A y B1) en forma de doble hélice. Esas asociaciones juntas forman regiones ordenadas o “láminas cristalinas” (Figura 16). En la figura observamos tres regiones: (a) montón de láminas microcristalinas separadas por el desarrollo de anillos amorfos, (b) la vista ampliada de las regiones amorfas y cristalinas, y (c) estructuras helicoidales formadas por cadenas adyacentes de amilopectina, dando origen a la lámina cristalina. Los puntos de ramificación constituyen las regiones amorfas. Los racimos adyacentes de cadenas de amilopectina al interior de la lámina tienen un ancho promedio de 10 nm por 9 a 10 nm de longitud (Donald *et al.*, 1997).

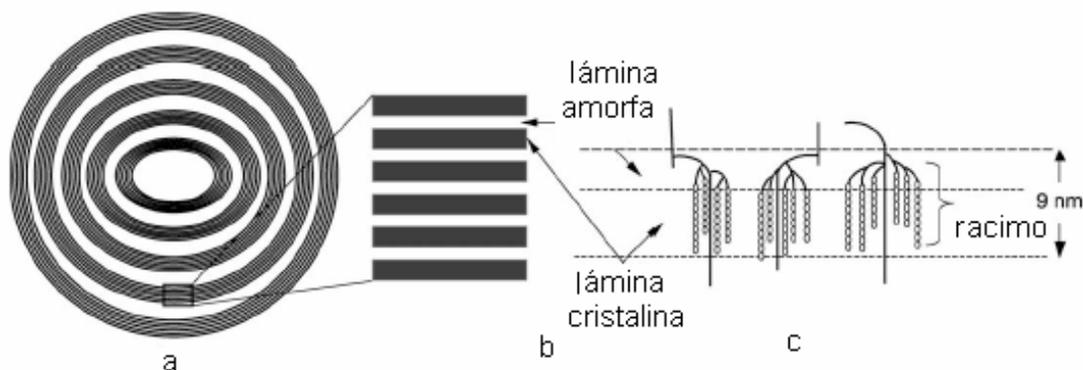


Figura 16. Representación de la estructura laminar de los gránulos de almidón (Donald *et al.*, 1997).

Gallant *et al.* (1997) propusieron la existencia de un nuevo nivel de organización de los gránulos de almidón, que denominaron como “bloques”. La definición de un bloque es para aquellas estructuras que son visibles óptimamente con un tamaño de aproximadamente 1 μm y son objetos formados debido más bien a la separación de capas que a las estructuras preformadas (Baker *et al.*, 2001). Los bloques se han considerado como estructuras de tamaño intermedio entre las observaciones micro y macro de los almidones (Baker *et al.*, 2001; Ridout *et al.*, 2002).

2.4 Gelatinización del almidón y microDSC

Gelatinización del almidón

Usualmente en la industria de alimentos, el almidón es procesado mediante tratamientos térmico y mecánico en presencia de agua y durante éste existen 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, hinchamiento del gránulo y disociación de las dobles hélices (Singh *et al.*, 2003). La transición orden – desorden ocurre durante el calentamiento de una dispersión 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 influida por la presencia de compuestos almidón – lípido (Thomas y 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 *hilum* del gránulo el cual se hincha rápidamente hacia la periferia, por lo que ocurre inicialmente en las regiones amorfas (Jenkins y 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 mostrado que se observa también la pérdida del orden laminar (Jenkins y Donald, 1998). Cuando el 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 y 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 el amilopectina atraviesa diferentes 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 y 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 y Ring, 2001). La combinación de 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) (Vermeulen *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 microDSC, mientras que los almidones tipo B presentaron 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 y 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.

MicroDSC

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 y 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 de un almidón se muestra en la Figura 17. 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 (Billaderis *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 un hule (Whistler y 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 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 17). Es muy usual que también se reporte la temperatura del final de la transición (T_{final}) por considerarla la parte final del proceso 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 cadena unitaria, cantidad de ramificaciones, peso molecular y polidispersidad) (Tester y Morrison, 1990; Jane *et al.*, 1990) 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).

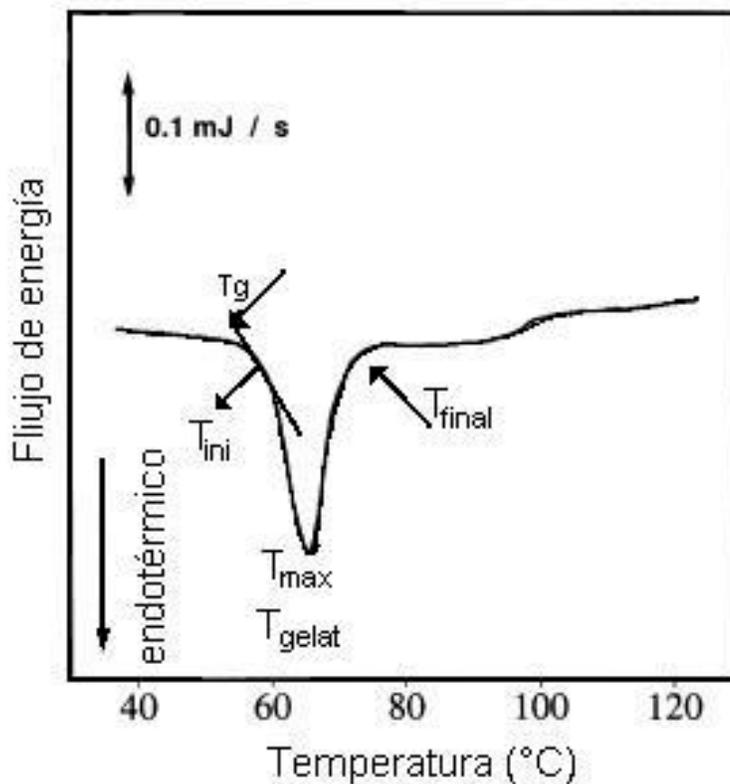


Figura 17. Curva de calentamiento en microDSC para almidón de maíz 20% (adaptado de Takaya *et al.*, 2000). Tasa de calentamiento 1 °C/min.

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. El Cuadro 2 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 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).

Cuadro 2. Parámetros de gelatinización de almidones de diversas fuentes botánicas obtenidos por microDSC.

Fuente de almidón	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 y Singh 2003
maíz normal	62.9	70.5	81.1	12.6	Tester <i>et al.</i> 2000
maíz normal	69.8	74.8	78.1	10.9	Singh y Singh 2003
maíz normal	65.7	71.0	-	12.0	Li y Yeh 2001
maíz ceroso	64.2	69.2	74.6	15.4	Jane <i>et al.</i> 1999
maíz normal	68.3	72.5	77.9	14.4	Liu <i>et al.</i> 2006
maíz ceroso	66.6	73.6	-	14.2	Li y Yeh 2001
maíz ceroso	62.6	72.6	84.4	15.6	Tester <i>et al.</i> 2000
maíz con alto contenido de amilosa	67.7	91.0	104.8	17.7	Tester <i>et al.</i> 2000
maíz con alto contenido de amilosa	66.8	73.7	-	13.7	Li y Yeh 2001
arroz	61.1 a 75.8	67.0 a 79.2	73.7 a 83.6	8.8 a 8.1	Singh <i>et al.</i> 2006
arroz	57.7	65.1	-	11.5	Li y Yeh 2001
arroz	66.0 a 67.3	69.7 a 71.9	74.1 a 74.0	8.2 a 10.9	Singh y Singh 2003
arroz	70.3	76.2	80.2	13.2	Jane <i>et al.</i> 1999
sago	-	69.3 a 70.1	-	15.1 a 16.3	Ahmad <i>et al.</i> 1999
trigo	57.1	61.6	66.2	10.7	Jane <i>et al.</i> 1999
trigo	51.9	58.2	69.6	10.1	Tester y Morrison 1990
avena	44.7 a 47.3	56.2 a 59.5	68.7 a 73.7	8.1 a 9.2	Tester y Karkalas 1996

- no reportado

Hinchamiento y solubilidad

Como se ha citado previamente, el calentamiento continuo de los gránulos de almidón en exceso de agua resulta en el hinchamiento de los gránulos y la lixiviación de los componentes solubles (principalmente el amilosa). Cuando se completan el hinchamiento y la solubilidad, 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 del amilopectina 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 y 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: $(D_i/D_0)^3$, donde el D_i es el $D[v, 0.5]$ (diámetro mediano) de los gránulos hinchados y D_0 es el $D[v, 0.5]$ del almidón nativo sin cocer (Tecante y 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 del 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 cH cuando $cH < 1$, donde c es la concentración de los gránulos de almidón y H es el hinchamiento (Bagley y 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 cH . Cuando $cH < 1$, existe un exceso de disolvente entre las partículas, para $cH > 1$, todo el disolvente está absorbido por las partículas (Bagley y Chistinson, 1982). Sin embargo, cuando parte del almidón se disuelve, esta condición se puede extender a la siguiente expresión (Doublier, 1987):

$$\phi = (1 - S/100) \times cH \quad (2)$$

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 la pastas (Acquarone y 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 Modificaciones químicas en el almidón

Los almidones nativos son excelentes estabilizadores y reguladores en los sistemas alimenticios. Sin embargo, carecen de versatilidad para funcionar adecuadamente en el intervalo completo de productos alimenticios que actualmente se posicionan en el mercado. Algunas limitaciones son su baja resistencia a la deformación, a la descomposición por tratamiento térmico – mecánico y su alta tendencia hacia la retrogradación, lo que limita sus aplicaciones en algunos sistemas alimenticios industriales. La modificación de los almidones incluye una alteración de las características físicoquímicas de los almidones nativos y mejora sus características funcionales, lo que puede ser usado para adaptar los almidones en aplicaciones alimenticias muy específicas. Estas modificaciones incluyen cambios en algunas unidades D-glucopiranosas de las moléculas e involucran la eterificación, esterificación, entrecruzamiento e inserción, la oxidación o hidrólisis ácida o enzimática o la pregelatinización (Singh *et al.*, 2007).

La modificación química incluye la introducción de grupos funcionales en la molécula de almidón, dando como resultado una alteración de sus características físicoquímicas. La acetilación o formación de ésteres con anhídrido acético, la hidroxipropilación o eterificación con óxido de propileno en presencia de catálisis alcalina, el entrecruzamiento y las modificaciones duales son los mecanismos más empleados en las modificaciones químicas. Los reactivos químicos deben estar aprobados por la agencia reguladora de los Estados Unidos (FDA) para producir almidones modificados para uso alimenticio. Los reactivos permitidos y los niveles de empleo se encuentran en el Capítulo 21 del Código Federal de Regulaciones Federales en el capítulo correspondiente a “Almidones modificados” (sección 172.892) (Thomas y Atwell, 1999).

Entrecruzamiento

Quizá la técnica de entrecruzamiento es el tipo más común de modificación química. Los productos derivados del almidón por el empleo de un reactivo químico bi- o un poli-funcional el cual es capaz de reaccionar con uno o dos diferentes grupos hidroxilo del mismo o diferentes polímeros de almidón, crea puentes covalentes entrecruzados que actúan como “sitios de soldadura o unión” intra e intermoleculares localizados en forma aleatoria que estabilizan la estructura granular (Acquarone y Rao, 2003), (Figura 18). Las pastas de almidón entrecruzado son menos susceptibles al rompimiento de los gránulos y

pueden tolerar altas temperaturas, altas deformaciones y condiciones ácidas (Hirsch y Kokini, 2002).

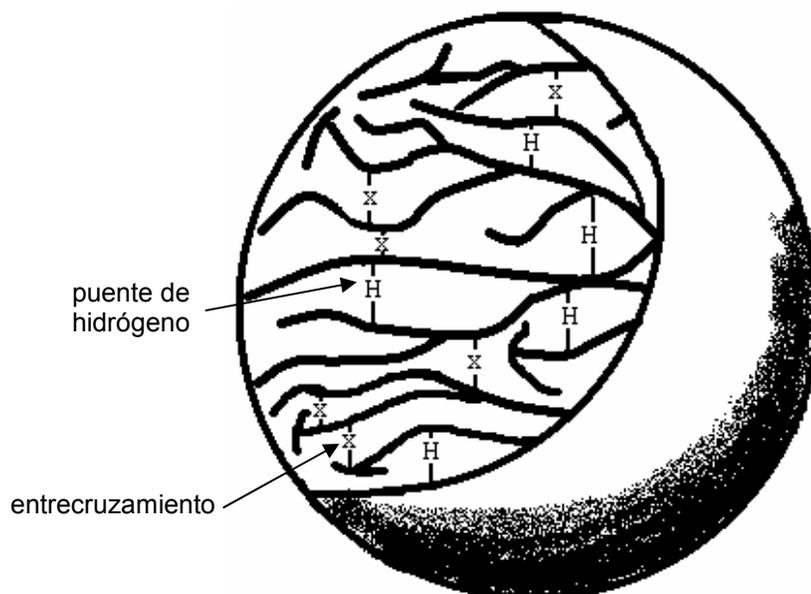


Figura 18. Esquema de la estructura de un gránulo de almidón entrecruzado. (Tomas y Atwell, 1999). Cada "x" representa un enlace covalente de entrecruzamiento.

El entrecruzamiento de 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. Entre los reactivos químicos aprobados y usados para el entrecruzamiento de almidón están el oxocloruro de fósforo, el trimetafosfato de sodio, el tripolifosfato de sodio y mezclas de anhídrido adípico y anhídrido acético (Singh *et al.*, 2007).

En este último caso, una suspensión acuosa de almidón, tratada previamente con peróxido de hidrógeno, se ajusta a pH preferentemente entre 8 a 8.5, mediante 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 y Goznez, 1988). La mezcla de reactivos anhídridos empleados en esta reacción (Figura 19) crea 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 éteres 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 también es sustituido por grupos acetilo.

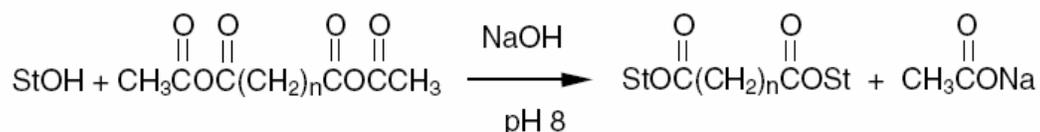


Figura 19. Reacción química para entrecruzamiento de almidón por una mezcla de anhídridos adípico y acético. St = polímero de almidón (Thomas y Atwell, 1999).

La reacción con el 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 20. 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 termicomecánica de los procesos (Thomas y Atwell, 1999).

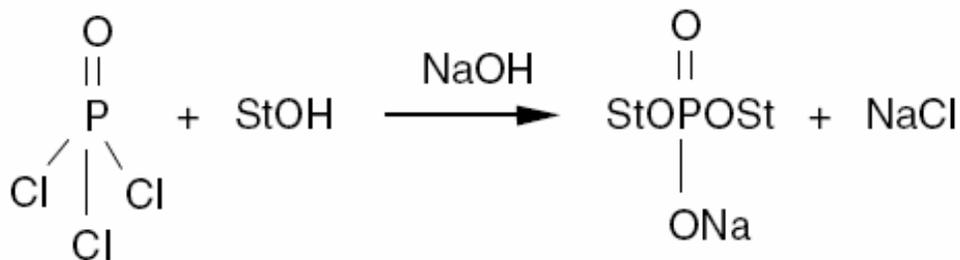


Figura 20. Reacción química para el entrecruzamiento de almidón con oxiclورو de fósforo en medio alcalino. (Singh *et al.*, 2007). St = polímero de almidón.

En la reacción con el trimetafosfato de sodio, de manera similar que con el oxiclورو de fosfato, el producto obtenido es un fosfato dialmidón con enlaces éster (Figura 21). Sin embargo, requiere un mayor tiempo de reacción que aquella con el oxiclورو de fosfato debido a la baja reactividad del trimetafosfato de sodio.

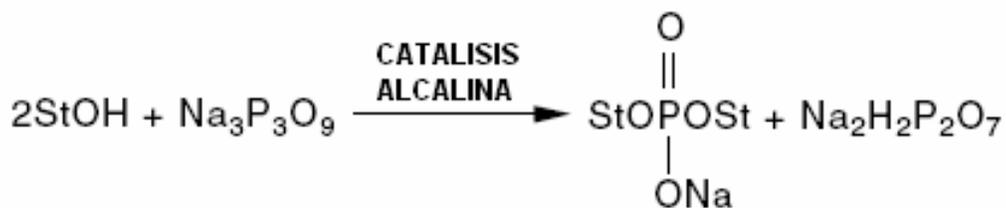


Figura 21. Reacción química para entrecruzamiento de almidón con trimetafosfato de sodio. St = polímero de almidón (Singh *et al.*, 2007).

Los estudios realizados con almidón de maíz ceroso empleando diferentes reactivos para el entrecruzamiento, como POCl_3 y óxido de propileno, reportaron la existencia de variaciones en el patrón de reacción (Huber y BeMiller, 2001). Debido a la alta reactividad del POCl_3 el entrecruzamiento predomina en la superficie de los gránulos; sin embargo, cuando se emplea el óxido de propileno, la reacción es más lenta y éste tiene tiempo para difundirse hacia el interior de la matriz del gránulo previo a la reacción. Otro factor que puede influenciar la extensión del entrecruzamiento es la distribución del tamaño de partícula de los gránulos de almidón (Hung y Morita, 2005). La rápida reactividad del POCl_3 con la superficie de los gránulos produce que los entrecruzamientos provoquen la formación de una corteza dura en la superficie, misma que restringe el hinchamiento de los gránulos (Huber y BeMiller, 2001). Así, en forma general, los almidones entrecruzados tienen solubilidades más bajas en relación con los almidones nativos. La solubilidad disminuye cuando hay un aumento en la concentración de los reactivos para el entrecruzamiento, el cual se puede atribuir a un incremento en la densidad del entrecruzamiento (Kaur *et al.*, 2005).

El entrecruzamiento puede alterar las temperaturas y entalpías durante la gelatinización de los almidones. El efecto depende de la concentración y el tipo de reactivo para la reacción de entrecruzamiento, las condiciones de reacción y la fuente botánica del almidón. Este incremento se relaciona con la reducción de la movilidad de las cadenas amorfas en los gránulos de almidón como resultado de la formación de puentes intermoleculares. El nivel de entrecruzamiento tiene una fuerte influencia en las propiedades determinadas por microDSC en los almidones. Choi y Kerr (2004) reportaron que la temperatura y entalpía de gelatinización de los almidones entrecruzados fueron muy similares a los almidones nativos cuando se emplearon bajas concentraciones de POCl_3 mientras que con altas concentraciones de reactivo T_{gelat} y ΔH_{gelat} aumentaron. Sin embargo, T_g no se vio afectada significativamente (Liu *et al.*, 2003). El empleo de ácido adípico en el entrecruzamiento de *Canavalia ensiformis* (Chel-Guerrero y Betancur, 1998)

no produjo cambios en las propiedades térmicas del almidón, ni en la composición química del mismo. Sin embargo, se incrementó la estabilidad, la viscosidad de las pastas y la firmeza de los geles en relación con el almidón nativo con una disminución en la solubilidad, el poder de hinchamiento y la sinéresis.

Es un hecho que el entrecruzamiento forma geles más rígidos causados por la reasociación de las moléculas de amilosa (retrogradación). Para minimizar la retrogradación, se aplica un proceso de estabilización por medio de la introducción de “grupos químicos bloqueadores” tales como los grupos acetilo (Lawal y Adebowale, 2005) o hidroxipropilo a lo largo de la cadena principal del almidón (Figura 22). La acetilación es el método más empleado, que adicionalmente incorpora una mayor resistencia a la retrogradación de los almidones (Singh *et al.*, 2004). La acetilación ocurre típicamente por la adición de anhídrido acético o acetato de vinilo a pH entre 7.5 y 9.0. Posteriormente, la reacción se completa en un medio neutro y se lava el almidón. Finalmente, los almidones acetilados se recuperan como polvo por centrifugación y secado (Thomas y Atwell, 1999). En forma general, los almidones sustituidos, y particularmente los entrecruzados, se emplean primeramente como espesantes por su estabilidad y claridad en una variedad de alimentos, principalmente refrigerados y congelados (Singh y Singh, 2005).

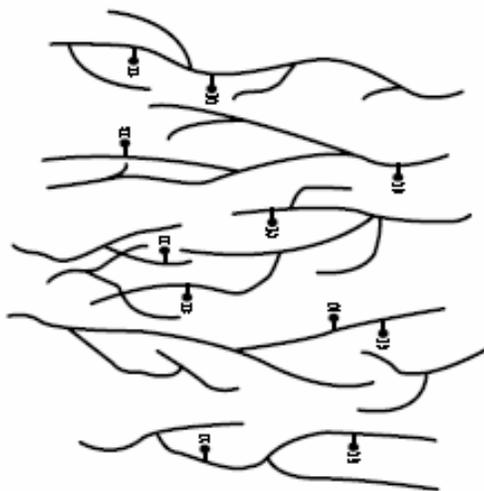


Figura 22. Representación esquemática de los grupos bloqueadores en almidones estabilizados (Thomas y Atwell, 1999).  Agentes modificantes,  representación de una acción bloqueadora (hidrofóbica / hidrofílica).

2.6 Pruebas reológicas en pastas y geles de almidones

Como ya se ha citado, durante la gelatinización de suspensiones de almidón se presentan cambios importantes en el sistema. Los gránulos de almidón se hidratan e incrementan su tamaño original varias veces, mientras que los componentes de los gránulos, principalmente amilosa, lixivian hacia el medio continuo formando una matriz de amilosa con gránulos hinchados en su interior. Estos cambios son responsables de las características reológicas exhibidas por las suspensiones de almidón durante el calentamiento.

Los primeros estudios de viscosidad en pastas de almidón se realizaban en equipos conocidos como Analizador Rápido de Viscosidad (RVA por sus siglas en inglés), siendo el más famoso el Viscoamilógrafo Brabender. Estos aparatos trabajan controlando el mezclado y el programa de calentamiento y enfriamiento con un alto grado de reproducibilidad en los perfiles de gelatinización y elaboración de las pastas. Sin embargo, el sistema de mezclado empleado no cumple con las características geométricas necesarias para tener un flujo viscométrico durante la elaboración de las pastas. Las unidades arbitrarias de medición son las Unidades Brabender (BU) y las (RVV) en el Analizador Rápido de Viscosidad (Thomas y Atwell, 1999). Aunque en la industria de producción de almidón y la de alimentos a estos aparatos se les llama viscosímetros, está claro que no lo son en el sentido estricto del término y por lo tanto la llamada “viscosidad Brabender” no puede considerarse una propiedad reológica fundamental. No obstante una de las ventajas de estos equipos es que permiten la aplicación de las mismas condiciones termomecánicas de cocción del almidón y por ello no es raro usarlos simplemente como cocedores y usar los trazos con propósitos de control de la cocción y no para la obtención de funciones materiales reológicas.

Un estudio reológico bien fundamentado es aquel que permite obtener funciones materiales en flujo estacionario y no estacionario. La mayoría de los estudios reológicos versa sobre propiedades de flujo estacionario y propiedades viscoelásticas dinámicas en régimen armónico. Hace dos décadas comenzaron a surgir estudios reológicos bien fundamentados de suspensiones de almidón. Principalmente se determinaron los cambios en la viscosidad de las suspensiones de almidón durante el calentamiento y el efecto de diferentes tratamientos térmicos en la viscosidad de estos sistemas (Doublier, 1981; Bagley y Christianson, 1982; Doublier, 1987; Rao y Tattiyakul, 1999).

En la comprensión del comportamiento reológico de las pastas de almidón, Evans y Haisman (1979) emplearon técnicas de sedimentación en almidones gelatinizados y sugirieron que el comportamiento reológico de suspensiones de almidón gelatinizado está determinado por interacciones intergranulares, tales como uniones débiles de corta duración dentro de la superficie de moléculas vecinas y por las características viscoelásticas y de compresibilidad de los gránulos. Sin embargo, Doublier (1981) comparó curvas de flujo de pastas de almidón de trigo elaboradas con diferentes tratamientos térmicos y concluyó que las diferencias observadas en el comportamiento de flujo se deben a la composición de la fase continua, formada por material disuelto y partículas finas procedentes de gránulos fragmentados, y al tamaño de las partículas que conforman la fase dispersa, compuesta por gránulos hinchados y gránulos fragmentados.

Para la interpretación del comportamiento de las pastas o geles de almidón, el sistema se describe como bifásico con una fase continua constituida por el disolvente y el material extraído del gránulo durante la gelatinización y una fase dispersa compuesta de gránulos hinchados (Doublier, 1981; Bagley y Christianson, 1982; Doublier, 1987; Da Silva *et al.*, 1997). Este punto de vista hace énfasis en la presencia de partículas hinchadas en las suspensiones de almidón, las cuales difieren de las suspensiones de partículas rígidas en que los gránulos hinchados no sólo pueden ser deformables sino también compresibles e incluso elásticos, de tal forma, que las suspensiones de almidón permanecen fluidas a concentraciones muy superiores a aquéllas donde el volumen total se encuentra ocupado por los gránulos hinchados. Por lo tanto es de esperarse que las propiedades reológicas de las suspensiones de almidón dependan, entre otros factores, de las características de las fases continua y dispersa.

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 del ángulo de pérdida, δ , ha proporcionado información del carácter predominantemente elástico de estos sistemas (Evans y Haisman, 1979; Alloncle y Doublier, 1991; Tecante y Doublier, 1999), mismos que se han estudiado bajo el modelo de sistemas compuestos o "composites" (Eliasson, 1986). Sin embargo, en los trabajos realizados con almidón de maíz ceroso nativo y entrecruzado (Abdulmola *et al.*, 1996b; Mohamed *et al.*, 1998), donde el efecto del 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, aún a bajas concentraciones de almidón.

2.7 Pruebas reológicas en mezclas almidón - hidrocoloides

Normalmente, en la industria de alimentos, 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.*, 2003). Lo anterior se justifica debido a los cambios que se han observado en las mezclas de almidón en presencia de hidrocoloides, tales como: aumento en las temperaturas y entalpías de gelatinización (Chaisawang y Suphantharika, 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.*, 2003) y sobre todo, los cambios en el comportamiento reológico (Alloncle y Doublier, 1991; Abdulmola *et al.*, 1996b; Chaisawang y Suphantharika, 2006; Kim *et al.*, 2006). De ahí la importancia que toma el conocimiento y la comprensión de las interacciones entre estos sistemas.

Es generalmente aceptado que las pastas de almidones de cereales se pueden describir como suspensiones de partículas de almidón hinchado disperso en un medio macromolecular, las partículas hinchadas consisten principalmente de amilopectina mientras que la fase continua contiene predominantemente amilosa. De aquí que la incorporación de otras macromoléculas interferirá tanto en las propiedades de la fase continua como con la fase dispersa. Uno de los aspectos importantes a considerar, es la temperatura a la que se realizan las observaciones, debido a que a temperaturas mayores de 50 °C el amilosa se encuentra en una forma de hebra aleatoria de tal forma que conceptualmente hablamos de “pastas”, mientras que a temperaturas menores de este valor, puede conformar dobles hélices y formar “geles” cuando la concentración del amilosa es mayor de 1% (Gidley, 1989).

Para interpretar la interacción entre el amilosa o el amilopectina con otras macromoléculas, es importante considerar las características químicas de los hidrocoloides, debido a que las propiedades físicas de los sistemas dependen de la naturaleza química de cada almidón e hidrocoloide. En cuanto a la naturaleza de los hidrocoloides, éstos se clasifican como neutros, como las amilopectinas, el amilosa, las

arabinosas, los galactomananos, la celulosa y el xiloglucano, y polielectrolitos como la gelana, la xantana, las carrageninas, los alginatos, las pectinas, la goma arábica, la karaya y el tragacanto) (Whistler y BeMiller, 1997).

Almidón – hidrocoloides neutros

Desde el punto de vista reológico, en investigaciones realizadas donde se incorporaron hidrocoloides neutros, observamos que, de manera general, éstos producen un efecto sinérgico, (Alloncle y Doublier, 1991; Lai *et al.*, 2003; Yoo *et al.*, 2005 y Kim *et al.*, 2006), tanto en la viscosidad de las pastas como en la rigidez de los geles obtenidos, sin embargo aún no se explica de manera clara este fenómeno. En pruebas realizadas en un viscoamilógrafo, Christianson *et al.* (1981) propusieron que el incremento de la viscosidad de pastas elaboradas con mezclas de almidón e hidrocoloide, se debe a la formación de una red de amilosa en presencia del hidrocoloide, de tal forma que la incorporación de este último contribuye a incrementar la viscosidad de la pasta. Eidam *et al.* (1995) sugirieron la formación de complejos entre el almidón soluble y el hidrocoloide adicionado. Por otro lado, con base en el modelo de dos fases para Alloncle *et al.* (1989), la sinergia resulta de la modificación de la fase continua donde se ubica el hidrocoloide adicionado, de tal forma que conforme ocurre la gelatinización, los gránulos de almidón se hidratan disminuyendo el volumen disponible de disolvente en la fase continua, produciendo un incremento artificial de la concentración del hidrocoloide en esta última.

Sin embargo, el efecto sinérgico se puede ver revertido a concentraciones elevadas de hidrocoloide, denominando así una “concentración crítica” (CC). Esta concentración varía con las características del sistema, por ejemplo, en pastas de almidón de maíz a 60 °C, la CC de guar fue de 0.1% y de 0.2% para algarrobo (Alloncle y Doublier, 1991), mientras que en almidón de trigo, maíz normal y tapioca con goma de hojas de hsian-tsao fue de 1.2% (Lai *et al.*, 2003). Una de las hipótesis de la disminución de la viscosidad en mezclas con hidrocoloides es que probablemente el hidrocoloide inhibe la gelatinización completa del almidón (Jiménez-Ávalos, 2005; Chaisawang y Suphantharika, 2006) ya que un exceso de hidrocoloide en el espacio intergranular puede reducir los contactos entre las partículas de almidón o interrumpir las redes de amilosa o amilosa-hidrocoloide.

En mezclas a 25 °C también es posible observar la formación de pastas, por ejemplo, en mezclas de almidón de arroz (5%) con guar y algarrobo (0 a 0.8%), el comportamiento reológico corresponde al de una alta concentración de partículas en suspensión ($G' > G''$, y $\tan \delta > 0.1$) y se observó un efecto sinérgico en la rigidez (G') de las pastas obtenidas a

20 °C. Sin embargo, el incremento de la concentración de las gomas produjo dispersiones con un aumento del carácter líquido, a mayor concentración de goma, mayor $\tan \delta$, (Yoo *et al.*, 2005), observándose el mismo efecto a 4 °C (Kim *et al.*, 2006). En mezclas entre almidón de maíz (3 y 5%) con altas concentraciones de goma arábica (25 y 35%) a 25 °C, se obtuvieron dispersiones con un comportamiento de fluido viscoelástico observándose un cruzamiento de los módulos (Jiménez-Ávalos *et al.*, 2005), produciendo una viscosidad menor en las mezclas en comparación con la del almidón solo.

En algunos otros casos, la incorporación de los hidrocoloides no sólo se realiza para el reforzamiento de los sistemas alimenticios, sino también con el objetivo de modificar sus características de gelatinización y retrogradación. Por ejemplo, encontramos que la incorporación de guar produce un incremento de la temperatura de gelatinización del almidón de yuca nativo y de yuca aniónico (Chaisawang y Supphantharika, 2006) así como un decremento en la entalpía de gelatinización. Este efecto también es dependiente del peso molecular de la guar: a mayores pesos moleculares se obtiene una mayor temperatura de gelatinización y mayor viscosidad de las pastas (Funami *et al.*, 2005).

En este aspecto, no sólo se emplean hidrocoloides de altos pesos moleculares, sino también azúcares de bajo peso molecular; por ejemplo, sacarosa, glucosa y xilosa, para disminuir la retrogradación de los almidones, ya que aún a altas concentraciones (10 a 30%) de estos azúcares, es posible observar la gelificación del amilosa de almidón de maíz normal, aunque con una disminución de la rigidez de los geles obtenidos debido al aumento en la concentración del azúcar (Chang *et al.*, 2004).

Almidón– hidrocoloides iónicos

En la naturaleza, también podemos encontrar hidrocoloides que en su estructura básica contienen una o varias cargas, negativas preferentemente, conocidos como polielectrolitos, que pueden interactuar tanto con grupos químicos de los almidones como con contraiones. Uno de los polielectrolitos más empleados en mezclas con almidones es la xantana. Se ha observado que la xantana produce un incremento en la viscosidad en mezclas de pastas con almidones de maíz a 60 °C así como en geles a 25 °C (Alloncle y Doublier, 1991) y con almidón de yuca (Chaisawang y Supphantharika, 2006), produciendo un incremento tanto en la viscosidad de las pastas como en la rigidez de los geles con un aumento de la concentración de este hidrocoloide. Una hipótesis de este incremento en la viscosidad es que la xantana produce una asociación entre los gránulos de almidón hinchados, posiblemente por un mecanismo de agotamiento y floculación (Abdulmola *et*

al., 1996b). Por otro lado, mediante el empleo de SEM fue posible observar que en el caso del almidón de yuca, la xantana recubre la superficie de los gránulos de almidón de yuca nativo, sin que este efecto se observe en un almidón de yuca aniónico, de ahí la conveniencia de considerar la naturaleza de los almidones empleados (Chaisawang y Shuphantharika, 2006).

Debido a su naturaleza, los polielectrolitos tienden a interactuar con los iones, provocando así una enorme gama de posibilidades en la obtención de propiedades en los materiales. Específicamente hablando de sus mezclas con los almidones, encontramos que también pueden producir un efecto sinérgico en las propiedades reológicas y estos efectos se ven influidos también por la presencia de iones. En este contexto, Sosa-Herrera *et al.*, 2001 estudiaron el comportamiento reológico de un sistema de almidón de maíz ceroso entrecruzado químicamente (Clearam® CH10, de 2 a 4%) y sus mezclas con gelana (0.25%), y encontraron que a 60 °C, los gránulos de almidón hinchados se encuentran embebidos en una solución macromolecular de gelana. En cuanto a los geles a 25 °C observaron que conforme se incrementa la concentración de almidón, el módulo de almacenamiento disminuye, lo que puede interpretarse como geles de menor rigidez, evidenciando la inhibición de la formación de la red de gelana en la fase continua por la presencia del almidón. De igual forma, dejaron abierta la posibilidad de que otros factores como la concentración del ión adicionado, Ca^{2+} , puedan tener efectos adicionales a este fenómeno, debido a que en las pruebas de cizalla simple, los geles formados con concentraciones de 1 y 5 mM de CaCl_2 presentan viscosidades mayores que las de almidón solo, e inclusive aquellos que contienen una concentración de 10 mM de CaCl_2 . La observación anterior, descarta la hipótesis de que bajas concentraciones de iones inducen la formación de dobles hélices en la gelana y éstas se refuerzan con el aumento de la concentración iónica, esperando así una disminución de la viscosidad de las pastas y un incremento sobre las propiedades elásticas (Sosa-Herrera, 2002).

En el caso de geles elaborados con mezclas de almidones cerosos no modificados (1 a 7%) – gelana, Rodríguez-Hernández *et al.* (2001), encontraron que las pastas elaboradas con una concentración inferior de 3.0% (temperatura de cocción = 75 °C) de almidón presentan un estado físico que puede ser descrito por un modelo bifásico considerando gránulos de almidón hinchados dispersos en una solución macromolecular, mientras que para concentraciones de almidón mayores de 3% o temperaturas de cocción mayores, el comportamiento reológico es dependiente de la concentración de gelana y puede ser descrito como una dispersión coloidal con gránulos hinchados, gránulos fragmentados y

amilopectina disuelta, debido a que este tipo de almidón, pese al alto contenido de amilopectina, no es estable al tratamiento mecánico, produciendo un sistema con una mezcla de gránulos fragmentados embebidos en una red macromolecular de amilopectina-gelana, siendo esta última la que domina el carácter elástico, mientras que el almidón provee un medio de carácter más viscoso. Una vez evidenciada la formación y el dominio de la red de gelana sobre el carácter elástico del sistema anteriormente descrito, Rodríguez-Hernández *et al.* (2003) presentaron un estudio que busca correlacionar las propiedades reológicas con las estructurales en sistemas de bajas concentraciones de gelana (< 0.05 %) y en presencia de 10 mM CaCl₂, demostrando que aun a bajas concentraciones de gelana, existe evidencia de la presencia de una red macromolecular, misma que es posible mostrar a través tanto de técnicas reológicas como calorimétricas, reforzando sus observaciones con imágenes de la ultraestructura de los geles por medio de microscopia confocal de barrido láser. La contribución de este trabajo, es el empleo de herramientas complementarias con la reología que permiten la comprensión del comportamiento de los sistemas analizados mediante dichas técnicas, y deja abierta la posibilidad de ampliar el estudio del mecanismo de gelificación de la gelana, por medio del empleo de diversas concentraciones de cationes.

Otro hidrocoloide usado ampliamente en la industria de alimentos, y sobre todo de los postres, es la κ -carragenina (Descamps *et al.*, 1986) debido a que en sus mezclas con almidón, puede reducir hasta en 50% el contenido de éste disminuyendo así el contenido calórico de los alimentos (Nadison y Doreau, 1991). Por otra parte, la κ -carragenina tiene una alta capacidad de formación de geles en presencia de iones como el K⁺ (Tecante y Doublier, 1999) y el Ca²⁺ (Dunstan *et al.*, 2001). En pruebas reológicas donde se observó la evolución de G' con la temperatura en pruebas de enfriamiento, las mezclas de κ -carragenina con almidón de arroz nativo gelatinizado y en ausencia de iones, presentaron una disminución del valor de G' máximo obtenido (G'_{max}). Sin embargo, se produjo un incremento en las temperaturas de gelificación y fusión de los geles debido a la incorporación de 1% de almidón a 2% de κ -carragenina (Lai *et al.*, 1999). En mezclas de almidones de maíz ceroso modificado químicamente se observó un efecto sinérgico en la viscosidad con tres tipos de carrageninas: kapa, iota y lambda. En pruebas de cizalla estacionaria, las mezclas con ι -carragenina presentaron mayores viscosidades a 25 °C, sin embargo, en pruebas de penetración, los geles formados con κ -carragenina presentaron una mayor resistencia (Descamps *et al.*, 1986). En geles de almidón de maíz normal, la presencia de κ -carragenina (0.05 a 0.5%) produjo un efecto sinérgico en la

rigidez de los geles, a mayor concentración de κ -carragenina, mayor G' (Verbeken *et al.*, 2004).

En mezclas de almidones de maíz ceroso entrecruzado químicamente (Clearam® CH10) a 3%, la incorporación de κ -carragenina (0.5%) incrementó significativamente la viscosidad aparente al igual que el diámetro mediano, $D[v, 0.5]$, comparados con el almidón solo en pastas a 60 °C, presentando un comportamiento fluidificado por cizalla. Sin embargo, la presencia de K^+ (20 mM) produjo una disminución de la viscosidad aparente, sin que ésta sea menor que la de almidón solo (Loisel *et al.*, 2000). Una posible explicación de este fenómeno es que el aumento del diámetro mediano incrementa la viscosidad aparente y por ende la fracción volumen nominal de la fase dispersa (Rao y Tattiyakul, 1999; Loisel *et al.*, 2000; Paterson *et al.*, 2001) produciendo una mayor viscosidad del sistema. En pruebas oscilatorias a 60 °C, este mismo sistema presentó el comportamiento reológico de una dispersión de partículas en suspensión, donde predomina el comportamiento elástico a altas concentraciones de almidón (4 y 3%). El carácter elástico de las mezclas disminuye con la disminución de almidón (2%) y la presencia de K^+ (20 mM) (Tecante y Doublier, 1999). Durante la observación del cambio de G' a través del tiempo a 25 °C en mezclas 20 mM de KCl–0.5% κ -carragenina–2 a 4% de almidón de maíz ceroso modificado químicamente, el aumento de la concentración de almidón produjo geles con mayor rigidez, formando sistemas de geles compuestos (composites) de partículas hinchadas embebidas en una red macromolecular (Tecante y Doublier, 1999). Así, el comportamiento reológico de sistemas de almidón/carragenina está gobernado por la fracción volumen de la fase dispersa y la viscosidad de la fase continua.

Para modelar el comportamiento reológico de “composites” se ha aplicado la “ley para mezclas bifásicas de macromoléculas que forman redes en iso – deformación e iso – esfuerzo” (Takayanagi *et al.*, 1963) en almidón de maíz entrecruzado ceroso y no ceroso con gelatina (Abdulmola *et al.*, 1996a) y xantana (Abdulmola *et al.*, 1996b), y almidón de maíz ceroso entrecruzado (1 a 5%) con agarosa (0.25%) (Mohammed *et al.*, 1998). Para tal efecto, se considera que en un sistema iso–deformación (cuando G' de la fase continua es mayor que la G' de la fase dispersa) la G' de la mezcla es la suma del producto de G' por la fracción volumen de las fases: $G_{mezcla} = G_x\phi_x + G_y\phi_y$, donde x representa la fase continua, y la fase dispersa. En un sistema iso–esfuerzo (cuando G' de la fase dispersa es mayor que la G' de la fase continua) el inverso de la G' de la mezcla será la suma del radio entre la fracción volumen y la G' de la fase: $1/G_{mezcla} = \phi_x/G_x + \phi_y/G_y$.

Este modelo fue propuesto originalmente para el cálculo de rigidez en sistemas que forman cogeles acoplados en un arreglo serial (iso-deformación) o paralelo (iso-esfuerzo) según sea el caso. La aplicación de este método se ha extendido a sistemas almidón – hidrocoloides, sin embargo, presenta desviaciones con altas concentraciones de almidón (Mohammed et al., 1998).

Loisel *et al.* (2000), estudiaron el efecto de la temperatura sobre las propiedades reológicas de mezclas de almidón modificado de maíz y κ -carragenina, así como su efecto sobre el tamaño de los gránulos hinchados. La aportación más relevante de este trabajo, es que los gránulos de almidón presentaron un diámetro promedio mayor conforme la temperatura de cocción se incrementa, y comprobaron que el tamaño de los gránulos hinchados hace que se incremente tanto la viscosidad aparente como el módulo de almacenamiento, atribuyendo dicho incremento a la adición de la carragenina incorporada al almidón.

Entre otro de los sistemas estudiados, se encuentra el almidón de maíz ceroso entrecruzado con κ -carragenina, (Tecante y Doublier, 1999), donde el empleo de este tipo de almidón permite tener un sistema exento de amilosa y gránulos de almidón lo suficientemente rígidos para generar una suspensión de partículas hinchadas en un medio continuo. Tecante y Doublier (1999) concluyeron que el modelo bifásico propuesto para dispersiones y geles de almidón se puede aplicar en este tipo de mezclas, sin embargo, no es posible la aplicación del esquema propuesto por Alloncle *et al.* (1989). De acuerdo con este esquema, la concentración de carragenina se incrementaría en la fase continua como resultado de la reducción del volumen disponible al hincharse el gránulo de almidón, a tal grado que no necesitaría iones para inducir su gelificación, lo cual no se detectó en las propiedades de flujo ni en los espectros mecánicos de los sistemas estudiados.

En el contexto de la reología, también existen las pruebas mecánicas, que nos permiten evaluar las propiedades de textura de los alimentos de una manera objetiva por medio de instrumentos que permiten determinarlas aplicando fuerzas y deformaciones. Reyes (2002) realizó el estudio de las propiedades mecánicas en geles de almidón de maíz ceroso modificado – κ -carragenina y gelana; y las relacionó con la estructura de los mismos. La aportación más importante de este trabajo está relacionada con el estudio del efecto de la fuerza iónica sobre dichas propiedades y el efecto de la concentración, encontrando que no existe un comportamiento lineal sobre el esfuerzo necesario para fracturar los geles.

2.6 Discusión

Debido a su gran versatilidad, el almidón es uno de los polisacáridos más empleados en la industria de alimentos. En la naturaleza existe en una gran variedad de formas geométricas, distribución de tamaños, composición, relación amilosa/amilopectina y localización en la planta, dependiendo del origen botánico. El estudio de los almidones nativos ha revelado que muchos de éstos no son estables ante los tratamientos térmicos y mecánicos a los que son sometidos. Esto ha dado origen a materiales transgénicos y a los almidones modificados. Las modificaciones pueden ser por medio de tratamientos físicos o químicos. Entre ellas, el entrecruzamiento o reticulación es el tipo de modificación química más común que produce almidones menos susceptibles al rompimiento de los gránulos y por ende pueden tolerar altas temperaturas, altas deformaciones y medios ácidos. Esto ha dado como resultado una mayor variedad en las características de los almidones. El hecho de que sus dos componentes macromoleculares, amilosa y amilopectina, a pesar de tener la misma base estructural constituida por cadenas de α -1-4-glucosa, muestren diferencias de tamaño molecular, dimensión, estructura y polidispersidad dependiendo del origen de la especie botánica, ha producido que el almidón sea el polisacárido más estudiado.

Para comprender el fenómeno de gelatinización de los almidones se han usado técnicas como la difracción de rayos X, la resonancia magnética nuclear, la microscopia y la calorimetría de barrido diferencial. Esta última es la técnica más usada para determinar el intervalo de temperaturas en las que ocurre el fenómeno y conocer el cambio de energía involucrado, expresado por la entalpía de gelatinización. Se considera que tanto T_{gel} , ΔH_{gel} y el hinchamiento de los gránulos son controladas por la estructura molecular de la amilopectina y sobre todo de sus características fisicoquímicas como el crecimiento o capacidad de hinchamiento de los gránulos. Este último está relacionado con la fracción volumen de los gránulos de almidón dispersos en la fase continua e inicialmente se expresó como el producto de la concentración y el hinchamiento ($\phi=cH$). En la literatura existen diversas técnicas para determinar la capacidad de hinchamiento de los gránulos de almidón. Sin embargo, en los últimos años se ha empleado el método de azul dextrana el cual toma en cuenta únicamente el agua intragranular, reportándose así como el factor de hinchamiento. Este método y la relación de diámetros medianos $(D/D_0)^3$, llamada poder de hinchamiento, han producido resultados muy similares, haciendo válidos ambos métodos para estimar el poder de hinchamiento de los gránulos. Considerando la

disolución parcial de los gránulos se corrigió el cálculo de la fracción volumen (Doublier, 1981).

Tradicionalmente, el viscoamilógrafo Brabender ha sido el instrumento más usado para caracterizar el comportamiento “reológico” de los almidones durante su cocción. Sólo hace alrededor de 20 años, empezaron a usarse geometrías bien definidas y mediciones reológicas fundamentales a través de pruebas de flujo estacionario y oscilatorio (Doublier, 1981; Bagley y Christianson, 1982; Doublier, 1987; Rao y Tattiyakul, 1999). La interpretación de los resultados reológicos así obtenidos ha estado basada en la consideración de 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, el cual difiere de las suspensiones de partículas rígidas ya que los gránulos hinchados no sólo son deformables sino también compresibles y elásticos. De esta forma las suspensiones de almidón permanecen fluidas a concentraciones muy superiores de aquéllas donde el volumen total se encuentra ocupado por los gránulos hinchados (Doublier, 1981).

Cuando los almidones son mezclados con otras macromoléculas, éstas pueden afectar tanto las propiedades de la fase continua como las de la fase dispersa. En general, se observa un incremento en la viscosidad de las pastas así como en la rigidez de los geles obtenidos con la incorporación de otros hidrocoloides. Sin embargo, no existe un criterio general para explicar este incremento. Se han planteado diferentes mecanismos de interacción entre los almidones y los hidrocoloides no amiláceos: 1) La asociación del almidón soluble, amilosa preferentemente, con el hidrocoloide disuelto en la fase continua (Christianson *et al.*, 1981) la cual puede derivar en un efecto de incompatibilidad termodinámica entre los polisacáridos, amilopectina preferentemente, (Closs *et al.*, 1999; Lai *et al.*, 1999); 2) Un efecto de exclusión de los gránulos hinchados que produce un incremento en la concentración del hidrocoloide en la fase continua con la aceleración de la formación del gel, debido a la pérdida de agua que se introduce en el gránulo hinchado (Alloncle *et al.*, 1989; Lai *et al.*, 1999; Verbeken *et al.*, 2004); 3) La interferencia del almidón soluble en la asociación molecular durante la gelificación, como se ha observado en dispersiones con un alto contenido de almidón de maíz ceroso (4%), y 4) El hecho de que el almidón disperso se puede considerar un “composite” donde los gránulos hinchados que forman la fase dispersa controlan las propiedades viscoelásticas, mientras que la fase continua hace una contribución adicional debido a su propia viscoelasticidad (Alloncle *et al.*, 1989).

Estas interacciones dependen de factores que incluyen la naturaleza química de los almidones e hidrocoloides, los tratamientos térmico – mecánicos empleados para preparar las mezclas, la relación amilosa – amilopectina de los almidones y la capacidad del hidrocoloide para retener agua. Por ello se considera importante estudiar la interacción específica de cada sistema.

CAPÍTULO 3

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis

De acuerdo con la revisión bibliográfica, durante la transición sol–gel, la κ -carragenina adopta diferentes conformaciones, que dependen de la concentración iónica total, C_T , y de la temperatura. Por otro lado se puso en evidencia la complejidad de las interacciones existentes entre los almidones y los hidrocoloides. En razón de ello, se planteó la siguiente hipótesis:

“El comportamiento reológico de las mezclas almidón de maíz ceroso modificado químicamente– κ -carragenina-KCl estará influenciado por la fracción volumen de los gránulos de almidón hinchados presentes en la fase dispersa, así como por la concentración de hidrocoloide y de KCl presentes en la fase continua. Dicho comportamiento reológico estará afectado de manera notable por las conformaciones que adopte la carragenina, las cuales a su vez están determinadas por las condiciones de su medio ambiente, principalmente la concentración iónica total y la temperatura.”

En este contexto, los gránulos de almidón de maíz ceroso modificado químicamente incrementarán el valor de G' de los geles de κ -carragenina, reforzando la red tridimensional formada por este biopolímero. Por otro lado, la presencia de KCl producirá sistemas más rígidos, tanto en geles de κ -carragenina sola como en sus mezclas con el almidón. Las diferentes condiciones de concentración de biopolímero–KCl y de temperatura producirán diferentes conformaciones en la κ -carragenina, lo que se reflejará en diferencias apreciables de comportamientos reológicos. En una conformación de hebra aleatoria y de dobles hélices sin formar agregados, el comportamiento reológico dependerá tanto de la fracción volumen de los gránulos de almidón hinchado en la fase continua como de la concentración de iones presentes en dicha fase.

3.2 Objetivo general

Estudiar la interacción almidón-carragenina, su estructura, su ultraestructura, y determinar sus propiedades viscoelásticas bajo diferentes condiciones de medio ambiente acuoso y temperaturas que induzcan cambios en la conformación de la carragenina para conocer la organización estructural de la mezcla almidón-carragenina y relacionarla con su manifestación macroscópica a través de su comportamiento reológico.

3.3 Objetivos particulares

1. Determinar las propiedades reológicas de los componentes individuales usados para preparar las mezclas para comprender su comportamiento por separado bajo diferentes condiciones de medio ambiente acuoso.
2. Conocer el estado físico de las mezclas una vez cocido el almidón determinando la solubilidad, el hinchamiento y examinando su morfología por microscopía de luz transmitida, para saber cómo se encuentra el almidón cuando se mezcla con la κ -carragenina.
3. Determinar las propiedades reológicas de las mezclas para conocer la forma en que se manifiestan de manera macroscópica las interacciones de los componentes.
4. Examinar el comportamiento de la transición de conformación y de la transición sol-gel de la κ -carragenina inducida por cambios de temperatura usando microcalorimetría de barrido diferencial.
5. Examinar la ultraestructura de las mezclas usando microscopía confocal de barrido láser y relacionarla con los comportamientos reológicos de los diferentes sistemas para poder explicar dichos comportamientos.
6. Determinar el estado físico y la ultraestructura de las pastas y geles resultantes a diferentes condiciones de temperatura y relacionarlos con la respuesta macroscópica de los sistemas expresada a través de sus propiedades reológicas para comprender las interacciones almidón - hidrocólide en diferentes conformaciones.

CAPÍTULO IV

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Materiales

El almidón de maíz ceroso modificado químicamente con ácido adípico y estabilizado con acetato, CLEARAM® CH10, fue proporcionado por la sociedad Roquette Frères (Lestrem, Francia). La κ -carragenina grado alimenticio fue donada por Degusa Texturant Systems (Baupte, Francia). De acuerdo con las especificaciones del donador es una carragenina extraída de *Euchema cottoni*. Investigaciones basadas en electroforesis y permeabilidad en gel han mostrado que la carragenina extraída de esta alga está formada principalmente por κ -carragenina (Marrs, 1986). Por medio de absorción atómica se determinó el contenido de sales en la muestra (Cuadro 3). Acorde con los resultados se concluye que se cuenta con una sal de K^+ .

Cuadro 3. Contenido de sales de la κ -carragenina usada en este estudio.

	K^+	Na^+	Ca^{2+}
Concentración ppm	193	157	83

Como fluorocromos se emplearon isotiocianato de fluoresceína (FITC por sus siglas en inglés) para el almidón e isotiocianato de rodamina B (RITC por sus siglas en inglés) para la κ -carragenina. El dimetilsulfóxido (DMSO), el azida de sodio (NaN_3), el dibutiltin dilaurato (DBTDL), la piridina y el KCl empleados fueron grado analítico. El azul dextrana (Sigma D5751 – 5G), $M_w = 2 \times 10^6$ fue grado analítico. Se usó agua desionizada.

4.2 Métodos

4.2.1 Cocción de las pastas y los geles de κ -carragenina–almidón–KCl

En forma individual, los geles y las pastas de almidón se prepararon mediante la dispersión de los polisacáridos en agua a temperatura ambiente y entonces se introdujeron en un recipiente de acero inoxidable que cuenta con una chaqueta de calentamiento. Una vez cerrado el recipiente, la mezcla se calentó a 92 °C a una tasa de 1.5 °C/min bajo agitación mecánica (125 rpm). Cada mezcla se mantuvo a 92 °C por 10

min y entonces se enfrió a 60 °C a una tasa de 1.5 °C/min. La temperatura se controló con un baño de recirculación con control de temperatura. Una vez a 60 °C, la mezcla se vació en un molde de aluminio, calentado previamente, formando discos de 25 mm de diámetro y 3 mm de espesor. El molde se almacenó a 4 °C por 48 horas para completar la formación del gel. En el caso de las pastas de almidón solo, éstas se prepararon en el momento previo a su evaluación. La concentración de κ -carragenina se varió de 0.01 a 1.0%, del almidón de 1 a 4% y el KCl de 0 a 300 mM.

4.2.2 Preparación de muestras para microscopia confocal de barrido láser (CLSM)

4.2.2.1 Reacción RITC- κ -carragenina

La κ -carragenina fue marcada en forma covalente con RITC empleando el procedimiento de De Belder y Granat (1973) con algunas modificaciones. Se disolvió 1 g de κ -carragenina en 50 mL de DMSO con agitación magnética a temperatura ambiente por 15 min. Se incorporaron 5 gotas de piridina, seguido por 0.06 g de RITC y 50 μ L de DBTDL. La mezcla se calentó en una parrilla con agitación magnética por 2 horas a 40 °C. Posteriormente, la RITC- κ -carragenina se precipitó con etanol (95%) y se pasó a través de un filtro de vidrio poroso (40 a 60 μ m). Entonces se deshidrató con etanol absoluto y finalmente con acetona para remover el marcador libre. La RITC- κ -carragenina se secó en una estufa a 30 °C por 24 horas. Pasado este tiempo, se disolvió en agua a 80 °C por 15 minutos y se dializó contra agua desionizada con 0.02% NaN₃ para prevenir el desarrollo microbiano hasta no observar marcador libre. Finalmente la RITC- κ -carragenina se liofilizó y se almacenó a 4 °C.

4.2.2.2 Grado de sustitución (g.s.) de RITC- κ -carragenina

El g.s. se determinó empleando el procedimiento de De Belder y Granat (1973). Se obtuvo una solución madre de RITC (10^{-6} mol/mL) mediante la disolución de 5.33 mg en 10 mL de agua desionizada y se construyó una curva estándar de RITC con lecturas de absorbancia a 557 nm en un espectrofotómetro (Genesys 10 UV, Thermo Electron Corporation, EUA). La muestra de RITC- κ -carragenina, aproximadamente 5.0 mg, se disolvió en 5 mL de agua desionizada para determinar el porcentaje de absorbancia y posteriormente la concentración por referencia a la curva estándar. El g.s. se calculó

como la relación molar de RITC por unidad de azúcar. El grado de sustitución obtenido fue de 4.18×10^{-4} mol RITC/unidad de azúcar.

4.2.2.3 Marcaje del almidón

Se utilizó FITC como marcador no covalente. Se preparó una solución de FITC (2 g/L) en una solución 50/50 de DMSO/agua desionizada a temperatura ambiente. Se observó al microscopio óptico el almidón crudo y el cocido. Este último se obtuvo calentando una suspensión con 1% de almidón con 12.5 $\mu\text{L/g}$ de la solución de marcador. La suspensión de almidón-fluorocromo se calentó de 25 a 92 °C con una tasa de 1.5 °C/min. Una vez alcanzada esta temperatura, se mantuvo por 10 min para después enfriar a 25 °C a una tasa de 1.5 °C/min. En algunos casos se realizaron diluciones de la suspensión de almidón de 1 en 100 con el fin de observar los gránulos en forma aislada.

4.3 Mediciones

4.3.1 Hinchamiento, solubilidad y fracción volumen

Estas determinaciones se hicieron 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 se determinaron de acuerdo con el procedimiento descrito en la literatura (Tecante y 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. Se enfrió rápidamente la dilución a 25 °C y se centrifugaron 8 mL de ésta a 700g durante 15 minutos (Leach *et al.*, 1959) en una centrífuga (Hermle Z200A, Labnet, EUA). Los restantes 8 mL se secaron en una estufa durante 24 horas a 100 °C para obtener la masa de almidón seco. Se calculó la solubilidad, [S], referida a la masa de almidón seco, a partir de la concentración de almidón soluble en el volumen total de sobrenadante, la cual se determinó empleando el método de fenol-sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956), el cual cuantifica la cantidad de azúcares totales. El hinchamiento del gránulo, H, se calculó a partir de la masa de residuo de la concentración y la masa de almidón seco. Se calculó la fracción volumen, ϕ , a partir de la relación $\phi = (1 - S/100)cH$ (Doublier, 1981), donde c es la concentración inicial de almidón.

Adicionalmente, se empleó el método de azul dextrana (Ellis *et al.*, 1989). 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 azul dextrana ($M_w = 2 \times 10^6$) en un matraz de boca ancha. La mezcla se agitó varias veces y se tomaron alícuotas de 10 g para separar los gránulos a 10000g por 5 min en una centrífuga (Hermle Z 200A, Labnet, EUA). El sobrenadante fue separado y se leyó su absorbancia a 620 nm en un espectrofotómetro (Genesys 10 UV, Thermo Electron Corporation). Previamente se obtuvo una curva de calibración estándar preparada con azul dextrana con ocho concentraciones diferentes (c_{ad}) en un intervalo de 0.01 a 0.1% (m/v) ($c_{ad} = -1.87 \times 10^{-4} + 0.117(\% \text{Absorbancia})$, $r^2 = 0.999$). Todas las mediciones se hicieron por triplicado.

El hinchamiento se calculó como:

$$H = \frac{m_b + m_d}{m_d} \quad (3)$$

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:

$$m_b = m_t - m_{ad} \times 0.1 / c_{ad} \quad (4)$$

donde m_t es el peso total de agua (agua en la dispersión del almidón + agua en la solución de azul dextrana) (g); m_{ad} es el peso de la solución 0.1% de azul dextrana (g); c_{ad} es la concentración de azul dextrana en el sobrenadante (%). El término $m_{ad} \times 0.1 / c_{ad}$ toma en cuenta el agua intersticial entre los gránulos de almidón.

4.3.2 Distribución de tamaño de partícula

Se realizó por quintuplicado a temperatura ambiente (25 °C) empleando un equipo de difracción de rayo láser (Malvern Master SizerS 2000, Malvern Instruments, Ltd) y una unidad de dispersión (Hydro 2000 MU). Una vez preparada la pasta y enfriada a 60 °C, la mezcla κ -carragenina–almidón–KCl 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 subsiguiente del almidón. En algunos casos en que la concentración de KCl fue inferior de 5 mM se hicieron diluciones isoiónicas a fin de comparar si la dilución afecta la medición de tamaño de partícula. Posteriormente, 10 mL de la dilución 1 en 10 se dispersaron en 800 mL de agua desionizada en el módulo Hydro

2000 MU, obteniendo una concentración final de almidón del orden de $5 \times 10^{-3}\%$ m/v y de 1.25×10^{-6} a $1.1 \times 10^{-3}\%$ m/v para la κ -carragenina. Los resultados se muestran como el diámetro mediano $D[v, 0.5]$.

4.3.3 Microcalorimetría de barrido diferencial

Se analizó el efecto de K^+ (de 0 a 300 mM KCl) en la temperatura y entalpía de gelatinización del almidón en un calorímetro TA Instruments modelo 2010 (TA Instruments, New Castle, DE) previamente calibrado con Indio. Se pesaron 2 mg de muestra (en base seca) directamente en el portamuestra de aluminio y se adicionó una solución de K^+ con la concentración de KCl requerida con una microjeringa para hacer una suspensión líquida del 70% masa. Después de sellar el portamuestra se dejó equilibrar por 24 horas a temperatura ambiente y se calentó de 30 a 100 °C a una tasa de 1 °C/min. Como referencia, se empleó una charola con igual cantidad de solución y concentración de KCl que la muestra.

Se rastreó la transición gel-sol de mezclas κ -carragenina–almidón de maíz ceroso reticulado-KCl en un micro calorímetro Setaram DSC III (Setaram, Francia). Una masa (500 mg) de una mezcla de κ -carragenina–almidón–KCl a 60 °C recién preparada se colocó en una celda de acero inoxidable y se selló herméticamente. Se empleó una solución de KCl a la misma concentración que en la mezcla como referencia con una diferencia en peso de ± 10 mg contra el peso de la muestra. Las muestras fueron calentadas de 5 a 90 °C a 1 °C/min y enfriadas a 5 °C a la misma tasa en dos ciclos de calentamiento - enfriamiento para caracterizar el material.

4.3.4 Microscopia

4.3.4.1 Microscopia de luz transmitida y polarizada

Una vez obtenidas las pastas a 25 °C, éstas se diluyeron en una proporción 1 en 10 y se colocó una gota de la dilución sobre un portaobjetos. Se adicionó una gota de Lugol (Sigma Chemicals) y se colocó un cubre objetos. Los gránulos de almidón se observaron a través de una cámara de alta resolución adaptada a un microscopio Olympus BX (Japón) con los objetivos 10 y 40x. La captura de imágenes se realizó con el apoyo del programa Image-Pro Plus Ver .1.00 (Media Cybernetics, L.P.). Las imágenes de luz

polarizada se obtuvieron en observación directa de los gránulos nativos sin cocer usando un filtro de luz polarizada (BX45-PO).

4.3.4.2 Microscopia confocal de barrido láser

La microscopia confocal de barrido láser (CLSM, por sus siglas en inglés) se realizó con un microscopio BioRad RS 1024 con un láser de Ar/Kr en modo fluorescente con objetivos de inmersión de agua (40x). Las muestras recientemente preparadas se colocaron entre el porta y el cubreobjetos previamente calentados para posteriormente sellarlos con barniz para uñas. Las muestras se almacenaron durante 24 h a temperatura ambiente previamente a la observación al microscopio con el fin de asegurar la difusión del colorante en el gránulo de almidón. Las observaciones en CLSM fueron a temperatura ambiente. Las longitudes de onda de excitación/emisión fueron 543/575 a 640 y 488/510 a 565 nm para el RITC y el FITC, respectivamente. Se obtuvieron las imágenes tradicionales en 2D de las muestras con una resolución de 512 x 512 píxeles y se almacenaron en un formato TIF así como proyecciones en tercera dimensión.

4.3.5 Cizalla estacionaria y cizalla oscilatoria de baja amplitud

4.3.5.1 Propiedades reológicas del almidón de maíz

Se realizaron pruebas de cizalla angular estacionaria en almidón solo a 9, 25 y 60 °C en un reómetro de deformación controlada (ARES-RFS III, TA Instruments, EUA). La geometría empleada fue de cilindros concéntricos de doble pared (altura = 31.98 mm, espacio anular interno = 0.78 mm, espacio anular externo = 1 mm). Una vez cocida la pasta se colocó en la geometría del reómetro estabilizado previamente a la temperatura de medición. Se realizaron dos barridos consecutivos de ascenso-descenso de 0 a 300 s⁻¹ en forma logarítmica, seguidos por un último ascenso lineal de 0 a 300 s⁻¹ en un tiempo total de 12 minutos. De manera complementaria, se realizaron pruebas de cizalla oscilatoria de baja amplitud mediante la aplicación de barridos de deformación y frecuencia en un intervalo de 0.1 a 100 rad/s en la zona de viscoelasticidad lineal. En cada prueba se empleó una nueva alícuota de la pasta de almidón. Las concentraciones de almidón fueron del 1 al 4%.

4.3.5.2 Cinéticas de gelificación de κ -carragenina

Las concentraciones de polímero fueron 0.1, 0.5 y 1% masa con KCl de 0 a 300 mM. Las soluciones se prepararon disolviendo inicialmente el KCl y dispersando la κ -carragenina a temperatura ambiente. La dispersión se calentó a 80 °C y permaneció a esta temperatura por 15 min. La transición sol-gel se determinó bajo condiciones de deformación de baja amplitud en un reómetro de deformación controlada (ARES-RFS III, TA Instruments, EUA). La solución caliente se examinó en placas paralelas estriadas (20 mm de diámetro y 1 mm de separación) previamente equilibrados a 80 °C. El borde de las placas se cubrió con parafina líquida para prevenir la evaporación. Se examinó el cambio de G' y G'' durante el enfriamiento (2.5 °C/min) a 25 °C y 1 Hz en la zona de viscoelasticidad lineal. La extensión de esta zona dependió de la concentración de polímero y de la sal. Una vez a 25 °C, se determinaron las propiedades viscoelásticas bajo condiciones de deformación oscilatoria de baja amplitud de 0.1 a 100 rad/s. Finalmente, las muestras se calentaron (3 °C/min) a 80 °C. La temperatura se controló con un baño de circulación (FS18-MV, Julabo, Ltd, Alemania). La zona de viscoelasticidad lineal se determinó con barridos de deformación a temperatura constante. Se analizó la aplicación del método de Winter y Chambon, (Winter y Chambon, 1986) así como el procedimiento de ángulo de fase crítico (Doublrier y Cuvelier, 1996) para determinar la temperatura de transición y la dependencia de G' y G'' con la frecuencia en un intervalo de 80 a 10 °C.

La transición desorden–orden se analizó en soluciones 0.3 y 0.4% de κ -carragenina sin la incorporación de KCl. Se hicieron barridos de temperatura de 25 a 9 y de 9 a 25 °C en un reómetro de deformación controlada (ARES RFS II, Rheometrics, EUA) empleando una geometría de cono y plato ($\phi = 50$ mm, ángulo = 0.04 rad) a 1 rad/s y una deformación constante en la zona de viscoelasticidad lineal para el intervalo de temperaturas manejado. Se obtuvieron los espectros mecánicos de las soluciones a 25 y 9 °C mediante barridos de frecuencia de 0.1 a 100 rad/s en la zona de viscoelasticidad lineal. La geometría fue cubierta con parafina líquida para evitar la evaporación.

4.3.5.3 Viscosidad intrínseca y masa molecular promedio

Se combinaron los modelos de Huggins, de Kraemer y de un solo punto:

Ecuación de Huggins (Launay *et al.*, 1997):

$$\frac{\eta_{sp}}{c} = [\eta_0] + k_1 [\eta_0]^2 \times c \quad (5)$$

donde η_{sp} es la viscosidad específica = $(\eta - \eta_s) / \eta_s$ y k_1 es la constante de Huggins y es adimensional.

Ecuación de Kraemer (Torres *et al.*, 1993):

$$\frac{\ln(\eta_{rel})}{c} = [\eta_0] - k_2 [\eta_0]^2 \quad (6)$$

donde η_{rel} es la viscosidad relativa = η_{sp} / c y k_2 es la constante de Kraemer [g/dL]

Un solo punto (Chronakis *et al.*, 2000):

$$[\eta] = \frac{[2(\eta_{sp} - \ln \eta_{rel})]^{1/2}}{c} \quad (7)$$

La viscosidad intrínseca se relacionó con la masa molecular promedio mediante la ecuación de Mark-Houwink:

$$[\eta_0] = kM_w^a \quad (8)$$

Las constantes empleadas fueron $a = 0.95$ y $k = 3.1 \times 10^{-5}$ (Rochas y Landry, 1987) en una solución acuosa 0.1 N de NaCl + 0.005 M de EDTA a 25 °C.

4.3.5.4 Cizalla angular estacionaria y mediciones oscilatorias de baja amplitud en soluciones de κ -carragenina a 9 °C

Se empleó un viscosímetro de baja deformación (Low Shear 40, Contraves, Switzerland) para evaluar el efecto de C_T sobre la viscosidad intrínseca $[\eta]$ de la κ -carragenina. Las soluciones de κ -carragenina fueron cizalladas de 7 a 100 s^{-1} en una geometría de cilindros coaxiales ($\Phi_{interno} = 5.5$ mm, $\Phi_{externo} = 6.0$ mm). Las pruebas se

realizaron a 9 °C a las concentraciones de 0.0029, 0.0043, 0.0058 y 0.0072 eq/L de acuerdo con el diagrama de transición sol– gel (Figura 23). Esta figura muestra la concentración iónica total, C_T , empleada y las concentraciones máximas de κ -carragenina necesarias para obtener los valores de C_T . Las soluciones de κ -carragenina a C_T constante se obtuvieron con la mezcla de una solución madre con 0.5% de κ -carragenina y 10 mM de KCl preparadas previamente. La solución madre de κ -carragenina se preparó con la dispersión de la cantidad necesaria de polisacárido, en base seca, a temperatura ambiente en una parrilla de calentamiento con agitación magnética, seguida de calentamiento a 92 °C por 20 min (Chronakis *et al.*, 2000). Posteriormente la solución se dejó enfriar a temperatura ambiente en forma natural.

Las muestras de concentración iónica constante fueron evaluadas en un reómetro de deformación controlada (ARES RFS II, Rheometrics, EUA) empleando una geometría de cono y plato ($\phi = 50$ mm, ángulo = 0.04 rad). Se obtuvieron los espectros mecánicos de las soluciones a 9 °C mediante barridos de frecuencia de 0.1 a 100 rad/s en la zona de viscoelasticidad lineal. La geometría fue cubierta con parafina líquida para evitar la evaporación.

4.3.5.5 Propiedades reológicas de mezclas κ -carragenina–almidón–KCl

El estudio reológico de las mezclas κ -carragenina–almidón–KCl incluye el comportamiento reológico a tres temperaturas diferentes con el objetivo de tener las diferentes conformaciones de la κ -carragenina, esto es: hebra aleatoria (60 °C), hélice sin formar agregados (9 °C) y gel (25 °C). La Figura 23 presenta el diagrama de transición sol-gel de κ -carragenina con las líneas verticales indicando estas temperaturas, y sobre las líneas, las concentraciones de KCl usadas en cada temperatura para una concentración de κ -carragenina de 0.5% masa, de tal manera que sea fácil ubicar el estado físico de este biopolímero.

En el caso de las pastas a 60 y 9 °C se empleó una geometría de cilindros concéntricos de doble pared (altura = 31.98 mm, espacio anular interno = 0.78 mm, espacio anular externo = 1 mm). Se obtuvieron los barridos de frecuencia dentro de la zona de viscoelasticidad lineal determinada previamente para cada mezcla. Los geles individuales se examinaron en un reómetro de baja amplitud de deformación controlada (ARES-RFS III, TA Instruments, EUA) empleando placas paralelas estriadas con un

diámetro de 25 mm y 3 mm de altura, previamente estabilizados a 25 °C. Se determinó la variación de G' y G'' con la frecuencia (0.1 a 100 rad/s) en la zona de viscoelasticidad lineal previamente encontrada en un barrido de deformación. La extensión de esta zona dependió de la concentración de almidón y de KCl.

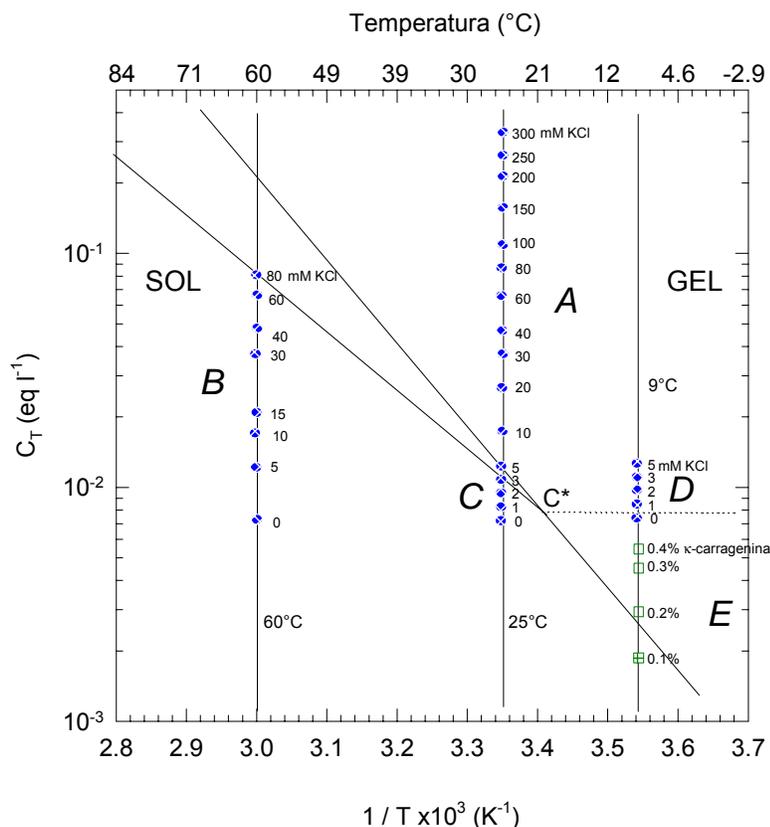


Figura 23. Representación de las condiciones experimentales de concentración iónica total y de temperatura usadas en este trabajo para κ -carragenina 0.5% (círculos) y κ -carragenina sola sin KCl, en el diagrama de transición sol-gel de la sal de potasio de la κ -carragenina (Rochas, 1982).

CAPÍTULO V

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Propiedades de la κ -carragenina

5.1.1 MicroDSC

5.1.1.1 Concentración iónica total superior a la concentración iónica crítica ($C_T > C^*$)

Las señales de calentamiento y enfriamiento fueron reproducibles durante el primero y el segundo barridos de temperatura y por ello solamente se reporta el segundo ciclo. La Figura 24 muestra los termogramas de disoluciones con 0.5% de κ -carragenina con concentraciones de KCl de 0 a 80 mM (condiciones B en la Figura 23). Solamente se observó un pico “endo” y uno “exo” durante el enfriamiento y el calentamiento, respectivamente. Durante el calentamiento, los puentes de hidrógeno se rompen y las dobles hélices cambian su conformación, dando origen a la fusión de agregados y al rompimiento de la red. La transición ocurre sobre un intervalo de temperaturas. La temperatura máxima (T_{max}) fue tomada como la temperatura de transición gel-sol o fusión, T_{fus} , (Figura 24a). Durante el enfriamiento, (Figura 24b), la transición de hebra aleatoria a hélice ocurre en forma exotérmica, dando origen a la formación de un gel a la temperatura de transición sol-gel o temperatura de gelificación, T_{gel} , representada por la T_{max} en la señal de DSC. La diferencia entre T_{fus} y T_{gel} 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). Los resultados muestran que la agregación ocurre cuando los iones K^+ se adicionan a la κ -carragenina, lo que hace que T_{fus} sea mayor que T_{gel} para la misma concentración de KCl, para todas las concentraciones de sal. La histéresis térmica también se ha reportado para κ -carragenina con y sin la adición de KCl aunque para concentraciones de polímero de 1 a 4% con 0, 27, 54 y 80 mM de KCl (Kara *et al.*, 2003). Como en el caso de la gelana, cuyo mecanismo de gelificación es muy similar al de la κ -carragenina, la histéresis se puede asociar con la existencia de diferentes niveles de energía entre las hélices empacadas (Milas y Rinaudo, 1996).

La Figura 25 muestra la variación de T_{fus} , T_{gel} , ΔH_{fus} , y ΔH_{gel} con la concentración de KCl durante el enfriamiento y el calentamiento de una solución con 0.5% de κ -carragenina. Las T_{fus} y T_{gel} fueron diferentes y aumentaron con el incremento de la concentración de KCl (Figura 25a).

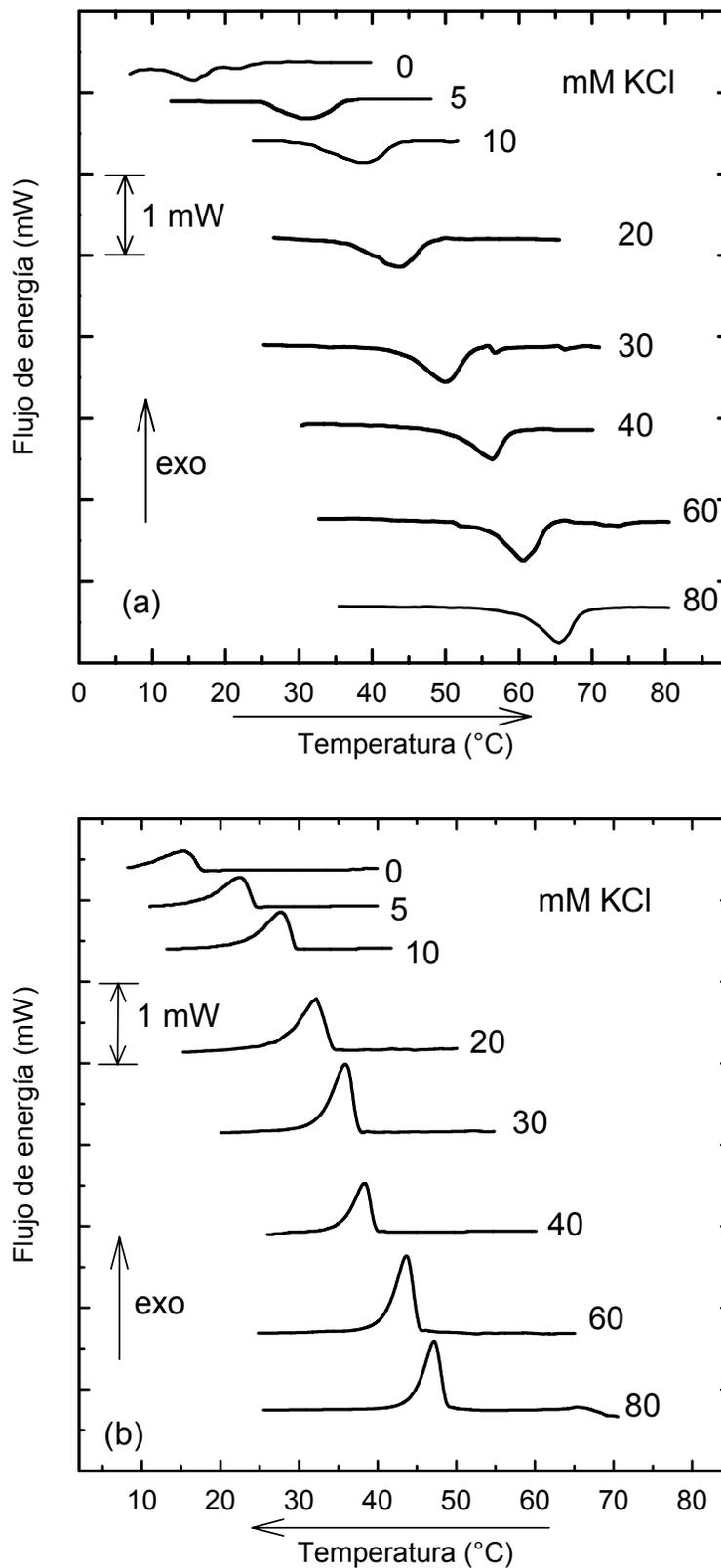


Figura 24. Termogramas de calentamiento (a) y de enfriamiento (b) de disoluciones con 0.5% de κ -carragenina con diferentes concentraciones de KCl. Tasa de calentamiento y enfriamiento = 1 °C/min.

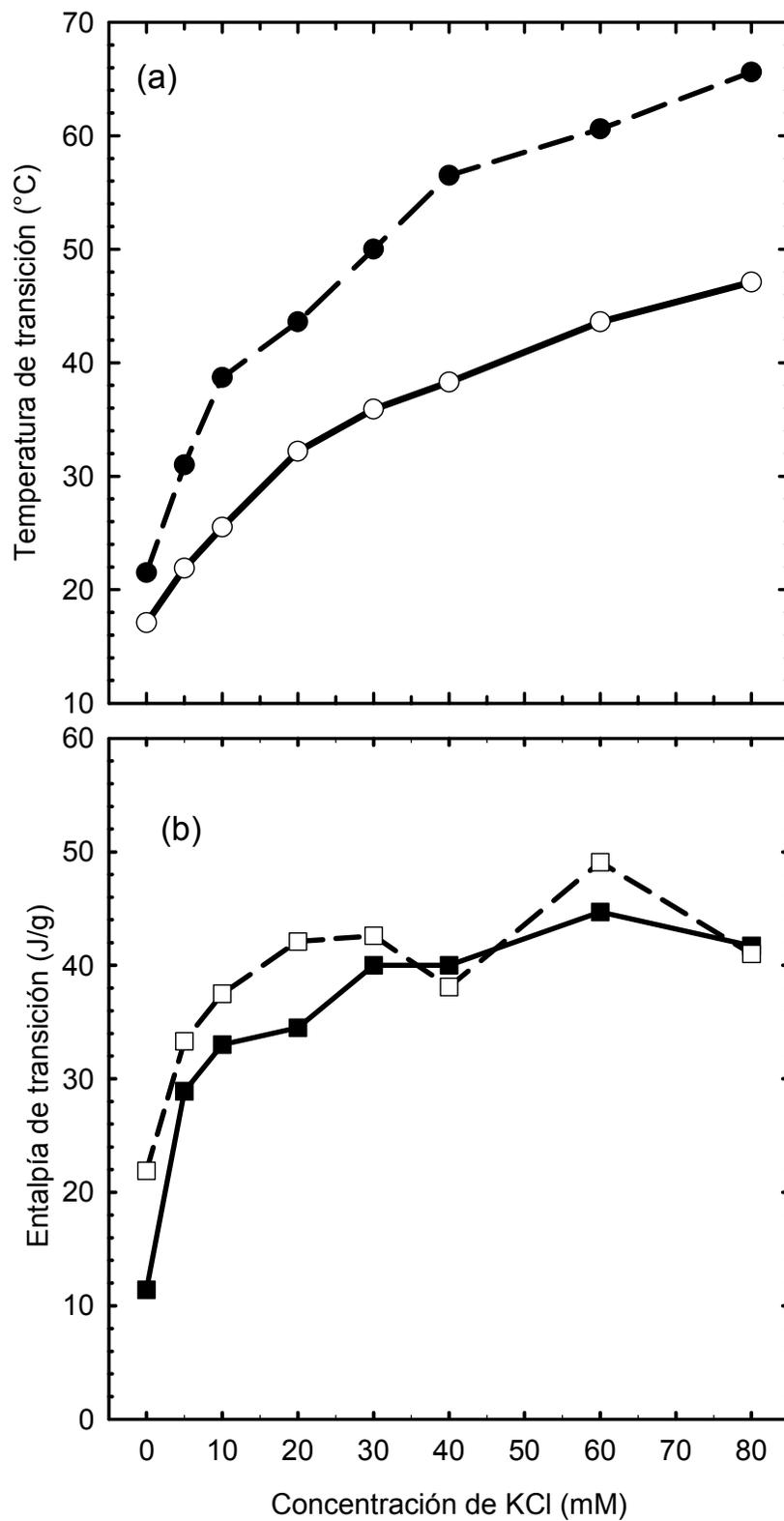


Figura 25. Variación de la temperatura (a) y de la entalpía de transición (b) con la concentración de KCl durante la fusión (símbolos negros) y la gelificación (símbolos vacíos) de disoluciones con 0.5% de κ -carragenina.

Los segmentos de hélices agregadas de κ -carragenina pueden dar origen a una diferencia de hasta 10 °C en T_{fus} sobre los segmentos de hélices aisladas no agregadas (Rochas y Rinaudo, 1982). Un incremento en la concentración de KCl también puede producir una histéresis térmica mayor. Este hecho sugiere que el número de zonas de interacción aumenta con el incremento de la concentración de KCl. La variación de las entalpías de gelificación, ΔH_{gel} y de fusión, ΔH_{fus} , fue similar (Figura 25b). ΔH_{gel} fue ligeramente mayor que ΔH_{fus} porque la agregación de dobles hélices libera más energía que la requerida para fundir los agregados como se observó por transmisión de fotones de κ -carragenina con iones K^+ (Kara *et al.*, 2003). Este tipo de polisacáridos exhibe una relación lineal entre $\log C_T$ y T_{fus}^{-1} (Rinaudo, 2001), donde C_T es la concentración iónica total (eq/L) calculada como $C_s + \bar{\gamma} C_p$, donde C_s es la concentración iónica debido al contenido de sal (iones inherentes al polímero más la añadida), C_p es la concentración iónica del polímero (eq/L) y $\bar{\gamma}$ es el coeficiente de actividad promedio, 0.55 para la sal de potasio de la κ -carragenina (Rochas, 1982). La pendiente es particular para cada polisacárido y sal añadida. Nuestros datos tuvieron una pendiente de -3284 K para el enfriamiento, mientras que Boutebba *et al.* (1997) reportaron una pendiente de -14600 K para succinoglucana y Rinaudo (2001) reportó una pendiente de -2000 K para la sal de sodio de la xantana. Para la sal de potasio de la κ -carragenina, se ha reportado (Rochas, 1982) una pendiente de -8080 K, a partir de la gráfica $\ln C_T$ vs T_{fus}^{-1} , la cual corresponde a -3415 K cuando se usa $\log C_T$.

5.1.1.2 Concentración iónica total cercana a la concentración iónica crítica ($C_T \approx C^*$)

Considerando que la $C^* \approx 0.007$ eq/L (Rochas, 1982), se incorporaron bajas concentraciones (0 a 5 mM) de KCl para que la C_T de disoluciones con 0.5% de κ -carragenina fuera cercana a la C^* (condiciones C en la Figura 23). La Figura 26 muestra los termogramas en estas soluciones. De manera similar al caso anterior, ambos procesos térmicos mostraron un incremento tanto de T_{ini} como T_{max} cuando la concentración de KCl aumentó. El proceso de enfriamiento mostró un solo pico “exo”, sin embargo, el calentamiento o fusión mostró en forma general dos picos “endo”. Se ha reportado la presencia de dos picos en el termograma de calentamiento de κ -carragenina 1% sin la adición de KCl (Nayouf, 2003). En la señal correspondiente al calentamiento de κ -carragenina sola (0 mM de KCl), el área del primer pico (de izquierda a derecha) es

mayor que la del segundo pico lo que produce una entalpía mayor, 0.59 J/g, para la primera transición que para la segunda cuya entalpía es de 0.01 J/g (Cuadro 4)

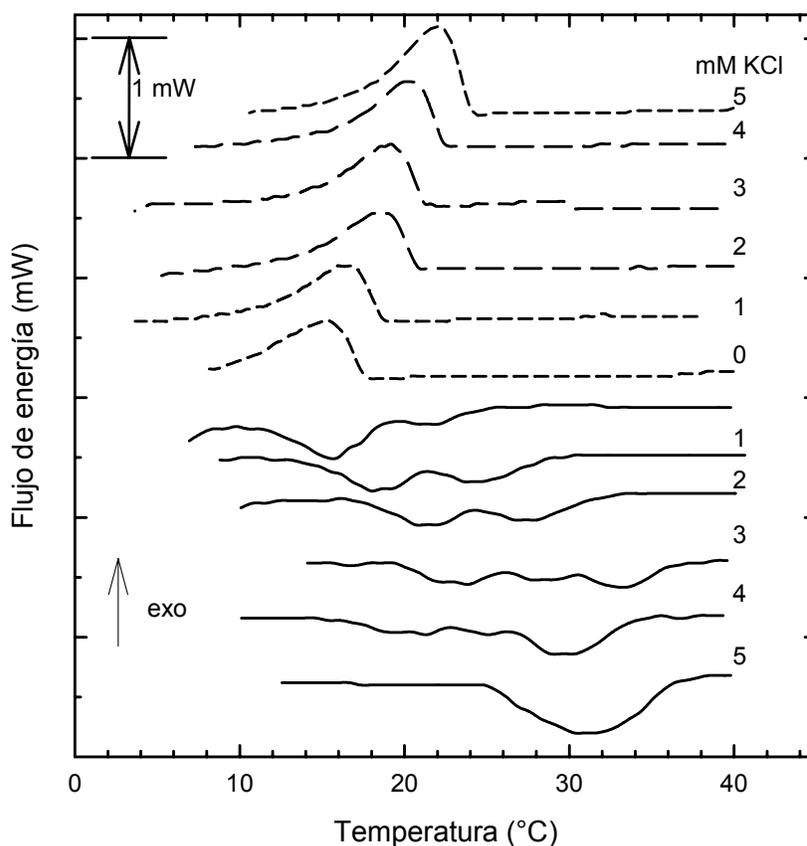


Figura 26. Efecto de la concentración de ion K^+ sobre la transición sol-gel de κ -carragenina 0.5% cuando C_T es muy próxima a C^* . Calentamiento (líneas continuas), enfriamiento (líneas punteadas).

El primer pico podemos atribuirlo a la transición de hélice a hebra aleatoria y el segundo pico a la fusión de los agregados de hélices presentes en pequeña cantidad (Milas y Rinaudo, 1996). La pequeña cantidad de hélices que forman agregados se debe a la presencia de iones K^+ inherentes a la κ -carragenina. Cuando la concentración de K^+ aumentó, las áreas se invirtieron hasta aparecer un solo pico a 5 mM KCl con la respectiva histéresis térmica. Este fenómeno indica, que en estas condiciones, toda la κ -carragenina existente en la solución se encuentra en una conformación de dobles hélices formando agregados con la respectiva gelificación. Ikeda *et al.* (2001) concluyeron que aún en ausencia de agentes promotores de la agregación de las dobles hélices de κ -carragenina, éstas parecen ser capaces de asociarse y formar geles. Sin embargo, estos resultados (Fig. 26) permiten observar que, aunque exista la suficiente cantidad de κ -

carragenina para formar una estructura ordenada de dobles hélices, es necesaria la presencia de una cantidad mínima de K^+ para que las dobles hélices puedan agregarse. Esto no contrapone a las observaciones hechas por Ikeda *et al.* (2001) porque esto se da en concentraciones elevadas (2% κ -carragenina) como se mostrará más adelante (sección 5.3.2.1). La gelana, polisacárido con un mecanismo de gelificación similar al de la κ -carragenina, presenta dos picos durante el calentamiento (Nishinari, 1996; Miyoshi *et al.*, 1996) para concentraciones de polisacárido mayores de 3.2%, sin embargo presenta un pico por abajo de este valor (Miyoshi *et al.*, 1996; Mazen *et al.*, 1999), lo que sugiere que la concentración crítica para la formación de una red tridimensional es cercana al valor indicado.

Cuadro 4. Temperaturas de fusión y de gelificación de κ -carragenina 0.5% cuando la concentración iónica total es muy próxima a la concentración iónica crítica.

Concentración de KCl (mM)	Enfriamiento			Calentamiento		
	T_{ini} (°C)	T_{gel} (°C)	ΔH_{gel} (J/g) [†]	T_{ini} (°C)	T_{fus} (°C)	ΔH_{fus} (J/g) [*]
0	19.2	16.2	-20.92	11.7 y 19.7 ^{**}	15.8 y 21.8 ^{**}	0.59 y 0.01 ^{**}
1	19.8	17.7	-28.50	14.0 y 22.0 ^{**}	18.1 y 24.9 ^{**}	0.04 y 0.03 ^{**}
2	21.0	18.3	-28.84	17.5 y 21.9 ^{**}	21.1 y 24.8 ^{**}	0.04 y 0.03 ^{**}
3	21.8	19.8	-27.88	19.5 y 27.0 ^{**}	22.4 y 29.1 ^{**}	0.02 y 0.26 ^{**}
4	22.8	20.8	-30.80	16.8 y 26.9 ^{**}	19.1 y 30.4 ^{**}	0.02 y 0.26 ^{**}
5	25.4	31.0	-33.28	25.2	31.0	0.14

* Por gramo de κ -carragenina en peso seco.

** Para el primero y el segundo pico, respectivamente.

† Por convención el signo negativo indica un proceso exotérmico.

5.1.1.3 Concentración iónica total inferior a la concentración iónica crítica ($C_T < C^*$)

La Figura 27 muestra los termogramas de sistemas con 0.3 y con 0.4% de κ -carragenina (condiciones E en la Figura 23). Como en los casos previamente descritos, durante el enfriamiento existe un solo pico “exo”, y en este caso particular, pese a tratarse de κ -carragenina sin la incorporación de K^+ , se presentó sólo un pico “endo” durante la fusión. El valor de T_{max} fue mayor para 0.4% que para 0.3% de κ -carragenina. De acuerdo

con el diagrama de transición sol-gel, cuando $C_T < C^*$, existe una transición orden-desorden (dobles hélices-hebra aleatoria) de la κ -carragenina sin la agregación de las dobles hélices y por ende no hay formación de la red tridimensional. En estas condiciones, las propiedades térmicas dejan de considerarse como fusión y gelificación para transformarse únicamente en temperatura y entalpía de transición orden-desorden (T_{o-d} y ΔH_{o-d}) y desorden-orden (T_{d-o} y ΔH_{d-o}). Para tal efecto, se consideró la T_{max} como la temperatura de transición. El Cuadro 5 muestra las temperaturas de transición para estas dos disoluciones. Nayouf (2003) reportó una temperatura $T_{d-o} = 14.8$ y $T_{o-d} = 18.3$ °C en una solución con 0.44% de κ -carragenina. Estos valores son cercanos a los obtenidos en este trabajo. Considerando que en estas condiciones no existe la agregación de dobles hélices, las entalpías durante el enfriamiento y el calentamiento son similares, sin embargo, no existió una diferencia significativa ($\alpha = 0.05$) entre las dos concentraciones de κ -carragenina.

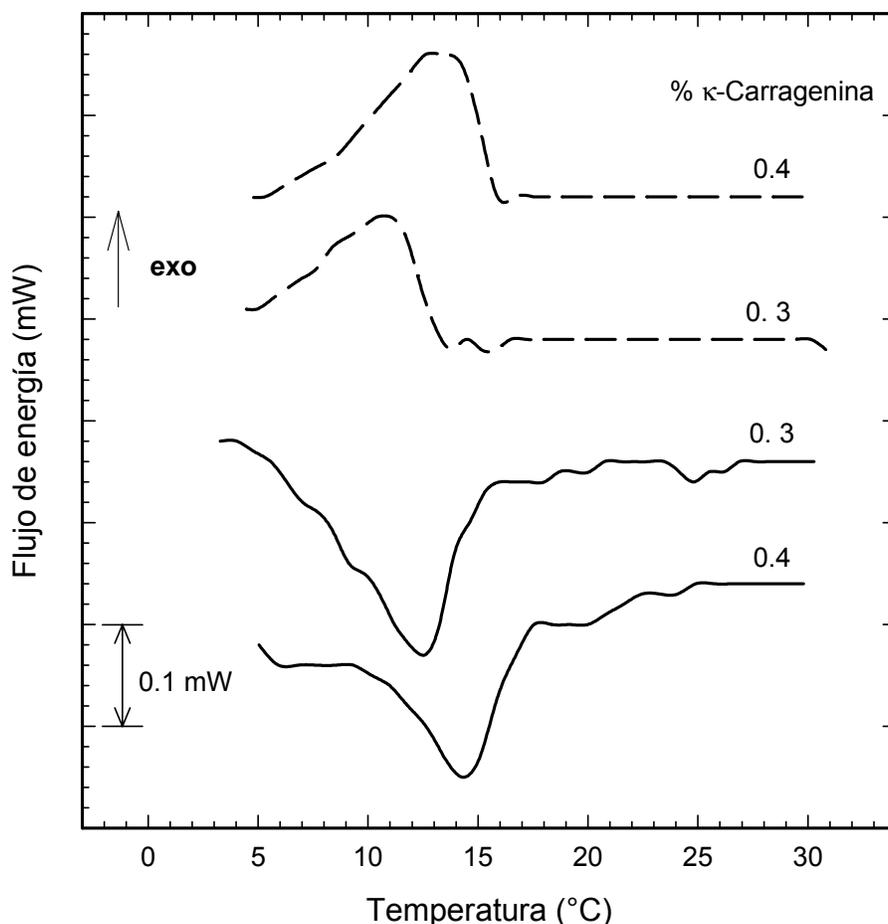


Figura 27. Transición orden-desorden de κ -carragenina cuando $C_T < C^*$. Calentamiento (líneas continuas), enfriamiento (líneas punteadas). Tasa = 1 °C/min.

Cuadro 5. Temperaturas de transición orden–desorden de κ -carragenina cuando la concentración iónica total es inferior a la concentración iónica crítica.

κ -carragenina (% masa)	Enfriamiento		Calentamiento	
	T_{d-o} (°C)	ΔH_{d-o} (J/g)*	T_{o-d} (°C)	ΔH_{o-d} (J/g)*
0.3	10.44	-11.07	12.34	11.25
0.4	13.34	-11.22	14.25	10.73

* Por gramo de κ -carragenina en peso seco.

Chronakis *et al.* (2000) reportaron $T_{o-d} = 55$ °C y $\Delta H_{o-d} = 12.3$ kJ/mol de polímero (30.15 J/g) para una solución con 0.35% de κ -carragenina en 0.2 M de NaI, mientras que para 0.4% de ι -carragenina, $T_{o-d} = 61$ °C y $\Delta H_{o-d} = 14.9$ kJ/mol (36.12 J/g). Al comparar estos valores con los obtenidos en este trabajo, se concluye que las propiedades térmicas son afectadas significativamente por la naturaleza y concentración del contraión que interactúa con la κ -carragenina así como con el tipo de carragenina.

Por otro lado, el ΔH_{o-d} de κ -carragenina es independiente de la concentración de este polisacárido en un intervalo de concentraciones de 0.35 a 1.6% (Chronakis *et al.*, 2000). Con estos resultados se confirmó la necesidad de tener una concentración iónica total mínima para tener la agregación de las dobles hélices y la respectiva conformación de una red tridimensional. Nuestros resultados indican que la κ -carragenina se encuentra en una conformación ordenada a bajas temperaturas y esta conformación depende de la concentración del polisacárido debido a la existencia de un solo pico durante el calentamiento así como la inexistencia de histéresis térmica en los procesos de calentamiento - enfriamiento.

5.1.2 Determinación de la temperatura de gelificación de κ -carragenina por diversos métodos reológicos

5.1.2.1 Análisis de la variación de G' y G'' con la frecuencia y la temperatura

La Figura 28a muestra la variación de los módulos dinámicos con la frecuencia desde 38.6 hasta 42.7 °C para una solución con 0.5% de κ -carragenina con 40 mM de KCl. Estos datos fueron tratados de acuerdo con el procedimiento de Winter y Chambon (1986). A 42.7 y 41.2 °C el comportamiento reológico fue típico de una solución macromolecular con $G'' > G'$ y ambos módulos dependientes de la frecuencia (Ferry,

1980). A 40.8 °C, ambos módulos fueron prácticamente iguales por arriba de 10 rad/s ($\tan \delta \approx 1.0$, Figura 28c). A 39.6 y 38.6 °C, apareció el comportamiento característico de un gel con $G' > G''$, $\tan \delta = 0.2$ a 0.4 y 0.05, respectivamente (Figura 28c), y ambos módulos con una baja dependencia de la frecuencia ($G' \sim \omega^{0.2}$). Las disoluciones con 1% de κ -carragenina sin la adición de sal exhibieron un comportamiento similar durante la transición sol-gel (Figura 28b). Sin embargo, a la temperatura de transición de 22.3 °C, ambos módulos fueron menores que para 0.5% de κ -carragenina con adición de K^+ . Esto muestra que la cantidad de agregados existentes con 0.5% de κ -carragenina + 40 mM de KCl es mayor que con 1% de κ -carragenina sin K^+ añadido. A 24.2 °C, la solución con 1% de κ -carragenina mostró el comportamiento de una solución macromolecular, mientras que a 22.3 °C ambos módulos son muy cercanos entre sí ($\tan \delta = 1.0$, Figura 28d). Por debajo de 22.3 °C, G' es mayor que G'' y ambos módulos dependen ligeramente de la frecuencia (G' y $G'' \propto \omega^{0.25}$). Estos resultados son acordes al comportamiento reportado para 1% κ -carragenina entre 20 y 5 °C (Chen *et al.*, 2002). Cerca del punto de gelificación, la variación de G' y G'' con la frecuencia obedecen la ley de la potencia.

El exponente de la ley de la potencia fue calculado a partir de los espectros mecánicos para ambas concentraciones de κ -carragenina. La Figura 29a muestra la variación del exponente de la ley de la potencia con la temperatura durante el enfriamiento de 0.5% de κ -carragenina + 40 mM de KCl. A 38.6 °C, el valor del exponente ley de la potencia fue menor porque a esta temperatura se forma un gel en el cual, como se esperaba, los módulos dinámicos fueron prácticamente independientes de la frecuencia (Ferry, 1980). El exponente del modelo ley de la potencia se incrementó significativamente con la temperatura; alrededor de 40.8 °C, fue igual con 0.62 y los módulos se cruzan proporcionando el valor de n para este sistema. Los datos mostraron que el exponente del modelo ley de la potencia no es constante, pero cerca de la transición sol-gel, su valor se incrementa rápidamente con la temperatura. Por ejemplo, pasó de 0.1 a 39.6 °C a 0.8 a 42°C.

De acuerdo con el criterio de Winter y Chambon (1986), en el punto crítico de gelificación, G' y G'' muestran la misma dependencia del modelo ley de la potencia en un amplio intervalo de frecuencia y n se obtiene a partir de un espectro mecánico en particular, como G' y $G'' \sim \omega^n$, podría coincidir con la n obtenida a partir de la condición: $\tan \delta = G''/G' = \text{constante} = \tan (n\pi/2)$. Sin embargo, como se muestra en el espectro mecánico a 40.8 °C (triángulos en la Figura 28a) G' y G'' mostraron una baja dependencia

con la frecuencia y en consecuencia, la $\tan \delta$ varió de 0.6 a 0.9 (Figura 28c). Un análisis similar para la solución 1 % κ -carragenina (Figura 29b) produjo un exponente del modelo ley de la potencia menor a 0.3 para temperaturas menores de 20 °C. Este valor indica una ligera dependencia de G' y G'' con la frecuencia para esos geles, mientras que a 24 °C, el exponente se incrementó rápidamente para ambos módulos. A 22.1 °C, tomando la temperatura de gelificación de acuerdo con el criterio de Winter y Chambon (1986), G' y G'' tienen el mismo exponente, $n = 0.48$. Sin embargo, el espectro mecánico para el cual la $\tan \delta$ fue independiente de la frecuencia con $\tan \delta = 1.0$ (Figura 28d) fue de 22.3 °C.

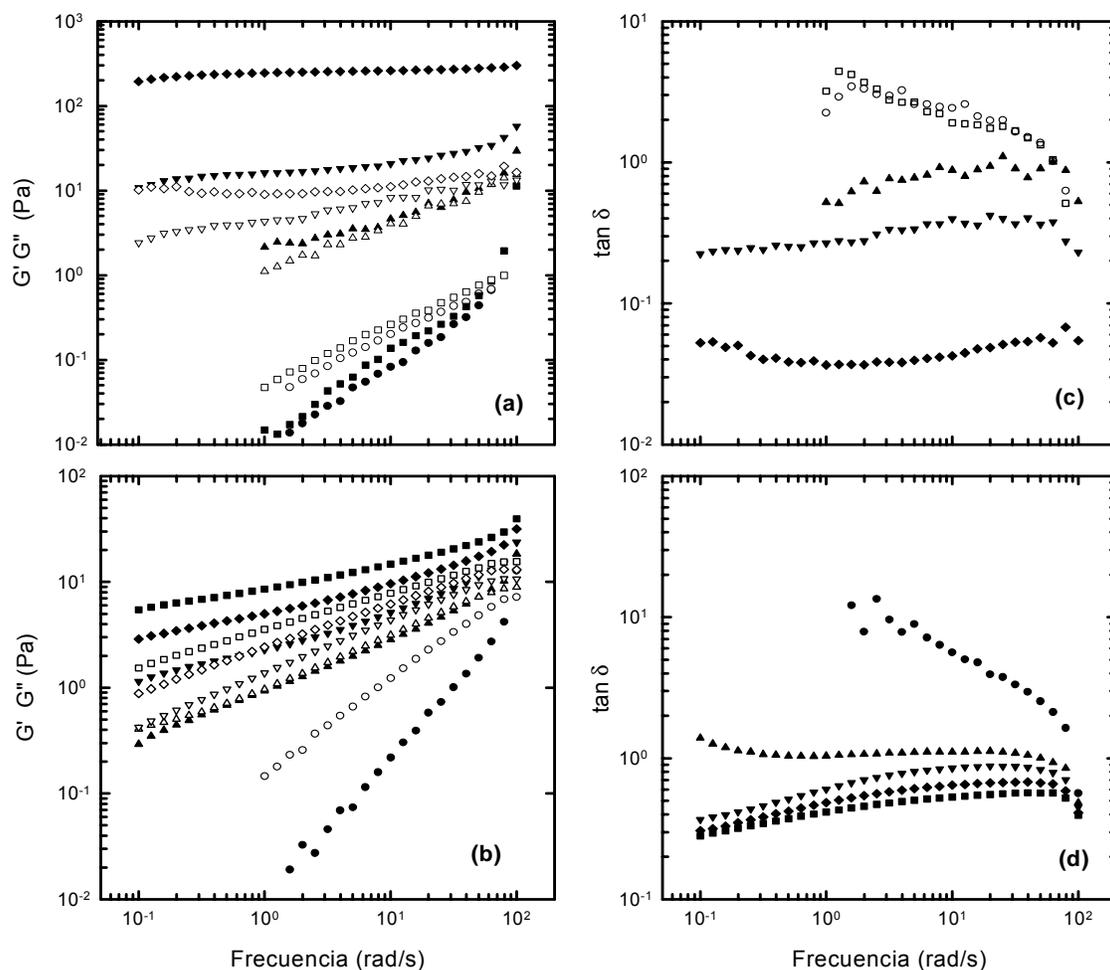


Figura 28. Variación con la frecuencia de los módulos dinámicos y la $\tan \delta$ a diferentes temperaturas (a) y (c) 0.5% de κ -carragenina + 40 mM de KCl, a 42.7 °C (círculos), 41.2 °C (cuadros), 40.8 °C (triángulos), 39.6 °C (triángulos invertidos) y 38.6 °C (diamantes). (b) y (d) 1.0% de κ -carragenina sin KCl añadido a 24.2 °C (círculos), 22.3 °C (triángulos), 21.4 °C (triángulos invertidos), 20.5 °C (diamantes) y 19.5 °C (cuadros). G' (símbolos llenos) y G'' (símbolos vacíos).

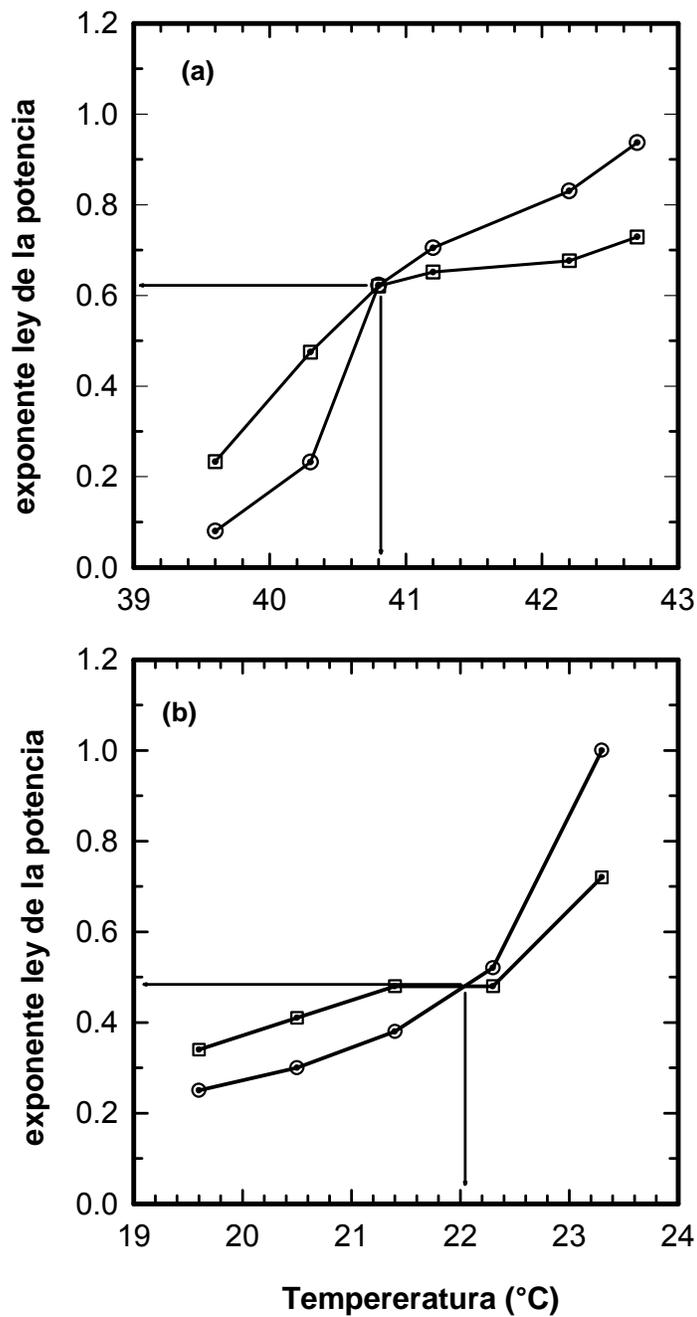


Figura 29. Variación del exponente del modelo ley de la potencia con la temperatura para (a) 0.5% de κ -carragenina + 40 mM de KCl y (b) 1.0% de κ -carragenina sin sal añadida. G' (círculos) y G'' (cuadros). Las líneas que unen los datos se usan únicamente como guías para una mejor localización de la temperatura de transición. El cruce del exponente de los módulos dinámicos se muestra en los insertos correspondientes.

El procedimiento de Winter y Chambon (1986) fue propuesto para geles químicos en los cuales el exponente n , el cual toma un valor de 0.5, se relaciona con el coeficiente estequiométrico de los reactivos. Este criterio se ha empleado indistintamente en geles físicos, en los cuales n depende de la naturaleza del sistema. Por ejemplo, $n = 0.5$ para b 1.3/1.6 schizophyllan glucan (Fuchs *et al.*, 1997), $n = 0.22$ para xantana –Al (III) (Rood *et al.*, 2001) y ι -carragenina (Hossain *et al.*, 2001). En el caso de xantana – Al (III), los autores precisan que el valor de n no está de acuerdo con trabajos previos para sistemas con una relación estequiométrica limitada. El uso inadecuado de este método con $n = 0.5$ para determinar la temperatura de gelificación en geles físicos se hace evidente. Sin embargo, el criterio se ha empleado exitosamente en geles de proteína de suero de leche ($n = 0.62$ a 0.69) (Labropoulos y Hsu, 1996), de proteínas de soya ($n = 0.13$) (Hsu, 1999) y en geles obtenidos por desnaturalización inducida por calentamiento de la yema de huevo ($n = 0.56$) (Cordobés *et al.*, 2004). En nuestra opinión, este método de análisis de los datos reológicos para determinar T_{gel} en geles físicos no es sencillo porque, como se mostró en la Figura 29, el exponente del modelo ley de la potencia cambia radicalmente en un intervalo de temperatura muy estrecho, requiriendo un control de temperatura preciso junto con un sistema en el cual la gelificación se pueda detener a cierta temperatura, como por ejemplo con yema de huevo (Cordobés *et al.*, 2004). Por otra parte, la gelificación de κ -carragenina ocurre rápidamente y una vez iniciado el proceso no se puede detener (Takemesha y Chiba, 2001).

5.1.2.2 Análisis de el ángulo de fase crítico ($\tan \delta_c$)

La Figura 30 la dependencia de la $\tan \delta$ con la temperatura y la frecuencia de los espectros mecánicos mostrados en la Figura 28. Para 0.5% de κ -carragenina + 40 mM de KCl, $T_{gel} = 40.75$ °C (Figura 30a), mientras que para 1% de κ -carragenina, $T_{gel} = 22.1$ °C (Figura 30b), lo cual corresponde a una $\tan \delta_c$ de 1.3 y 0.95, respectivamente.

Este método se ha empleado exitosamente en aislados de proteína de suero (Labropoulos y Hsu, 1996), mezclas de galactomananos de mesquite y xantana desacetilada en 5 mM de NaCl (Goycoolea *et al.*, 2001), geles de xiloglucano de semilla de tamarindo con gelana (Nitta *et al.*, 2003) y ι -carragenina (Michon *et al.*, 1995).

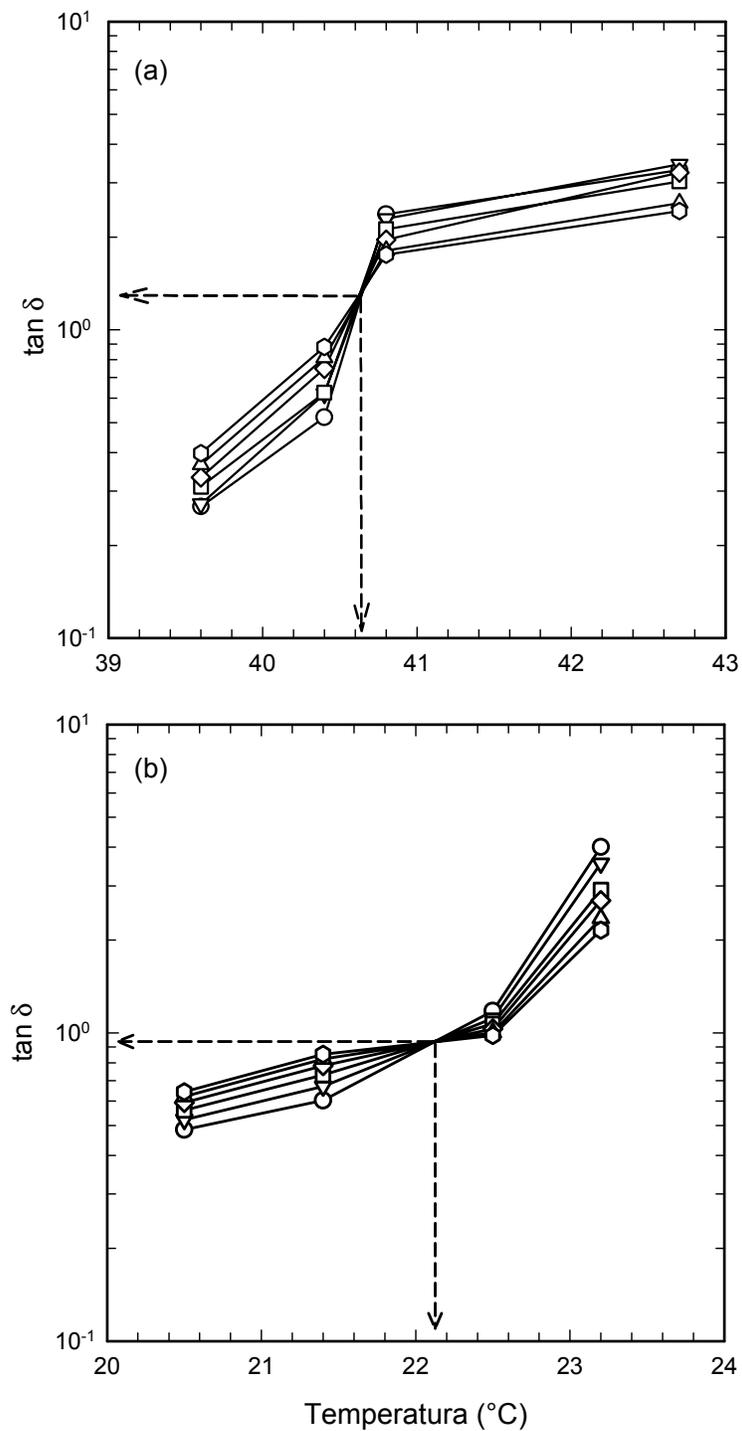


Figura 30. Dependencia de la $\tan \delta$ con la frecuencia y la temperatura para (a) 0.5% de κ -carragenina + 40 mM de KCl y (b) 1.0% de κ -carragenina sin sal añadida a frecuencias (rad/s) de 1.0 (círculos), 1.6 (cuadros), 2.5 (triángulos), 3.9 (triángulos invertidos), 6.3 (diamantes) y 10 (hexágonos). Los datos corresponden a los espectros mecánicos de la Figura 28.

La diferencia en las temperaturas de gelificación obtenidas por el criterio de Winter y la $\tan \delta_c$ fueron menores del 1%: 0.36 y de 0.68% para 0.5% de κ -carragenina + 40 mM de KCl y 1% de κ -carragenina sin sal añadida, respectivamente. En nuestra opinión, el análisis del ángulo de fase crítica es más simple que el análisis de la variación de la dependencia de G' y G'' con la frecuencia y no es susceptible a efectos de tiempo durante la gelificación.

5.1.2.3 Barridos de temperatura

a) Sistemas con concentración iónica total mayor que la concentración iónica crítica ($C_T > C^*$)

La Figura 31 muestra un comportamiento típico de la evolución de G' y G'' durante el enfriamiento de 60 a 25 °C y el calentamiento de 25 a 60 °C para 0.5% de κ -carragenina + 40 mM de KCl. La evolución de los módulos durante el barrido de temperatura en el reómetro mostró tres regiones diferentes: *Región I*, por arriba de 45 °C antes de comenzar la gelificación, se caracterizó por una señal inestable de ambos módulos con “ruido” a altas temperaturas debido a que los entrecruzamientos necesarios para formar una zona de interacción estable fueron insuficientes. En esta región, la detección de una señal clara para G' y G'' no fue posible. *La Región II*, por abajo de 44 °C, se caracterizó por un incremento en G' y G'' así como un notable decremento de la $\tan \delta$ de 10 a 0.02 (datos no mostrados). El punto de cruce entre G' y G'' con la temperatura ($\tan \delta = 1.0$) se localizó típicamente en esta región. Por otra parte, la evolución de G' y G'' con la temperatura indica la existencia de un rápido proceso que toma parte esencial en esta región. En este caso se puede afirmar que cerca de la temperatura para la cual los módulos comienzan a incrementarse, ocurre la incipiente gelificación. En este punto, existen los suficientes entrecruzamientos que producen un incremento en G' y G'' durante el enfriamiento. Finalmente, la *Región III*, por debajo de 41 °C, se caracterizó por un incremento monótono de ambos módulos, con $G' > G''$ y valores bajos de la $\tan \delta$. Sin embargo, no se observó una zona donde G' y G'' fueran constantes. La gelificación tomó lugar en esta región, pero para la κ -carragenina el tiempo para que ambos módulos alcancen el equilibrio es alrededor de 15 horas (Tecante y Doublier, 1999).

De acuerdo con el segundo criterio descrito por Ross-Murphy (1991), la temperatura de transición se estimó cuando el “ruido” desaparece. La flecha vertical continua en la Figura

31 indica la temperatura para la cual se observó una señal estable durante el enfriamiento. Por lo tanto, 42.5 °C fue considerada la temperatura de transición sol-gel. Cuando la temperatura aumenta, las hélices involucradas en las zonas de interacción cambian su conformación y la red se rompe, como lo indica la disminución de G' . Cuando el incremento de la temperatura incorpora la ruptura de la red, ésta se funde a altas temperaturas, como lo indica el descenso en G'' , las hélices formadas previamente cambian rápidamente su conformación y regresan a su estado de hebra aleatoria (MacArtain *et al.*, 2003).

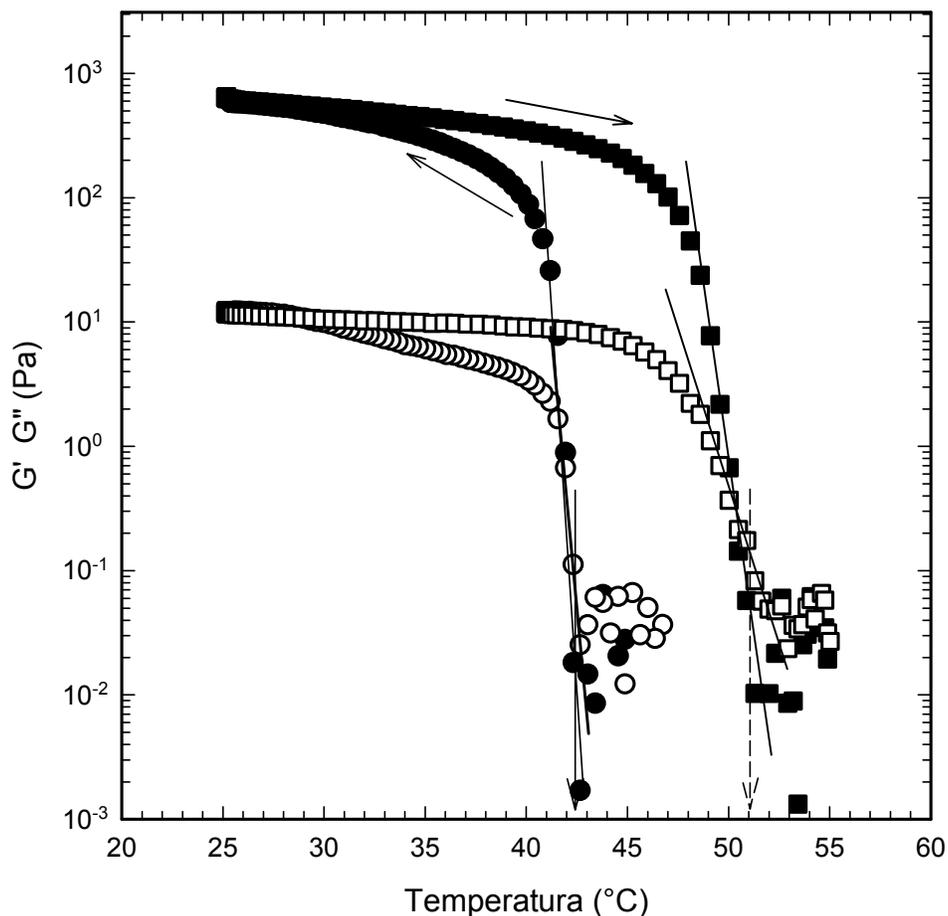


Figura 31. Cinética de gelificación–fusión de 0.5% de κ -carragenina + 40 mM de KCl a 1 Hz y 10% de deformación en enfriamiento (círculos) y calentamiento (cuadros). G' (símbolos llenos) G'' (símbolos vacíos). Las líneas indican la variación de los módulos dinámicos con la temperatura en la región de "ruido". Las flechas indican la temperatura a la cual los módulos se separan del "ruido" para la gelificación (continua) y la fusión (punteada).

El "ruido" aparece nuevamente porque el gel formado previamente a 25 $^{\circ}\text{C}$ experimentó una transición gel–sol a una T_{fus} , alrededor de 51 $^{\circ}\text{C}$, como lo indica la flecha

vertical punteada. La histéresis térmica fue observada en el barrido reológico de temperatura al igual que en microDSC. Una posible fuente de error en la determinación de T_{gel} y T_{fus} por este método se puede atribuir a la sensibilidad del reómetro empleado en la medición de G' y G'' y sus cambios durante el enfriamiento y calentamiento. Una forma de evaluar el error es comparando las temperaturas obtenidas con otro tipo de medición, tal como la microDSC. En la Figura 31, las líneas se dibujaron para mostrar el cambio de los módulos con la temperatura y para una fácil determinación de las temperaturas de transición.

b) Sistemas con concentración iónica total menor que la concentración iónica crítica ($C_T < C^*$)

La Figura 32 presenta la evolución de los módulos G' y G'' en función de la temperatura de 25 a 9 °C durante el enfriamiento y de 9 a 25 °C durante el calentamiento, en 0.3 y 0.4% de κ -carragenina ($C_T = 0.043$ y 0.058 eq/L, respectivamente). De acuerdo con el diagrama de transición sol–gel, estas concentraciones se encuentran por debajo de la C^* (ver Figura 23). A diferencia de la Figura 31, la evolución de los módulos mostró una transición desorden–orden y orden–desorden durante el enfriamiento y calentamiento, respectivamente. El proceso se caracterizó porque el módulo $G'' > G'$ durante todo el proceso térmico, lo que mostró el dominio del carácter viscoso de la solución sobre el carácter elástico. Pese al incremento de los módulos durante el enfriamiento, no existió el cruce entre ambos módulos y hubo ausencia de histéresis térmica entre el enfriamiento y el calentamiento. Lo anterior indicó la inexistencia de dobles hélices agregadas y por ende, de una red tridimensional.

Al igual que en el caso anterior, la T_{ini} se consideró como la temperatura de transición desorden–orden, T_{d-o} , durante el enfriamiento y T_{fin} como la temperatura orden–desorden, T_{o-d} , durante el calentamiento (flechas verticales en la Figura 32). Cuando $T > T_{d-o}$, la κ -carragenina se encuentra en una conformación de hebra aleatoria, al disminuir la temperatura, la transición a doble hélice se presenta, siendo ésta la conformación ordenada. De manera similar a la calorimetría, un incremento en la concentración de κ -carragenina produjo una temperatura mayor de transición durante el enfriamiento (14.6 y 15.3 °C para 0.3 y 0.4% de κ -carragenina, respectivamente).

Al comparar las T_{d-o} obtenidas con el reómetro con las reportadas previamente por calorimetría (Sección 5.1.1.3) se encontró una diferencia de 28 y 12.8% para 0.3 y 0.4%

de κ -carragenina, respectivamente. Sin embargo, en la calorimetría se consideró el T_{\max} y no T_{ini} como temperatura de transición. La discusión versa entonces sobre qué temperatura considerar para reportar la $T_{\text{d-o}}$ durante las pruebas reológicas. En el caso particular, los métodos descritos previamente, Winter y Chambon y $\tan \delta_c$, no son aplicables a transiciones desorden-orden porque a 9°C , los espectros mecánicos de la κ -carragenina corresponden a los de una solución macromolecular (Figura 33) y no existe empalme entre los módulos, lo que no produjo una independencia de la $\tan \delta$ con la frecuencia (datos no mostrados).

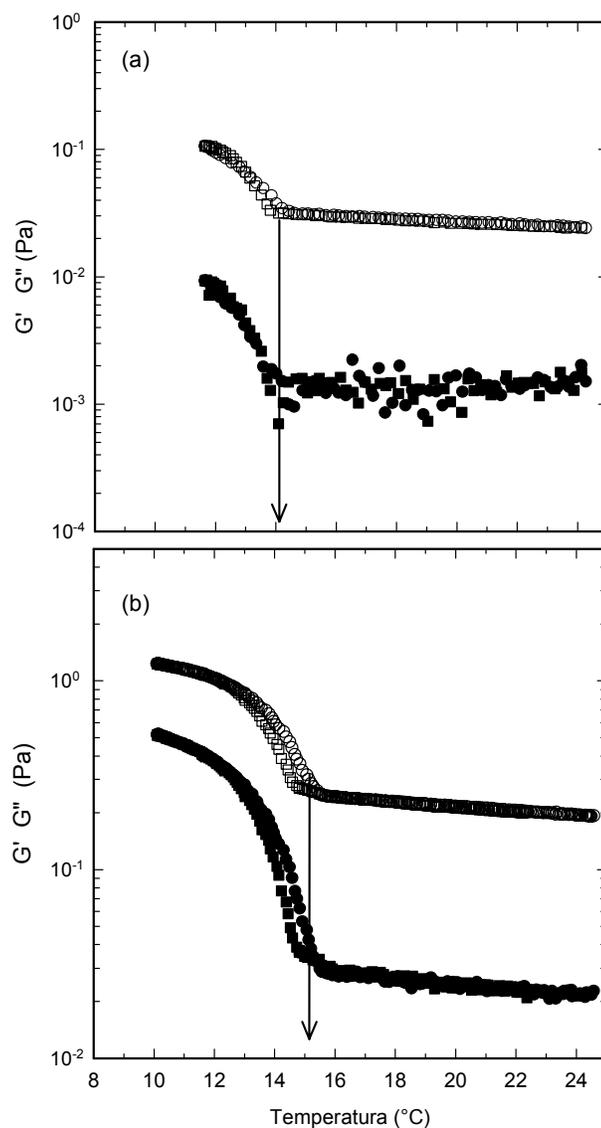


Figura 32. Cinética de transición orden–desorden en sistemas con 0.3% de κ -carragenina (a) y 0.4% de κ -carragenina sin la adición de KCl (b) durante el enfriamiento (círculos) y el calentamiento (cuadros). G' (símbolos llenos) G'' (símbolos vacíos). Las flechas verticales indican la T_{ini} de la transición. 1 rad/s con 60 y 50% de deformación para 0.3 y 0.4% de κ -carragenina, respectivamente.

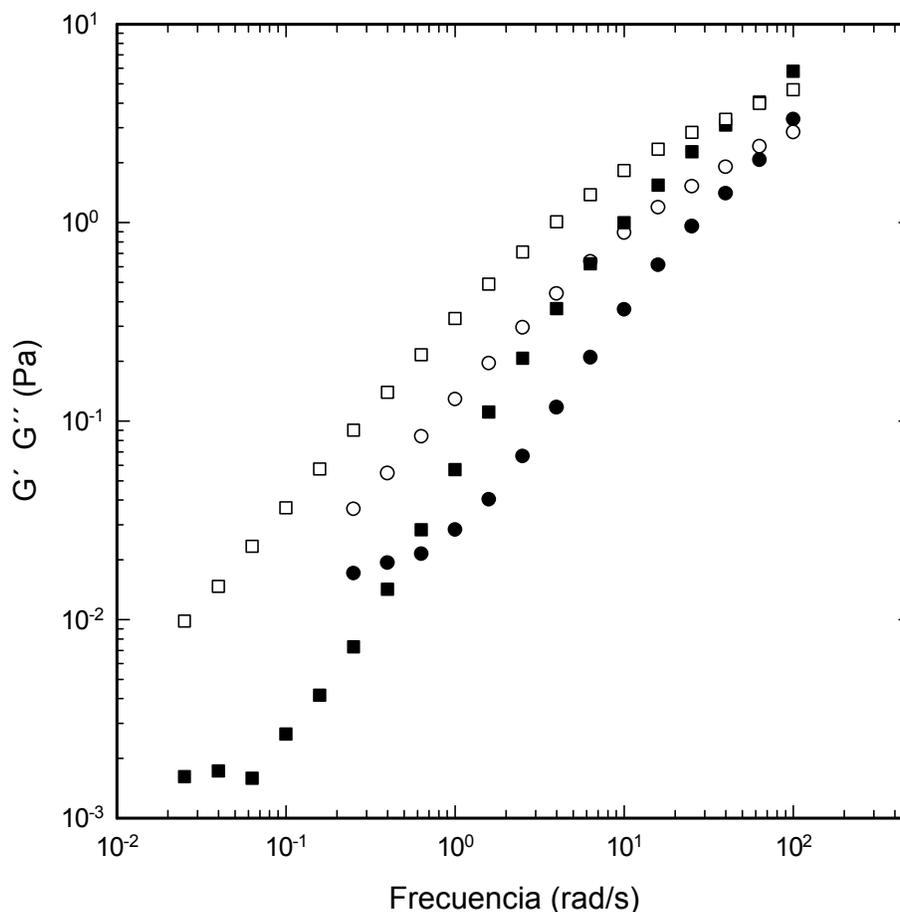


Figura 33. Espectros mecánicos de sistemas con 0.3% (círculos) y con 0.4% (cuadros) de κ -carragenina a 9 °C. G' (símbolos llenos) G'' (símbolos vacíos) con 60 y 50% de deformación, respectivamente. Condiciones experimentales E en la Figura 23.

5.1.2.4 Diagrama de transición

La Figura 34a muestra las temperaturas de transición obtenidas por medio de los barridos de temperatura así como los reportados por Rochas (1982). Este último empleó técnicas de polarimetría y conductividad iónica en una preparación purificada de κ -carragenina como sal de potasio. La regresión lineal de sus datos crudos representados en una gráfica $\log C_T$ vs $1/T$ son: $\log C_T = -3491 (1/T) + 9.80$ ($r^2=0.996$), que corresponde a una pendiente de 8080 K empujando $\ln C_T$ vs T^{-1} , y $\log C_T = -2748 (1/T) + 7.21$ ($r^2=0.980$) para el enfriamiento y el calentamiento, respectivamente. De acuerdo con nuestros resultados, la regresión correspondiente a la reometría produce: $\log C_T = -3456 (1/T) + 9.64$ ($r^2=0.989$) para el enfriamiento y $\log C_T = -2486 (1/T) + 6.35$ ($r^2=0.982$) para el calentamiento. Para la microDSC las regresiones fueron $\log C_T = -3251 (1/T) + 9.09$

($r^2=0.997$) para el enfriamiento y $\log C_T = -2458 (1/T) + 6.17$ ($r^2=0.983$) para el calentamiento. Boutebba *et al.* (1997) reportaron una pendiente de 14,600 para succinoglucano, y Rinaudo (2001) reportó una pendiente de 2000 K para xantana con Na^+ . Las líneas de calentamiento y enfriamiento convergen en una concentración iónica crítica, C^* , y temperatura crítica, T^* . Por abajo de este valor no existe histéresis térmica. La solución simultánea de las ecuaciones de las líneas descritas previamente se obtiene una $C^* = 0.0066$ eq/L (0.007 eq/L como lo reportó Rochas, 1982) y $T = 18.1$ °C, mientras que nuestros datos reológicos produjeron una $C^* = 0.0086$ eq/L y $T = 22$ °C.

Las temperaturas de transición que se obtuvieron son acordes con las reportadas previamente por Rochas (1982) a pesar de haber empleado una preparación comercial de κ -carragenina sin una purificación posterior. La Figura 34b muestra las temperaturas de transición obtenidas por otros autores. En general, solamente uno de ellos trabajó en calentamiento (Kara *et al.*, 2003) mientras que en enfriamiento es más común porque la temperatura de gelificación es más estudiada que la temperatura de fusión. De acuerdo con esta figura, solamente Kara *et al.* (2003) reportaron diferentes concentraciones de κ -carragenina con KCl. Así, de sus datos crudos, la ecuación de regresión para enfriamiento fue $\log C_T = -3726 (1/T) + 10.48$ ($r^2 = 0.978$) y para el calentamiento $\log C_T = -4587 (1/T) + 12.53$ ($r^2 = 0.979$) y es probable que las líneas nunca se crucen. Como lo muestra esta figura, en el enfriamiento las temperaturas de gelificación son acordes entre todos los autores, pero no así con las de calentamiento.

5.1.3 Efecto de la concentración de K^+ sobre el comportamiento reológico de 0.5% de κ -carragenina a 60 y 25 °C

En el estudio reológico de la κ -carragenina se establecieron tres temperaturas de trabajo con el objetivo de estudiar las diferentes conformaciones de la misma: hebra aleatoria, gel y hélice sin formar agregados. Las temperaturas de trabajo elegidas fueron: 60, 25 y 9 °C. En todas las mediciones se realizaron pruebas dinámicas oscilatorias en un intervalo de 0.1 a 100 rad/s dentro de la zona de viscoelasticidad lineal.

5.1.3.1 Temperatura superior a la temperatura crítica ($T > T_{\text{fus}}$)

La Figura 35 muestra el efecto de la concentración de KCl en una solución con 0.5% de κ -carragenina sobre los módulos G' y G'' en barridos de frecuencia de 1.0 a 100 rad/s

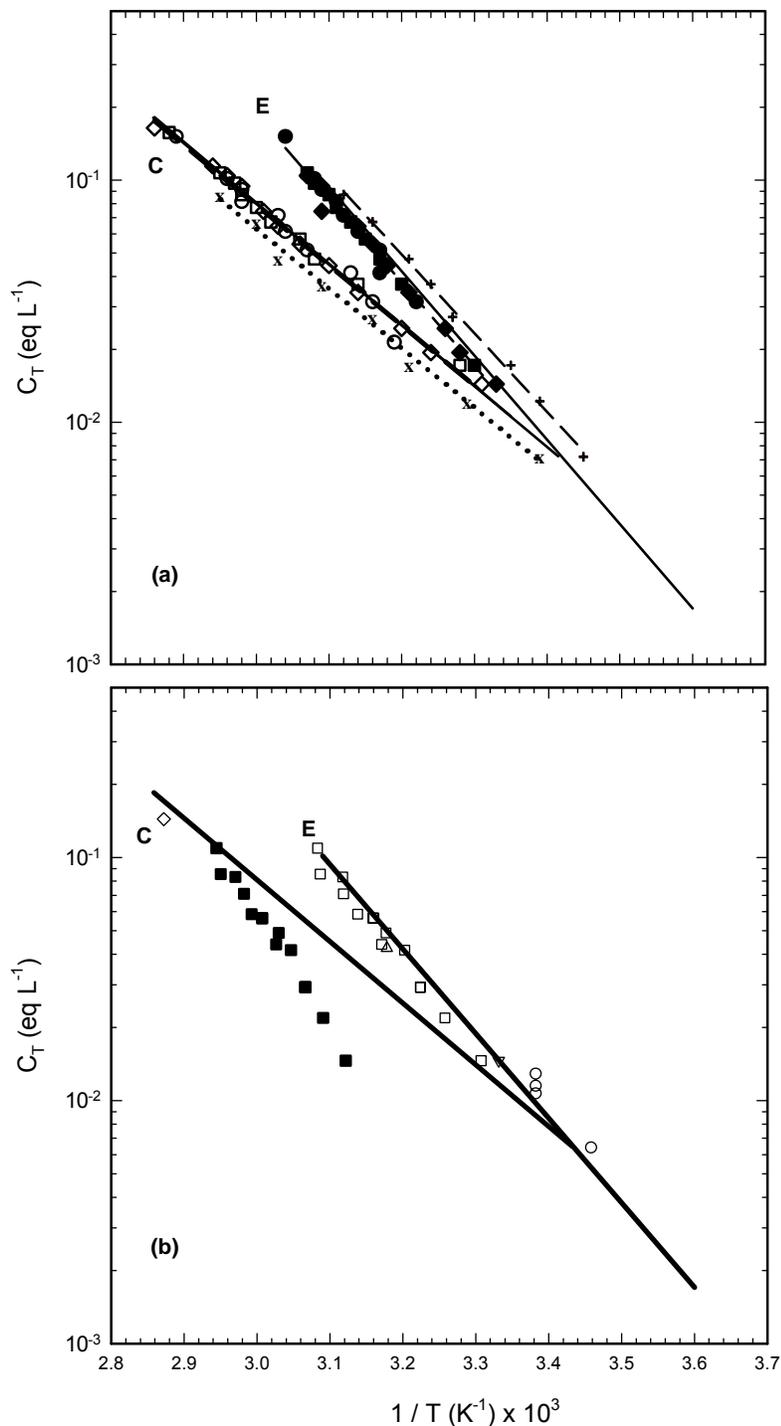


Figura 34. Diagrama de transición sol–gel para κ -carragenina con y sin adición de KCl. (a) Reología: enfriamiento (símbolos negros), calentamiento (símbolos blancos) para 0.1 (círculos), 0.5 (cuadros), 1% (diamantes) y regresión (líneas discontinuas) microDSC: enfriamiento (+), calentamiento (x) para 0.5% de polímero y regresión (línea punteada). (b) Datos reportados: Diamantes (Sugiyama *et al.*, 1998), triángulos invertidos (Chen *et al.*, 2002), triángulos (Yuguchi *et al.*, 2002), círculos (Mangione *et al.*, 2003), cuadros negros (calentamiento), cuadros blancos (enfriamiento) (Kara *et al.*, 2003). Las líneas continuas son la regresión de las temperaturas de transición determinadas por rotación óptica y conductividad para enfriamiento (E) y calentamiento (C) (Rochas, 1982).

en la zona de viscoelasticidad lineal a 60 °C. En estas soluciones, el módulo viscoso predominó sobre el módulo elástico y ambos módulos fueron dependientes de la frecuencia (por ejemplo, $G' \sim \omega^{1.9}$, $G'' \sim \omega^{0.90}$). Los exponentes n de G' y G'' presentaron una tendencia hacia los valores de un líquido viscoelástico (2 y 1 para G' y G'' , respectivamente) (Ferry, 1980).

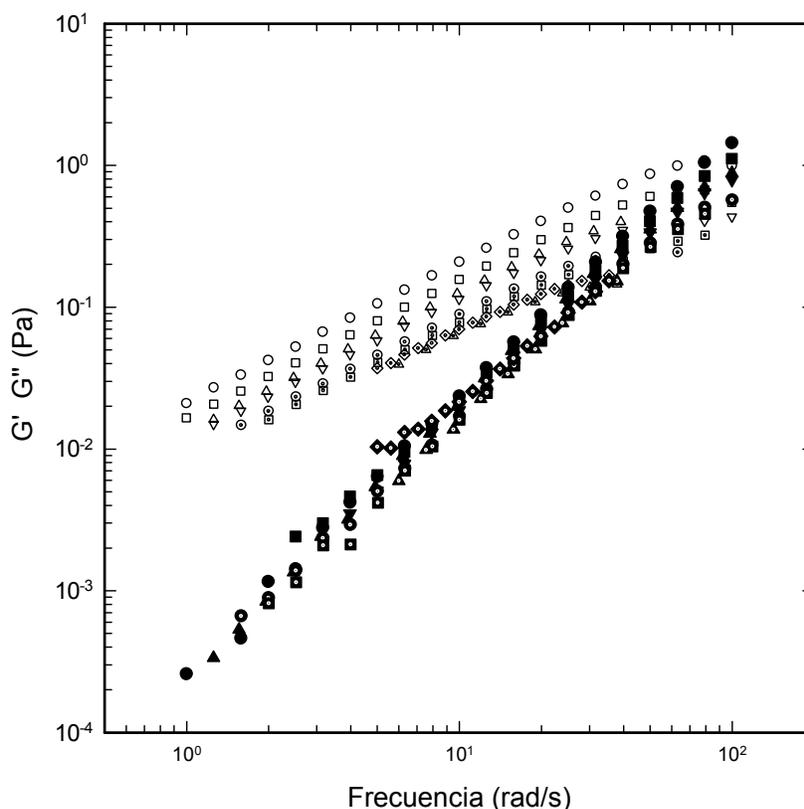


Figura 35. Espectros mecánicos a 60 °C de 0.5% de κ -carragenina con: 0 (círculos), 5 (cuadros), 10 (triángulos), 15 (triángulos invertidos), 30 (círculos punteados), 40 (cuadros punteados), 60 (triángulos punteados) y 80 mM (diamantes punteados) de KCl. G' (símbolos llenos), G'' (símbolos vacíos). Condición experimental B en la Figura 23.

Esto se traduce en que la mayor contribución del comportamiento reológico se debió al componente viscoso y en el caso particular de 80 mM KCl, G'' fue mayor que a 60 mM porque en estas condiciones, C_T es muy próxima a la zona de de transición sol-gel (Figura 23). La presencia de K^+ produjo una disminución de la viscosidad compleja tanto a 60 como a 25 °C (Figura 36). Acorde con el diagrama de transición sol-gel, en estas condiciones, pese a que $C_T > C^*$ con $T > T_{fus}$, una solución con 0.5% de κ -carragenina se encuentra en estado sol a 60 y a 25 °C aun en presencia de K^+ .

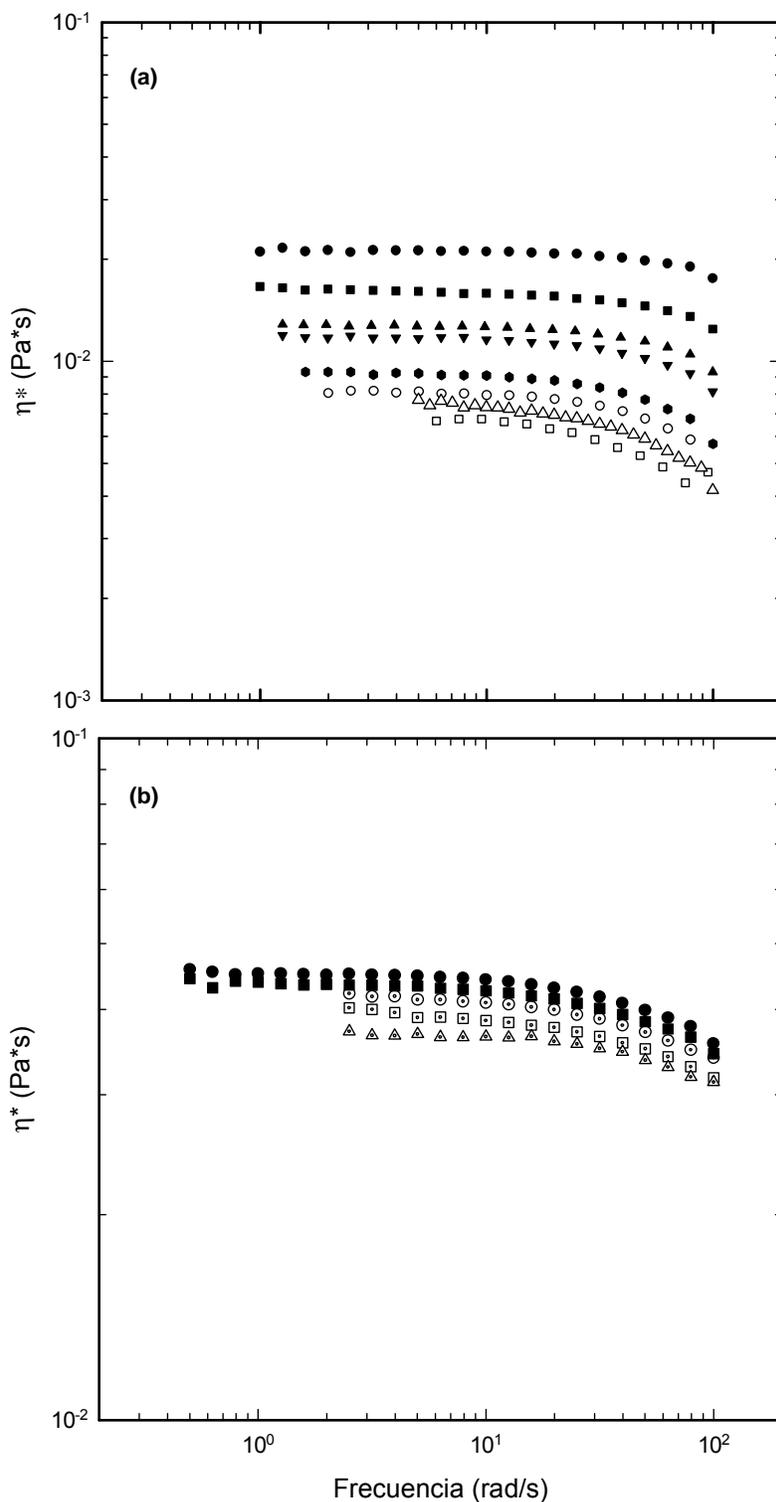


Figura 36. Efecto de la concentración de K^+ sobre η^* de 0.5% de κ -carragenina a: (a) 60 y (b) 25 °C. 0 (círculos llenos), 1 (círculos punteados), 2 (cuadros punteados), 3 (triángulos punteados), 5 (cuadros llenos), 10 (triángulos llenos), 15 (triángulos invertidos), 30 (hexágono lleno), 40 (círculos vacíos), 60 (cuadros vacíos) y 80 mM (triángulos vacíos) de KCl. Condiciones experimentales B y C en la Figura 23, respectivamente.

Las concentraciones de KCl variaron de 0 a 80 mM a 60 °C y de 0 a 5 mM KCl para 25 °C. A 60 °C, la viscosidad compleja disminuye conforme la concentración de KCl aumenta. Sin embargo, para 80 mM esta viscosidad es superior que para 60 mM. A 25 °C la viscosidad compleja para 5 mM es superior a las viscosidades para 1, 2 y 3 mM. Esto se explica porque 80 y 5 mM se ubican sobre la línea de transición (Fig. 23). Por otro lado los resultados reológicos mostraron que cuando la κ -carragenina se encuentra en una conformación de hebra aleatoria se obtiene un comportamiento tendiente al newtoniano, siendo la fase continua la responsable. Cuando C_T se ubica cerca de la línea de transición, el comportamiento se hace fluidificado por cizalla.

Con lo anterior, en estado sol, sin importar la temperatura, la presencia de iones K^+ escuda las repulsiones electrostáticas entre las moléculas del polímero y tiende a reducir la dimensión de la hebra y por ende su viscosidad intrínseca (Snoeren, 1976), de tal forma que la viscosidad disminuye con el aumento de KCl. Sin embargo, cuando la carga iónica total se aproxima a la transición sol-gel se promueve la asociación de hélices incrementando el número de zonas de interacción y las cadenas se activan tendiendo a la formación de la red (Nishinari, 1996). Cuando existe una estructura helicoidal, la viscosidad intrínseca se incrementa debido al aumento de la rigidez de la molécula (Milas *et al.*, 1990; Rinaudo, 2001) lo que se refleja en un aumento de la viscosidad. El efecto de la disminución de la viscosidad intrínseca por la presencia de iones se observa en otros biopolímeros como la gelana (Nishinari, 1996; Nakamura *et al.*, 1996) y la xantana (Launay *et al.*, 1984). En este tipo de sistemas se ha encontrado un comportamiento lineal entre la viscosidad intrínseca y el inverso de la raíz cuadrada de la concentración iónica del catión (Snoeren, 1976; Vreeman *et al.*, 1980; Jampen *et al.*, 2000).

5.1.3.2 Concentración iónica total inferior a la concentración crítica y temperatura inferior a la temperatura de fusión ($C_T > C^*$ y $T < T_m$)

En estas condiciones y en acuerdo con el diagrama de transición sol-gel, cuando $T < T_{fus}$, a 25 °C hay formación de geles (condiciones experimentales A en la Figura 23). La Figura 37 muestra el efecto de K^+ sobre el comportamiento reológico de los geles obtenidos con 0.5% de κ -carragenina. En ésta observamos que a 10 mM KCl es posible ver el cruce de los módulos G' y G'' a baja frecuencia (0.15 rad/s), sin embargo, a partir de 20 mM KCl el comportamiento de ambos módulos es característico de un gel (Ferry, 1980; Morris, 1983; Nishinari, 1997), ya que ambos módulos son independientes de la

frecuencia (i.e. $G' \propto \omega^{0.03}$) en un intervalo de 0.1 a 100 rad/s y $G' \gg G''$. En todos los casos, el orden de magnitud de la $\tan \delta \approx 0.1$, con excepción de 10 mM KCl.

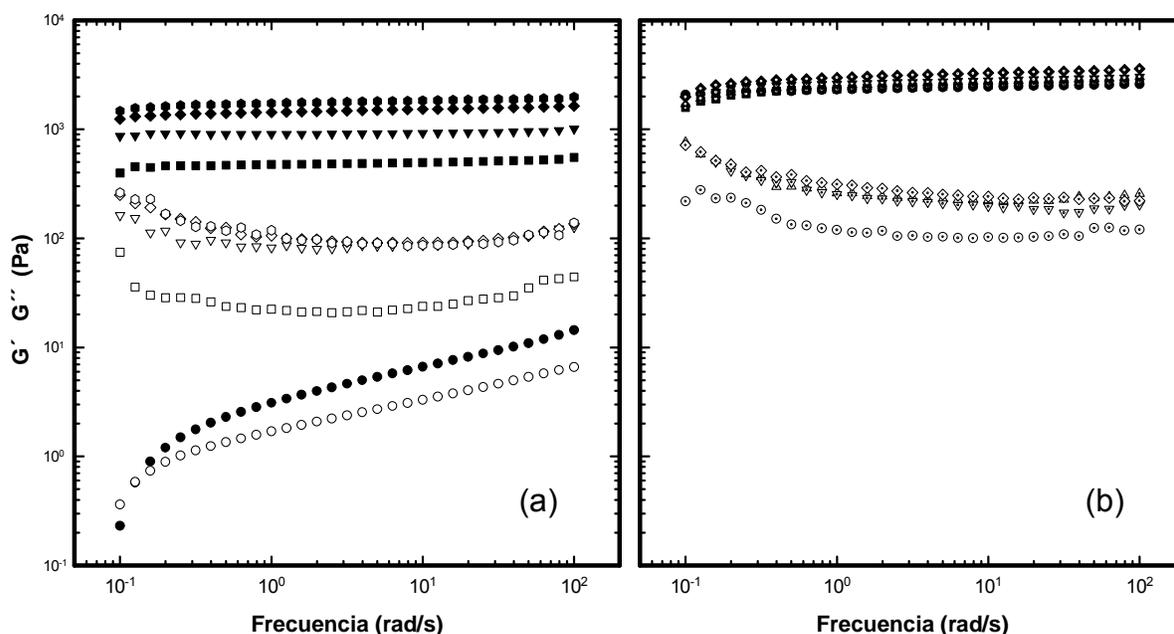


Figura 37. Efecto de la concentración de K^+ sobre el comportamiento reológico de geles con 0.5% de κ -carragenina a 25°C. (a) 10 (círculos), 20 (cuadros), 40 (triángulos invertidos), 60 (diamantes), 80 (hexágonos). (b) 100 (círculos punteados), 150 (cuadros punteados), 200 (triángulos punteados), 250 (triángulos invertidos punteados) y 300 mM (diamantes punteados) de KCl. G' (símbolos llenos) y G'' (símbolos vacíos). Condiciones experimentales A en la Figura 23.

La presencia de sinéresis en los geles de κ -carragenina ha producido el deslizamiento durante las mediciones dinámicas (Richardson y Goycoolea, 1994). Sin embargo, en el presente trabajo, si bien los geles de κ -carragenina exhibieron sinéresis, el empleo de la geometría de placa paralela estriada permitió evitar el deslizamiento de éstos durante la medición de sus propiedades reológicas.

5.1.3.3 Efecto de la concentración de κ -carragenina y de K^+ en los geles a 25 °C

Como consecuencia del enfriamiento de las disoluciones de κ -carragenina descritas en la sección 5.1.2.3a, se obtuvieron los espectros mecánicos de los geles resultantes, dentro de la zona de viscoelasticidad lineal a 25 °C. La Figura 38 muestra el barrido de frecuencia y deformación (inserto en la Figura 38) para 0.5% de κ -carragenina + 40 mM

de KCl a 25 °C. La zona de viscoelasticidad lineal para cada gel fue particular. Es importante considerar que estos geles se obtuvieron durante un proceso de enfriamiento “in situ” en el reómetro sin un tiempo previo para su estabilización.

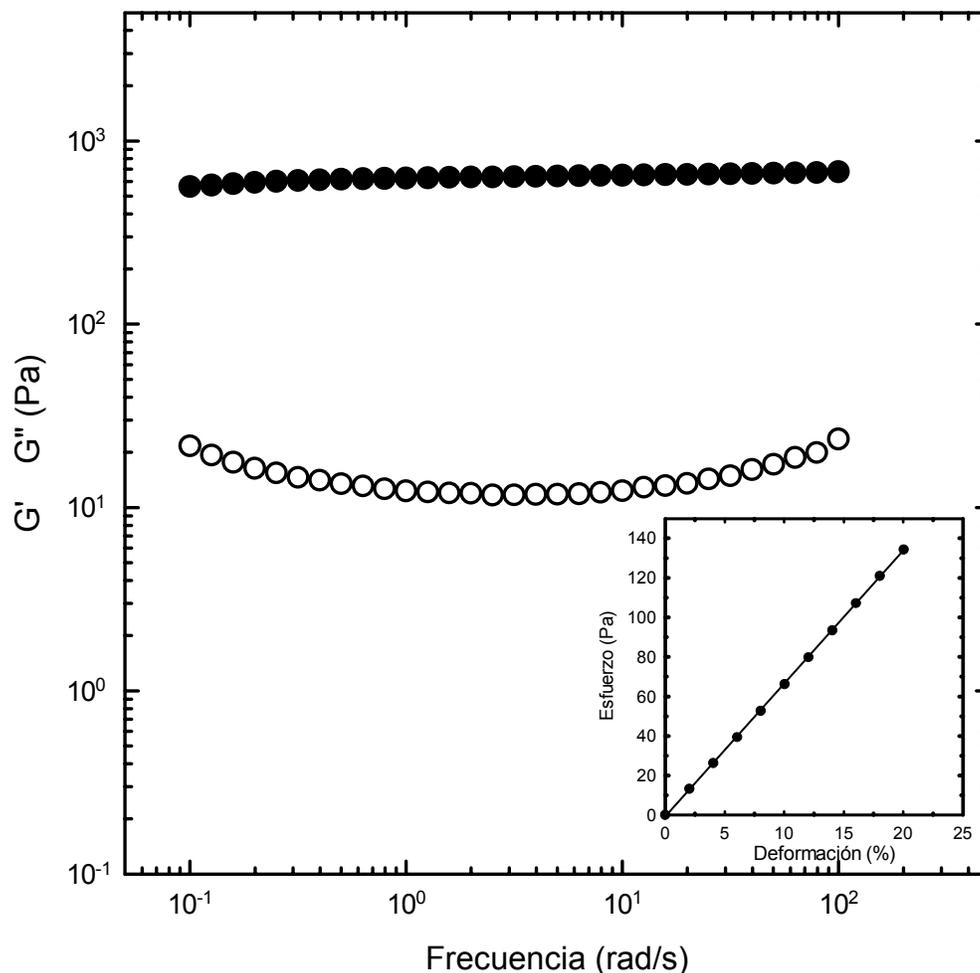


Figura 38. Espectro mecánico de 0.5% de κ -carragenina + 40 mM de KCl a 25 °C y 10% de deformación. G' (símbolos llenos), G'' (símbolos vacíos). Inserto: barrido de deformación a 1 Hz y 25 °C.

El barrido de frecuencia mostró el comportamiento típico de un gel (Ferry, 1980; Nishinari, 1997) con ambos módulos poco dependientes de la frecuencia ($G' \propto \omega^{0.03}$) de 0.1 a 100 rad/s, $G' > G''$ y la $\tan \delta \ll 1.0$. La κ -carragenina existe como un gel cuando $C_T > C^*$ (0.007 eq/L) y $T < T_{gel}$. De los valores de G' obtenidos a 1 Hz en los barridos de frecuencia a 25 °C, se analizó el efecto de la concentración de κ -carragenina y de KCl. La Figura 39 muestra el efecto de la concentración del polisacárido y de KCl en G' (a 1 Hz en el barrido de frecuencia) de los geles correspondientes. La rigidez de los geles se

incrementó con la concentración del polisacárido y de sal. Para 0.1% de κ -carragenina, G' aumentó notablemente para concentraciones de KCl menores de 60 mM, sin embargo, altas concentraciones produjeron solamente un incremento marginal.

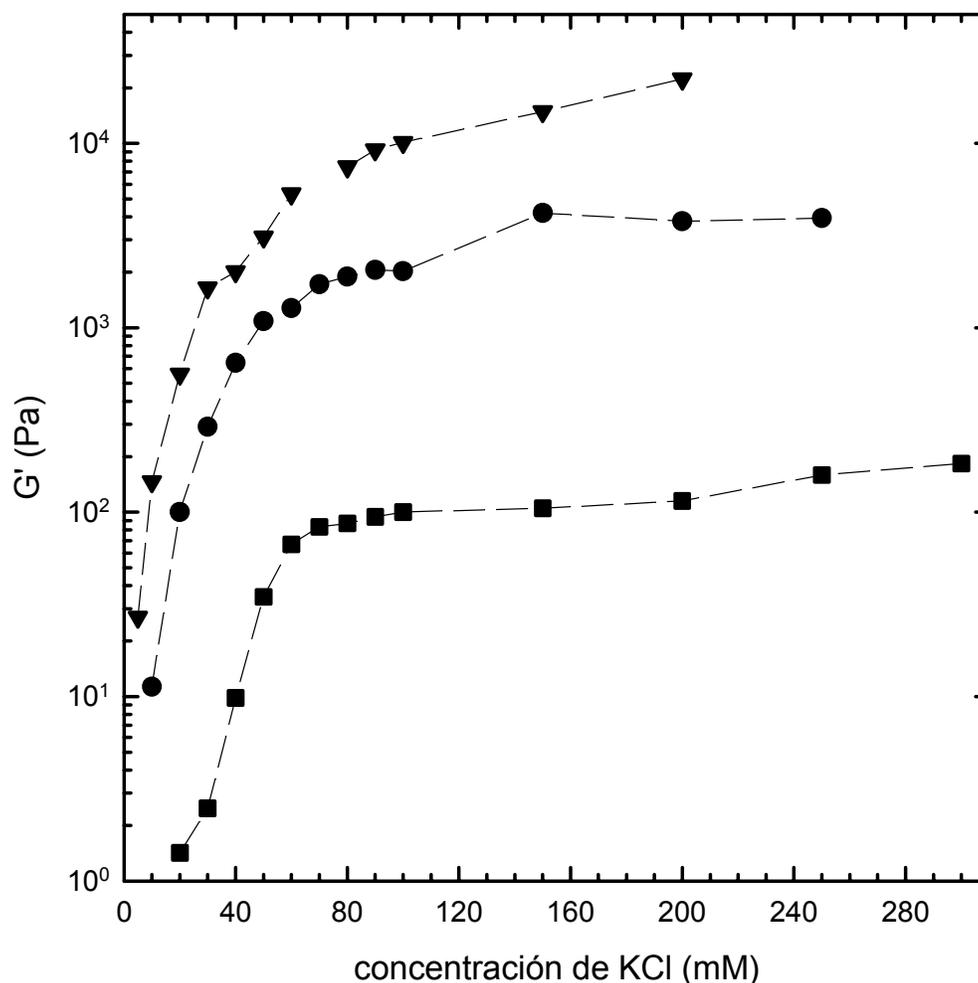


Figura 39. Efecto de la concentración de κ -carragenina y de KCl sobre el módulo de almacenamiento G' a 25 °C y 1 Hz: 0.1% (cuadros), 0.5% (círculos) y 1% (triángulos invertidos).

Un comportamiento similar se observó para 0.5% y 1% de κ -carragenina para lo cual el límite de la concentración de KCl fue de 100 y 150 mM, respectivamente. Altas concentraciones de κ -carragenina y de KCl producen geles más rígidos porque la proporción de hélices agregadas se incrementa con la concentración de sal. El incremento marginal de G' por arriba de una concentración dada de KCl, cuyos valores dependen de la concentración de κ -carragenina, se puede deber a una sobresaturación con los iones potasio. En la transición sol-gel de la κ -carragenina con Ca^{2+} se observó un valor máximo

de G' para una relación de 1.2 mol Ca^{2+} / 1 mol κ -carragenina (MacArtain *et al.*, 2003), pero no una zona plana como en la Figura 39. Este comportamiento se atribuyó a la precipitación de κ -carragenina por un exceso de Ca^{2+} . La gelificación es un proceso rápido el cual puede variar con la velocidad de enfriamiento y puede producir diferentes microestructuras en la red (Richardson y Goycoolea, 1994). Con base en las observaciones realizadas en la Figura 39 y considerando que para la concentración de 0.1%, G' y G'' tuvieron poca dependencia de la frecuencia ($G' \sim \omega^{0.02}$; $G'' \sim \omega^{0.06}$ de 60 a 100 mM KCl) con la $\tan \delta \ll 1.0$ y $G' > G''$, la formación de una red tridimensional ocurrió durante el enfriamiento de las disoluciones con los valores de G' dependientes de la concentración del polisacárido y del ion. En tales geles, las zonas de interacción tienen un alto contenido energético con un gran tiempo de estabilidad.

5.1.4 Efecto de la concentración iónica total en disoluciones de κ -carragenina para temperaturas inferiores a la temperatura crítica ($T < T^*$)

Las condiciones experimentales de estas soluciones se ubican en la zonas D y E en la Figura 23, donde se eligió 9 °C como condición experimental. En estas condiciones, $T < T^*$, sin embargo, existe la posibilidad de tener soluciones cuya $C_T > C^*$ o bien cuando $C_T < C^*$. Las siguientes secciones tratan una y otra condición.

5.1.4.1 Efecto de la concentración de K^+ en las disoluciones de κ -carragenina cuando la concentración iónica total es superior a la concentración iónica crítica ($C_T > C^*$)

Inicialmente, se estudió el efecto de K^+ (1 a 5 mM de KCl) en la evolución de los módulos G' y G'' con respecto al tiempo en disoluciones con 0.5% de κ -carragenina en condiciones isotérmicas a 1 Hz y una deformación constante durante 7 horas. Posteriormente, se obtuvieron los barridos de frecuencia a 9 °C. En cada solución se empleó la deformación para que ésta estuviera dentro de la zona de viscoelasticidad lineal. La Figura 40 muestra la evolución de los módulos G' y G'' con el tiempo en una solución con 0.5% de κ -carragenina + 1 y 3 mM de KCl a 9 °C a 1 Hz como una forma representativa de las disoluciones en estas condiciones.

En todas los casos, excepto para 1 mM de KCl, la baja concentración de K^+ produjo una velocidad baja de formación de agregados, lo que se reflejó en la presencia de un cruce de los módulos G' y G'' . En la solución con 1 mM de KCl, G'' predominó sobre G' ,

sin embargo este último fue el que presentó un incremento con el tiempo, mientras que el incremento de G'' fue bajo (14%), con una probablemente tendencia asintótica hacia 0.7 Pa. De manera similar, en la solución con 3 mM de KCl, G'' permaneció constante mientras que el cambio de G' fue de 62%, sin embargo, inicialmente, G'' predominó sobre G' , probablemente porque la cantidad de hélices agregadas no fue suficiente para que el carácter rígido de la solución predominara en el sistema. Así, la agregación de las hélices es la que proporciona el carácter elástico a los geles de κ -carragenina. El tiempo de cruce entre los módulos fue dependiente de la cantidad de K^+ incorporada a la solución. El Cuadro 6 resume el efecto del K^+ sobre el tiempo de cruce entre los módulos durante el enfriamiento.

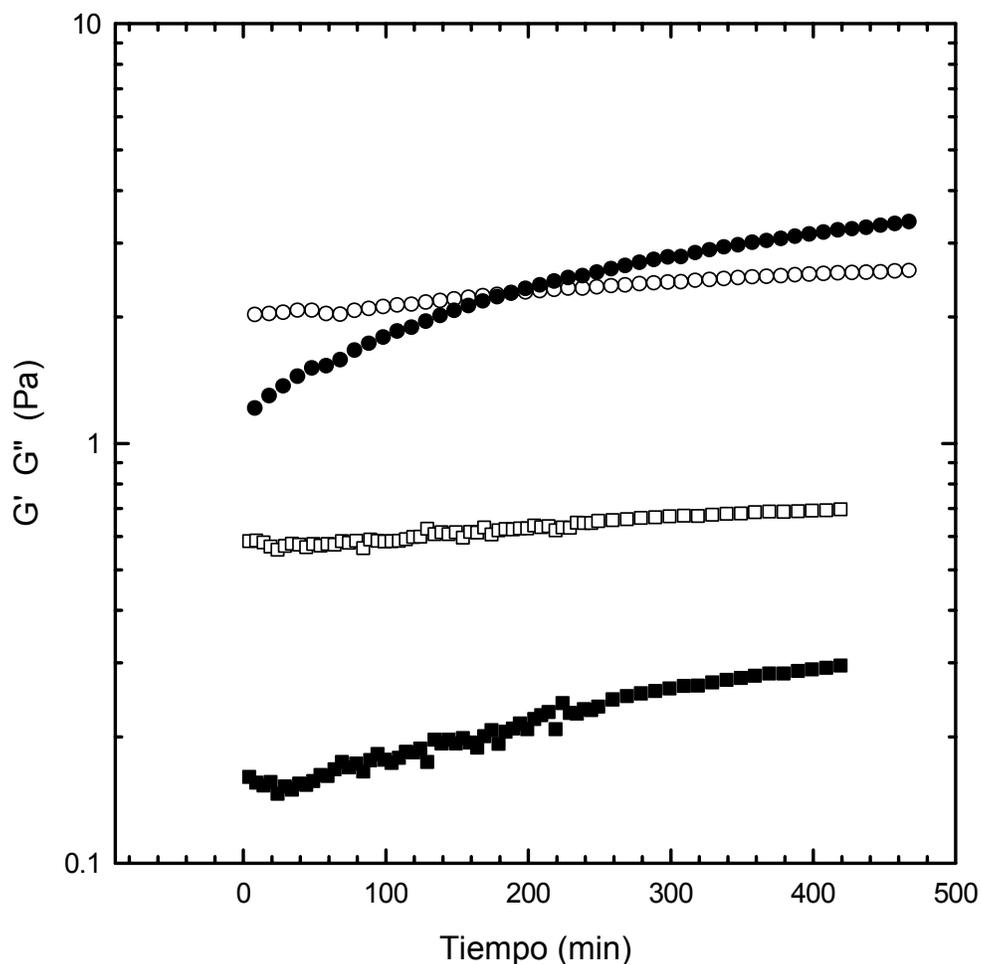


Figura 40. Evolución de los módulos G' (símbolos llenos) y G'' (símbolos vacíos) con el tiempo en 0.5% de κ -carragenina + 1 (cuadros) y 3 (círculos) mM de KCl a 9 °C y 1 Hz. Condiciones experimentales D en la Figura 23.

El incremento de K^+ produjo tiempos más cortos para el cruce de los módulos, sin embargo, no hubo efecto significativo ($\alpha = 0.05$) sobre los valores numéricos de G' y G'' cuando ocurrió el cruce. La baja rigidez de los “geles” formados en estas concentraciones de KCl, permitió emplear altas deformaciones durante el seguimiento de los módulos. En acuerdo con el cuarto criterio citado por Ross-Murphy (1991): el tiempo de gelificación (t_{gel}) ocurre cuando $G' = G''$ ($\tan \delta = 1.0$) y este disminuyó con el incremento de la concentración de K^+ .

Cuadro 6. Efecto de la concentración de K^+ sobre el tiempo de cruce de los módulos G' y G'' para 0.5% de κ -carragenina a 9 °C y 1 Hz en la zona de viscoelasticidad lineal.

Concentración KCl (mM)	G', G'' (Pa)	Tiempo (min)	% deformación
1	-	-	60
2	2.32	414	40
3	2.28	189	30
4	2.41	42	20
5	2.38	17	5

La Figura 41 muestra el efecto de la concentración de K^+ (1 a 5 mM KCl) sobre la evolución del módulo G' y la $\tan \delta$ a través del tiempo a 9 °C a 1 Hz en la zona de viscoelasticidad lineal. No se incluyó la solución con 0.5% de κ -carragenina sin la adición de K^+ porque no presentó ningún cambio debido a la inexistencia de un gel, la C_T de esta solución se encuentra muy próxima a C^* (Figura 23). Al incorporar KCl, G' (Figura 41a) aumenta gradualmente con el tiempo tendiendo hacia un valor asintótico. Un aspecto adicional que se observó, es que la velocidad de gelificación se incrementó con la presencia de KCl, de tal forma, que con mayores concentraciones de KCl se pueden obtener geles más rápido. Por su parte, la $\tan \delta$ (Figura 41b) disminuyó con la presencia de KCl, sin embargo, sólo con 5 mM se obtuvieron valores < 1 pero no tan pequeños como los reportados previamente en la sección 5.1.3.3.

Una vez concluidas las 7 horas, se realizaron barridos de frecuencia al mismo valor de deformación empleado durante la prueba anterior y se corroboró la zona de viscoelasticidad lineal. Los resultados se muestran en la Figura 42.

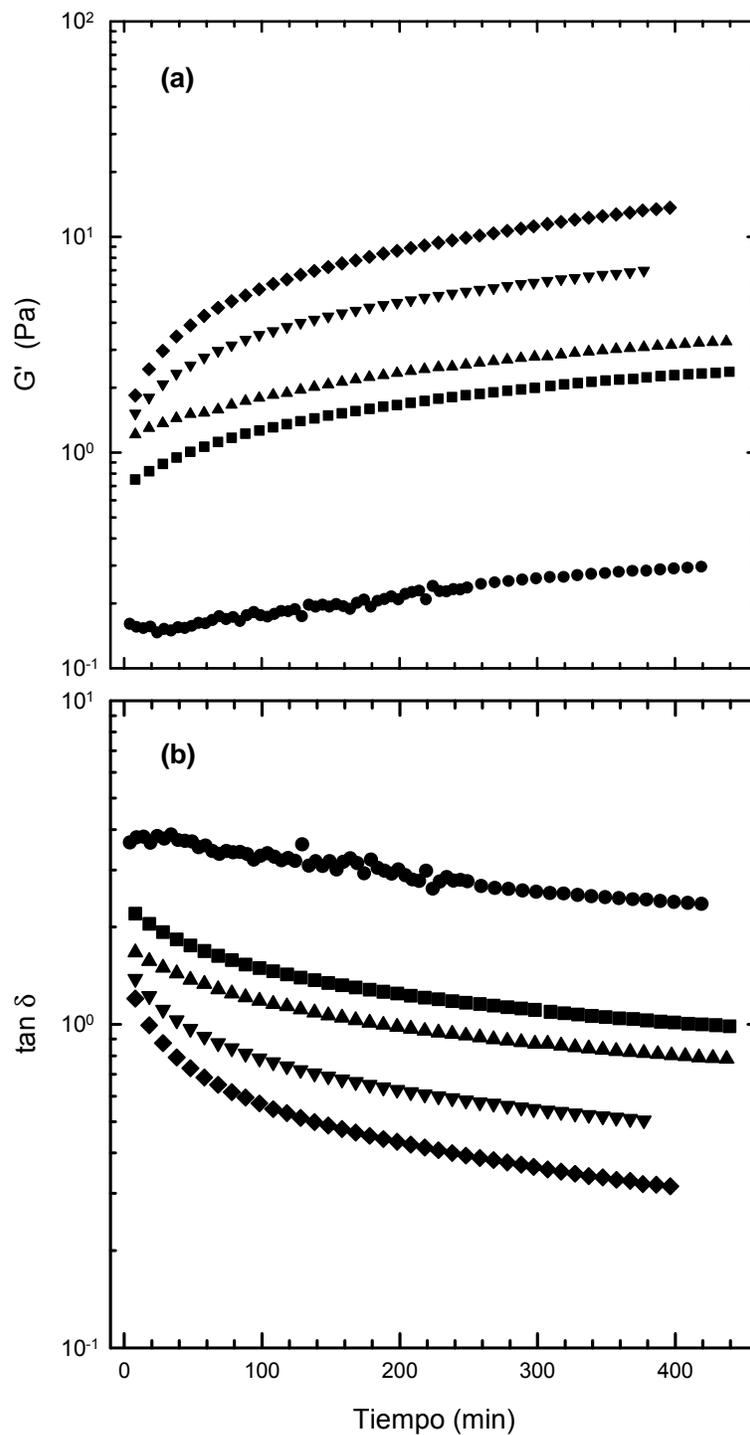


Figura 41. Efecto de la concentración de K^+ sobre la evolución de (a) G' , (b) $\tan \delta$ en 0.5% de κ -carragenina a 9 °C y 1 Hz en la zona de viscoelasticidad lineal: 1 (círculos), 2 (cuadros), 3 (triángulos), 4 (triángulos invertidos) y 5 (diamantes) mM de KCl. Las condiciones experimentales corresponden a la zona D en la Figura 23.

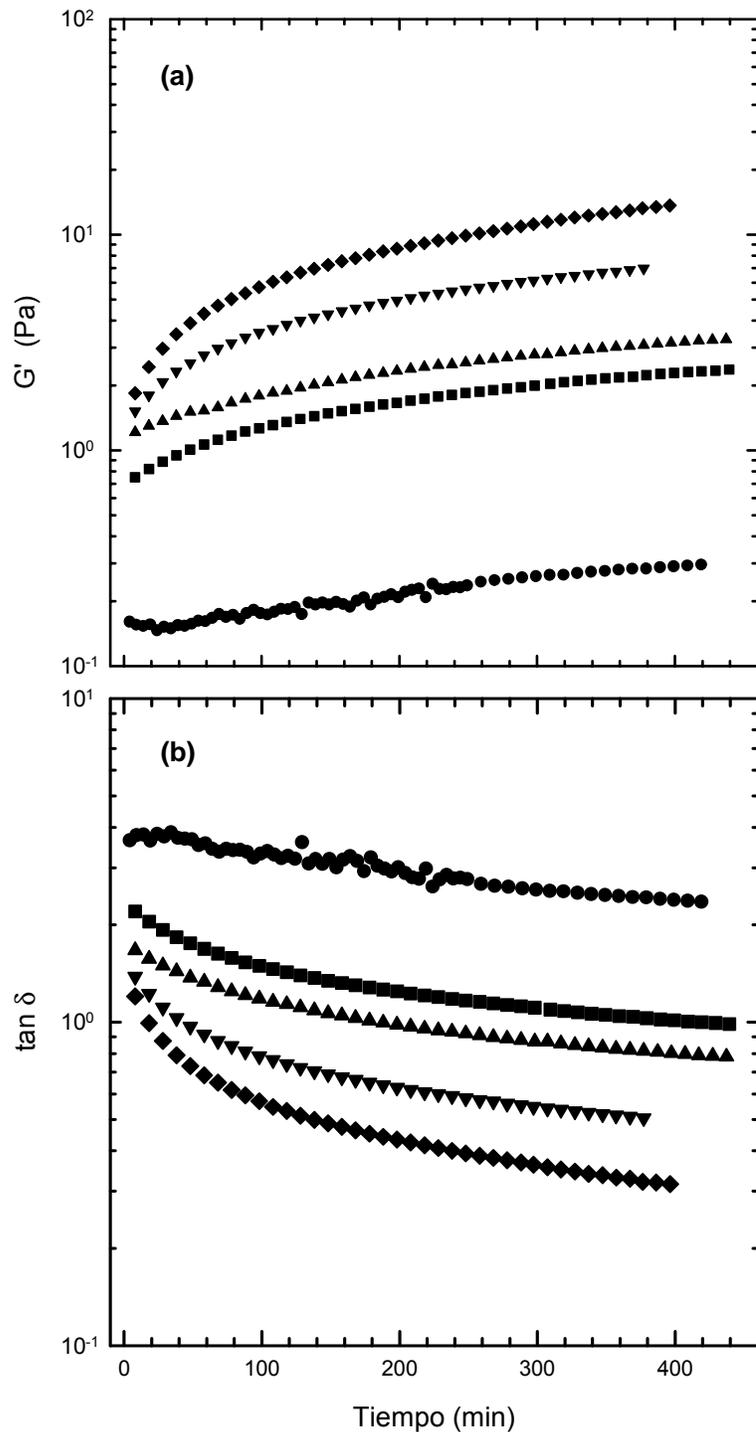


Figura 41. Efecto de la concentración de K^+ sobre la evolución de (a) G' , (b) $\tan \delta$ en 0.5% de κ -carragenina a 9 °C y 1 Hz en la zona de viscoelasticidad lineal: 1 (círculos), 2 (cuadros), 3 (triángulos), 4 (triángulos invertidos) y 5 (diamantes) mM de KCl. Las condiciones experimentales corresponden a la zona D en la Figura 23.

En general, ambos módulos incrementaron su valor con el aumento en la concentración de KCl. La solución de κ -carragenina sola (círculos) mostró un comportamiento característico de una solución macromolecular, donde $G'' > G'$ y ambos módulos fueron dependientes de la frecuencia, con un entrecruzamiento entre sí, Figura 42a, así como la $\tan \delta$, que siempre fue mayor de 1.0 (Figura 42b). La incorporación de K^+ produjo cambios en la dependencia de los módulos con la frecuencia, siendo el caso extremo el de 5 mM de KCl (cuadros punteados). El Cuadro 7 resume los resultados obtenidos de los valores de cruzamiento de los módulos, la frecuencia y el tiempo de relajación calculado como el inverso de la frecuencia de entrecruzamiento de los módulos G' y G'' .

Cuadro 7. Efecto de la concentración de K^+ adicionado sobre los valores de G' y G'' , ω , tiempos de relajación y coeficientes a y b para κ -carragenina 0.5% a 9 °C.

mM KCl	$G' = G''$ (Pa)	ω rad/s	Tiempo relajación (s)	$G' \sim \omega^a$		$G'' \sim \omega^b$	
				a	r^2	b	r^2
0	4.1	45.0	0.02	1.37	0.99	0.93	0.99
1	3.3	16.7	0.06	1.16	0.99	0.80	0.99
2	0.87	0.5	2.0	0.46	0.99	0.37	0.99
3	-	-	-	0.29	0.99	0.36	0.99
4	-	-	-	0.29	0.99	0.27	0.99
5	-	-	-	0.18	0.99	0.22	0.99

La presencia de K^+ produjo cambios en los tiempos de relajación de las disoluciones: a mayor concentración de KCl mayores tiempos de relajación con una menor dependencia de los módulos G' y G'' con respecto a la frecuencia. Finalmente, el análisis de la $\tan \delta$ de los fluidos anteriores (Figura 42b), al igual que los módulos, mostró una dependencia de la concentración de KCl. En esta figura, se observó una clara dependencia de la $\tan \delta$ con respecto a la frecuencia para 0 y 1 mM KCl variando desde 3 a 1 en ambos casos, mientras que para 3 mM la dependencia disminuyó de valores mayores a menores de 1, como lo refleja el cruce de los módulos G' y G'' . Para las concentraciones de 4 y 5 mM de KCl se observaron comportamientos menos dependientes de ω , característicos de un gel, con una mayor rigidez conforme se incrementó la concentración de KCl.

Chen *et al.* (2002) analizaron el efecto de la temperatura, de 5 a 20 °C, sobre la evolución en el tiempo de G' , así como la dependencia de ambos módulos con la

frecuencia de una solución con 1% de κ -carragenina sin la presencia de K^+ . Los espectros reológicos no mostraron en ningún caso un cruce entre los módulos, sin embargo, denominaron estos materiales como “geles débiles” porque $G' > G''$ y porque fluyen (Ross-Morphy, 1995). Desde este punto de vista, se puede considerar que este tipo de geles formados pueden tratarse como débiles a partir de 3 mM de KCl porque $G' > G''$ y la $\tan \delta$ es pequeña. Sin embargo, y recordando que estas soluciones corresponden con las estudiadas por microDSC en la sección 5.1.1.2, las bajas concentraciones de KCl añadido produjeron disoluciones donde no todas las dobles hélices formadas tuvieron la capacidad de formar agregados, lo que produjo la coexistencia en un mismo sistema de dobles hélices agregadas con dobles hélices sin agregar. Es importante mencionar que no se habían realizado estudios reológicos previos de la κ -carragenina para estas condiciones de C_T y temperatura, probablemente porque el sistema no presenta una estructura homogénea. Ahora bien, desde el punto de vista reológico, el empleo del término “gel débil” no es válido en estos sistemas, porque la conformación de la red tridimensional, si bien es cierto que existe, no puede considerarse homogénea ni continua en el sistema estudiado, por lo que la definición de gel deja de ser válida. Se trata de disoluciones cuyo carácter elástico, o sólido, está determinado por la cantidad o proporción de dobles hélices que logran formar agregados. A mayor concentración de KCl, mayor será la proporción de dobles hélices que se encuentren formando dichos agregados. Sin embargo, existen dobles hélices que se encuentran en forma aislada, formando parte de una solución y cuyo tiempo de relajación aumenta con la concentración de K^+ , debido a que la presencia de iones produce un incremento en la rigidez de las dobles hélices en solución.

5.1.4.2. Efecto de la concentración iónica total en disoluciones de κ -carragenina cuando la concentración iónica total es inferior a la concentración crítica ($C_T < C^*$)

Como se citó previamente en la revisión bibliográfica, existe evidencia de la conformación de la κ -carragenina en doble hélice sin formar agregados en presencia de Γ . Sin embargo no existe un estudio reológico sobre la condición de conformación de dobles hélices sin formar agregados en presencia de K^+ (condiciones experimentales E, en la Figura 23), aún cuando existe una gran probabilidad de que algunos de los productos alimenticios, especialmente las bebidas tipo yogur, contienen bajas cantidades de carragenina y se consumen en condiciones de refrigeración (9 °C).

a) Viscosidad intrínseca

En esta sección se analiza el efecto de C_T del sistema K^+ - κ -carragenina en una conformación helicoidal. De acuerdo con el diagrama de transición sol-gel (Figura 23), $C^* \approx 0.0072$ eq/L, lo que corresponde con una concentración de 0.5% de κ -carragenina. Esta es la máxima concentración de polisacárido para obtener una conformación helicoidal sin formar agregados. Debido a esto, las concentraciones de todas las soluciones empleadas en el presente estudio fueron menores que este valor de C_T . La determinación de la $[\eta]$ se hizo siguiendo la descripción de la sección 4.3.5.2 de materiales y métodos.

La Figura 43 muestra la representación de las ecuaciones 5, 6 y 7 de κ -carragenina en 0.1 N de NaCl + 0.005 M de EDTA a 25 °C. La solución presentó congruencia en la ordenada al origen para las tres ecuaciones citadas, con coeficientes de regresión, $r^2 > 0.95$ con una $[\eta] = 10.5$ dL/g. Chronakis *et al.* (2000) obtuvieron una $[\eta] = 7.25$ dL/g en una solución con 0.05 M de NaCl. El valor obtenido en el presente trabajo es característico de polisacáridos lineales de cadenas flexibles, tales como la guar con una $[\eta] = 8.3$ dL/g, (Robinson *et al.*, 1982) y la gelana, con una $[\eta] = 5$ dL/g (Dreveton *et al.*, 1996). Este valor se usó en la ecuación de Mark-Houwink (ecuación 8) con las constantes $a = 0.95$ y $k = 3.1 \times 10^{-5}$ (Rochas y Landry, 1987) y se obtuvo una masa molecular promedio de 5.63×10^5 g/mol.

A 9 °C, no fue factible usar la solución salina de NaCl porque el diagrama de transición sol-gel fue obtenido en presencia de K^+ y lo que se buscó fue obtener una conformación de dobles hélices sin formar agregados a una C_T constante. Para esto, en cada C_T estudiada (ver región E de la Figura 23) se calculó la C_T para diferentes concentraciones de κ -carragenina. Por ejemplo, el 0.5% de κ -carragenina, correspondió a $C_T = 0.0072$ eq/L, y se obtuvo la viscosidad intrínseca ajustando las concentraciones de C_p y C_s de tal manera que C_T fuera constante. Para una $C_T = 0.0072$ eq/L, la $[\eta] = 19.3$ dL/g, sin embargo, de la ecuación de Huggins, $k_1 = 0.82$, lo que indicó que existió la agregación entre las moléculas del biopolímero durante la medición de la viscosidad (Beer *et al.*, 1999; Chronakis *et al.*, 2000). De acuerdo con el diagrama de transición sol-gel (Figura 23), una $C_T = 0.0072$ eq/L es muy próxima a la C^* pero es superior. El comportamiento reológico de la solución de κ -carragenina a 9 °C se relaciona con los resultados de microDSC obtenidos previamente, donde se mostró la coexistencia de dobles hélices en solución con dobles hélices formando agregados.

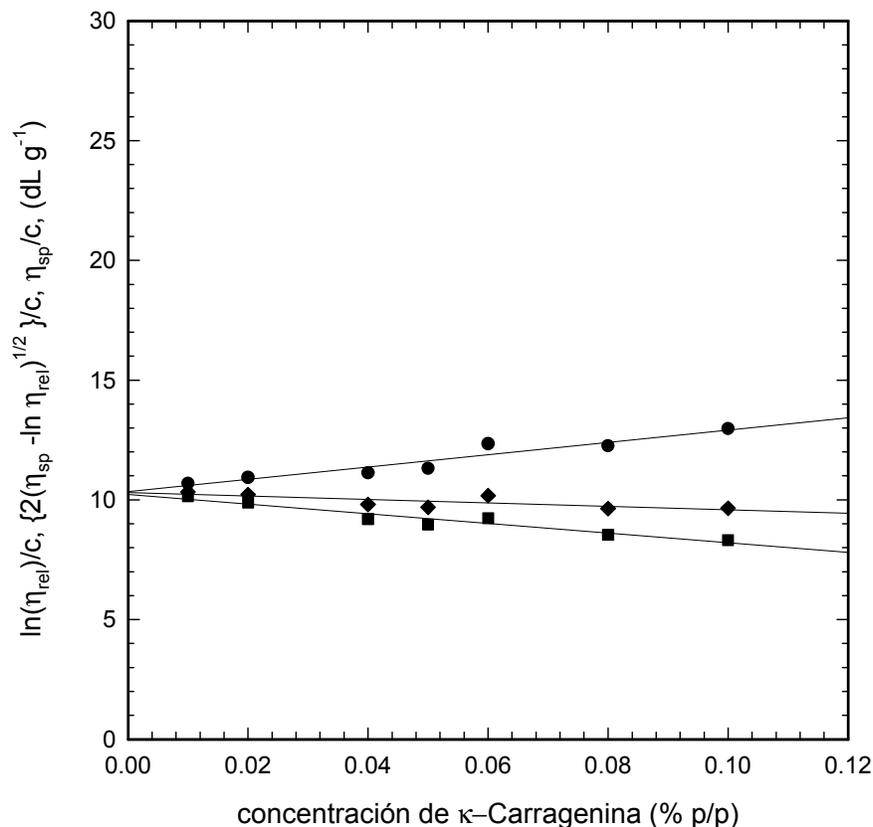


Figura 43. Viscosidad intrínseca de κ -carragenina en 0.1 N de NaCl + 0.005 M de EDTA a 25 °C. Ecuación de Huggins (círculos), Kraemer (cuadros) y un solo punto (diamantes).

Retomando el objetivo de esta sección, la Figura 44 muestra el cálculo de la viscosidad intrínseca de κ -carragenina para $C_T = 0.0058$ eq/L a 9 °C. El valor de la viscosidad intrínseca obtenida a 9 °C es mayor que a 25 °C. Si bien es cierto que se trata de condiciones iónicas diferentes, el volumen hidrodinámico se duplica a 9 °C, indicando que se trata de una conformación diferente a la obtenida a 25 °C. De acuerdo con el diagrama de transición sol gel, en estas condiciones se tiene una conformación de dobles hélices sin formar agregados. Estos resultados son congruentes con los obtenidos previamente por microDSC y con los barridos de temperatura de la sección 5.1.2.3b, donde se observa una transición desorden–orden.

Para una conformación helicoidal de κ -carragenina en presencia de I^- (0.2 M NaI), Chronakis *et al.* (2000) reportaron un valor de $[\eta] = 23.5$ dL/g, valor acorde con el presente trabajo. De forma similar, se obtuvieron las respectivas viscosidades para $C_T = 0.0043$, 0.0029 y 0.0014 eq/L (figuras no mostradas). El Cuadro 8 muestra el resumen de

la constante k_1 de la ecuación de Huggins para cada C_T estudiada. En general, todas las gráficas siguieron (datos no mostrados) un comportamiento lineal de los tres modelos, en todos los casos $r^2 > 0.950$ con una buena convergencia hacia la dilución infinita entre los tres modelos. Los valores de viscosidad obtenidos para cada solución se resumen en el Anexo A.

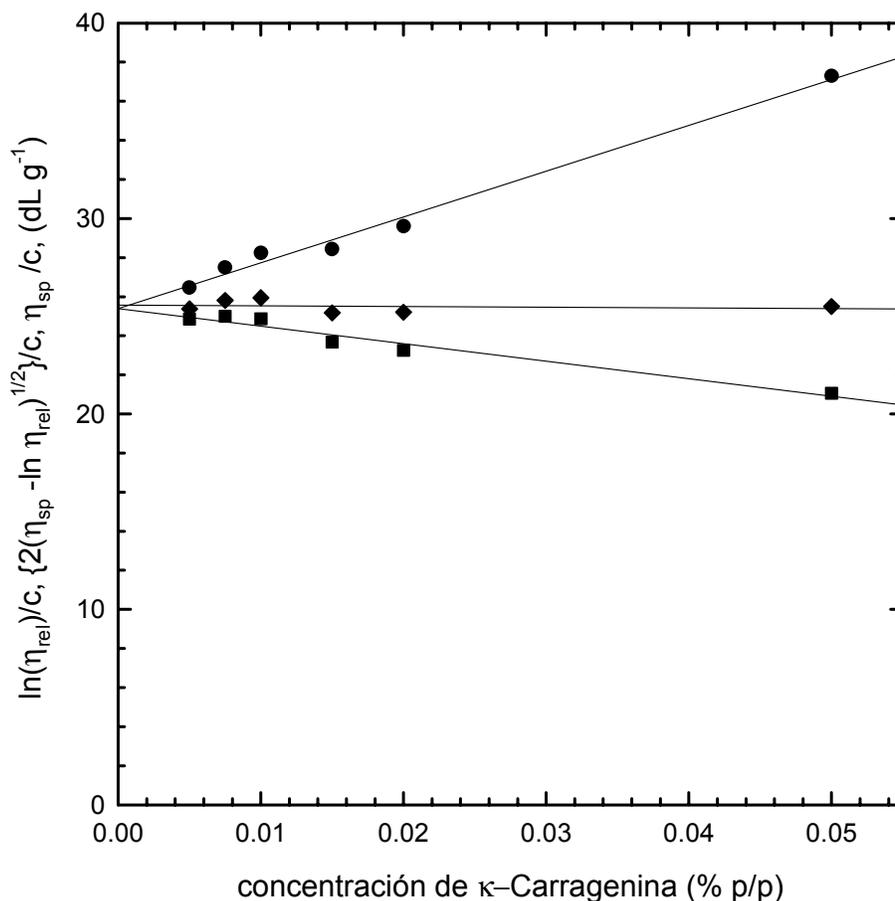


Figura 44. Viscosidad intrínseca de κ -carragenina a $C_T = 0.0058$ eq/L a $9\text{ }^\circ\text{C}$ en presencia de K^+ . Ecuación de Huggins (círculos), Kraemer (cuadros) y un solo punto (diamantes). Condiciones experimentales E de la Figura 23.

Los valores de k_1 mostraron que las C_T estudiadas a $9\text{ }^\circ\text{C}$ no presentaron la agregación de las dobles hélices.

Cuadro 8. Efecto de la C_T en disoluciones de K^+ - κ -carragenina a $9\text{ }^\circ\text{C}$.

C_T (eq/L)	k_1 de la Ec. de Huggins (ec. 5)
0.0058	0.338
0.0043	0.279
0.0029	0.451
0.0014	0.499

Para una $C_T = 0.0043$ eq/L (que corresponde a 0.3% de κ -carragenina) los resultados son congruentes con los obtenidos previamente en microDSC y los respectivos barridos de temperatura en esta solución.

El efecto de C_T sobre la $[\eta]$ a 9 °C se muestra en la Figura 45. En general, todos los valores de $[\eta]$ fueron altos, lo que indica una molécula que estructuralmente se encuentra en forma expandida. De acuerdo con la figura, la viscosidad intrínseca disminuye ligeramente entre los valores de 0.0028 a 0.0046 eq/L y drásticamente a 0.0058 eq/L. Por otro lado, a 0.0014 eq/L, la κ -carragenina ya no se encuentra en una conformación de dobles hélices (ver Figura 23) sino en una conformación de hebra aleatoria en una $C_T = 0.0014$ eq/L. Desafortunadamente, la zona de conformación de dobles hélices de la κ -carragenina sin formar agregados es limitada, y no permitió ampliar el estudio de la misma en esta conformación bajo condiciones de C_T elevada. Sin embargo, se mostró que el incremento de la C_T produce una disminución de la $[\eta]$ tanto en una conformación de hebra aleatoria como en forma de dobles hélices sin formar agregados.

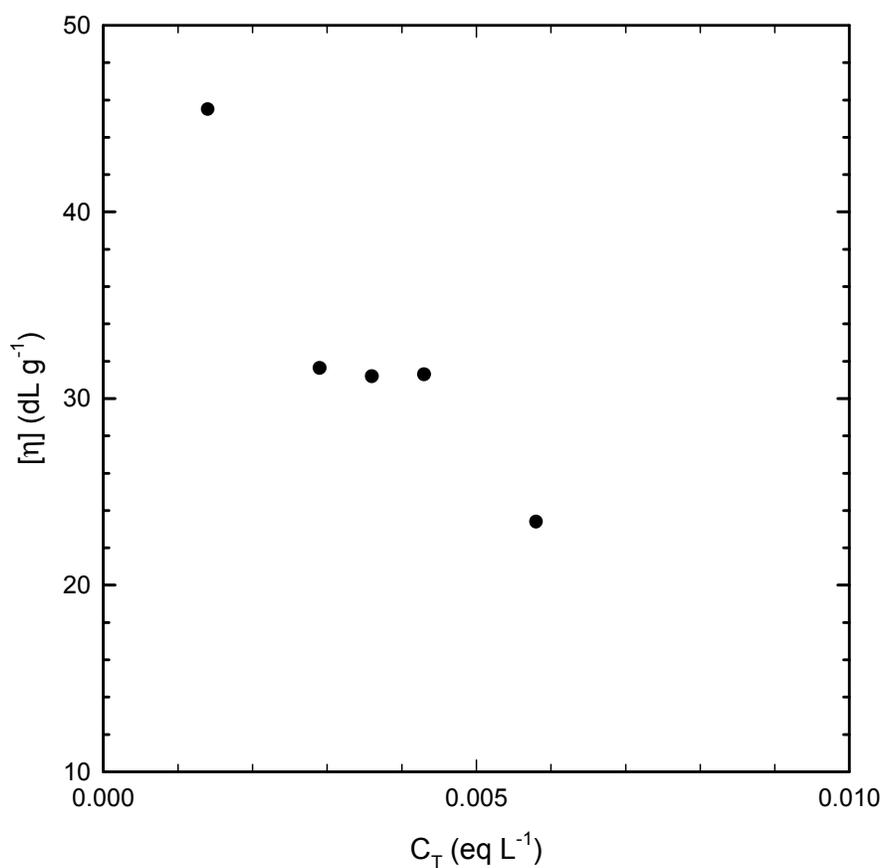


Figura 45. Efecto de C_T en la $[\eta]$ de κ -carragenina a 9 °C. Condiciones experimentales E en la Figura 23.

Cuando la κ -carragenina se encuentra en un estado de hebra aleatoria es posible obtener un comportamiento lineal entre la $[\eta]$ vs. el recíproco de la raíz cuadrada de la fuerza iónica de la solución, $I^{-0.5}$ (Vreeman *et al.*, 1980). En el presente estudio no fue factible obtener el especto de $[\eta]$ debido al estrecho intervalo de posibilidades para la obtención de la hebra aleatoria a C_T constante en presencia de K^+ .

b) Dependencia de la viscosidad de κ -carragenina con la concentración iónica total

La Figura 46 muestra la variación de la viscosidad específica, η_{sp} con respecto a la concentración de polímero, expresada como la fracción volumen “efectiva” de las cadenas hidratadas con el disolvente, $c[\eta]$ (Chronakis *et al.*, 2000), para $C_T = 0.0058$ eq/L a 9 °C. En la figura se observan dos zonas bien definidas por el cambio de las pendientes obtenidas antes y después de c^* (ver flecha vertical en la figura). La figura muestra que existen dos regímenes de dependencia de la concentración de polímero; en el régimen diluido, $c[\eta] < c^*[\eta]$, las cadenas helicoidales se encuentran en una forma aislada. Cuando se alcanza c^* , las cadenas comienzan a superponerse y el movimiento libre de una cadena individual es restringido por la presencia de otras. En la región semidiluida, $c[\eta] > c^*[\eta]$, existe la compresión y la posterior interpenetración entre las cadenas poliméricas (Chronakis *et al.*, 2000). Así se observó una transición gradual del comportamiento de una solución diluida (dobles hélices aisladas) con un incremento continuo del grado de interacción de las moléculas hacia una solución semidiluida con macromoléculas sobrepuestas.

En un sistema de κ -carragenina en 0.1 N de NaI, los valores de las pendientes fueron de 1.2, 1.28 y 6.0 en tres zonas definidas por el cambio de pendiente entre $\log \eta_{sp}$ y el $\log c[\eta]$ (Chronakis *et al.*, 2000), sin embargo en el presente trabajo, sólo se observaron dos zonas perfectamente bien delimitadas. Los valores de las pendientes son similares a las pendientes obtenidas para otros polisacáridos, por ejemplo la xantana en 0.1 M en NaCl, cuyas pendientes son de 1.25 y 1.94 antes y después de c^* , respectivamente (Ndjouenkeu *et al.*, 1996). De forma similar, se determinaron las pendientes y c^* para otros valores de C_T . El Cuadro 8 resume los valores de las pendientes obtenidas y la Figura 48 muestra la dependencia de c^* con C_T .

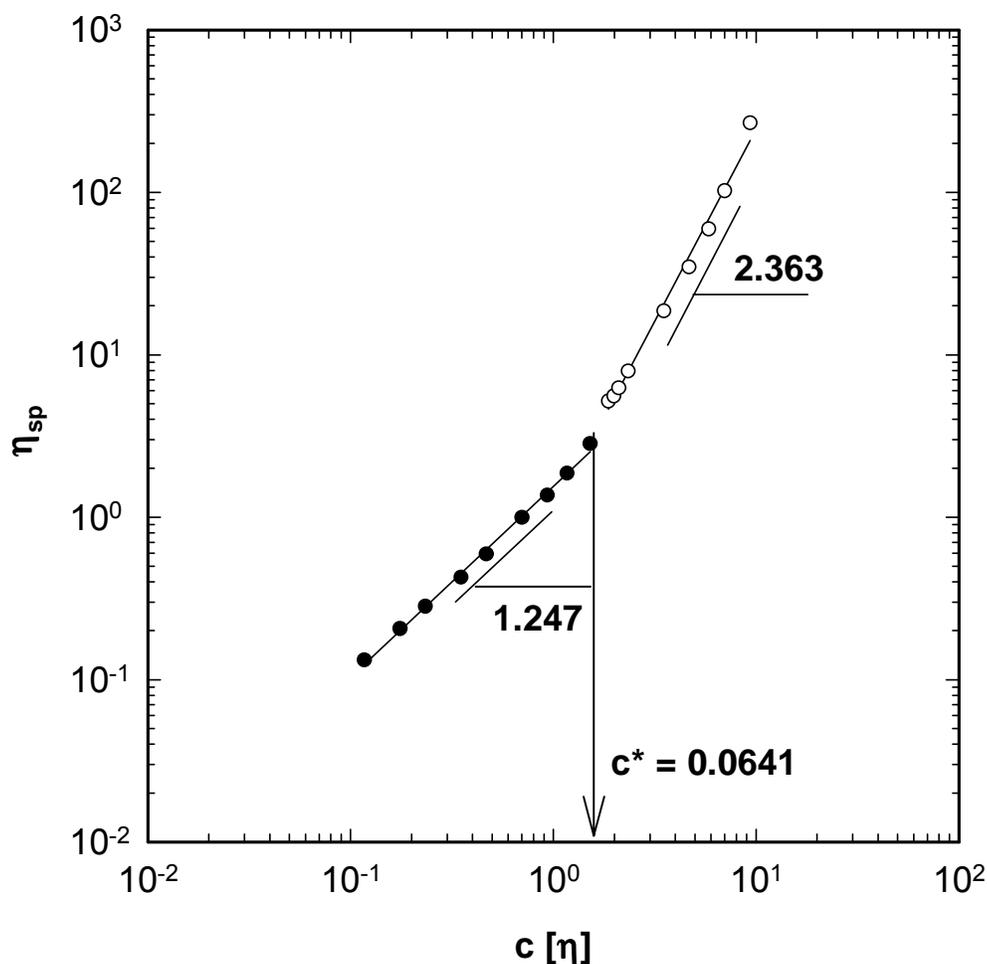


Figura 46. Variación de la viscosidad específica (η_{sp}) con el volumen efectivo de κ -carragenina para $C_T = 0.0058$ eq/L a 9°C .

Cuadro 9. Efecto de C_T en la concentración crítica en K^+ - κ -carragenina a 9°C .

C_T eq/L	pendiente $c[\eta] < c^*[\eta]$	pendiente $c[\eta] > c^*[\eta]$	Condición crítica $c[\eta]$
0.0072	1.28	2.80	2.0
0.0058	1.25	2.36	1.5
0.0043	1.17	2.31	1.4
0.0029	1.25	1.92	1.5

A partir de los valores del cuadro, se observa que en todos los casos, el valor de las pendiente es muy similar, pero el punto importante de resaltar es que en la condición crítica (valor de $c[\eta]$ para el cual se determinó la c^*) fue el mismo, a excepción de $C_T = 0.0072$ eq/L, donde existe evidencia de la agregación en las dobles hélices. Si en la condición crítica, el producto $c[\eta]$ se mantuvo constante, el valor de c^* dependió de la C_T en la misma proporción que varió la $[\eta]$, como lo muestra la Figura 47: c^* disminuye

cuando C_T disminuye. Sin embargo para $C_T = 0.0029$ eq/L hubo una excepción debido a que el valor de $[\eta]$ fue similar al valor para $C_T = 0.0043$ eq/L. En general, se observó una pequeña zona de comportamiento lineal, sin embargo ésta se perdió para $C_T = 0.0029$ eq/L. Chronakis *et al.* (2000) encontraron un valor de $c^* = 0.09\%$ masa para κ -carragenina en una solución 0.2 M de NaI a 25 °C, valor muy cercano al obtenido para $C_T = 0.0072$ eq/L. Es importante señalar que una gráfica similar de la dependencia de c^* con respecto a C_T en una conformación helicoidal en presencia de K^+ no existe en la literatura, por lo que esto constituye una contribución original en este trabajo. Estos resultados permiten comprender la forma en que interaccionan las moléculas de κ -carragenina en solución cuando se encuentran en forma de doble hélice, así como el establecimiento del régimen de dilución en que se encuentran y cómo la concentración iónica influye sobre éste.

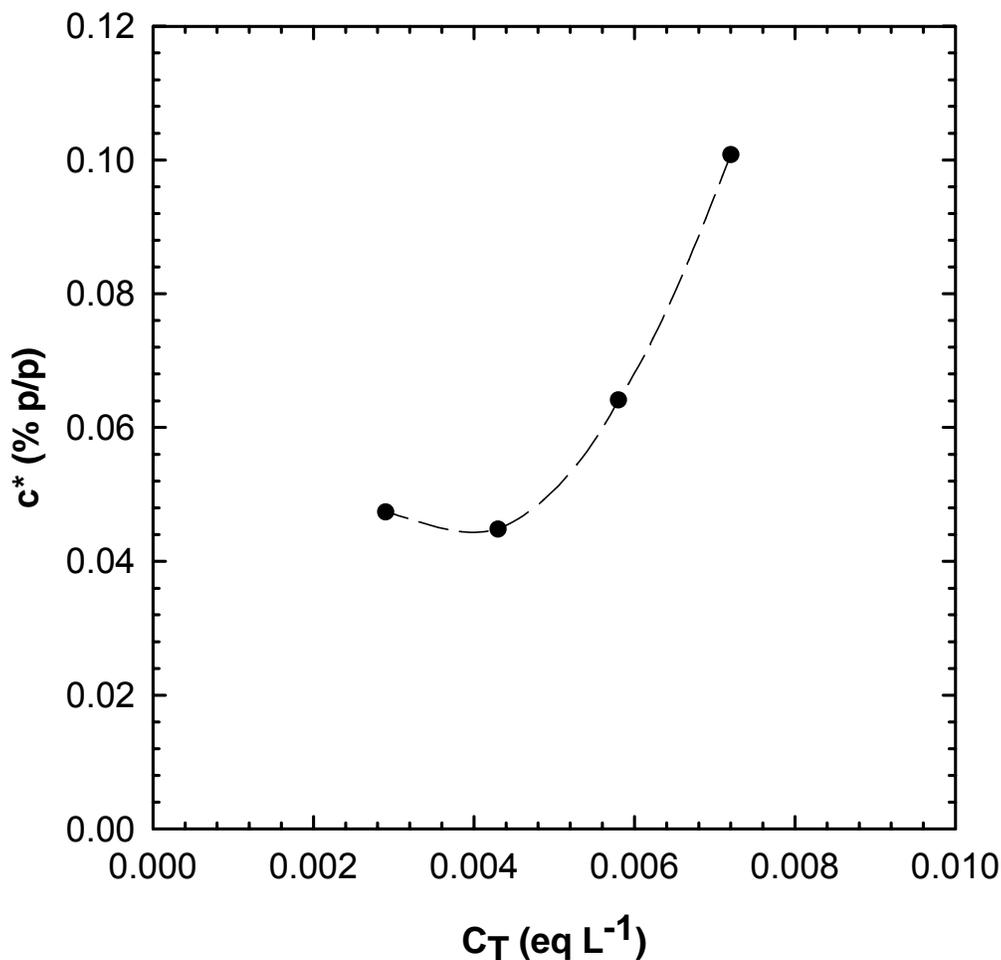


Figura 47. Efecto de C_T sobre la c^* en K^+ - κ -carragenina en una conformación de dobles hélices a 9 °C. Las líneas sólo se incluyeron como guías visuales.

c) En pruebas de cizalla oscilatoria

Para complementar el estudio del efecto de C_T sobre el comportamiento reológico de la κ -carragenina en forma de doble hélice en presencia de K^+ , se realizaron pruebas de cizalla oscilatoria a 9 °C a C_T constante, obteniendo *curvas maestras concentración–frecuencia*. Éstas se obtuvieron con el empalme de las curvas individuales a diferentes concentraciones de κ -carragenina para una misma C_T (ajustada con una solución 10 mM de K^+ cuando fue necesario), empleando en este caso específico una concentración de 0.2% de κ -carragenina como referencia. El propósito de la sobreposición de las curvas para cada concentración es extender el intervalo de frecuencia en el espectro mecánico de una solución polimérica. El segundo objetivo de la sobreposición fue analizar el efecto de la C_T sobre el tiempo de relajación de las soluciones, calculado como el inverso de la frecuencia de cruce entre los módulos G' y G'' . La Figura 48 muestra las curvas maestras obtenidas para cada C_T en el intervalo de 0.0058 a 0.0029 eq/L. En forma general, para todas las soluciones manejadas en el presente estudio, el comportamiento reológico fue característico de una solución macromolecular, donde ambos módulos son dependientes de la frecuencia (por ejemplo, $G' \approx \omega^{1.35}$ y $G'' \approx \omega^{0.97}$ para $C_T = 0.0058$ eq/L). La dependencia de los módulos, muestra que tienden hacia el comportamiento de un líquido viscoelástico, sin embargo las pendientes de ambos módulos cambiaron para cada C_T .

Para todos los valores de C_T , el factor de frecuencia a_c (o factor horizontal) y el factor modular, b_c (o factor vertical) se determinaron gráficamente por una sobreposición vertical y horizontal de los datos de una concentración dada con respecto a la concentración de referencia. El factor horizontal se calculó como:

$$a_c = \omega_{\text{sobreposición}} / \omega_{\text{datos originales}} \quad (9)$$

donde $\omega_{\text{sobreposición}}$ es la frecuencia angular después de la sobreposición, $\omega_{\text{datos originales}}$ es la frecuencia angular original. El factor vertical, b_c se calculó mediante la expresión:

$$b_c = G^*_{\text{sobreposición}} / G^*_{\text{datos originales}} \quad (10)$$

donde $G^*_{\text{sobreposición}}$ es el módulo complejo después de la sobreposición y $G^*_{\text{datos originales}}$ es el módulo complejo original.

Los valores de a_c y b_c se resumen en la Figura 49 considerando la concentración de referencia como 0.2% de κ -carragenina en todas las curvas maestras. Para una solución de κ -carragenina en 0.2 M de NaI, Chronakis *et al.* (2000) encontraron un comportamiento lineal entre $\log a_c$ y la concentración de κ -carragenina en un intervalo de concentración de 0.35 a 1.2%. Sin embargo, sólo tuvieron los respectivos factores de desplazamiento

horizontal (a_c) sin emplear el desplazamiento vertical. La tendencia de los factores a_c y b_c no siempre siguió un comportamiento lineal entre los factores a_c y b_c con respecto a la concentración, debido probablemente al desplazamiento tanto vertical como horizontal realizado del comportamiento reológico original de cada solución de κ -carragenina, sin embargo es visible un efecto de la C_T en las curvas maestras obtenidas.

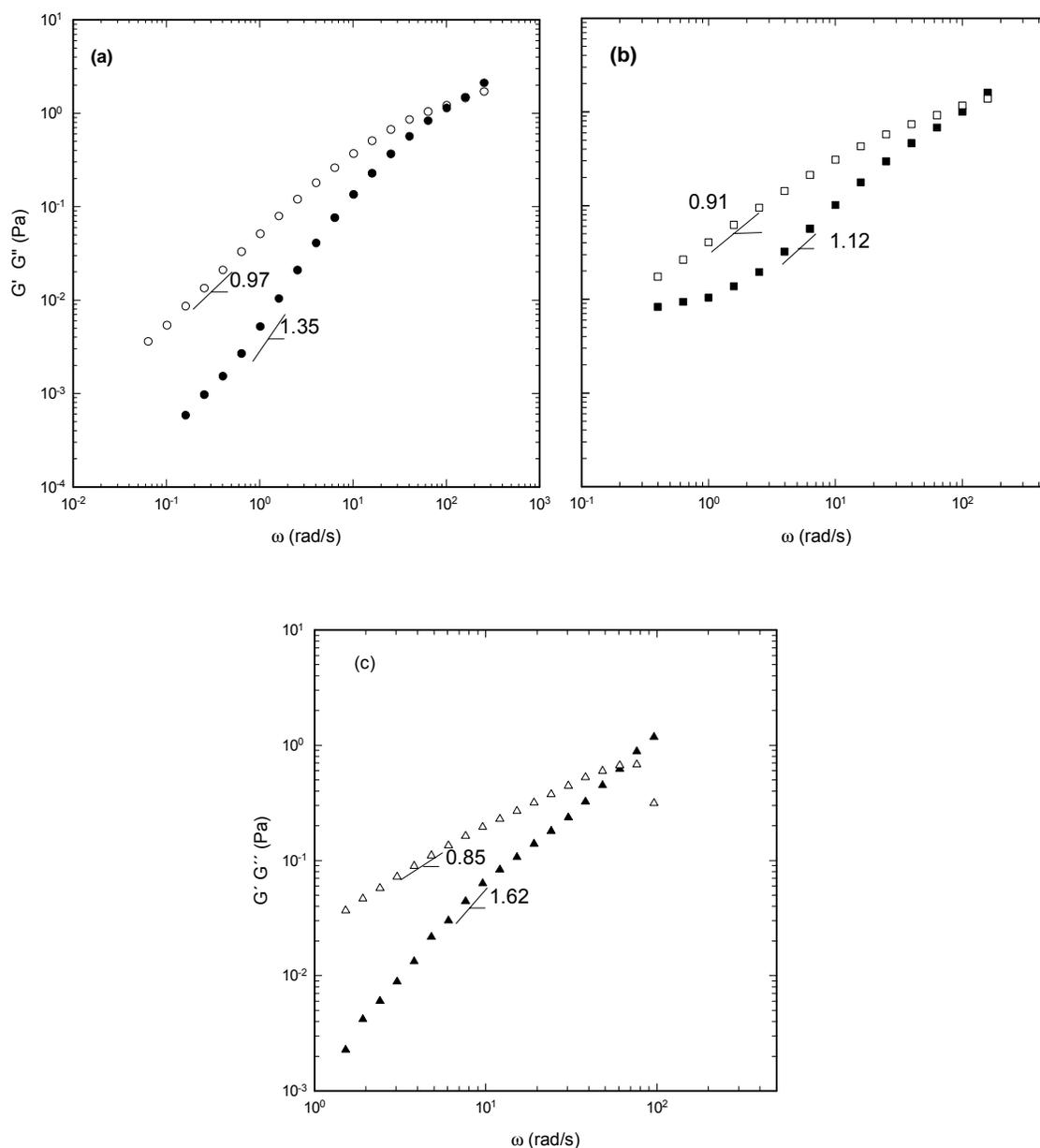


Figura 48. Efecto de C_T en curvas maestras de K^+ - κ -carragenina a 9 °C a: $C_T =$ (a) 0.0058, (b) 0.0043 y (c) 0.0029 eq/L. G' (símbolos llenos) y G'' (símbolos vacíos). Condiciones experimentales E en la Figura 23.

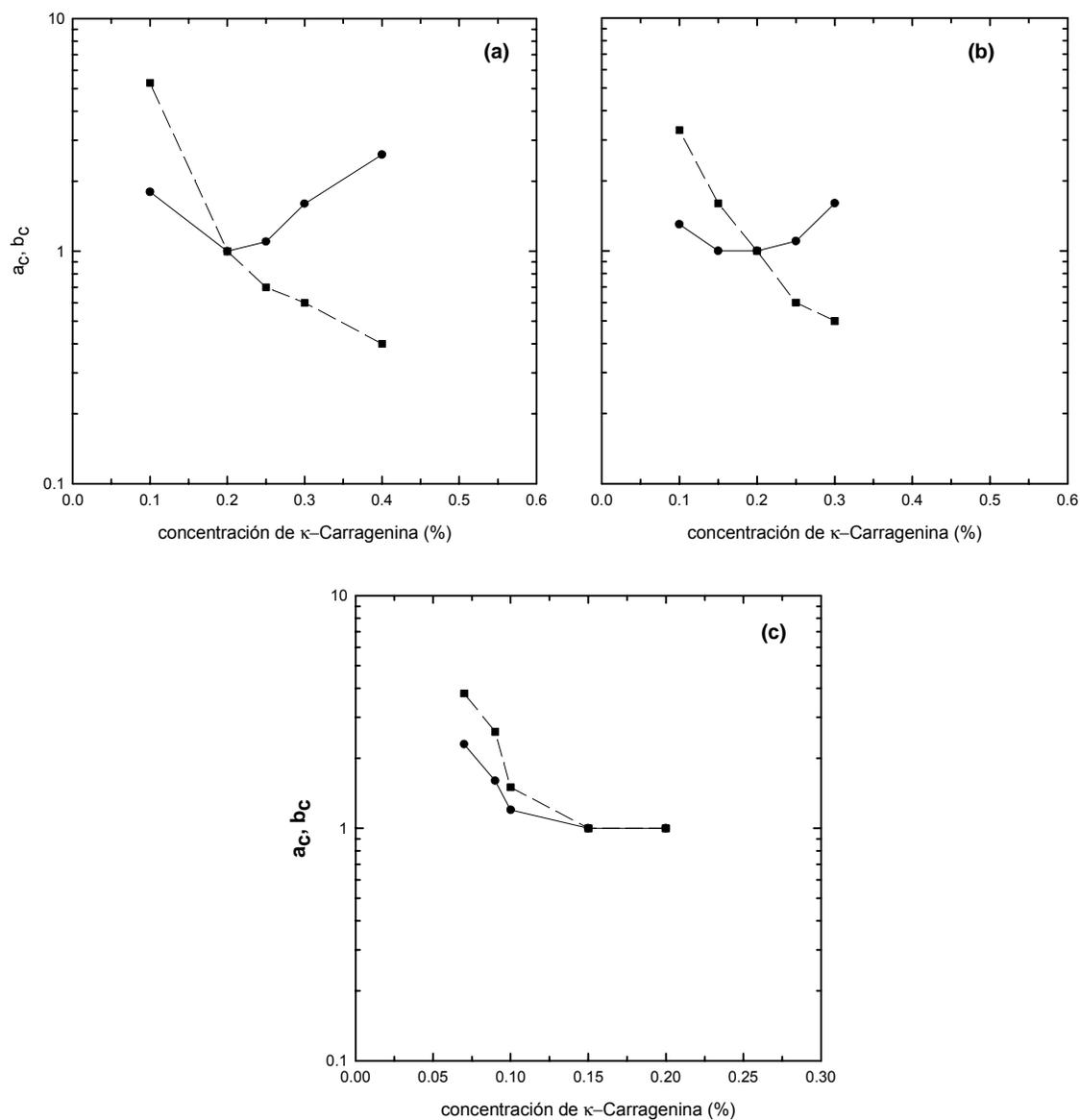


Figura 49. Efecto de C_T en los factores de sobreposición a_c y b_c en soluciones de K^+ - κ -carragenina a 9 °C a: $C_T =$ (a) 0.0058, (b) 0.0043 y (d) 0.0029 eq/L. a_c (círculos), b_c (cuadros). Las líneas sólo sirven como guías visuales. Condiciones experimentales E en la Figura 23.

5.1.5. Ultraestructura

5.1.5.1 Efecto de la concentración de κ -carragenina sobre la conformación de la red tridimensional

Para analizar el efecto del proceso de marcaje en la κ -carragenina se determinó la viscosidad intrínseca en una solución 0.1 N de NaCl + 0.005 M de EDTA a 25 °C. Los

valores obtenidos fueron de 10 dL g^{-1} para κ -carragenina sin marcar y 9 dL/g para RITC- κ -carragenina. El valor obtenido para RITC- κ -carragenina sugiere una ligera hidrólisis durante la reacción de marcado. La Figura 50 muestra las curvas de flujo de κ -carragenina sin marcar y marcada. Los valores de viscosidad de la RITC- κ -carragenina confirman la hidrólisis de la κ -carragenina, sin embargo ésta se considera aceptable con respecto a la posible modificación de la muestra original..

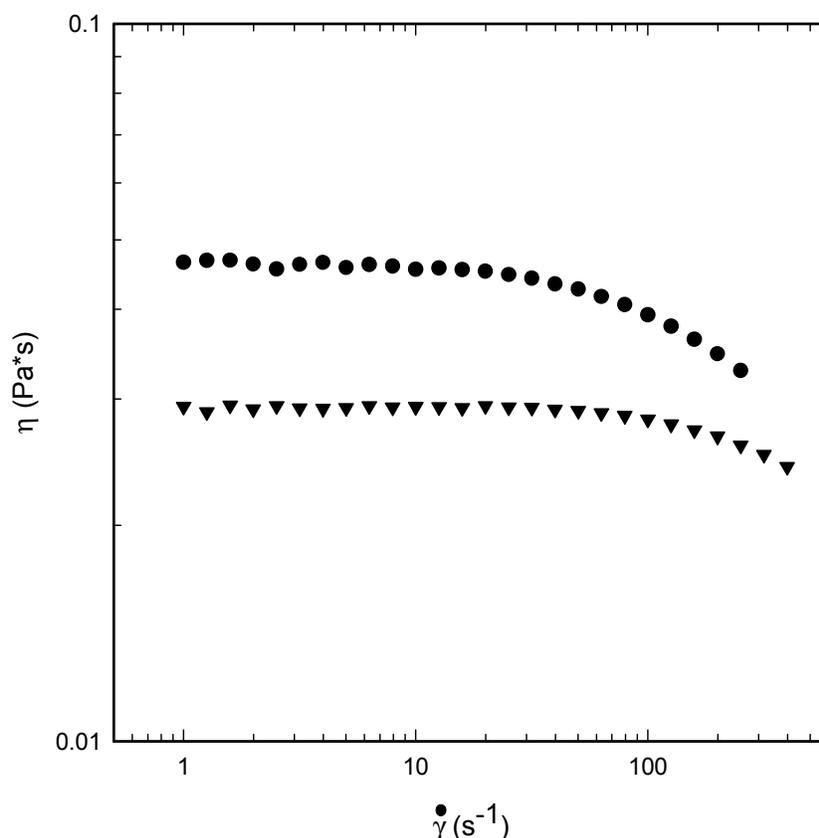


Figura 50. Curvas de flujo de una solución 0.5% de κ -carragenina sin marcar (círculos) y marcada (triángulos) a 25°C .

Las observaciones con el microscopio se orientaron al análisis de: (a) el efecto de la concentración de κ -carragenina sobre la formación de la red tridimensional para una concentración fija de KCl, y (b) el efecto del KCl sobre la formación de la red tridimensional de la κ -carragenina.

La Figura 51 muestra las imágenes, obtenidas de RITC- κ -carragenina para diferentes concentraciones de polisacárido en presencia de una solución 40 mM de KCl, con el fin de asegurar la gelificación del mismo a 25°C . En general, las figuras muestran la conformación de una red tridimensional con una distribución homogénea del fluorocromo.

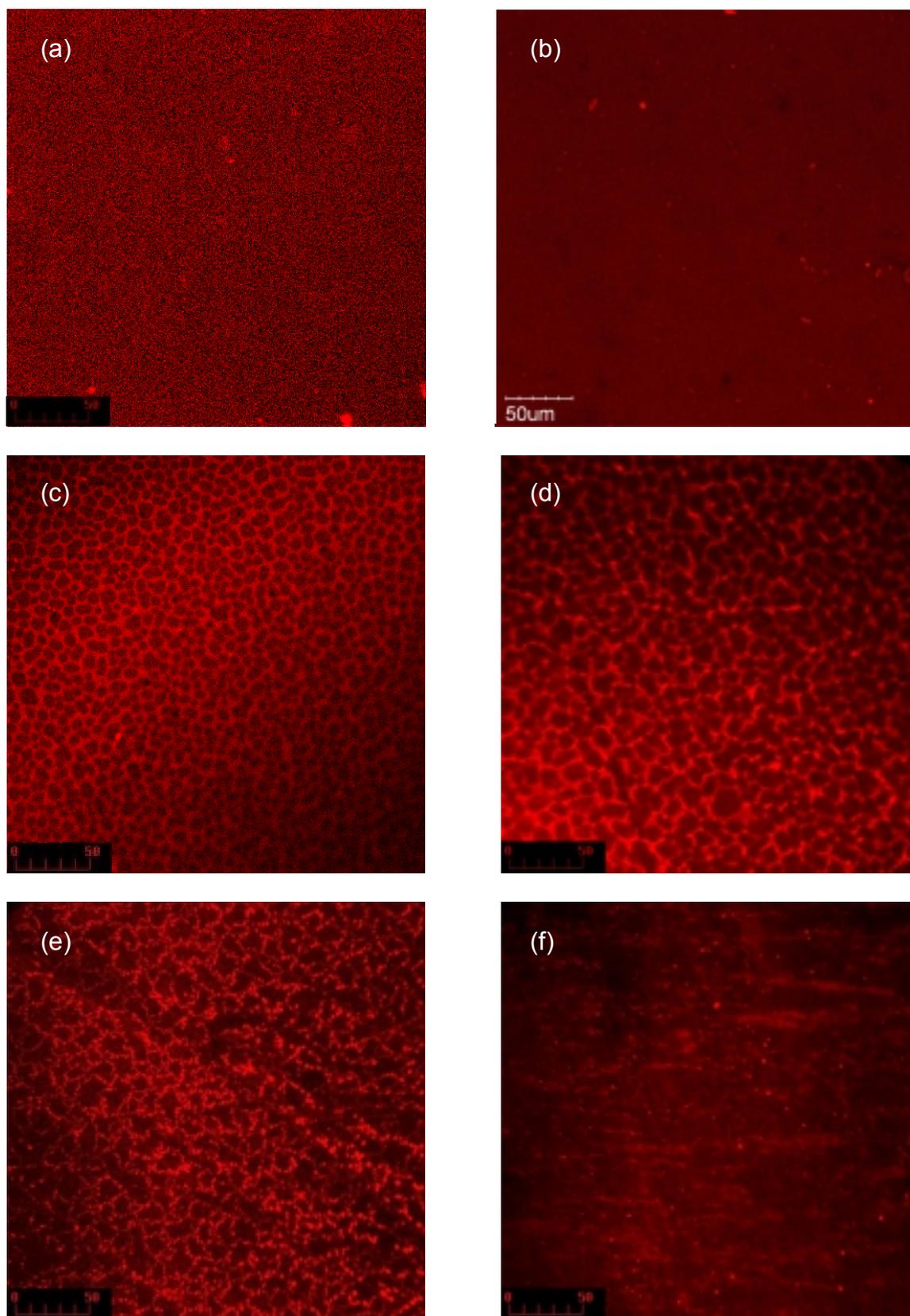


Figura 51. Microscopia confocal de barrido láser de RITC-κ-carragenina a $\lambda = 580$ nm. Efecto de la concentración de κ-carragenina en la formación de una red tridimensional en presencia de 40 mM de KCl: (a) 1.0, (b) 0.5, (c) 0.25, (d) 0.10, (e) 0.05, y (f) 0.01% masa de polímero. La escala representa μm .

La Figura 51a y la Figura 51b muestran una saturación de la red en todo el campo visual, con espacios interesaciales extremadamente pequeños. Conforme la concentración de κ -carragenina disminuyó a 0.25 y 0.1%, Figura 51c y Figura 51d, los poros de la red fueron más abiertos, sin embargo, mostraron una continuidad en la misma y los espacios intersticiales fueron del mismo orden de magnitud (5–20 μm). Cuando la concentración de κ -carragenina es del orden de 0.05 y 0.01%, Figura 51e y 51f, si bien se observó la formación de agregados, parece que existe una falta de continuidad de la red.

De forma complementaria a las observaciones realizadas en la Fig. 51, se realizaron acercamientos de los sistemas que mostraron una red abierta, debido a que altas concentraciones de κ -carragenina, 1 y 0.5 %, los acercamientos no mostraron diferencias visuales con las imágenes mostradas previamente por la saturación de la red (Fig. 51a y b). La Figura 52 muestra el sistema de κ -carragenina con 40 mM KCl complementario a la Figura 51. Como lo muestra la Fig. 52 a y b, nos confirman que a 0.1 % κ -carragenina se produce una red continua, con poros pequeños pero una red bastante definida. La Figura 52c corresponde a una concentración de 0.05 % κ -carragenina y muestra una red poco definida donde no se observa una continuidad entre los filamentos de la red y con zonas concentradas de fluorocromo. Finalmente, para 0.01% κ -carragenina, se observan hilos filamentosos extremadamente delgados, que pareciera formar una red continua, sin embargo, observando la correspondiente imagen de esta concentración, Fig. 51f, observamos que corresponde a una pequeña película de κ -carragenina que se formó. Para una concentración de 0.005% de κ -carragenina ya no fue posible observar la formación de una red continua (imagen no mostrada). Dunstan *et al.* (2001) observaron la conformación de la red tridimensional de la κ -carragenina 1% con 10 mM de KCl mediante microscopía de barrido electrónico. Ellos observaron una estructura tubular alargada, misma que coincide con las observadas en el presente trabajo.

Con el apoyo de la observación de la red tridimensional de κ -carragenina por medio de CLSM, se comprobó que aún a bajas concentraciones de polisacárido (0.05%) es posible conformar una red tridimensional. Sin embargo, cuando la concentración del polisacárido es muy baja, si bien es cierto que la κ -carragenina existe en una conformación de dobles hélices en forma de agregados, éstos no son suficientes para ocupar todo el espacio y se obtiene una solución salina de KCl con pequeñas redes de κ -carragenina dispersas en la fase continua. Las observaciones realizadas en CLSM son congruentes con los resultados reológicos obtenidos en los sistemas con 0.1% de κ -carragenina, que presentaron el

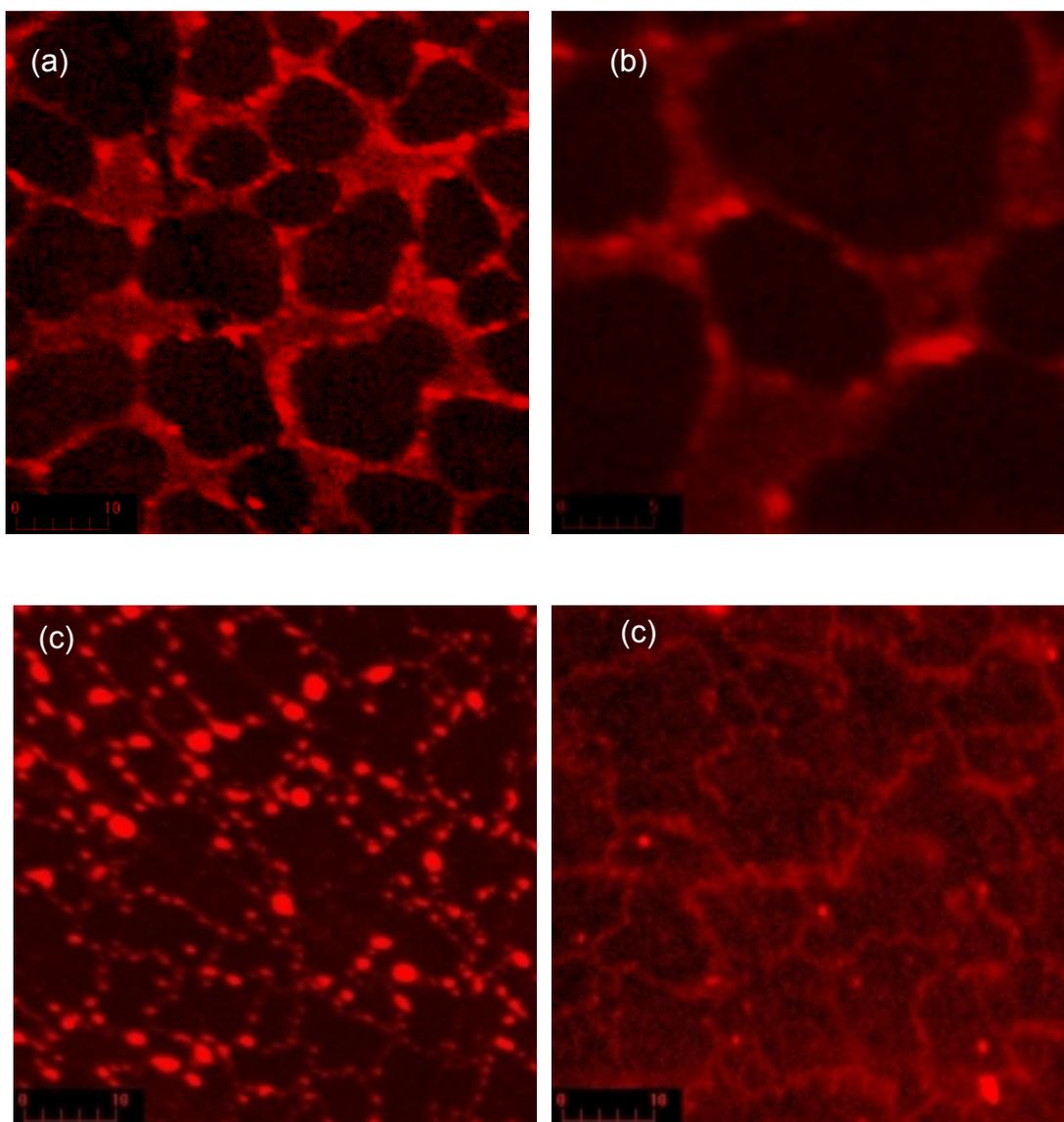


Figura 52. Microscopia confocal de barrido láser de RITC- κ -carragenina en presencia de 40 mM KCl a $\lambda=580$ nm. Concentración de κ -carragenina: (a) y (b) 0.1%, (c) 0.05% y (d) 0.01%. La escala representa μm .

comportamiento característico de un gel. Rodríguez-Hernández *et al.* (2003) mostraron evidencia de la formación de una red de gelana a concentraciones de polisacárido tan pequeñas como 0.005 a 0.05% en presencia de 10 mM de CaCl_2 con observaciones de la red tridimensional con CLSM y pruebas reológicas de baja amplitud.

5.1.5.2 Efecto de la concentración de K^+ sobre la formación de la red tridimensional

Posteriormente se analizó el efecto de la concentración de KCl en una solución con 0.5% de κ -carragenina con bajas concentraciones de KCl (Figura 53). Las imágenes

muestran que, pese a tener un alto contenido de κ -carragenina, la red que se forma no tiene la misma definición que las obtenidas previamente con 40 mM KCl, debido a que la cantidad de iones K^+ presentes en la solución no fue suficiente para que toda la κ -carragenina presente forme agregados, lo que se reflejó en una pobre estructura de la red. De igual manera, se elaboraron preparaciones con cantidades menores de KCl, sin embargo no fue posible observar ninguna red en estas mezclas.

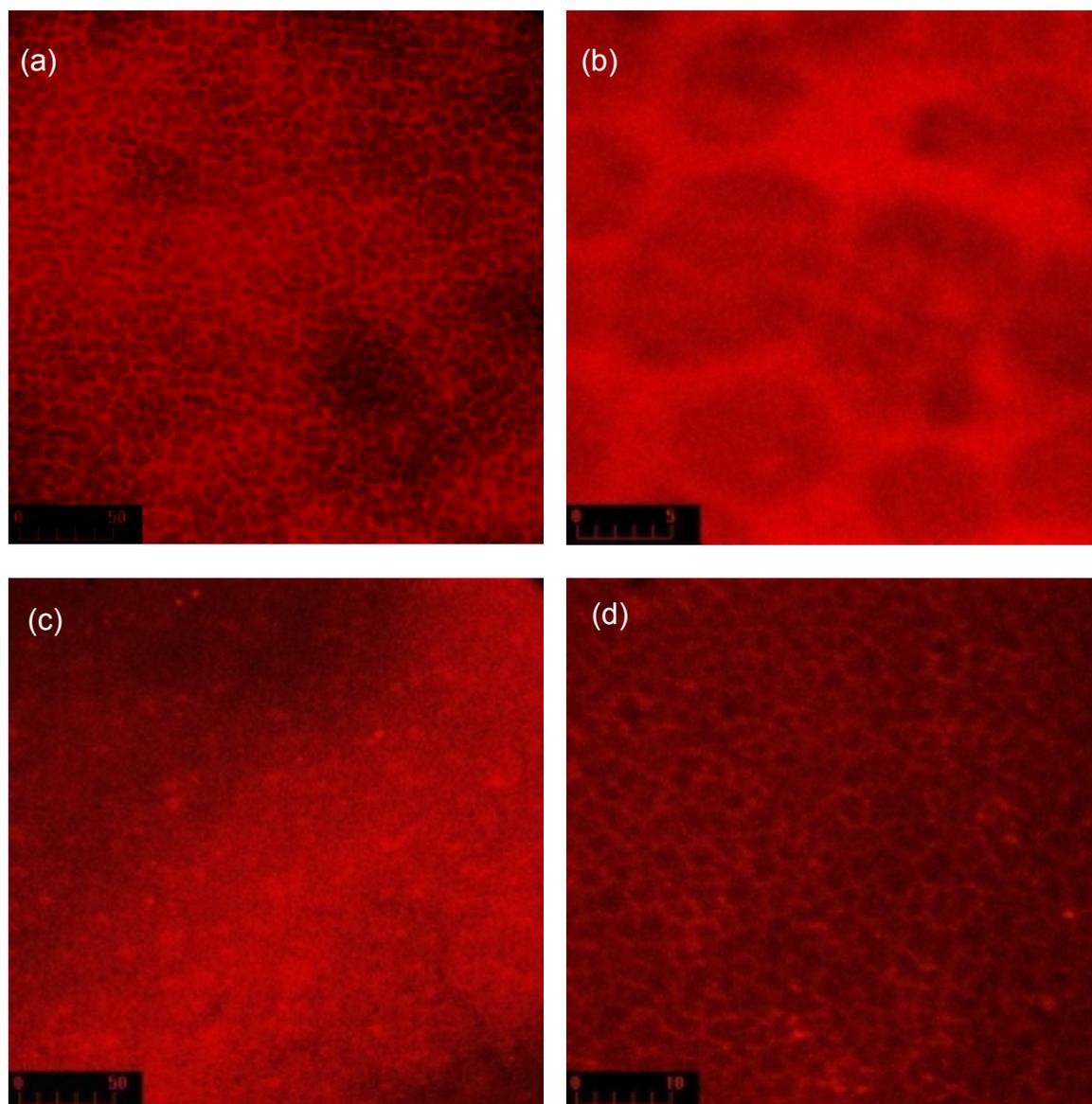


Figura 53. Microscopia confocal de barrido láser de 0.5% de κ -carragenina con diferentes concentraciones de KCl: (a) y (b) 5 mM, (c) y (d) 3 mM. La escala representa μm .

5.1.6 Discusión

Pese a la existencia de diversos estudios de la transición sol–gel de la κ -carragenina, muy pocos trabajos basan sus conclusiones en un diagrama de cambio de conformación. En este contexto, las temperaturas determinadas por microDSC y reología mostraron un buen acercamiento y fueron similares a las determinadas por Rochas (1982), aunque más completas.

Pese al hecho de que la dependencia de G' y G'' contra la frecuencia y el ángulo de fase crítica parten del mismo principio discutido por Winter y Chambon, el análisis de los datos reológicos para determinar la temperatura de transición sol-gel mostró que la dependencia de los módulos dinámicos con la frecuencia y la temperatura es difícil de aplicar a la κ -carragenina, probablemente porque la gelificación dependen del tiempo y no se puede detener una vez que empieza. Un punto importante es que el exponente del modelo ley de la potencia cambia drásticamente en un intervalo bastante estrecho de temperatura de alrededor de 2 °C. Hossain *et al.* (2001) aplicaron el método de Winter y Chambon en ι -carragenina y encontraron una diferencia de entre 8 y 12% con respecto a la T_{gel} medida por DSC. El tratamiento de los datos reológicos para observar la T_{gel} según el criterio de $\tan \delta_c$ mostró ser aplicable aún en soluciones cuya gelificación es dependiente del tiempo. El seguimiento de los módulos en barridos de temperatura se ha empleado durante la gelificación de yema de huevo (Cordobés *et al.*, 2004), Ca^{2+} - κ -carragenina (MacArtain *et al.*, 2003), gelana (Miyoshi *et al.*, 1996; Nishinary, 1997) y ι -carragenina (Takemesa y Chiba, 2001). En este caso particular, la señal de “ruido” de G' y G'' evitó la observación del cruce entre estos dos módulos como resultado de las bajas concentraciones de κ -carragenina (0.1 y 0.5%), la conformación de hebra aleatoria adoptada por las cadenas poliméricas debajo de T_{gel} en el enfriamiento y T_{fus} en el calentamiento y la baja deformación aplicadas durante los barridos de temperatura. Sin embargo, el método permitió observar la histéresis térmica característica de este polisacárido.

Los datos experimentales de esta sección mostraron que la concentración crítica total, C^* , la cual es el valor mínimo para que la gelificación exista, fue alrededor de 0.0086 eq/L. Para concentraciones $C_T < C^*$, la evolución de G' y G'' durante el enfriamiento no mostró un entrecruzamiento con la temperatura porque en esta región sólo existió una transición orden–desorden sin la agregación de las dobles hélices o gelificación. Con la técnica usada fue posible obtener el diagrama de transición el cual es una pieza importante sobre

el estado que guarda un sistema en condiciones dadas como una función de la temperatura, la concentración del biopolímero y la concentración de la sal añadida. Se han obtenido otros diagramas de transición, por ejemplo: para succinoglucano (Boutebba *et al.*, 1997), gelana (Milas y Rinaudo, 1996) y κ -carragenina- Ca^{2+} (MacArtain *et al.*, 2003). El número de investigaciones que se han hecho para describir el efecto del potasio y de otros iones en los geles de κ -carragenina es extenso (Takemasa y Chiba, 2001; Chen *et al.*, 2002; Kara *et al.*, 2003; Nishinari y Takahashi, 2003; Mangione *et al.*, 2003; Yuguchi *et al.*, 2003). Sin embargo, no es común que los resultados sean referidos a un diagrama de transición o cambio de conformación por lo que la interpretación y comparación de los datos experimentales reportados por muchos autores es difícil y sería más simple si se usara este diagrama. Con ello se podría contribuir a una mejor comprensión del estado del sistema y de sus características observadas.

Como lo muestra la Figura 34b, los datos reportados por otros investigadores (Sugiyama *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2002; Yuguchi *et al.*, 2002; Kara *et al.*, 2003; Mangione *et al.*, 2003) pueden ser incluidos en el diagrama de transición sol-gel para ayudar a situar la condición del sistema estudiado. Por ejemplo, los datos reportados por Mangione *et al.* (2003), para 0.05, 0.1 y 0.2% κ -carragenina con 10 mM de KCl se encuentran muy cercanos a la línea de transición en acuerdo con los datos de Rochas, aunque en la zona de gel, mientras que para 0.1% de κ -carragenina con 5 mM de KCl se está muy cerca de la C^* y de su correspondiente temperatura. Por otro lado, los datos de Sugiyama *et al.* (1998), Chen *et al.* (2002) y Yuguchi *et al.* (2002) fueron consistentes con los de Rochas (1982) y con los datos experimentales obtenidos en este trabajo. Sin embargo, los datos de Kara *et al.* (2003) se desviaron durante el enfriamiento con una pequeña desviación a bajas concentraciones y temperaturas, pero los datos para calentamiento divergen significativamente. Aparentemente, la razón de tal inconsistencia no es el empleo de las diferentes técnicas para determinar la temperatura de transición, sino el criterio que se emplea para determinar la temperatura a partir de una señal específica. Por ejemplo, Yuguchi *et al.* (2002) tomaron el cruce entre el vector de barrido máximo, q_{\max} , y el radio de giro de molécula de κ -carragenina, R_{GC} , Kara *et al.* (2003) tomaron el pico a partir de la primera derivada de dl_{tr} / dT en las mediciones de transmisión de fotones, Mangione *et al.* (2003) consideraron la temperatura del punto medio, T^* en dispersión de rotación óptica, Sugiyama *et al.* (1998) consideraron la temperatura máxima a partir de la señal de microDSC y, Chen *et al.* (2002) la temperatura de inicio, T_{ini} , en la dependencia de G' con la temperatura.

Por otro lado, se obtuvo una relación lineal entre $\log C_T$ y T^{-1} . A partir de la pendiente en el enfriamiento, la entalpía de activación para la transición sol-gel se puede calcular de acuerdo con la ecuación $\log C_T = -\Delta H / 2.303 RT + \text{constante}$, donde C_T es la concentración iónica total, T es la temperatura de transición, R es la constante de los gases y ΔH es el calor de reacción de la zona de interacción a la temperatura de transición (Eldridge y Ferry, 1954). El Cuadro 10 muestra los valores de las entalpías para el calentamiento y el enfriamiento y su comparación con otros trabajos. Como se citó previamente en la sección 5.1.2.4, Kara *et al.* (2003) fueron los únicos investigadores que trabajaron en pruebas de calentamiento, y sus datos experimentales presentaron una gran desviación del diagrama de transición sol – gel (Fig. 34), lo que se reflejó en un valor alto de ΔH comparado con los obtenidos en el presente trabajo.

Es importante aclarar que no es posible comparar ΔH_{gel} con el ΔH porque el anterior fue calculado sobre un intervalo amplio de temperaturas de una endoterma durante la asociación – disociación de zonas de interacción, acompañado por la recombinación de redes como ocurre en la formación de geles termorreversibles de κ -carragenina (Hossain *et al.*, 2001).

Cuadro 10. Resumen de pendientes y calores de reacción de la ecuación:

$$\log C_T = -\Delta H / 2.303 RT + \text{constante}$$

Referencia	Técnica	enfriamiento			calentamiento		
		m (K)	r	ΔH (kJ/mol)	m (K)	r	ΔH (kJ/mol)
Rochas (1982)	Rotación óptica y conductividad	-3507	0.998	67.1	-2522	0.998	48.3
Kara <i>et al.</i> (2003)	Foto transmisión	-3726	0.988	71.3	-4587	0.989	87.8
Este trabajo	Reometría	-3456	0.994	66.1	-2486	0.991	47.6
Este trabajo	micro CDB	-3251	0.998	62.2	-2458	0.992	47.0

Los estudios reológicos de la interacción entre la carragenina y los iones, tratan principalmente sobre el efecto de la concentración iónica durante la gelificación de la carragenina (Chen *et al.*, 2002). En una conformación de estado sólido gel (condiciones experimentales A en la Figura 23), altas concentraciones de κ -carragenina y KCl resultaron en geles más fuertes, sin embargo, inclusive para aquellas concentraciones de

KCl que no se habían estudiado previamente. También fue posible obtener geles con 0.1% de κ -carragenina y KCl sólo cuando la $C_T > C^*$. Sin embargo, se observó un valor límite en la rigidez del gel, G' , para una concentración constante de κ -carragenina. Una vez en el valor límite, la incorporación de KCl no incrementó la rigidez, pero ésta dependió de la concentración de polisacárido. Por ejemplo, para 0.1% de κ -carragenina, el valor límite de G' fue alrededor de 100 Pa para 80 mM de KCl, para 0.5% de κ -carragenina fue de 300 Pa con 100 mM de KCl y para 1% de κ -carragenina fue de 15000 Pa para 150 mM de KCl. Una posible explicación de este comportamiento es que el polisacárido fue saturado con K^+ , y se presentó la máxima agregación de dobles hélices. Estas observaciones fueron compatibles con la microDSC para 0.5% de κ -carragenina. Los valores de entalpía durante el calentamiento y el enfriamiento no se incrementaron más allá de 60 mM de KCl. Como técnica complementaria al estudio reológico de los polisacáridos en general, la CLSM es una herramienta de apoyo muy útil. Las imágenes mostradas de la κ -carragenina por CLSM conformando una estructura tridimensional permitieron reforzar el hecho de que aun a bajas concentraciones de κ -carragenina (0.1%) es posible obtener una red continua capaz de autosostenerse con un comportamiento reológico característico de un gel. Cuando la concentración de κ -carragenina no es suficiente para tener una red en toda la fase continua, si bien es cierto que toda la κ -carragenina se encuentra en una forma de dobles hélices agregadas, no significa que el polisacárido esté formando geles, como fue el caso de las concentraciones de 0.05 y 0.01% de κ -carragenina en presencia de 40 mM de KCl.

El efecto de la concentración de K^+ en la solución de κ -carragenina dependió en gran medida de la C_T y la temperatura a la cual se realizó la observación o medición. Cuando el polisacárido se encontró en una conformación de hebra aleatoria, la presencia de K^+ redujo el volumen hidrodinámico (condiciones B y C en la Figura 23) del polisacárido disminuyendo la viscosidad de la solución. Este efecto es característico de las soluciones de polielectrolitos, tales como la gelana y la xantana.

De acuerdo con el diagrama de transición sol gel, cuando $C_T > C^*$, invariablemente, la κ -carragenina se encuentra en forma de gel, sin embargo, los resultados de microDSC, y la CLSM, mostraron que cuando la cantidad de K^+ no fue suficiente para que toda la κ -carragenina pueda formar agregados (condiciones experimentales D en la Figura 23), existió coexistencia de dobles hélices de κ -carragenina sin agregar y dobles hélices agregadas, como lo muestran los termogramas de la Figura 26. Chen *et al.* (2002)

estudiaron el comportamiento reológico de soluciones de κ -carragenina sola sin la adición de K^+ sin complementar sus resultados con ningún otro tipo de prueba. De acuerdo con Chen *et al.* (2002), el comportamiento reológico de las soluciones de κ -carragenina sola corresponde al de un “gel débil” porque $G' > G''$. Desde este punto de vista, las soluciones donde coexisten dobles hélices sin agregar y hélices agregadas, serían “geles débiles” (Figura 42), sin embargo, a nuestra consideración este término no es adecuado porque en principio, no se trata de “geles” propiamente dichos, sino de un sistema con una fase continua donde la κ -carragenina se encuentra en una forma ordenada, y una fase dispersa conformada por pequeños agregados de κ -carragenina, como lo mostraron las imágenes de la Figura 53. Los estudios adicionales de microDSC y CLSM fueron herramientas poderosas para comprender el comportamiento reológico de las soluciones descritas previamente. Existen diversos trabajos en la literatura donde se emplea el término “gel débil” indistintamente por el hecho de que $G' > G''$, sin embargo, se considera pertinente obtener más información sobre dichos sistemas para poder realizar una mejor definición de los mismos. Las temperaturas de transición obtenidas por microDSC de estas soluciones, presentaron divergencia del diagrama de transición sol gel obtenido previamente (datos no mostrados), por la existencia de diversos picos en los termogramas.

Hasta ahora, se había empleado la capacidad de la κ -carragenina para formar dobles hélices sin agregar en presencia de aniones (I^-) con el objetivo de estudiar y comprender el mecanismo de gelificación de este polisacárido. En el presente trabajo, se mostró la existencia de la transición orden–desorden de la κ -carragenina en presencia de K^+ (condiciones experimentales E de la Figura 23) con el empleo de la microDSC y de la reometría. Ambos resultados fueron congruentes en las temperaturas de transición orden-desorden. La importancia de la caracterización reológica de este sistema radica en que muchos de los productos alimenticios que contienen κ -carragenina a bajas concentraciones ($< 0.4\%$) son bebidas refrigeradas (yogur para beber, malteadas, entre otros) por abajo de $9\text{ }^\circ\text{C}$. La determinación de la $[\eta]$ de κ -carragenina a una misma C_T a diferente temperatura mostró que en una conformación de hebra aleatoria, la κ -carragenina es un polímero lineal de cadenas flexibles ($[\eta]$ a $25\text{ }^\circ\text{C} = 10.5\text{ dL/g}$) mientras que en forma ordenada, es una molécula rígida que ocupa casi el doble del volumen de una estructura en forma desordenada ($[\eta]$ a $9\text{ }^\circ\text{C} = 19.3\text{ dL/g}$). Es importante considerar que en la determinación a $25\text{ }^\circ\text{C}$ se empleó una solución 0.1 N NaCl y a $9\text{ }^\circ\text{C}$ la C_T se

mantuvo constante a través de la combinación de la contribución iónica del polímero y el K^+ añadido. Pese a lo anterior, los resultados a 9 °C fueron congruentes con los reportados previamente por Chronakis *et al.* (2000) para NaI.

El efecto de la C_T en la $[\eta]$ de la κ -carragenina en estado ordenado en presencia de K^+ fue característico de un polielectrolito: a mayor C_T la $[\eta]$ disminuyó. Esta característica de los polielectrolitos ha sido empleada en el estudio de los mismos, así por ejemplo, en los sistemas para la determinación de las constantes de Mark-Houwink, las condiciones empleadas son tales que la C_T sea lo suficientemente grande para que el volumen hidrodinámico de las macromoléculas presente el menor valor durante la determinación de su masa molecular promedio. De igual manera, la c^* mostró dependencia con la C_T : una mayor C_T produjo un valor más grande de c^* , sin embargo, en las condiciones críticas, la fracción volumen “efectiva” de las cadenas hidratadas, $c[\eta]$, fue la misma, e independiente de la C_T . Esta última observación nos indica que sin importar la C_T empleada, en el cambio de régimen de un estado diluido a uno semidiluido, el volumen efectivo que ocupen las moléculas de cadenas ordenadas de κ -carragenina será siempre el mismo.

5.2 Propiedades del almidón

5.2.1 Comportamiento durante la cocción

Para la caracterización del almidón, se prepararon pastas a diferentes concentraciones (1 a 4%) en un microviscoamilógrafo Brabender. En éste se observó la evolución del torque durante la cocción (Figura 54). En la fase inicial, la señal de torque fue muy débil, sin embargo, alrededor de 24 minutos (66 °C), el torque de todas las suspensiones aumentó considerablemente. Este aumento se debe a la gelatinización del almidón, en la cual los gránulos se hinchan y aumentan hasta tres veces su tamaño, provocando una mayor interacción entre ellos. Una vez terminada la gelatinización, el torque aumentó constante y suavemente debido a la estabilidad de los gránulos de almidón al tratamiento térmico – mecánico. Algunos almidones, sobre todo los de baja estabilidad mecánica, muestran un torque máximo durante su cocción, debido a que una vez cocidos, los gránulos se fragmentan y se destruyen por la agitación mecánica a que son sometidos. La diferencia de los valores de torque observados se debió a la concentración de almidón: a mayor concentración mayor torque, sin que dicha relación sea necesariamente de proporcionalidad directa.

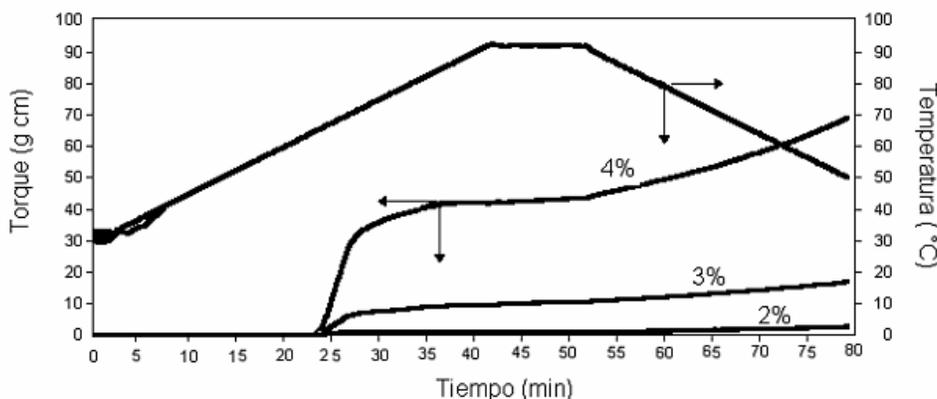


Figura 54. Evolución del torque durante el cocimiento de almidón a diferentes concentraciones.

5.2.2 Características ante la cocción

5.2.2.1 Hinchamiento y solubilidad

Una vez preparadas las pastas, se midió el hinchamiento (H) y la solubilidad (S) del almidón a 25 °C de acuerdo con el protocolo descrito en la sección 4.3.1. El Cuadro 11 muestra los valores obtenidos para las diferentes dispersiones. Como era de esperarse, la solubilidad es pequeña (< 3.0%) debido a la nula o baja existencia de amilosa en el almidón. No hubo diferencias significativas ($\alpha = 0.05$) en la solubilidad por efecto de la concentración de almidón. De igual forma, el hinchamiento no dependió de ($\alpha = 0.05$) la concentración.

Cuadro 11. Hinchamiento y solubilidad de almidón cocido a 92 °C.

almidón % masa	Solubilidad (S) %		Hinchamiento (H) %	
	promedio	desviación estándar	promedio	desviación estándar
1	2.6	0.34	22.7	0.87
2	2.2	0.18	23.3	1.73
3	2.6	0.27	25.9	1.27
4	2.3	0.30	25.0	0.62

Considerando que los gránulos de almidón son esféricos, se realizó una comparación de H con el máximo poder de hinchamiento (PH) definido como $(D_{max}/D_i)^3$ (Ziegler *et al.*, 1993), donde D_{max} es el diámetro máximo de los gránulos cocidos y D_i el diámetro inicial del almidón nativo. Para ello 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 transformó en $(D/D_0)^3$, donde D_0 es el diámetro mediano del

almidón nativo sin cocer, y D es el diámetro mediano de la pasta una vez cocido el almidón (Tecante y Doublier, 1999; Nayouf, 2003). La Figura 55 muestra el volumen acumulado (%) y las flechas indican el valor de $D[v, 0.5]$. La figura se construyó a partir de la distribución de tamaños de partícula del almidón cocido al 1, 2, 3 y 4% masa. De manera similar, se calculó el poder de hinchamiento con el método de azul dextrana (PH_{AD}) con el procedimiento descrito previamente (4.3.1). El Cuadro 12 resume los resultados obtenidos.

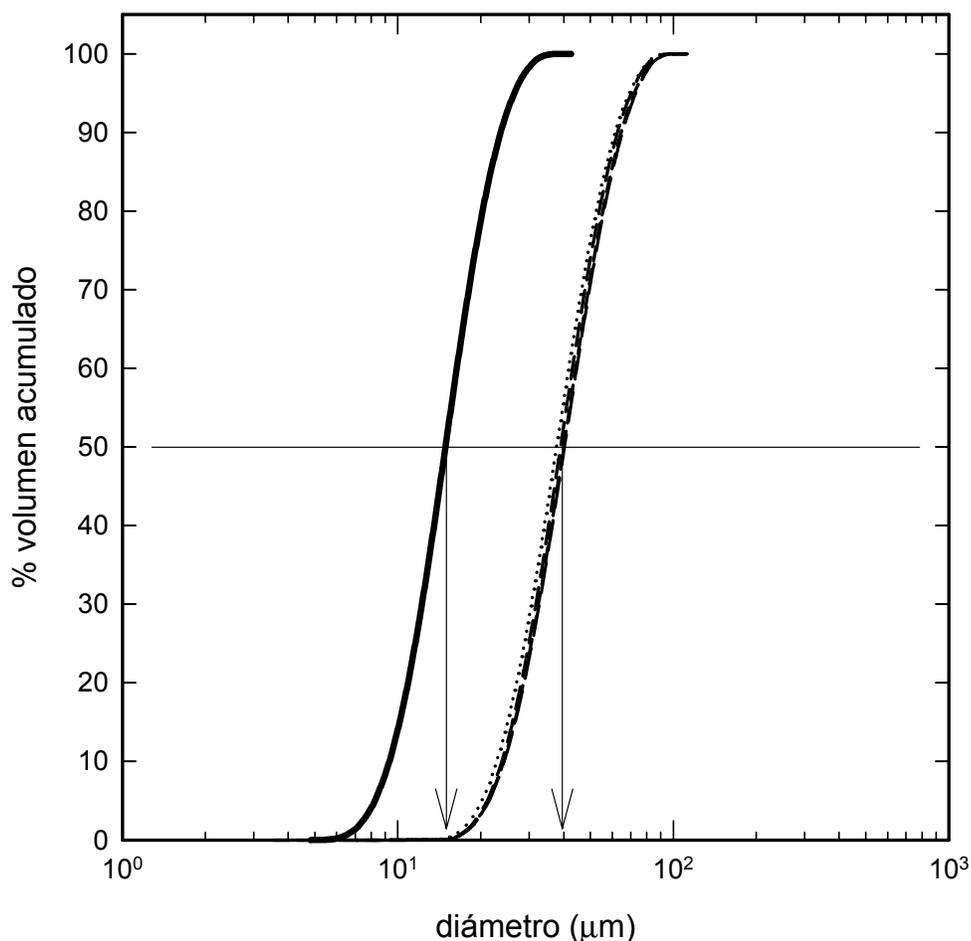


Figura 55. Distribución de tamaños de partícula de almidón cocido a 92 °C. Las flechas indican el valor de $D[v, 0.5]$. Almidón nativo (línea continua), 1% (línea punteada), 2% (línea discontinua), 3% (línea discontinua con puntos) y 4% (línea con segmentos largos).

Nayouf *et al.* (2003) reportaron un $D[v, 0.5] = 43.2 \mu\text{m}$ para de maíz reticulado químicamente y cocido a 90 °C, con $(D/D_0)^3 = 15.7$ y $H = 23.5$, lo que puede atribuirse a las diferencias entre las temperaturas de cocción usadas. De acuerdo con estos valores,

el valor de H reportado por Tecante y Doublier (1999) está sobreestimado (Cuadro 11) con respecto al calculado por el método de azul dextrana (PH_{AD}) (Cuadro 12). El método empleado por Tecante y Doublier (1999) en la determinación de H, considera que los gránulos hinchados ocupan todo el espacio disponible, desplazando el medio continuo (agua en este caso) del espacio intergranular. La comparación entre PH_{AD} y PH obtenidos por la relación de diámetros (Ziegler *et al.*, 1993), muestra que en este caso particular, dicha relación se puede emplear como una forma alterna para estimar PH en las mezclas de almidón- κ -carragenina. Lo anterior es debido a que la κ -carragenina interfirió en las lecturas del espectrofotómetro para emplear el método de azul dextrana para calcular la C_{ad} en la fase continua.

Cuadro 12. Diámetro mediano $D[v, 0.5]$ y poder de hinchamiento de almidón cocido a 92 °C.

Almidón % masa	$D[v, 0.5]$ μm	PH $(D/D_0)^3$	PH_{AD}
1	41.19	18.37	16.95
2	41.83	19.24	17.54
3	41.90	19.34	17.64
4	41.61	18.94	17.46
Nativo (sin cocer)	15.16	1	-

En general, la temperatura afecta el hinchamiento de los gránulos de almidón. Cuando la temperatura de cocción 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 superiores a 120 °C, tienen una mayor fragilidad al tratamiento mecánico que a 90 °C. Almidones de maíz ceroso no modificado (Li y Yeh, 2001) presentaron un incremento en PH para $T < T_{gelat}$ ($PH \approx 30$), mientras que para $T > T_{gelat}$, PH disminuyó, debido a la fragilidad de los gránulos de almidón y su posterior rompimiento. Almidones normales de avena cocidos a 80 °C han mostrado un $PH = 9.0$ (Tester y Karkalas, 1996), mientras que el almidón de maíz con alto contenido de amilosa cocido a la misma temperatura, mostró un $PH \approx 10$. 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.

5.2.2.2 Fracción volumen

Una vez calculados la solubilidad y el PH, se calculó la fracción volumen, ϕ , ocupada por los gránulos hinchados (Bagley y Christianson, 1982; Doublier, 1981), con la relación $\phi = (1 - S / 100)cH$, donde H se consideró como el PH obtenido por la relación de diámetros. Esta consideración fue basada en que, bajo las condiciones actuales de cocción, ambos valores fueron muy similares y sienta el precedente para utilizar el PH en el cálculo de ϕ en las mezclas almidón-hidrocoloide. La Figura 56 muestra el efecto de la concentración de almidón en ϕ , la cual es lineal ($\phi = 0.1870 \times c$, $r^2 = 0.998$). 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 cocimiento (Doublier, 1987).

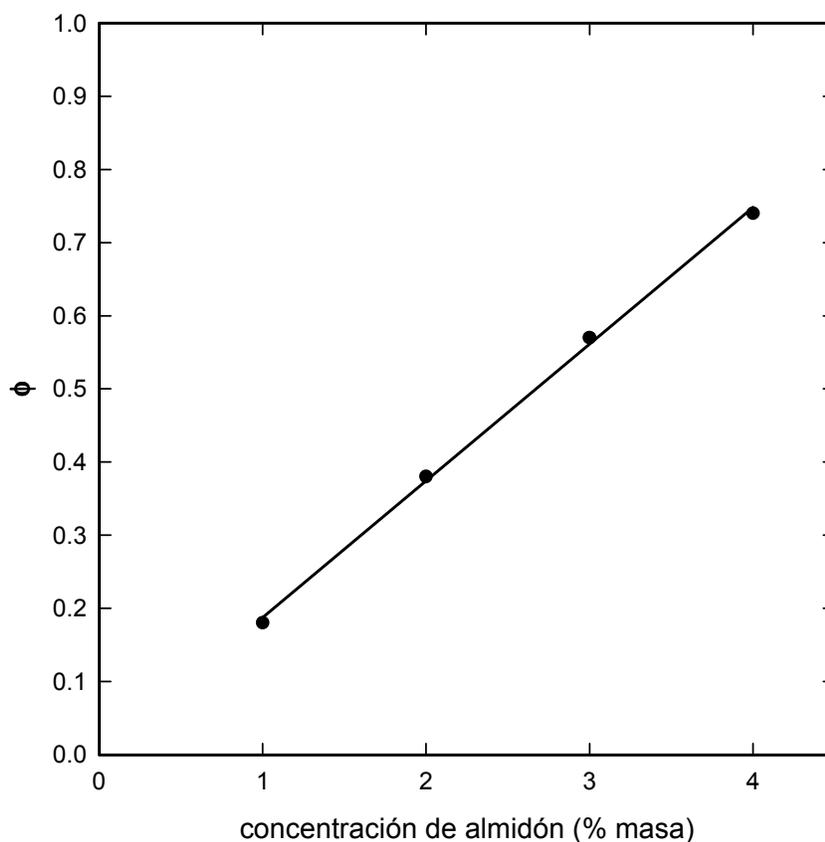


Figura 56. Fracción volumen de pastas de almidón cocido a 92°C.

5.2.2.3 Efecto de la concentración de K^+ en el tamaño de los gránulos de almidón

Inicialmente, se comparó la distribución de tamaños de partícula de las pastas de almidón en condiciones isoiónicas con K^+ y no isoiónicas (figuras no mostradas). Las distribuciones de tamaño de partícula de las dispersiones de almidón no mostraron diferencias significativas ($\alpha = 0.05$) entre ambas condiciones de dilución. Los resultados mostrados se presentan en condiciones de dilución no isoiónica. La Figura 57 muestra los valores de $D[v, 0.5]$ obtenidos en el almidón a diferentes concentraciones de KCl. De acuerdo con la figura, para concentraciones de KCl menores de 20 mM los gránulos de almidón tienen un diámetro promedio de $42.5 \mu\text{m}$ sin que haya diferencias significativas ($\alpha = 0.05$) entre los diámetros medianos, $D[v,0.5]$. Sin embargo, a partir de 30 mM, el $D[v, 0.5]$ disminuyó, hasta llegar a un valor de $39 \mu\text{m}$ con 300 mM KCl, es decir, 8% menor que para concentraciones de KCl menores de 20 mM. Esta disminución se debió a un posible efecto de ósmosis entre el interior y el exterior de los gránulos. No se ha demostrado que los iones de K^+ puedan introducirse en los canales internos de los gránulos de almidón, como consecuencia de la existencia de un gradiente de concentración entre el agua al interior de los gránulos y la fase continua del sistema que los rodea. Hasta el momento, no se ha encontrado en la literatura un estudio que muestre el efecto de una sal en el tamaño de partícula de gránulos de almidón nativo y cocido.

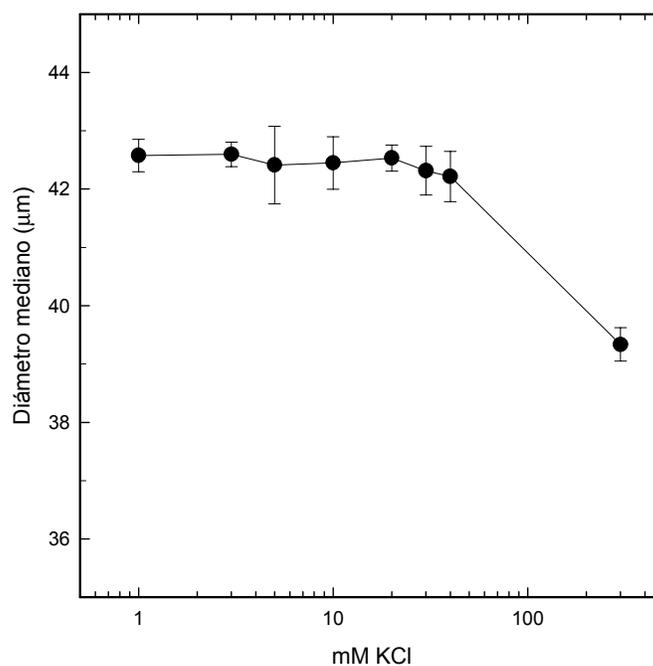


Figura 57. Efecto de la concentración de KCl sobre el $D[v, 0.5]$ de almidón 4% cocido a $92 \text{ }^\circ\text{C}$. Las líneas sirven como guía visual.

5.2.3 Microcalorimetría de barrido diferencial

5.2.3.1 Propiedades térmicas del almidón de maíz ceroso modificado químicamente

La Figura 58 muestra el termograma de almidón de maíz ceroso modificado. Las temperaturas durante la gelatinización fueron: $T_{ini} = 60.50$, $T_{max} = 63.76$ °C con $\Delta H = 12.49$ (J/g_{almidón seco}). Es importante aclarar que tanto T_{ini} como ΔH dependen en gran medida de la experiencia o criterio empleado por el usuario para marcar el inicio de la gelatinización en la curva de DSC. Para usar siempre el mismo criterio, se consideró el inicio de la gelatinización cuando el valor absoluto de la pendiente fue 0.05 mW/°C. Jane *et al.* (1999) reportaron para almidón de maíz ceroso sin modificar una $T_{ini} = 64.2$ °C con una $T_{gelat} = 69.2$ °C y un $\Delta H_{gelat} = 15.4$ J/g_{almidón seco}, resultados muy similares a los obtenidos en el presente trabajo.

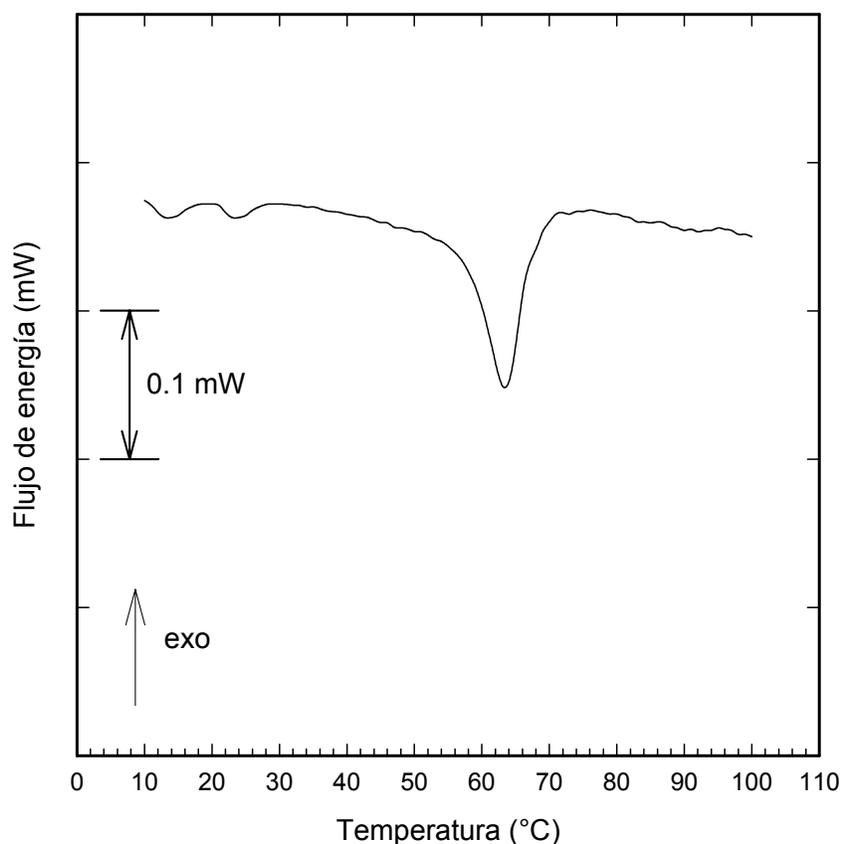


Figura 58. Termograma de gelatinización de almidón de maíz ceroso modificado químicamente.

5.2.3.2 Efecto de la concentración de K⁺ sobre la temperatura de gelatinización de almidón de maíz ceroso modificado químicamente

La Figura 59 muestra el efecto de K⁺ en los termogramas de almidón durante su gelatinización. Considerando que en el presente trabajo se examinaron mezclas de almidón- κ -carragenina-KCl, se estudió el efecto de este último sobre las propiedades térmicas del almidón. De acuerdo con la figura referida existe una diferencia en el flujo de energía requerido para la gelatinización del almidón por efecto de la concentración de KCl añadido. Una mayor concentración de KCl produjo un mayor flujo de energía. Se empleó T_{max} como la temperatura de gelatinización. Tanto T_{gelat} como ΔH_{gelat} no mostraron diferencia significativa por la presencia de KCl ($\alpha = 0.05$) (Cuadro 13). Los valores promedio son: T_{ini} = 62.99 ± 2.19 °C, T_{gelat} = 67.79 ± 1.04 °C y ΔH_{gelat} = 9.55 ± 1.33 J/g_{almidón seco}. Lii *et al.* (2002) estudiaron la influencia de la presencia de sales durante la gelatinización de los almidones, auxiliándose con técnicas como microscopía de luz polarizada, difracción de rayos X, resonancia magnética nuclear, y dedujeron que únicamente el Li⁺ retarda el hinchamiento debido a que penetra en los gránulos.

Cuadro 13. Efecto del KCl sobre la temperatura de gelatinización del almidón de maíz ceroso modificado químicamente.

KCl añadido mM	T _{ini} (°C)	T _{max} (°C)	ΔH_{gelat} (J/g _{almidón seco})
0	60.50	67.76	12.49
5	60.8	66.99	7.91
10	60.9	67.50	9.11
60	61.77	66.74	10.02
80	64.55	66.69	9.54
100	64.43	68.27	9.11
200	65.33	68.80	9.11
300	65.61	69.59	9.09

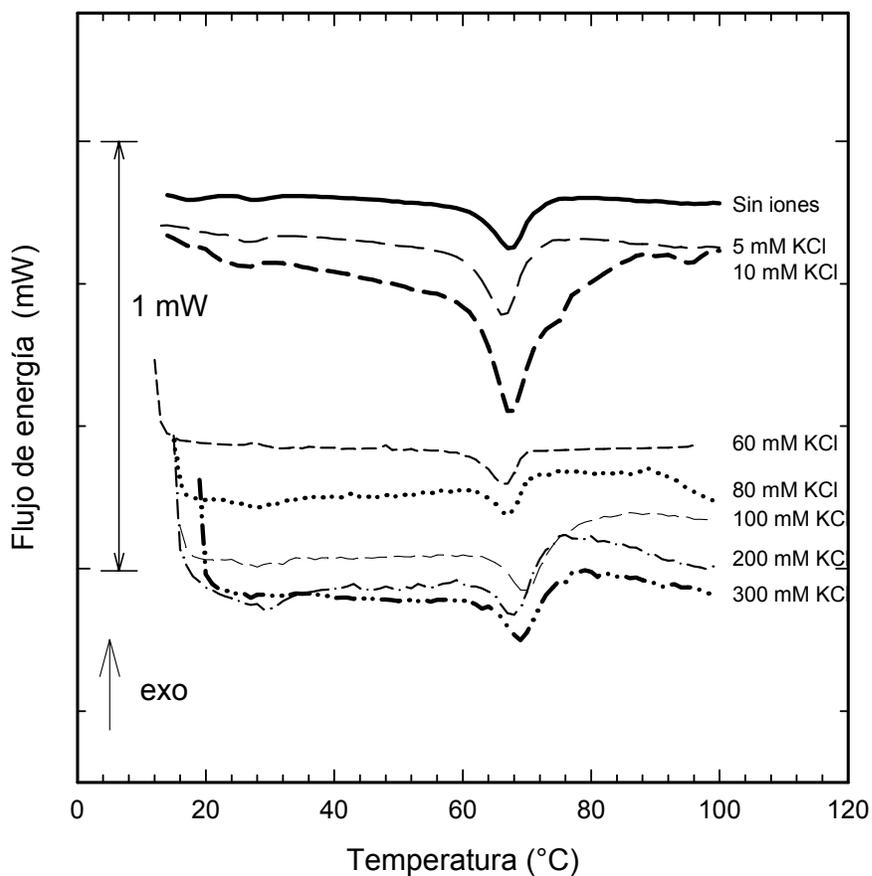


Figura 59. Efecto del K^+ sobre la gelatinización de almidón de maíz ceroso modificado químicamente.

5.2.4 Comportamiento reológico

5.2.4.1 Cizalla estacionaria

Las pastas obtenidas se examinaron a 25 y 60 °C. Las Figuras 60a y 60b muestran el comportamiento reológico de las pastas a 25 °C para las diferentes concentraciones de almidón de maíz. En general, todas las pastas presentaron histéresis entre los ciclos de cizalla, siendo éste más notorio para una mayor concentración de almidón. En todos los casos el segundo ciclo presentó valores de esfuerzo mayores que el primero. En todos los casos la curva de ascenso de velocidad de deformación estuvo por debajo de la curva de descenso. Se ha citado este tipo de comportamiento como “antitixotropía” (Doublier, 1981; Tecante y Doublier, 1999; Nayouf, 2003).

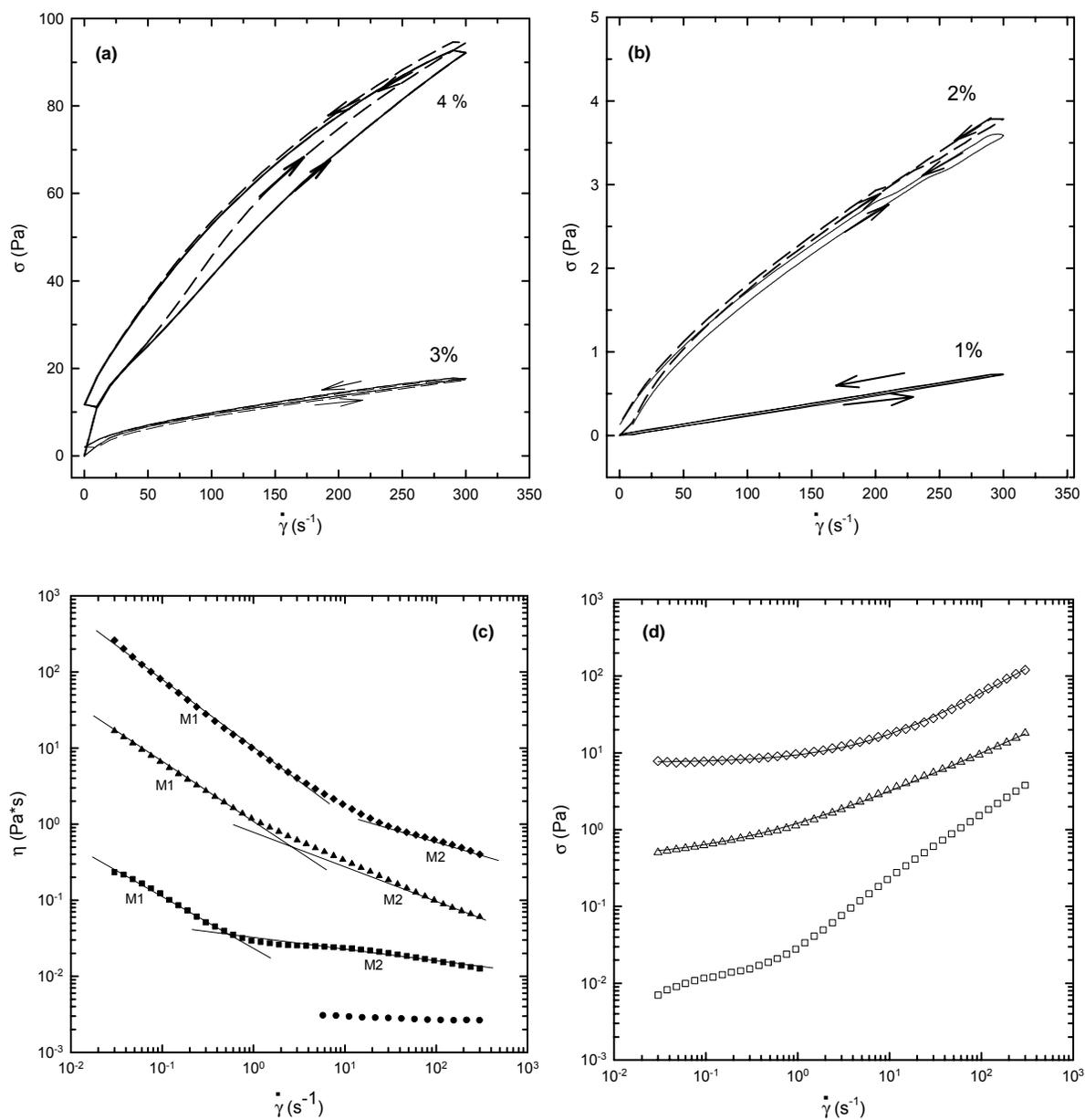


Figura 60. Cizalla estacionaria a 25 °C: (a) 3 y 4% (b) 1 y 2% : primero (línea continua) y segundo (línea punteada) ciclos de cizalla, (c) curva de flujo después del segundo ciclo de cizalla y (d) relación entre el esfuerzo y la velocidad de deformación en dispersiones con 1 (círculos), 2 (cuadros), 3 (triángulos) y 4% masa (diamantes) de almidón.

Los esfuerzos de la suspensión de almidón al 4% ($\phi = 0.75$) fueron considerablemente mayores que para las otras concentraciones, debido a una mayor interacción entre las partículas de almidón hinchado, en las dispersiones de 1 y 2 % (Figura 60b). La interacción disminuye al disminuir la concentración siendo la fase continua es la que determina el comportamiento reológico. En la Figura 60c se observa que no en todos los casos las dispersiones presentaron un comportamiento fluidificado por cizalla. El comportamiento de la dispersión con 1% ($\phi = 0.18$) mostró una baja variación de la viscosidad con la velocidad de deformación, con un promedio de 2.45 mPa·s y para ϕ mayores, hubo un comportamiento fluidificado por cizalla. De igual manera, se observa una fuerte dependencia de η con respecto a $\dot{\gamma}$ para las concentraciones de 2, 3 y 4% junto con un cambio en las pendientes de las curvas (Figura 60c). El cociente de pendientes (M1/M2) en las inflexiones de la relación η vs $\dot{\gamma}$ fue distinto. El punto de inflexión fue (Figura 60c) 0.8, 2.8 y 10 s⁻¹ en las pastas con 2, 3 y 4%, respectivamente. En general, el cambio de la pendiente no siguió un patrón establecido (M1/M2 = 4.7, 1.49 y 2.63 para 2, 3 y 4% almidón). Sin embargo, para valores pequeños de $\dot{\gamma}$, la pendiente (M1), fue más grande para una mayor concentración de almidón: M1(2%) = -0.681, M1(3%) = -0.775 y M1(4%) = -0.932. Lo anterior se debe a un aumento mayor de la η en la pasta con 4% cuando $\dot{\gamma}$ disminuyó en relación con las otras concentraciones. Según este incremento de la viscosidad, se puede considerar un esfuerzo de fluencia, σ_0 (Barnes, 1999), el cual se determinó con base en una gráfica σ vs. $\dot{\gamma}$ (Figura 60d).

Nayouf (2003) presentó curvas para pastas de almidón cocido desde 2 hasta 4% a 90 °C, en un intervalo de 0.6 a 660 s⁻¹. En ellas encontró un comportamiento fluidificado por cizalla y correlacionó sus datos experimentales con el modelo de Herschel-Bulkley, reportando valores de σ_0 dependientes de la concentración de almidón y la temperatura de cocción. Los datos mostrados en la Figura 60d se correlacionaron por medio de una regresión no lineal con el modelo de Herschel-Bulkley (líneas continuas en la figura) para las pastas con 3 y 4%. El Cuadro 14 muestra los valores obtenidos de las regresiones. En la pasta con 2%, el modelo no ajustó los datos. El error entre el modelo de Herschel-Bulkley y los datos experimentales se calculó como la raíz cuadrada de la suma del cuadrado del error:

$$SRSS = \sqrt{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y})^2} \quad (11)$$

Donde y_i es el valor experimental, \hat{y} es el promedio del valor de los datos. Un valor pequeño de SRSS indica una buena correlación.

Cuadro 14. Constantes del modelo Herschel-Bulkley ($\sigma = \sigma_0 + k \dot{\gamma}^n$) en pastas de almidón a 25 y 60 °C.

Almidón (% masa)	σ_0 (Pa)	k (Pa·s ⁿ)	n	SRSS
25 °C				
3	0.41	0.801	0.537	0.81
4	7.51	1.92	0.718	5.78
60 °C				
3	0.218	0.629	0.549	0.391
4	3.283	0.957	0.737	4.120

Los parámetros σ_0 , k y n dependen de la concentración de almidón. Se observó un mayor grado de fluidificación por cizalla con mayores concentraciones de almidón. De manera similar, a 60 °C, se observó un comportamiento fluidificado por cizalla durante los ciclos de ascenso y descenso (Figura 61a) con el efecto de “antitixotropía” observado a 25 °C: las curvas del segundo ciclo se ubicaron por encima del primero produciendo valores mayores de σ . En las pastas con 2 y 1 % de almidón, la fase continua determinó el comportamiento reológico (Figura 61b). Al igual que a 25 °C, las pastas con 3 y 4% de almidón (Figura 61c), mostraron una inflexión en η vs $\dot{\gamma}$. El intervalo de velocidad de deformación en las pastas con 1 y 2% fue más corto pero es posible apreciar un comportamiento fluidificado por cizalla sin punto de inflexión para 2% y un comportamiento donde la viscosidad no cambió para 1%, con un valor aproximado de 3 mPa·s. Se usó el modelo de Herschel-Bulkley para 3 y 4% (Figura 61d) y los valores obtenidos de la regresión del modelo se resumen en el Cuadro 14.

En general, la tendencia del comportamiento reológico para una misma concentración fue similar a 25 y 60 °C. Para un mismo valor de $\dot{\gamma}$, σ y η disminuyeron con el decremento de la concentración de almidón. Lo anterior se reflejó en los valores de σ_0 y k del modelo de Herschel-Bulkley, sin embargo, n se mantuvo prácticamente constante, lo que indica que estas pastas tuvieron el mismo comportamiento de flujo a estas dos

temperaturas. A partir del modelo de Herschel-Bulkley se reportaron valores de σ_0 , interpretado en la literatura como un “esfuerzo de fluencia”, sin embargo, mediante la aplicación de pruebas de fluencia (creep) (Giboreau *et al.*, 1994) y de relajación de esfuerzos (Genovese y Rao, 2003) en pastas de almidón cocidas a 90 °C, se ha demostrado la existencia de un “pseudo esfuerzo de fluencia”. En el presente estudio no se tienen pruebas suficientes para establecer si es un esfuerzo de fluencia falso o real.

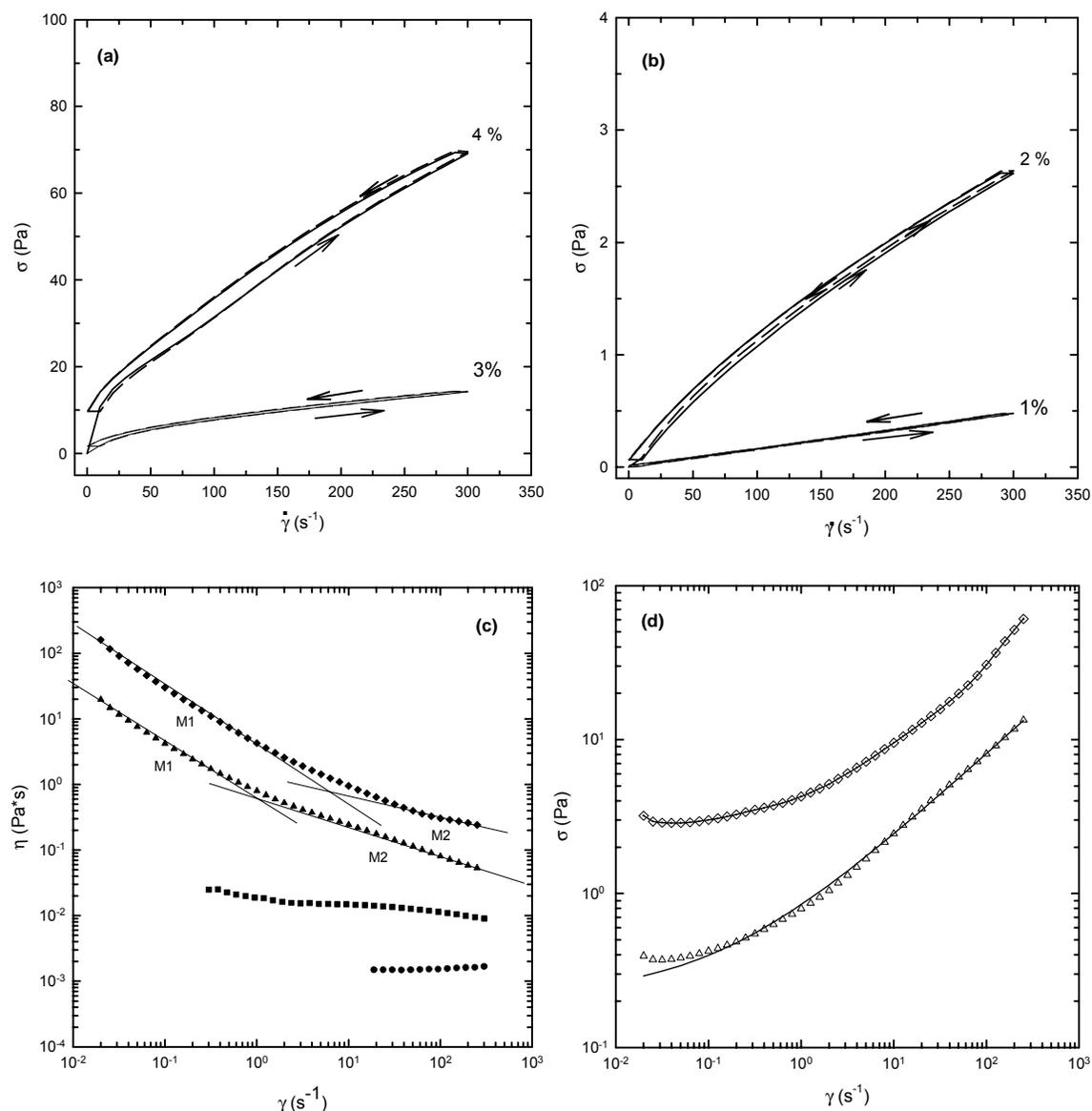


Figura 61. Cizalla estacionaria a 60 °C: (a) 3 y 4 % ; (b) 1 y 2 % almidón. Primero (línea continua) y segundo (línea punteada) ciclos de cizalla, (c) curva de flujo después del segundo ciclo de cizalla y (d) relación entre el esfuerzo y la velocidad de deformación en dispersiones con 1 (círculos), 2 (cuadros), 3 (triángulos) y 4% masa (diamantes) de almidón.

5.2.4.2 Estudio de la anisotropía y el deslizamiento en pastas de almidón a 25 °C

La anisotropía se define como el cambio en el comportamiento reológico, provocado por cambios de estructura debidos al flujo (Belzung *et al.*, 2000). Rigurosamente hablando, existen tres categorías de cambios de estructura:

- I.- Cuando solamente existen pequeñas distorsiones de la estructura en equilibrio, como es el caso de las dispersiones coloidales estables.
- II.- Cuando las dispersiones son sometidas a altos esfuerzos y las estructuras se caracterizan por una pronunciada orientación en dirección del flujo.
- III.- Cuando las dispersiones además de la orientación, presentan variaciones de concentración o de densidad en la dirección del flujo.

En el presente trabajo, con el fin de evaluar la posible existencia de anisotropía en el sistema, se realizaron barridos de cizalla en estado estacionario en ambos sentidos de giro, observando si los comportamientos reológicos obtenidos previamente a 25 °C (Figura 60) dependen del sentido en el que se realice la prueba. La Figura 62 muestra el efecto del sentido de giro sobre el comportamiento reológico de las pastas con 1, 2, 3 y 4%. La figura muestra que no existieron diferencias significativas ($\alpha = 0.05$) en el comportamiento de σ con respecto al sentido de giro, inclusive, realizando un barrido descendente en $\dot{\gamma}$ (datos no mostrados), el comportamiento reológico fue el mismo, descartando así la existencia de anisotropía inducida por el sentido de giro del sistema de medición. Belzung *et al.* (2000), mediante dispersión de luz (small-angle light scattering, SALS) en mezclas de polímeros y partículas de látex en suspensión, en pruebas reológicas de flujo estacionario, encontraron la existencia de anisotropía del tipo II en las partículas suspendidas, debido a la rigidez de las partículas de látex. En el presente estudio, la dispersión con 1% ($\phi = 0.2$) presentó poca variación de la viscosidad con un comportamiento reológico dominado por la fase continua, donde no se espera la presencia de anisotropía inducida por el flujo (Belzung *et al.*, 2000). La inflexión de la dispersión 2% ($\phi = 0.38$) se atribuye a la presencia de anisotropía del tipo II en las partículas de almidón, con una reorientación de las mismas en el sentido del flujo. Belzung *et al.* (2000) encontraron este tipo de efecto anisotrópico en partículas de látex con una $\phi = 0.48$, en un intervalo de 0.1 a 1000 s⁻¹, con un cambio de inflexión semejante a la presentada por esta pasta.

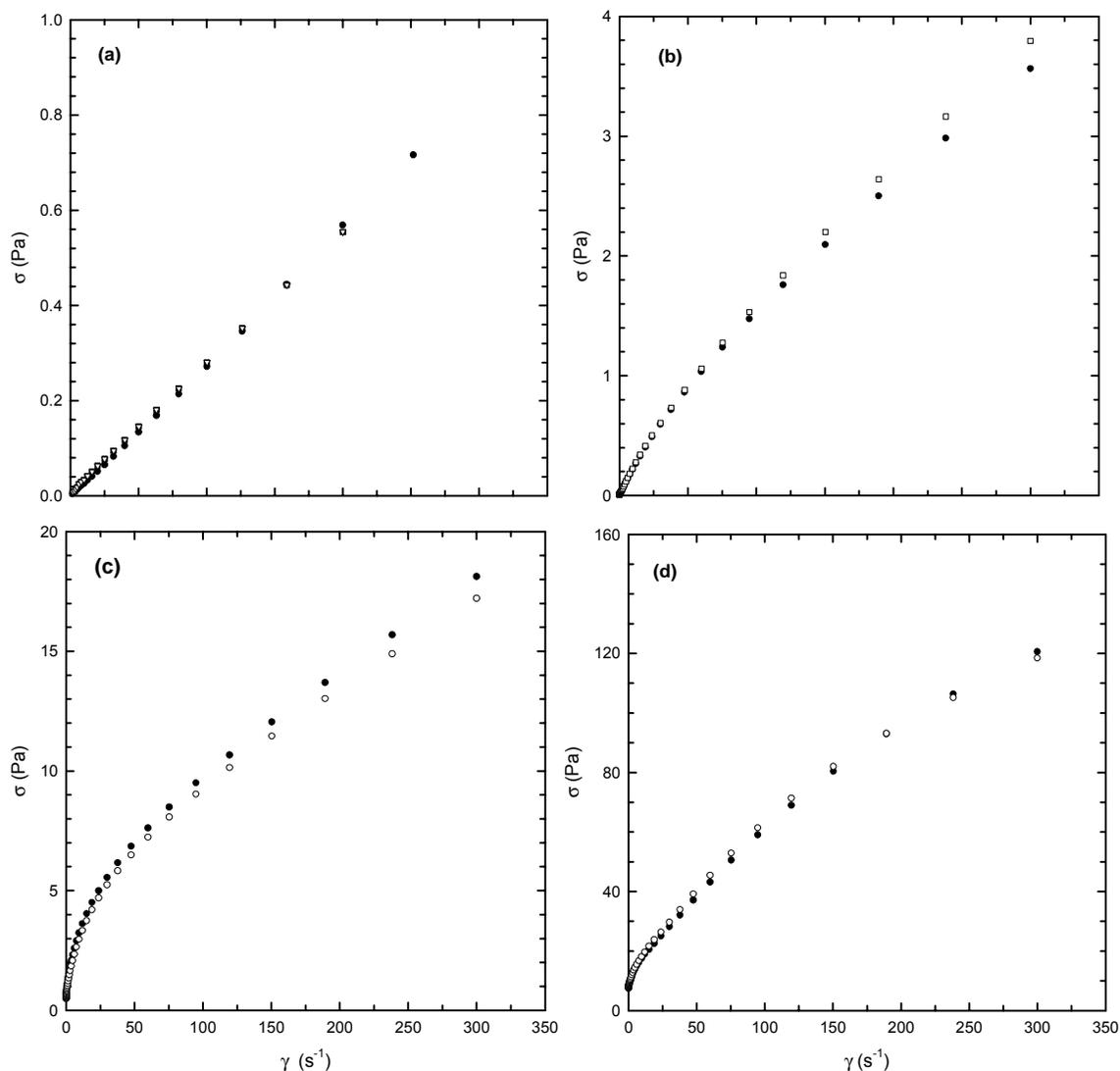


Figura 62. Efecto del sentido de giro sobre el flujo de suspensiones de almidón de maíz ceroso modificado químicamente en pruebas de cizalla estacionaria a 25 °C: (a) 1, (b) 2, (c) 3 y (d) 4% masa. Sentido horario (símbolos llenos), sentido antihorario (símbolos vacíos).

Los gránulos de almidón son semi rígidos y su rigidez les permite ser deformados reversiblemente en el intervalo de deformación empleada. Se ha encontrado que durante pruebas reológicas en cizalla estacionaria en sistemas con partículas en suspensión es muy común la presencia de deslizamiento entre éstas y la pared del sistema de medición (Barnes, 1995). Dada la importancia de este fenómeno durante los procesos de transformación de dichas suspensiones, diversos investigadores se han dado a la tarea de proponer modelos matemáticos para su descripción e interpretación. En este caso particular, para determinar si las inflexiones observadas durante las pruebas reológicas de

cizalla estacionaria pudieran ser efecto de la presencia de deslizamiento entre las partículas de almidón hinchado y la pared interna del sistema de medición, se realizaron las mismas pruebas de cizalla estacionaria usando otras geometrías (Barnes, 1995): placas paralelas y placas paralelas rugosas para las dispersiones con 3 y 4% de almidón. La Figura 63 muestra las curvas de flujo obtenidas en estas dos geometrías y cilindros concéntricos empleados en el presente trabajo. La tendencia de las curvas de flujo fue de un fluido fluidificado por cizalla, sin diferencias significativas ($\alpha = 0.05$) con respecto a las geometrías empleadas. Con base en lo anterior se descartó la existencia de deslizamiento y se confirmó el efecto anisotrópico sobre las partículas de almidón con 1, 2, 3 y 4%.

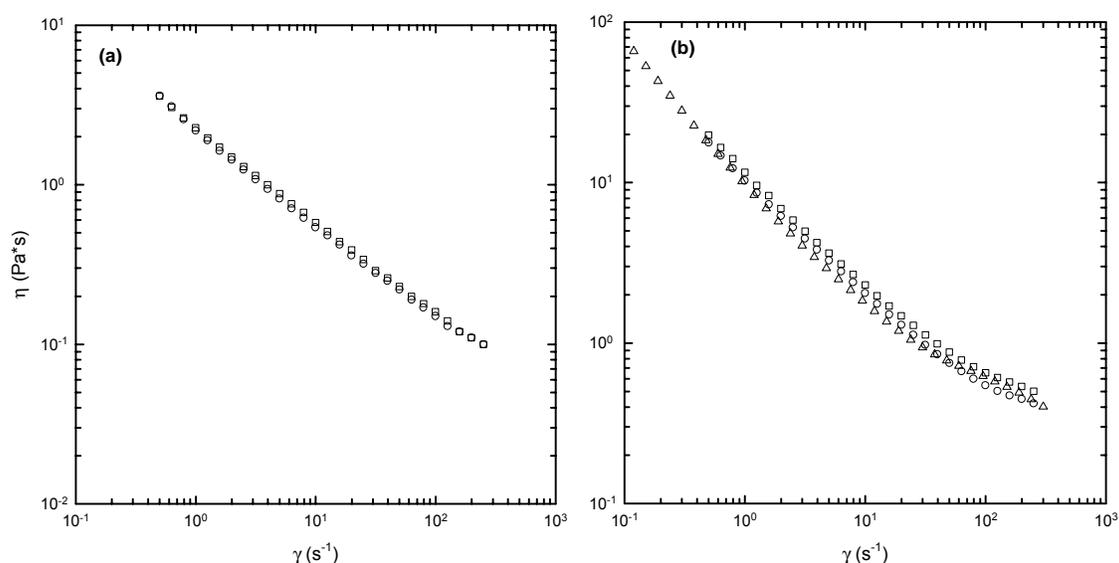


Figura 63. Efecto de la geometría sobre el comportamiento reológico de almidón de maíz a 25 °C: (a) 3 y (b) 4%. Placas paralelas rugosas (círculos), placas paralelas lisas (cuadros) y cilindros concéntricos de doble pared (triángulos).

5.2.4.3 Efecto de la concentración de K^+ sobre las propiedades reológicas de almidón de maíz ceroso modificado químicamente

Todas las muestras fueron sometidas a los dos ciclos de cizalla y un ascenso de 0 a 300 s^{-1} ; sin embargo, se muestran únicamente los resultados obtenidos durante el comportamiento de la η vs. $\dot{\gamma}$ durante la última etapa de cizalla. La Figura 64 muestra el efecto de K^+ sobre el comportamiento reológico de las pastas de almidón a 25 °C. La tendencia de las curvas de flujo fue la misma que se observó previamente, sin embargo se encontraron diferencias significativas ($\alpha = 0.05$) entre las curvas para una misma concentración de almidón. Hasta el momento, no se ha demostrado que los iones puedan

introducirse en los gránulos de almidón, con excepción del Li^+ (Lii *et al.*, 2002), sin embargo, es bien sabido que la presencia de iones provoca una rigidez en las cadenas de los polisacáridos cuando éstos se encuentran en solución (Snoeren, 1976).

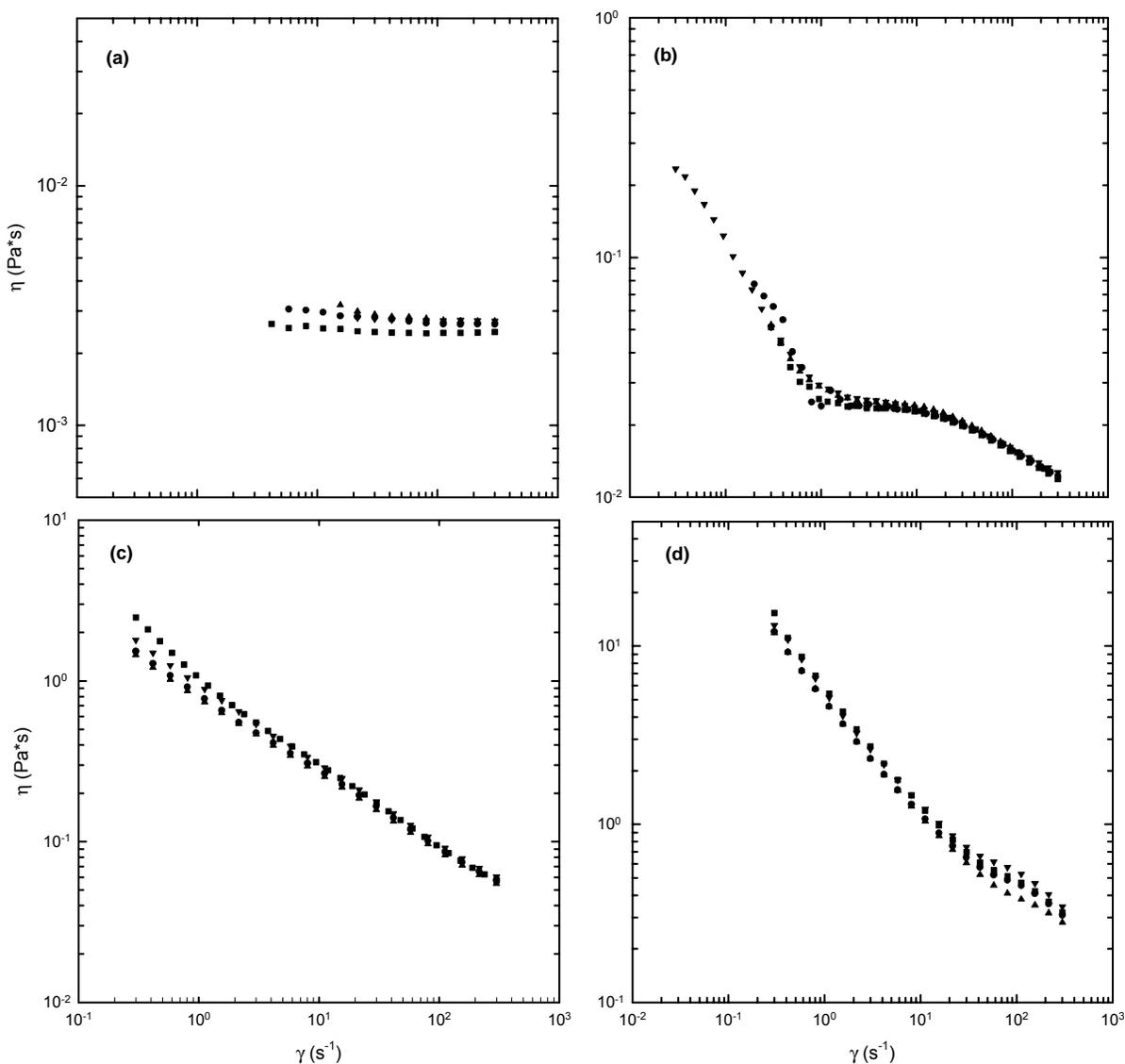


Figura 64. Efecto de la concentración de K^+ sobre el comportamiento reológico de almidón de maíz modificado químicamente a 25 °C. (a)1, (b)2, (c)3 y (d) 4% masa. 0 (círculos), 50 (cuadros), 100 (triángulos) y 200 (triángulos inversos) mM KCl.

5.2.4.4. Cizalla oscilatoria

La Figura 65 muestra los barridos de frecuencia (0.1 a 100 rad/s) de las pastas de almidón a 25, 60 y 9 °C en la zona de viscoelasticidad lineal. Estas temperaturas fueron las mismas que se emplearon en el estudio de las mezclas almidón- κ -carragenina-KCl. En las pastas con 3 y 4% ($\phi = 57$ y 0.74, respectivamente) predominó el carácter elástico de las muestras en las tres temperaturas y exhibieron un comportamiento tipo “sólido” (Ferry, 1980; Giboreau *et al.*, 1994). En estas pastas $G' > G''$, G' mostró poca dependencia con la frecuencia ($G' \propto \omega^{0.06}$) al igual que G'' ($G'' \propto \omega^{0.18}$). La baja dependencia de los módulos con la frecuencia fue similar en las tres temperaturas. Sin embargo, los valores de la $\tan \delta$ (Figuras 65d, e y f) no fueron los característicos de un gel (< 0.01). Dado que el sistema se encuentra compuesto por partículas en suspensión (gránulos de almidón hinchados) con una baja solubilidad ($< 2\%$), los espectros mecánicos corresponden a pastas lo suficientemente concentradas para presentar propiedades viscoelásticas (Sosa-Herrera, 2002). Los comportamientos viscoelásticos no presentaron efecto significativo ($\alpha = 0.05$) de la temperatura sobre ambos módulos a 25 y 60 °C. Los valores numéricos fueron los mismos para la misma concentración de almidón (3 y 4%). A 9 °C, se encontró efecto de la temperatura con respecto a 25 y 60 °C, con una disminución de ambos módulos pero no así en los valores de la $\tan \delta$, así, si bien los módulos disminuyeron, la dependencia de los módulos fue similar.

Las pastas con 1 y 2% de almidón presentaron el comportamiento clásico de un material viscoelástico, con los módulos G' y G'' dependientes de la frecuencia. La pasta con 1%, no proporcionó una respuesta confiable de torque tanto a 60 °C como a 9 °C. A 25 °C, el comportamiento fue característico de una solución diluida. Los módulos presentan una fuerte dependencia con respecto a la frecuencia ($G' \propto \omega^{1.17}$, $G'' \propto \omega^{0.52}$). Este comportamiento fue acorde con las pruebas de cizalla estacionaria a 25 °C. Con lo anterior, concluimos que con 1% a 25 °C, la fase continua determina el comportamiento reológico de la dispersión, atribuyéndole el carácter líquido. Al igual que en las pruebas de cizalla estacionaria, la dispersión con 2% a 25 °C (Figura 65a), G' presentó una “pequeña” inflexión para valores menores de 4 rad/s para después mostrar un comportamiento característico de una solución macromolecular concentrada (Macosko, 1994), donde los módulos son dependientes de la frecuencia ($G' \propto \omega^{1.11}$, $G'' \propto \omega^{0.64}$). Esta inflexión correspondió con la observada durante las pruebas de cizalla estacionaria para valores de $\dot{\gamma} < 1 \text{ s}^{-1}$. Para esta concentración, $\phi = 0.38$, la fase dispersa no ocupa completamente el

volumen de la dispersión, sin embargo, sí existe un número suficiente de partículas en suspensión, como para que a bajas deformaciones o cizalla, exista un reacomodo de las partículas, y al incrementarse ésta, las interacciones entre las partículas sean mayores, produciendo un cambio en la curva de flujo (Genovese y Rao, 2003).

En pastas con 3 y 4% de almidón, los gránulos hinchados, los cuales son deformables y elásticos, interactúan entre sí proporcionando un comportamiento tipo gel, mientras que en las pastas con 1 y 2% de almidón, la interacción entre los gránulos es menos dominante. Estos comportamientos se pueden explicar con base en la fracción volumen, ϕ , de los gránulos hinchados. Con lo anterior, se puede considerar que en pastas con 3 y 4% ($\phi > 0.4$), el carácter elástico se dio por los gránulos de almidón hinchados (Acquarone y Rao, 2003), siendo la fase dispersa la que determinó el comportamiento reológico. Nayouf (2003) reportó un comportamiento reológico similar en almidón de maíz cocido a 90 °C y observado a 17.5 °C. En este trabajo, es posible que dada la alta concentración de almidón en la pasta 4%, la temperatura de medición no afecta el comportamiento reológico cuando ésta es mayor de 25 °C en este tipo de pruebas, pues en las pruebas de cizalla estacionaria, sí se presentó una disminución de la viscosidad con respecto a la temperatura. En las dispersiones con $\phi < 0.4$, su carácter líquido se debe a la fase continua, lo que permitió establecer $\phi \approx 0.4$ como una fracción volumen crítica (Nayouf *et al.*, 2003). Más allá de este valor, las dispersiones de almidón exhibieron un comportamiento de suspensiones de partículas hinchadas, esto significa que su comportamiento reológico correspondió al de un fluido fuidificado por cizalla con la probable existencia de un “pseudo esfuerzo de fluencia” y propiedades viscoelásticas mensurables, típicas de un gel. Inclusive, para valores muy cercanos a $\phi = 0.4$, existe un reacomodo de las partículas de almidón a bajas velocidades de deformación (dispersión con 2%). Para valores menores de ϕ , la fase continua determina el comportamiento reológico de las dispersiones.

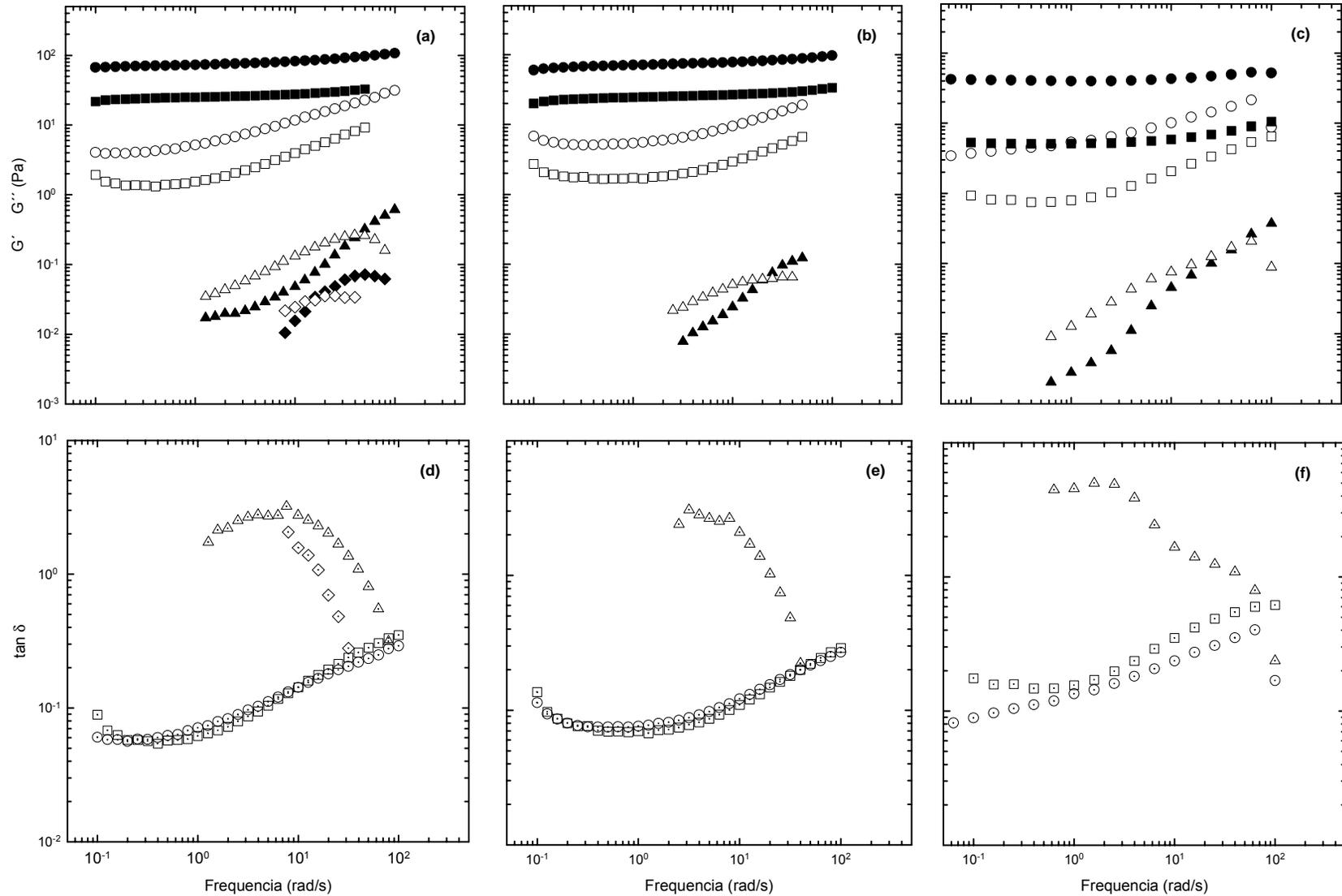


Figura 65. Efecto de la temperatura sobre los espectros mecánicos: (a) y (d) 25; (b) y (e) 60; (c) y (f) 9 °C, de dispersiones de almidón: 4% ($\phi = 0.74$, círculos), 3% ($\phi = 0.57$, cuadros), 2% ($\phi = 0.38$, triángulos) y 1% ($\phi = 0.18$, diamantes). G' (símbolos llenos), G'' (símbolos vacíos), $\tan \delta$ (símbolos punteados).

5.2.5. Ultraestructura

5.2.5.1 Luz transmitida y luz polarizada

La Figura 66 muestra las imágenes obtenidas de almidón nativo sin cocer en luz transmitida y bajo luz polarizada. La imagen de los gránulos nativos (Figura 66a) mostró que son pequeños, compactos y de forma esférica homogénea que no forman agregados. La forma de los almidones varía con la fuente vegetal de donde son extraídos, por ejemplo, algunos almidones con forma lenticular son los de cebada, papa, y trigo, almidones con formas poliédricas como los de avena, arroz y cebada (Tester *et al.*, 2004). La luz polarizada permitió observar la “cruz de malta” (Figura 66b) en los gránulos de almidón ceroso. Con base en las observaciones, se concluyó que el tratamiento químico proporcionado durante la reacción de entrecruzamiento no modificó la organización de los gránulos. Una vez cocido el almidón a 92 °C, (Figura 66c) los gránulos crecieron en una forma radial y mantuvieron su forma esférica original con cierta integridad. El almidón cocido no produjo imagen bajo luz polarizada (imagen no mostrada), porque durante la gelatinización se perdió el orden cristalino del amilopectina. El tratamiento térmico y mecánico aplicado no produjo el rompimiento de los gránulos. Considerando la temperatura de cocción del almidón empleada en este trabajo, las pastas se clasifican como “subcocidas” (Nayouf *et al.*, 2003), donde las pastas de almidón están constituidas esencialmente por una fase dispersa, formada por los gránulos hinchados y una fase continua libre de amilosa y amilopectina.

5.2.5.2 Microscopia confocal de barrido láser

Para obtener imágenes más específicas del componente de interés es posible la tinción con marcadores covalentes de un solo componente. De cualquier forma, en ambos tipos de marcaje (covalente y no covalente), se espera que la presencia de los marcadores no cambie las propiedades de los componentes de las muestras y como consecuencia, no afecte la estructura del espécimen. En este contexto, el resultado de la difracción láser de almidón de maíz ceroso marcado, expresado como el porcentaje volumen de los gránulos de almidón hinchados con y sin marcaje se muestra en la Figura 67.

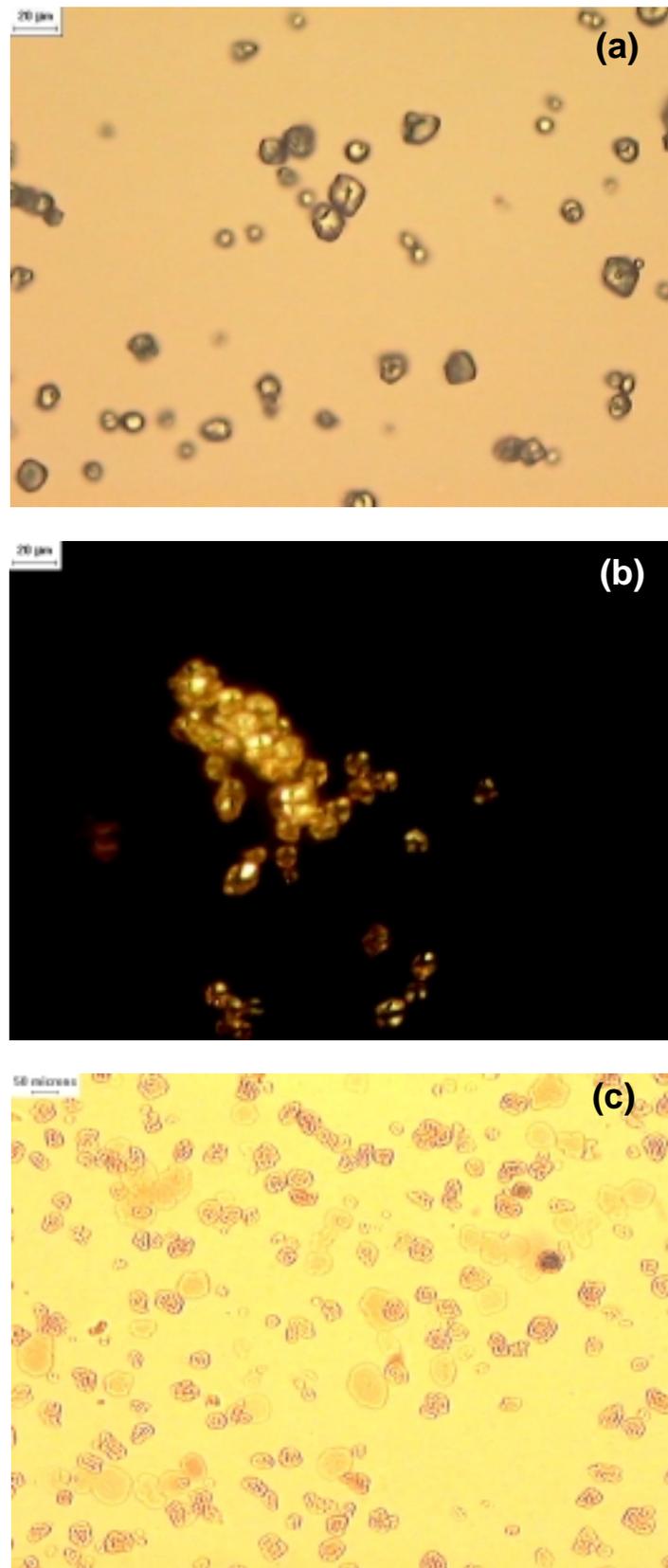


Figura 66. Imágenes de almidón de maíz ceroso modificado químicamente nativo en (a) luz transmitida, (b) luz polarizada y (c) cocido a 92 °C en luz transmitida.

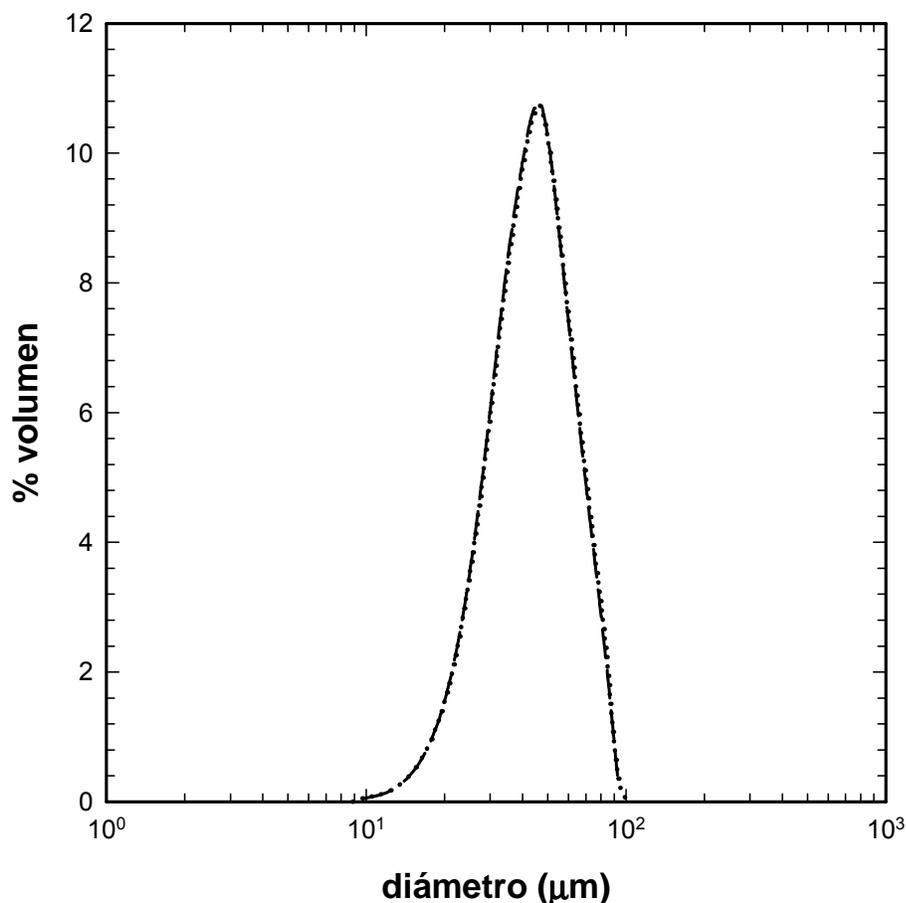


Figura 67. Distribución de tamaños de partícula de almidón de maíz ceroso 1% sin marcaje (línea punteada) y con FITC (12.5 mL/g) (línea discontinua).

En esta figura, el fluorocromo fue incorporado antes de la gelatinización del almidón. Como se ilustra, el fluorocromo empleado no cambió la distribución de tamaños de los gránulos de almidón. Mientras la imagen de los gránulos nativos de almidón es relativamente fácil de obtener (Figura 68a), es más complicado con las imágenes de almidón gelatinizado o de pastas de almidón, debido a la modificación de la estructura durante la gelatinización. De manera similar que las imágenes obtenidas por luz transmitida, el almidón nativo mostró partículas esféricas de tamaño homogéneo. Ambas imágenes mostraron que el FITC es un fluorocromo muy afín a los gránulos de almidón. El almidón con un bajo contenido de amilosa extraído de tubérculos, mostró poca afinidad con el APTS (ácido aminofluoroforo 8-animo 1,3,6 pirensulfónico) mientras que los almidones con amilopectinas de bajo peso molecular o con un alto contenido de amilosa mostraron una alta fluorescencia (Blennow *et al.*, 2003).

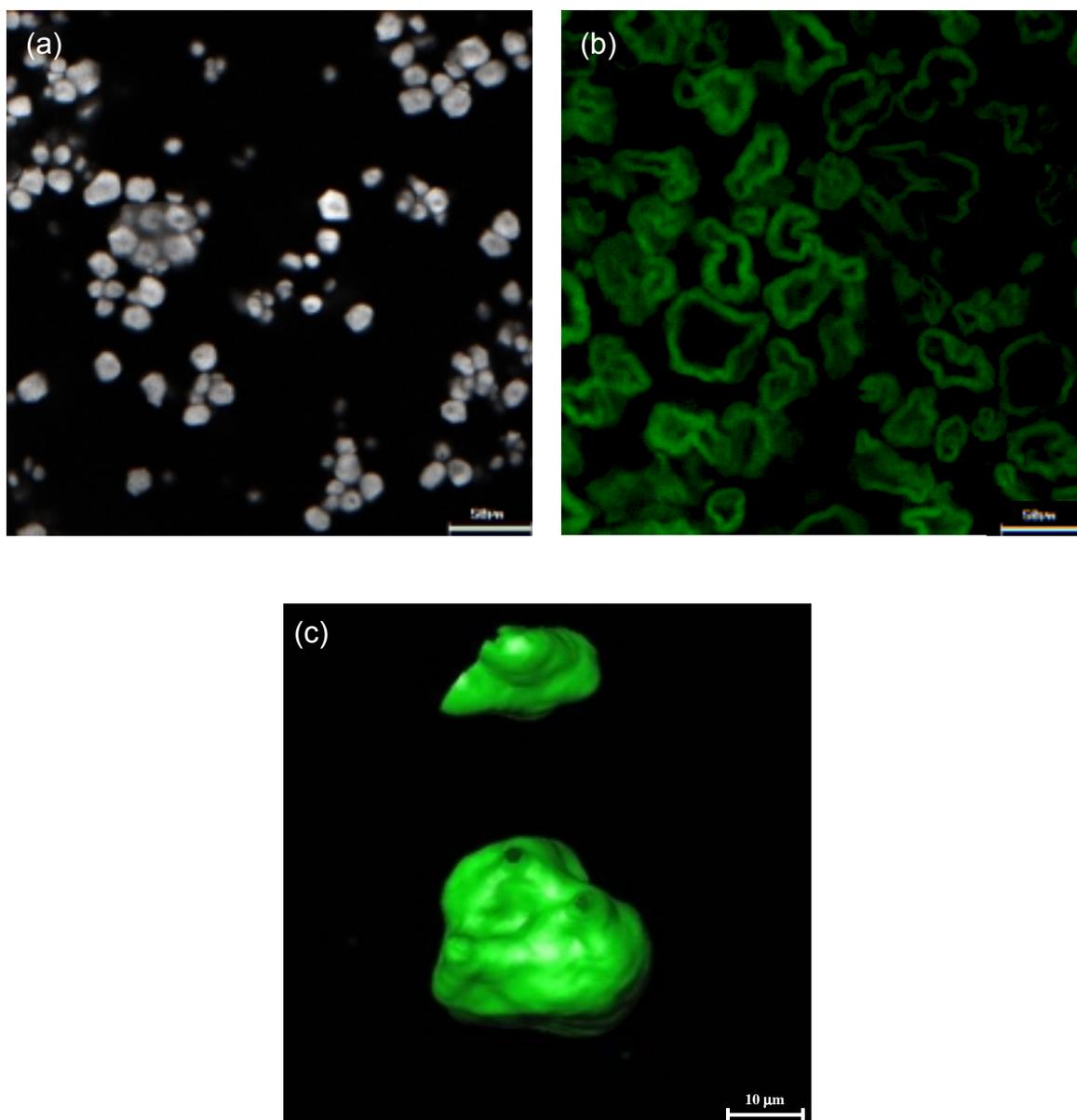


Figura 68. Almidón de maíz ceroso entrecruzado 1%, marcado con FITC ($12.5 \mu\text{L/g}$) (a) nativo y (b) y (c) cocido a $92 \text{ }^\circ\text{C}$ por 10 min.

Así, la naturaleza de la interacción entre el marcador y el almidón aún no es del todo comprendida. La existencia de nódulos y cavidades en la superficie del almidón nativo se ha demostrado mediante CLSM (van de Velde *et al.*, 2002). Huber and BeMiller (2000) estudiaron los canales de almidón de maíz y sorgo sin encontrar diferencias en los tamaños de éstos, sin embargo no propusieron una conclusión definitiva con respecto a la existencia de los canales y cavidades en cuanto a la frecuencia y el tamaño del poro considerando que sus conclusiones podrían ser prematuras. Los gránulos de almidón de

maíz transgénico e hidratados con APTS *in situ*, permitieron obtener imágenes de la distribución molar interna de los gránulos de almidón (Blennow *et al.*, 2003).

A diferencia de otras técnicas de microscopía, la CLSM no solamente provee excelente resolución con el plano de la sección ($\geq 0.1 \mu\text{m}$ en la dirección x- e y-), también provee una excelente resolución entre la sección de los planos ($\approx 0.1 \mu\text{m}$ en la dirección z-), lo que permite observar la ultraestructura de los materiales (van de Velde *et al.*, 2003). Una pila de secciones seriales ópticas ofrece la posibilidad de analizar en computadora cada una de las proyecciones compuestas o un volumen dando una representación en tres dimensiones del espécimen (Tromp *et al.*, 2001). La Figura 68b y 68c muestran el almidón de maíz gelatinizado. En la Fig. 68b se observa que, al igual que en la microscopía de luz transmitida, los gránulos de almidón presentaron un crecimiento radial en todas direcciones sin la destrucción de los mismos, debido a que el entrecruzamiento refuerza los gránulos de almidón (Loisel *et al.*, 2000). Por su parte, la Fig. 67c muestra la proyección tridimensional de dos gránulos de almidón obtenidos a partir de cortes de $1 \mu\text{m}$ en los gránulos. El programa que se utilizó para hacer la representación fue el Image Pro-Plus 4.2. La imagen muestra la esfericidad del gránulo de almidón con una superficie irregular, sin embargo, el fluorocromo cubrió adecuadamente la superficie de los gránulos de almidón. Desafortunadamente, el marcador no penetró al interior de los gránulos, lo que no permitió observar estructuras al interior del mismo.

5.2.6 Discusión

La microscopía es una herramienta útil en la comprensión de la estructura física de los sistemas. La imagen de luz polarizada mostró que durante la aplicación del tratamiento químico del almidón no se dañó la estructura cristalina del mismo, partiendo así de un almidón ceroso de forma esférica con una distribución de tamaños de partícula muy homogénea. Como lo demostraron el perfil de torque con la temperatura, las imágenes de microscopía de luz transmitida y la CLSM, el tratamiento térmico y mecánico aplicado al almidón en el presente trabajo, no dañó la estructura física de los gránulos durante su cocción. Dentro de la clasificación propuesta por Nayouf *et al.* (2003), con esta temperatura de cocción se tiene almidón subcocido constituido por partículas semirígidas con una alta estabilidad y resistencia a la cizalla. Dada su condición de partículas esféricas, fue posible emplear la relación de diámetros, $(D/D_0)^3$, como el factor de hinchamiento, sin que esto sea extrapolable a otros sistemas, sobre todo cuando los

almidones sufren un daño mecánico durante el proceso de cocción y se obtiene una gran cantidad de gránulos rotos, o bien en aquellos almidones con un gran contenido de amilosa (amilomaize). Las concentraciones de almidón empleadas en este trabajo (1 a 4%), permitieron tener un sistema con una fracción volumen, $\phi < 1.0$. Esta situación permite que la fase continua (o medio acuoso) sea suficiente para garantizar que todos los gránulos se hidraten e hinchen a su máxima capacidad.

Hasta el momento, no hay ninguna evidencia en la literatura de que los iones tengan la capacidad de introducirse en los gránulos de almidón, con excepción del Li^+ (Lii *et al.*, 2002). Por otro lado, no existe en la literatura información sobre el efecto de la presencia de iones en el almidón. En este contexto, la presencia de K^+ no produjo ningún efecto significativo en la distribución de tamaño de partícula a concentraciones inferiores de 40 mM de KCl, sin embargo, a 300 mM KCl, se observó una disminución de $D[v, 0.5]$ que se atribuyó a un posible efecto osmótico por la diferencia de concentraciones al interior del gránulo de almidón y la alta concentración de K^+ en la fase continua. Por otro lado, el K^+ no produjo diferencias significativas en las propiedades térmicas durante la gelatinización del almidón, sin embargo, en las pruebas de cizalla estacionaria, se presentaron pequeñas diferencias significativas. Se sabe que la presencia de los iones produce una rigidez en las cadenas de los polisacáridos.

Las pruebas reológicas de cizalla estacionaria mostraron la posible existencia de un esfuerzo de fluencia en las dispersiones 3 y 4 %, no se tiene suficiente información para establecer que este esfuerzo sea falso o verdadero.

Las pruebas de cizalla oscilatoria mostraron que para $\phi = 0.74$ y 0.57 , la fase dispersa, constituida por los gránulos de almidón hinchados, determina el comportamiento reológico del sistema, mismo que fue predominantemente elástico con valores altos en la $\tan \delta$ por tratarse de dispersiones con una alta concentración de partículas en suspensión. Para valores de $\phi = 0.38$ y 0.18 , la fase dispersa no determinó el comportamiento reológico del sistema, donde esencialmente predominó el carácter viscoso. La temperatura no tuvo efecto sobre los valores de G' y G'' a 25 y 60 °C, sin embargo, a 9 °C se observó una disminución de ambos módulos para $\phi = 0.74$ y 0.57 , probablemente por efecto de contracción de los gránulos por la baja temperatura.

5.3 Mezclas κ -carragenina-almidón-KCl

5.3.1 Tamaño de partícula y fracción volumen

5.3.1.1 En ausencia de K^+

Se analizó el tamaño de las partículas en mezclas almidón- κ -carragenina en ausencia de KCl. Todas las mezclas se prepararon siguiendo el procedimiento descrito previamente (sección 4.3.2). La Figura 69 muestra el efecto de la concentración de almidón y de la κ -carragenina en las mezclas. Una solución con 0.5% de κ -carragenina no produjo ninguna señal en el analizador de tamaños de partícula con lo cual podemos comprobar la ausencia de partículas en suspensión en dicha solución. La distribución de tamaños de partícula de almidón cocido en ausencia de κ -carragenina fue monomodal (línea continua en la Figura 69a). Las mezclas con 0.5% de κ -carragenina, mostraron una distribución bimodal, con un pequeño “hombro” entre 4 a 15 μm y todas estuvieron desplazadas hacia tamaños de partícula mayores: una mayor concentración de almidón produjo partículas de diámetro mayor. Es importante precisar que el porcentaje volumen es el cociente del volumen que ocupan las partículas de diámetro D_i , entre el volumen total que ocupan todas las partículas, multiplicado por 100. Los diámetros son calculados con referencia al diámetro equivalente de una esfera. Así, en la suspensión con 4% de almidón y 0.5% de κ -carragenina se obtuvo un porcentaje de volumen mayor que se reflejó en un $D[v, 0.5]$ más grande que en la suspensión con la misma concentración de κ -carragenina pero con 1 % de almidón. Este es el diámetro mediano, cuyo valor indica que 50% del volumen de la población es mayor y 50% es menor a dicho diámetro.

Para comprender mejor el comportamiento de las mezclas, examinamos dos procedimientos para prepararlas. En uno de ellos, denominado “cocción conjunta”, el almidón fue cocido en presencia de κ -carragenina. En el otro, denominado “cocción independiente”, el almidón fue cocido sin la presencia del hidrocoloide, y la κ -carragenina fue preparada aparte sin KCl y luego ambos componentes fueron mezclados. En las mezclas preparadas por “cocción conjunta” la concentración de κ -carragenina fue siempre 0.5%, mientras que la de almidón fue 1, 2 y 4%. En las mezclas preparadas por “cocción independiente” se coció a 92 °C un suspensión con 4% de almidón ($\phi = 0.74$, lo que aseguró un hinchamiento completo de los gránulos) y se preparó a la misma temperatura una disolución con 1% de κ -carragenina. Una vez a temperatura ambiente ambos componentes se mezclaron en proporciones que permitieron tener las mismas

concentraciones de κ -carragenina y de almidón que en las mezclas preparadas por “cocción conjunta” y se procedió a obtener la distribución de tamaños y el $D[v, 0.5]$ en las mismas condiciones. La distribución de tamaños de partícula fue bimodal (datos no mostrados) semejante a las mezclas obtenidas cuando se cocieron en forma conjunta. En la “cocción independiente” el diámetro mediano (Cuadro 15) no se vio afectado por la concentración de almidón, sin embargo, en la “cocción conjunta” la cantidad de almidón sí influyó en el tamaño de las partículas. Los valores de $D[v, 0.5]$ se resumen en la cuarta columna del Cuadro 15.

El Cuadro 15 muestra que el $D[v, 0.5]$ de las mezclas cuando los componentes se hidratan en forma independiente es mayor que el de almidón 4% cocido sin κ -carragenina y los de los polisacáridos cocidos en forma conjunta con 1 y 2% de almidón. En estas condiciones, dada la ausencia de K^+ en el sistema, la κ -carragenina se encuentra en una forma de hebra aleatoria sin formar un gel. Este incremento en el $D[v, 0.5]$ puede atribuirse a: 1) la presencia de carragenina puede provocar una disminución en la cantidad de agua disponible para que los gránulos de almidón se hinchen completamente, y 2) la posible adhesión de la κ -carragenina sobre la superficie de los gránulos de almidón. Comparando los valores de $D[v, 0.5]$ de las mezclas cocidas en forma conjunta (segunda columna del Cuadro 15) en relación con el almidón solo, se refuerza la posibilidad de la adhesión de la κ -carragenina sobre los gránulos, ya que en todos los casos se observa un incremento en el $D[v, 0.5]$. Sin embargo, pese a que la adhesión de κ -carragenina pudo haber persistido, es posible que la presencia de ésta no haya permitido el completo hinchamiento de los gránulos de almidón cuando ambos polisacáridos se cuecen en forma conjunta. Este efecto fue más pronunciado en las mezclas con 1% de almidón.

Estos resultados junto con el examen de la ultraestructura que se mostrará más adelante permiten postular que el aumento en el diámetro de las partículas de almidón se debe a la adhesión de la κ -carragenina sobre los gránulos. Se ha reportado la adhesión de xantana (Gonera y Cornillon, 2002; Chaisawang y Supphantharika, 2006) y de gelana (van de Velde *et al.*, 2003) sobre gránulos de almidón cuando éste se gelatiniza en presencia del otro componente. También se ha reportado que en presencia de xantana ocurre una reducción en el hinchamiento, y por ende en el diámetro, de gránulos de almidón de maíz normal (10%) la cual se ha atribuido a una reducción de la movilidad de las moléculas de agua por la presencia de la xantana (Krüger *et al.*, 2003).

Cuadro 15. Efecto de la concentración de almidón en 0.5% de κ -carragenina.

Almidón %	D[v, 0.5] (μm) sin κ -carragenina	D[v, 0.5] (μm) Cocción conjunta	D[v, 0.5] (μm) Cocción independiente
1	41.19	47.18	52.41
2	41.83	51.87	53.08
4	41.61	55.30	-

La Figura 69b muestra el efecto de la κ -carragenina en una dispersión con 4% de almidón. En todas las mezclas se observó un incremento de D[v, 0.5] aun con la incorporación de bajas concentraciones de κ -carragenina. El D[v, 0.5] aumentó rápidamente para concentraciones de κ -carragenina menores de 0.2%, posteriormente el aumento fue más suave hasta alcanzar un valor prácticamente constante para concentraciones de carragenina mayores de 0.4%. Durante el tratamiento térmico de las mezclas, mientras que el almidón se gelatinizó y se hinchó, la κ -carragenina se disolvió y adhirió presumiblemente sobre la superficie de los gránulos. Sin embargo, podría ser que ésta se haya “saturado” con κ -carragenina y por ello D[v, 0.5] no aumentó más. Es muy probable que el nivel de saturación de la superficie de los gránulos hinchados con la κ -carragenina sea diferente y varíe con la concentración de almidón. En estudios previos de un sistema similar de κ -carragenina-almidón de maíz ceroso entrecruzado químicamente (Tecante y Doublier, 1999; Loisel *et al.*, 2000) se observó un incremento en el diámetro de los gránulos debido a la presencia de la κ -carragenina, así como un incremento en el poder de hinchamiento, sin embargo, hasta ahora no se había proporcionado una explicación a este fenómeno.

Con base en el análisis realizado previamente sobre el uso del poder de hinchamiento (sección 5.2.2) para calcular la fracción volumen del almidón y las observaciones de éste al microscopio, se extendió el uso de PH obtenido a partir de la relación de diámetros, para calcular la fracción volumen de las mezclas. Para tal efecto, se analizaron los diferentes valores de diámetro obtenidos a partir de la distribución de tamaños de partícula.

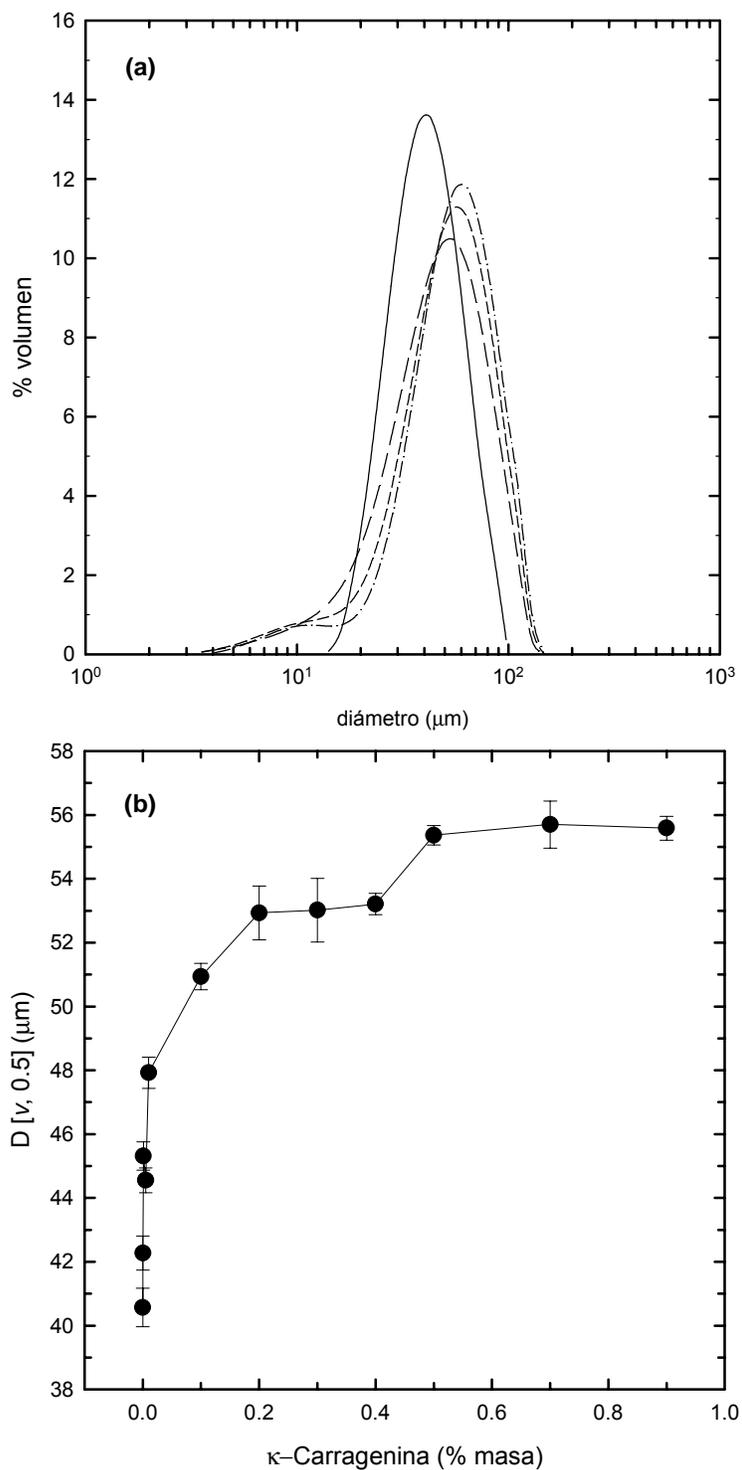


Figura 69. Distribución y tamaños de partícula en mezclas κ -carragenina-almidón cocidas a 92 °C. (a) Efecto de la concentración de almidón en 0.5% de κ -carragenina: almidón solo (línea continua), 1% (línea discontinua larga), 2% (línea discontinua corta) y 4% (línea - punto). (b) Efecto de la concentración de κ -carragenina en el $D[v, 0.5]$ de almidón 4%.

La Figura 70 muestra el efecto del uso de diferentes diámetros en la fracción volumen de las mezclas almidón-0.5% de κ -carragenina. El $D[v, 0.1]$ es el diámetro mediano al 10% y $D[v, 0.9]$ es el correspondiente para 90%. Todas las relaciones de diámetros se calcularon con respecto al D correspondiente del almidón nativo sin cocer. El uso de $D[v, 0.1]$ produjo valores de ϕ muy por debajo de los obtenidos con $D[v, 0.5]$ y con valores prácticamente constantes. Por su lado el $D[v, 0.9]$ mostró valores superiores a los obtenidos con $D[v, 0.5]$. La amplitud de la distribución de tamaños de partícula del almidón sin cocer fue muy angosta y la diferencia entre el valor de sus diámetros fue muy estrecha (10.25, 15.16 y 24.78 para $D[v, 0.1]$, $D[v, 0.5]$ y $D[v, 0.9]$, respectivamente). En las mezclas, el $D[v, 0.9]$ representó prácticamente el doble del valor de $D[v, 0.5]$, lo que produjo una sobre-estimación de ϕ calculada por este método. Para fines prácticos y con base en los resultados obtenidos previamente con los valores de PH_{AD} , en este sistema es aplicable el cálculo de ϕ con $D[v, 0.5]$. Como era de esperarse, la presencia de κ -carragenina produjo un incremento en la ϕ de las mezclas, (círculos en la Figura 70) con una tendencia similar a la descrita previamente para los tamaños de partícula. Bajas concentraciones de κ -carragenina producen un rápido incremento de ϕ , sin embargo, se llega a un valor constante por probable saturación de los gránulos de almidón con la κ -carragenina con valores finales de $\phi \approx 1.7$.

5.3.1.2 Efecto de la presencia de K^+

Finalmente, se analizó el efecto del K^+ (0 a 40 mM) sobre dos mezclas almidón- κ -carragenina a dos concentraciones: 0.2 y 0.5% de κ -carragenina. La Figura 71 muestra el efecto de la concentración de KCl y de la κ -carragenina sobre $D[v, 0.5]$ y ϕ , en las mezclas con 4% de almidón. La presencia de K^+ en las mezclas κ -carragenina-almidón produjo una disminución en $D[v, 0.5]$ (Figura 71a) y en ϕ (Figura 71b). Esto se debió a que en presencia de K^+ la κ -carragenina forma dobles hélices y probablemente éstas se agregan, evitando la adhesión del hidrocoloide sobre los gránulos de almidón. Pese a que la pasta inicial se diluyó en una proporción 1 a 50 a 60 °C, para concentraciones mayores de 40 mM de KCl, una vez enfriada la pasta, se formaron pequeños aglomerados que precipitaron, por lo que no fue posible medir los tamaños de partícula para concentraciones mayores de KCl.

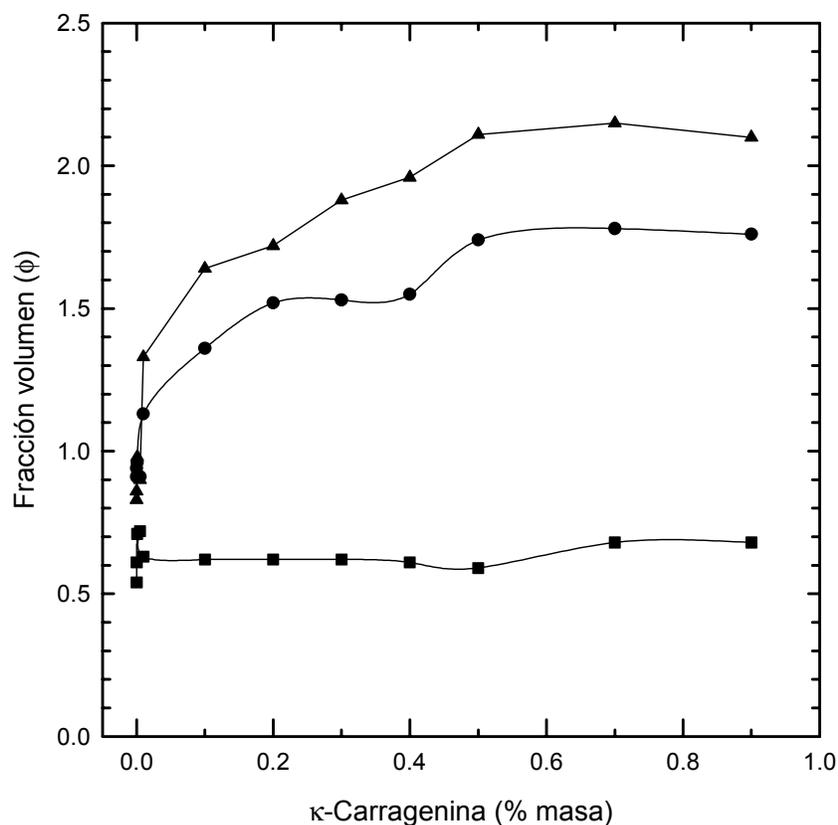


Figura 70. Efecto del uso de los diámetros de la distribución de tamaños de partícula en el cálculo de la ϕ en mezclas κ -carragenina-almidón 4%: $D[v, 0.1]$ (cuadros), $D[v, 0.5]$ círculos y $D[v, 0.9]$ (triángulos). Las líneas sólo se emplearon como guías visuales.

Este mismo efecto de disminución en los diámetros medianos se presentó (resultados no mostrados) cuando los componentes (almidón y κ -carragenina) fueron sometidos al proceso térmico en forma independiente, para ser mezclados posteriormente con una solución 1 mM de KCl (para evitar la formación de agregados). Los valores de $D[v, 0.5]$ fueron de 52.41 y 51.46 μm para la mezcla en ausencia y en presencia de KCl, respectivamente. Al comparar $D[v, 0.5]$ de las mezclas elaboradas en forma independiente con una mezcla de composición similar cocida conjuntamente, se volvió a observar que cuando todos los componentes de las mezclas se cuecen conjuntamente, los diámetros mediano de los gránulos de almidón fueron menores (51.46 y 46.64 μm en ausencia y presencia de KCl, respectivamente). Lo anterior se debe a una mayor afinidad de la κ -carragenina con el K^+ para formar un gel evitando parcialmente la adhesión de la κ -carragenina sobre la superficie de los gránulos, dando como resultado una disminución del diámetro mediano (7.6 y 3.7% para 0.5 y 0.2% κ -carragenina respectivamente) del almidón en ausencia de KCl y con 40 mM de KCl (Figura 71a). La diferencia del

porcentaje de disminución en el diámetro mediano entre 0.5 y 0.2% es debida a la existencia de una cantidad menor de κ -carragenina cuando su concentración es 0.2%

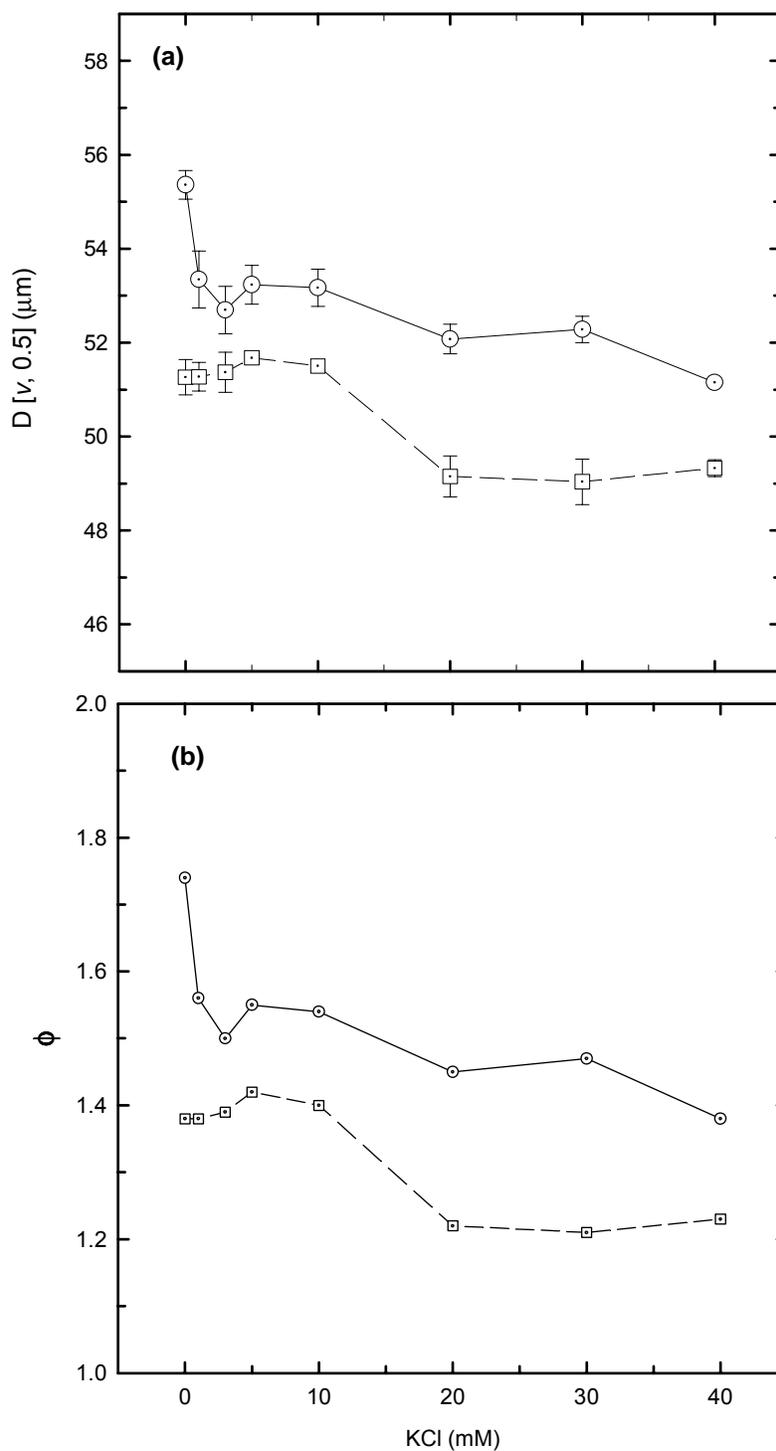


Figura 71. Efecto de la concentración de KCl en: (a) el diámetro mediano y (b) la fracción volumen de mezclas almidón 4%- κ -carragenina 0.2 (cuadros) y 0.5% (círculos). Las líneas sólo se emplearon como guías visuales.

Analizando de manera global los resultados previos, se puede concluir que la adhesión de la κ -carragenina sobre la superficie de los gránulos existe, sin embargo, se ve afectada por la cantidad de κ -carragenina adicionada a la mezcla así como por la presencia de KCl. Considerando que durante la gelatinización del almidón el hidrocoloide en la fase continua se concentra (Alloncle y Doublier, 1991) es muy probable que la concentración de κ -carragenina no sea homogénea en dicha fase y exista un gradiente de concentraciones, sobre todo en las zonas cercanas a los gránulos de almidón. Por otro lado, cuando también se encuentra presente el K^+ dentro del sistema, éste hace que exista una mayor afinidad con la κ -carragenina, lo que no evita la adhesión, pero sí la limita. Por otro lado, la presencia de κ -carragenina con el almidón, evita que este último se hidrate completamente. Las fracciones volumen en las mezclas se ven influenciadas por la cantidad de κ -carragenina y de KCl presentes en ellas.

5.3.2 MicroDSC

5.3.2.1 Análisis de la presencia de almidón en la κ -carragenina

De manera similar al tamaño de partícula, la microDSC se empleó para estudiar el efecto de cada uno de los componentes de la mezcla. Inicialmente se analizó la presencia de almidón (4%) sobre la κ -carragenina para diferentes concentraciones (0.3 a 2%) sin la presencia de KCl. Es importante aclarar que todos los termogramas aquí presentados son del segundo ciclo calentamiento-enfriamiento en el microcalorímetro. La Figura 72 muestra los termogramas de estas mezclas. En todos los casos, tanto en las mezclas (líneas externas) como en la κ -carragenina sola (líneas centrales), el enfriamiento fue monomodal con un pico “exo” mientras que en el calentamiento se observan picos “endo”. Durante el calentamiento ocurre la fusión de los agregados así como un rompimiento de la red a la temperatura de fusión y durante el enfriamiento, el pico exotérmico representa la temperatura para la cual ocurre la transición de hebra aleatoria (forma desordenada) a una forma helicoidal (forma ordenada) con la subsecuente agregación. En las curvas de calentamiento de las disoluciones con 0.3 y 0.4% de κ -carragenina existe un solo pico debido a que a estas concentraciones hay sólo una transición de una forma ordenada (dobles hélices sin formar agregados) a una desordenada (hebra aleatoria). Para mayores concentraciones de κ -carragenina, se presentaron dos picos, atribuyendo la existencia del

primero (de izquierda a derecha) a la transición de una conformación de doble hélice hacia una de hebra aleatoria, y el segundo a la fusión de la red formada por el hidrocoloide. De esta manera, es posible la existencia de pequeñas cantidades de dobles hélices sin formar agregados debido a que el K^+ presente en la κ -carragenina no está en cantidad suficiente para que toda se encuentre en forma agregada. Se observa también que a mayor concentración de κ -carragenina sola las temperaturas de gelificación y de fusión son mayores, y la proporción entre las áreas de los picos de uno y otro fenómeno (transición orden-desorden / fusión) se invierten; así, el área correspondiente a la transición de doble hélice a hebra aleatoria disminuyó y la correspondiente a la fusión de la red formada por el hidrocoloide aumentó. El Cuadro 16 muestra el resumen de entalpías y de temperaturas obtenidas de los termogramas de la Figura 72.

Cuadro 16. $T_{m\acute{a}x}$ y ΔH para κ -carragenina y sus mezclas con almidón 4% en ausencia de KCl.

Muestra	Calentamiento		Enfriamiento	
	$T_{m\acute{a}x}$ ($^{\circ}C$)	ΔH ($J/g_{\kappa\text{-carragenina}}$)	$T_{m\acute{a}x}$ ($^{\circ}C$)	ΔH ($J/g_{\kappa\text{-carragenina}}$)
0.3% κ -carragenina	12.34	11.25	10.44	11.07
0.3% κ -carragenina 4% almidón	13.42	11.94	12.38	-17.31
0.4% κ -carragenina	14.25	6.73	13.34	-11.22
0.4% κ -carragenina 4% almidón	15.39 y 22.05	5.99 y 4.24	15.52	-22.60
0.5% κ -carragenina	15.21 y 21.6*	13.20 y 2.44*	15.06	-29.40
0.5% κ -carragenina 4% almidón	33.13	11.76	23.46	-14.80
0.7% κ -carragenina	17.75 y 24.3*	17.61 y 8.97*	18.22	-55.97
0.7% κ -carragenina 4% almidón	29.4	37.10	20.61	-51.37
1% κ -carragenina	21.8 y 29.0*	5.9 y 23.9*	22.2	-30.70
1% κ -carragenina 4% almidón	41.9	31.1	29.5	-39.70
2% κ -carragenina	18.8 y 35.9*	0.8 y 31.5*	24.3	-36.70
2% κ -carragenina 4% almidón	49.4	41.3	32.1	-41.40

* Para el primero y segundo pico, respectivamente.

En todos los casos se observó un aumento en las temperaturas de transición tanto en el calentamiento como en el enfriamiento debido a la presencia del almidón. En la mezcla con 0.3% κ -carragenina-almidón, permaneció un solo pico durante el calentamiento, sin embargo, en 0.4% κ -carragenina-almidón surgió un segundo pico.

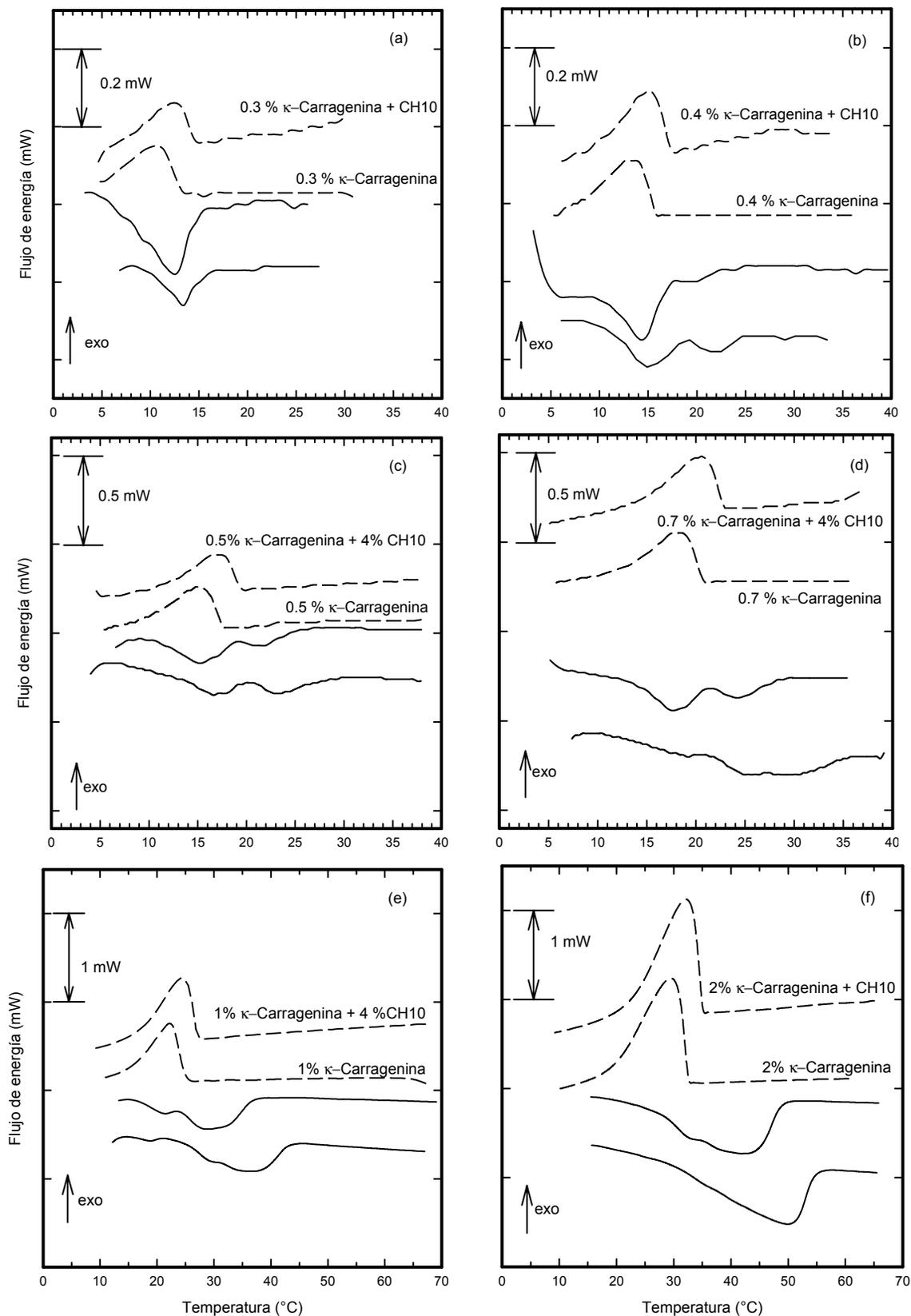


Figura 72. Termogramas de mezclas con 4% de almidón y κ -carragenina: (a) 0.3%, (b) 0.4%, (c) 0.5%, (d) 0.7%, (e) 1.0% y (f) 2.0%. Enfriamiento (líneas punteadas), calentamiento (líneas continuas).

En la mezcla 0.5% de κ -carragenina-almidón, se invirtió la proporción de los picos, aumentando el pico correspondiente a la fusión de los geles. Finalmente en las mezclas 0.7, 1.0 y 2% κ -carragenina-almidón no se observaron dos picos definidos, sino más bien, la inclusión del primer pico en el segundo. Durante el tratamiento térmico aplicado a las mezclas, la κ -carragenina se adhirió a los gránulos de almidón, provocando zonas con una mayor concentración de la κ -carragenina en la fase continua. Este aumento de concentración en la fase continua se reflejó en una mayor agregación de dobles hélices (segundo pico de los termogramas) lo que produjo un incremento en las temperaturas y entalpías de transición de la κ -carragenina. Estas observaciones son acordes con las observaciones de Alloncle *et al.* (1989), quienes propusieron que en mezclas de almidón-hidrocoloide, la fase continua se modifica por la presencia de almidón, de tal forma que conforme ocurre la gelatinización, los gránulos de almidón se hidratan disminuyendo el volumen disponible de la fase continua, elevando así la concentración de hidrocoloide en ésta. En un sistema de almidón de arroz a altas concentraciones (30%) con gelana (1.5%) se observó un incremento en las temperaturas de gelatinización del almidón con respecto al almidón solo, sin embargo el tamaño de la endoterma disminuyó ligeramente debido probablemente a que la presencia de la gelana inhibió la gelatinización completa del almidón (Liu y Lelievre, 1992). Sin embargo, en este caso, el fenómeno que se estudió en este trabajo fue la transición sol-gel de la κ -carragenina y no la gelatinización del almidón.

5.3.2.2 Análisis de la presencia de KCl en mezclas κ -carragenina - almidón

Para analizar la presencia de KCl, se eligió una concentración fija de 0.5% de κ -carragenina y 4% de almidón con concentraciones de KCl de 1 a 40 mM. La Figura 73 muestra los termogramas obtenidos y el Cuadro 17 presenta el resumen de las temperaturas y las entalpías obtenidas en las mezclas. Al igual que los termogramas previamente presentados, la fusión de la κ -carragenina a bajas concentraciones de KCl (1 y 3 mM) (Figuras 73a y 73b) se caracterizó por la presencia de dos picos endotérmicos. Una proporción de κ -carragenina se encontró en forma de dobles hélices sin formar agregados y la otra se encontró en forma agregada. Esta afirmación está soportada por el hecho de que la proporción de las áreas cambia al incrementar la concentración de KCl (Figuras 73c y 73d) de tal forma que el K^+ presente en la mezcla permitió que toda la κ -

carragenina se encuentre en forma de dobles hélices agregadas con la respectiva formación de red tridimensional.

Cuadro 17. $T_{m\acute{a}x}$ y ΔH de mezclas 4% de almidón-0.5% de κ -carragenina con diferentes concentraciones de KCl.

Muestra	Calentamiento		Enfriamiento	
	T_{fus} ($^{\circ}C$)	ΔH_{fus} (J/g κ -carragenina)	T_{gel} ($^{\circ}C$)	ΔH_{gel} (J/g κ -carragenina)
0.5% κ -carragenina 1 mM KCl	18.3 y 24.7*	18.23 y 8.37*	18.45	-57.64
0.5% κ -carragenina 1 mM KCl-4% almidón	17.6 y 24.9*	19.2 y 4.40*	18.69	-41.68
0.5% κ -carragenina 3 mM KCl	19.4 y 26.2*	18.17 y 8.29*	19.70	-55.45
0.5% κ -carragenina 3 mM KCl-4% almidón	25.7 y 33.4*	18.0 y 6.56*	21.20	-43.21
0.5% κ -carragenina 5 mM KCl	31.0	44.40	21.99	-51.14
0.5% κ -carragenina 5 mM KCl-4% almidón	32.5	31.40	23.52	-32.00
0.5% κ -carragenina 40 mM KCl	51.6	79.98	38.23	-76.10
0.5% κ -carragenina 40 mM KCl-4% almidón	55.8	78.89	40.18	-73.48
0.5% κ -carragenina 40 mM KCl-3% almidón	56.9	79.6	40.70	-77.71
0.5% κ -carragenina 40 mM KCl- 2% almidón	56.4	94.69	40.12	-86.11

* Para el primero y segundo pico, respectivamente.

Se observó un incremento en las T_{fus} y T_{gel} de la κ -carragenina con el incremento de la concentración de KCl, así como el ΔH_{fus} . La presencia de K^+ produjo una mayor proporción de dobles hélices en forma agregada. Sin embargo, sólo con 40 mM de KCl el incremento fue de ΔH_{gel} fue considerable. En forma general, en el intervalo de concentraciones de KCl estudiadas en este trabajo se produjeron ΔH_{gel} mayores que los de fusión debido a que la agregación de dobles hélices necesita más energía que la fusión de los agregados (Kara *et al.*, 2003). En las mezclas, existió un incremento en T_{fus} y T_{gel} por la presencia del almidón, en el caso extremo de 40 mM KCl, el incremento de la temperatura fue de 5 $^{\circ}C$ en la fusión entre la mezcla sin y con almidón. Sin embargo, no existe una diferencia significativa ($\alpha = 0.05$) entre las temperaturas de fusión y de gelificación de las mezclas con diferentes concentraciones de almidón. En mezclas κ -carragenina-almidón, la adhesión de la κ -carragenina se ve influenciada por la presencia de KCl, de tal forma que en ausencia de K^+ , la κ -carragenina tuvo más oportunidad de adherirse a la superficie del almidón, y cuando la sal se encuentra presente en el sistema, la κ -carragenina presentó una mayor afinidad hacia ésta para formar agregados así como la respectiva red tridimensional. Los resultados obtenidos entre la microDSC y el tamaño de partícula fueron congruentes entre sí.

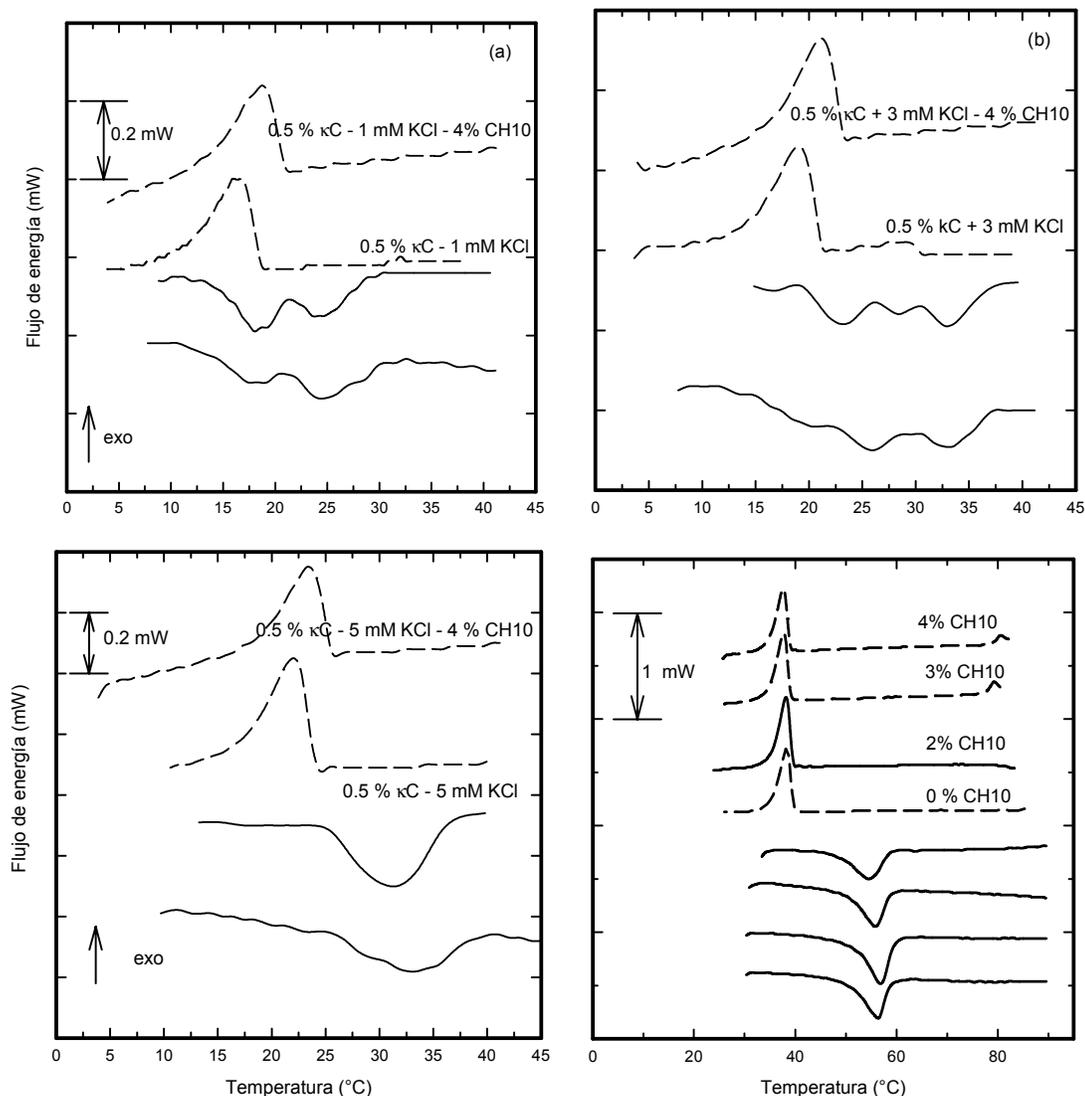


Figura 73. Termogramas de mezclas 4% de almidón-0.5% de κ -carragenina: (a) 1, (b) 3, (c) 5 y (d) 40 mM KCl. Enfriamiento (líneas punteadas), calentamiento (líneas continuas).

5.3.3 Cizalla oscilatoria en mezclas almidón- κ -carragenina-KCl

5.3.3.1 Efecto de la concentración de almidón y de KCl en geles con 0.5% de κ -carragenina a 25 °C

Primero se analizó el efecto de la concentración de almidón en mezclas con 0.5% de κ -carragenina en ausencia de KCl. La Figura 74 muestra los barridos de frecuencia a 25 °C obtenidos en la zona de viscoelasticidad lineal de estas mezclas. El comportamiento de κ -carragenina sola fue característico de una solución macromolecular (líneas) con $G'' > G'$ y

ambos módulos altamente dependientes de la frecuencia ($G' \propto \omega^{1.77}$, $G'' \propto \omega^{0.93}$). Este comportamiento es consistente con el diagrama de transición sol-gel de la κ -carragenina. A 25 °C, ésta se encuentra en un estado desordenado en forma de hebra aleatoria (Figura 23). En las mezclas con almidón 1% ($\phi = 0.27$), $G'' > G'$ en todo el intervalo de frecuencia evaluado, y a la vez mayor que para la κ -carragenina sola. Esto hace suponer que la interacción física entre el almidón- κ -carragenina y el fenómeno de adhesión de esta última sobre el almidón, produjo cierta rigidez en las cadenas de κ -carragenina. Estas interacciones parecen ser más fuertes en mezclas con 2% de almidón ($\phi = 0.70$), para las cuales, ambos módulos se cruzan alrededor de 0.5 rad/s y G' fue ligeramente mayor que G'' por arriba de esta frecuencia, produciendo una $\tan \delta$ muy cercana a uno, Figura 74b. En las mezclas con 3% ($\phi = 1.16$) y 4% ($\phi = 1.78$), $G' > G''$ y ambos módulos fueron menos dependientes de la frecuencia ($G' \propto \omega^{0.19}$, $G'' \propto \omega^{0.2}$). Como no se adicionó K^+ , la κ -carragenina no formó un gel en estas condiciones, así los gránulos de almidón hinchados se encuentran dispersos en una solución macromolecular e interactúan con las cadenas de κ -carragenina en una forma de hebra aleatoria. En general, la tendencia fue similar a la observada en las pastas individuales de almidón (Figura 65a) sin un incremento notable en el valor de los módulos, con excepción de 1 y 2% de almidón, donde se observó un cambio en el comportamiento de la fase continua.

En forma global, se observó que con 1 y 2% de almidón, la fase continua sigue predominando sobre los gránulos dispersos. Con 3 y 4%, los gránulos dispersos son los que gobernaron el comportamiento reológico de las mezclas. Comparando los valores de G' de las mezclas con los de almidón solo, se observó que numéricamente, no hubo cambios para 4% de almidón, pero para el resto de las concentraciones, se observó un efecto sinérgico, produciendo valores mayores de G' y G'' , sin embargo, la $\tan \delta$ también aumentó porque la presencia de la κ -carragenina produjo un carácter más líquido y no un carácter más sólido. El incremento en la concentración de κ -carragenina en la fase continua no fue acorde como lo predicho por Alloncle *et al.* (1989) (Tecante y Doublier, 1999).

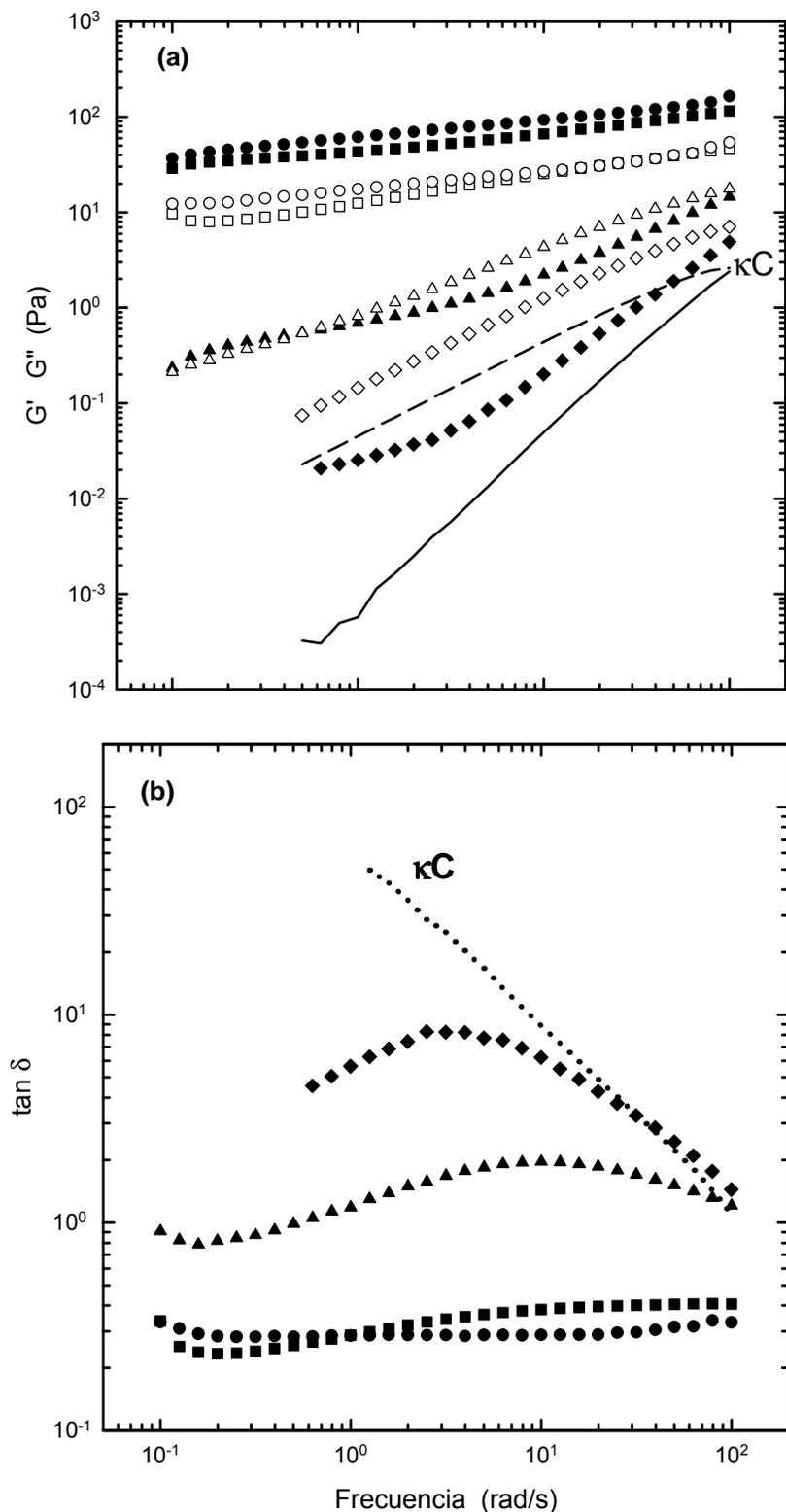


Figura 74. Efecto de la concentración de almidón sobre el comportamiento viscoelástico a 25 °C en sus mezclas con 0.5% de κ -carragenina. (a) G' (símbolos llenos y línea continua) y G'' (símbolos vacíos y línea discontinua); (b) $\tan \delta$: 4 (círculos), 3 (cuadros), 2 (triángulos), 1 (diamantes) y 0% (líneas discontinuas). Condiciones experimentales C de la Figura 23. κC (κ -carragenina sola).

Si bien es cierto que existe sinergia entre el almidón y la κ -carragenina y que además se atribuye al incremento de la concentración del hidrocoloide en la fase dispersa, también es importante tener presente que la adhesión de la κ -carragenina en la superficie de los gránulos puede proveer una interacción física entre las partículas de almidón.

En el análisis del efecto de K^+ en los geles de almidón- κ -carragenina, la Figura 75 muestra en barrido de frecuencia para un gel conteniendo 0.5% de κ -carragenina + 3% de almidón + 40 mM de KCl a 25 °C. Este comportamiento es un ejemplo representativo de las otras mezclas. La figura muestra el comportamiento típico de un gel (Ferry, 1980), donde ambos módulos presentaron una baja dependencia con la frecuencia ($G' \propto \omega^{0.03}$, $G'' \propto \omega^{0.11}$), $G' \gg G''$ (Figura 75a) y $\tan \delta$ menor de 0.1 (Figura 75b). A esta temperatura y C_T la κ -carragenina formó una red tridimensional. En tales condiciones, los gránulos de almidón se encuentran inmersos en una matriz de gel en la cual la κ -carragenina se encontró altamente ordenada.

Finalmente, se analizó el efecto de la concentración de K^+ adicionado al sistema, así como de la concentración de almidón sobre G' a 1 Hz, obtenido a partir de los barridos de frecuencia de cada una de las mezclas. La Figura 76 muestra los resultados obtenidos. Los valores de G' se incrementaron con la presencia del almidón: a mayor concentración de almidón, mayor fue el valor de G' . La presencia de los gránulos hinchados reforzó el efecto de la κ -carragenina en los geles en una forma de "composites" (Carnali y Zhou, 1996). En estos sistemas, las partículas de almidón se encuentran embebidas en una red tridimensional (Tecante y Doublier, 1999). El módulo de almacenamiento de los geles de las mezclas y los geles de κ -carragenina sola (triángulos invertidos) se incrementaron con la concentración de KCl, sin embargo, para concentraciones de sal menores que 100 mM, G' aumentó notablemente, mientras que para concentraciones mayores de 100 mM KCl, el aumento de G' fue marginal.

Para 0.5% de κ -carragenina sola o en combinación con el almidón, hay un umbral en la concentración de sal. Por debajo de éste, una adición gradual de sal induce la agregación continua de las cadenas de κ -carragenina que se encuentran en una conformación ordenada, dando como resultado un incremento de la rigidez de la red tridimensional. Arriba del umbral, la incorporación de sal adicional no induce más agregaciones de las cadenas de κ -carragenina, llegando a un valor constante del módulo de almacenamiento que puede incrementar solamente mediante el reforzamiento de los gránulos de almidón hinchados.

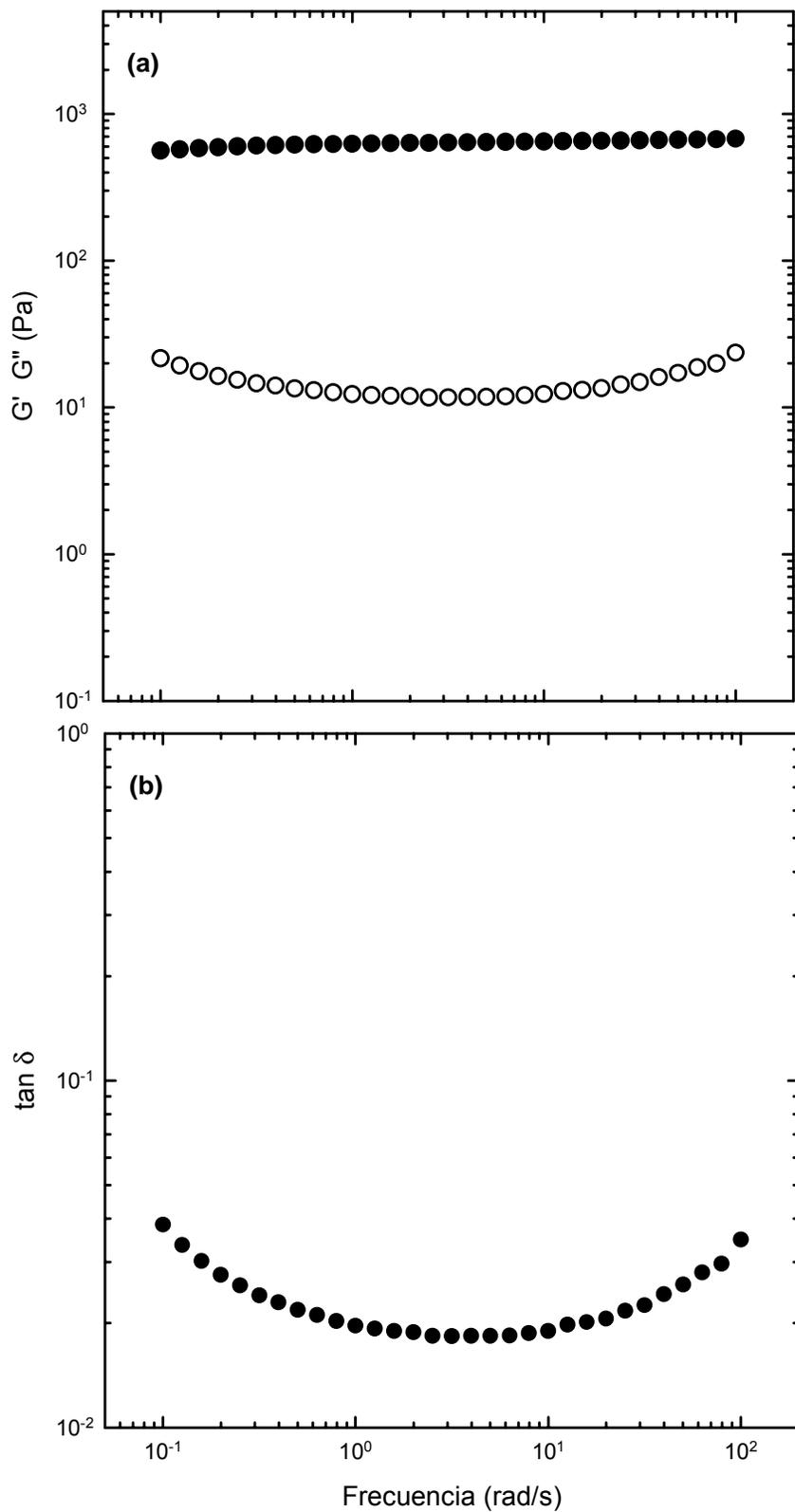


Figura 75. Barrido de frecuencia a 25 °C para un gel con 0.5% de κ -carragenina-3% de almidón-40 mM de KCl a 0.5% de deformación (a) G' (símbolos sólidos), G'' (símbolos vacíos), (b) $\tan \delta$.

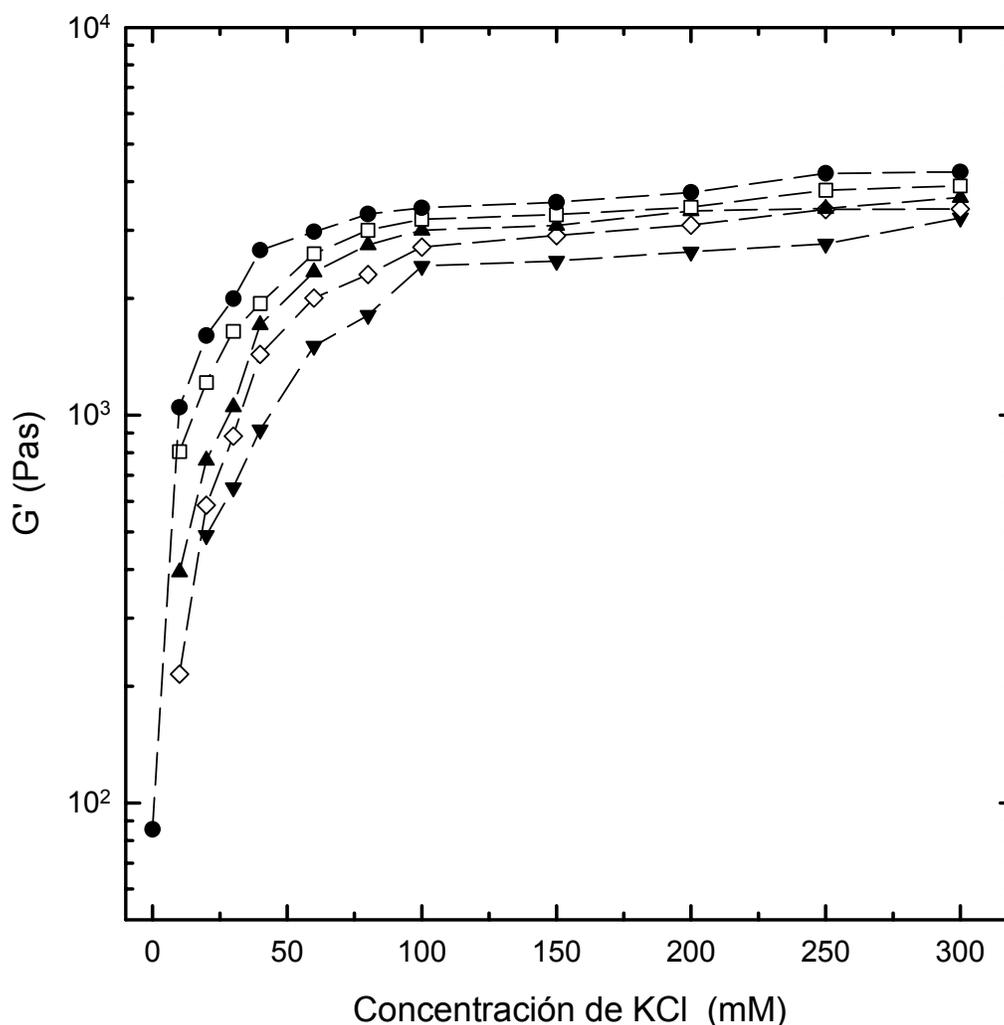


Figura 76. Efecto de la concentración de KCl y almidón en G' a 1 Hz y 25 °C para geles de κ -carragenina y mezclas 0.5% de κ -carragenina-KCl-almidón. 0 (triángulos invertidos). 1 (diamantes). 2 (triángulos). 3 (cuadros) y 4% (círculos) almidón.

5.3.3.2 Efecto de la concentración de almidón y de KCl en pastas con 0.5% de κ -carragenina a 60°C

De acuerdo con el diagrama de transición sol-gel (Figura 23) para 0.5% de κ -carragenina y 60 °C corresponde al estado sol. La Figura 77 muestra, a manera representativa cuando la fase continua predomina sobre la fase dispersa, el barrido de frecuencia de una mezcla con 0.5% de κ -carragenina-2% de almidón con diferentes concentraciones de KCl. De acuerdo con la figura, existe un efecto sinérgico tanto en la η^* (Figura 77a) como en los módulos G' y G'' (Figura 77b) con respecto a la κ -carragenina y

el almidón solos, sin embargo la η^* disminuyó en presencia de KCl en forma inversa a la concentración de KCl.

En ausencia de KCl las hebras aleatorias de κ -carragenina se encuentran expandidas ocupando un mayor volumen hidrodinámico que en presencia de sal (Tecante y Doublier, 1999). De esta forma el efecto de reducción de la $[\eta]$ de la κ -carragenina, observado previamente, sigue siendo válido para 1 y 2% de almidón. Sin embargo, al analizar los valores de G' y G'' , ambos módulos son característicos de una solución macromolecular, con una dependencia de la frecuencia ($G' \propto \omega^{1.30}$, $G'' \propto \omega^{0.80}$) pero ambos disminuyen por la presencia de K^+ . Probablemente, también existe un efecto sobre la κ -carragenina que se encontró de forma concentrada en la superficie del almidón.

Para una concentración de KCl de 60 mM no fue posible obtener barridos de frecuencia repetibles; algunas veces se observó un comportamiento de líquido, mientras que en otras el comportamiento fue de sólido. Por esa razón se decidió no incluirlos. Esta situación se explica porque 60 mM de KCl es una concentración muy cercana a la transición sol-gel. Este comportamiento es más notable en la carragenina sola para la cual la cercanía a la transición sol-gel ocurre para una concentración de KCl de 80 mM. Por su parte, la $\tan \delta$ (Figura 77c) muestra una dependencia en todas las mezclas, con valores superiores a 1.0.

De manera similar, se eligieron mezclas con 4% de almidón para ilustrar el comportamiento típico de una mezcla donde la fase dispersa gobierna el comportamiento reológico. La Figura 78 muestra el barrido de frecuencia correspondiente para una mezcla 0.5% κ -carragenina-4% almidón con diferentes concentraciones de KCl.

Al igual que en los casos anteriores, la mezcla de almidón- κ -carragenina produjo un aumento de la η^* y de los módulos G' y G'' (datos no mostrados para κ -carragenina sola) con respecto a la κ -carragenina sola, pero en el caso de almidón solo, este efecto se observó hasta 7 rad/s. De acuerdo con el comportamiento de la $\tan \delta$, la presencia de κ -carragenina produjo pastas más fluidas que el almidón solo, incrementando este efecto por la presencia de KCl. La Figura 78a muestra que la η^* presentó una disminución con la frecuencia, presentando el comportamiento de un material viscoelástico donde los módulos presentaron el comportamiento de una suspensión altamente concentrada de partículas suspendidas (Figura 78b), con una ligera dependencia con la frecuencia ($G' \propto \omega^{0.15}$, $G'' \propto \omega^{0.25}$). El comportamiento de las mezclas con 3% de almidón fue similar. Para un mismo valor de frecuencia, la η^* disminuye con un incremento de KCl (Figura 78a), al

igual que G' y G'' (Figura 78b). En todos los casos, la $\tan \delta$ mostró una gran dependencia con la frecuencia (Figura 78c).

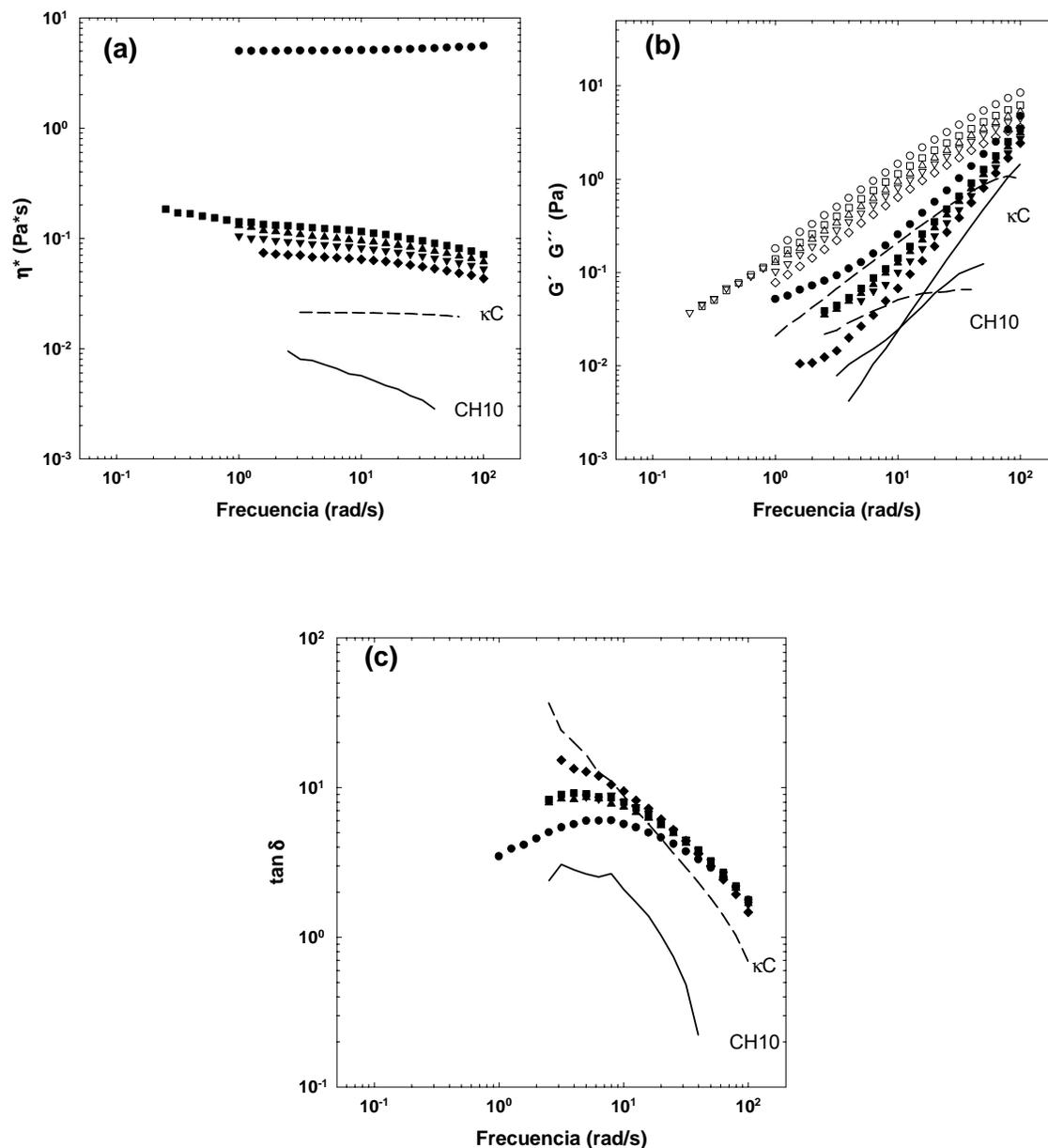


Figura 77. Efecto de la concentración de KCl sobre los módulos dinámicos de mezclas 0.5% de κ -carragenina-2% de almidón a 60 °C. (a) Viscosidad compleja (b) G' (símbolos llenos) y G'' (símbolos vacíos), (c) $\tan \delta$. G' (líneas continuas) G'' (líneas discontinuas) (c) $\tan \delta$. Concentración de KCl: 0 (círculos), 10 (cuadros), 20 (triángulos), 30 (triángulo invertido) y 40 mM (diamantes). CH10: Almidón solo, κC : κ -carragenina.

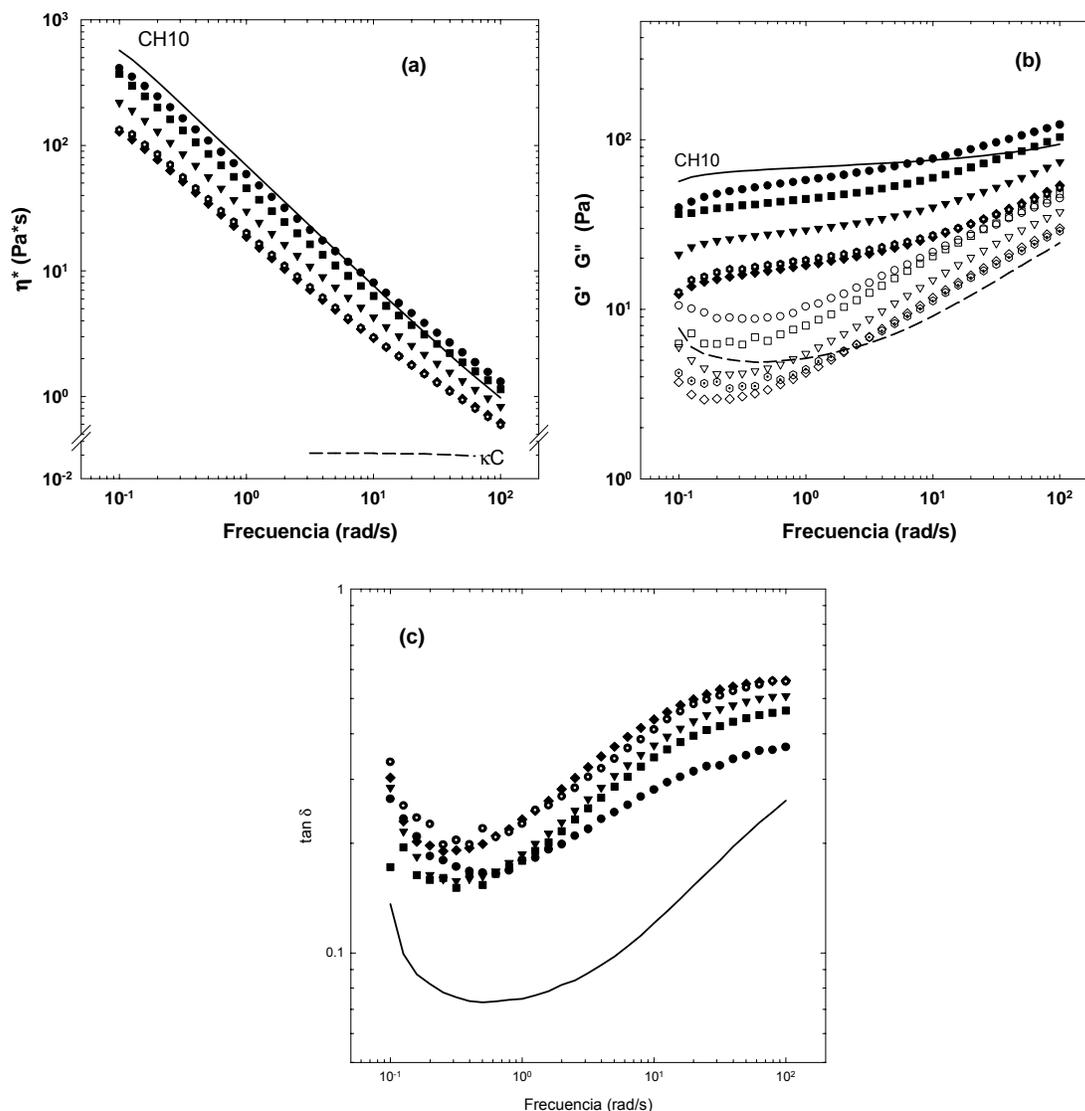


Figura 78. Efecto de la concentración de KCl sobre los módulos dinámicos de mezclas 0.5% de κ -carragenina-4% de almidón a 60 °C (a) η^* , (b) G' (símbolos llenos y líneas continuas) y G'' (símbolos vacíos y líneas discontinuas), c) $\tan \delta$. Concentración de KCl (mM): 0 (círculos), 10 (cuadros), 30 (triángulo invertido), 40 (diamantes) y 60 (círculos punteados). CH10: Almidón solo). κ C: κ -carragenina.

Con 60 mM KCl se obtuvo una señal estable y reproducible en el reómetro, tanto η^* como G' y G'' mostraron valores ligeramente mayores que con 40 mM de KCl porque el sistema se encontró sobre la línea de transición sol a gel de la κ -carragenina y cuando C_T se aproximó a la curva de transición sol-gel se promovió la asociación de hélices incrementando el número de zonas de interacción y tendieron a formar la red. La presencia de KCl no solo influyó en la κ -carragenina que se encontró en la fase continua, sino también en la que interactuó con la κ -carragenina en la superficie del almidón.

En un sistema con almidón de maíz ceroso modificado químicamente-gelana-CaCl₂, Sosa-Herrera *et al.* (2001), apoyados en pruebas reológicas de cizalla angular estacionaria, observaron que las pastas a 60 °C fueron sensibles a la presencia de Ca²⁺. La presencia de gelana produjo un efecto sinérgico sobre el almidón solo, produciendo valores mayores de viscosidad; este efecto sinérgico se acentuó al incorporar 1 y 5 mM de CaCl₂, sin embargo, para 10 mM de CaCl₂, la viscosidad se redujo incluso por abajo de los valores para la mezcla almidón-gelana sin iones, pero mayor que para el almidón solo.

5.3.3.3 Efecto de la concentración de almidón en pastas con κ -carragenina a 9 °C

Se analizaron las mezclas en las cuales la κ -carragenina existió en una conformación de doble hélice sin formar agregados. Para ello, se eligió una concentración de 0.4% de κ -carragenina a 9 °C, para la cual previamente se demostró la presencia de una transición de hebra aleatoria a doble hélice sin formar agregados (sección 5.1.4.2). La Figura 79 muestra los respectivos barridos de frecuencia a 9 °C. En forma general, la señal del reómetro fue bastante buena. El efecto de la presencia del almidón sobre la κ -carragenina condujo a un comportamiento similar al observado previamente a 25 °C.

La κ -carragenina sola se comportó como una solución macromolecular y la incorporación de 1% de almidón resultó en un comportamiento de dispersión de partículas altamente diluidas suspendidas en una solución macromolecular. La η^* (Fig. 79a) mostró una pequeña zona donde sin variación (0.1 a 1 rad/s) y posteriormente una disminución a frecuencias por arriba de 1 rad/s y la $\tan \delta$ varió de 10 a 0.9 (Fig. 79c). La mezcla con 2 % de almidón mostró una variación de η^* con la frecuencia, sin embargo los módulos G' y G'' (Fig. 79b) fueron muy parecidos entre sí, lo que produjo una $\tan \delta$ muy cercada a 1 en el intervalo de frecuencias (Fig. 79c). Con 4% de almidón, la fase dispersa determinó el comportamiento reológico. Sin embargo, en estas condiciones, las mezclas presentaron mayor rigidez que aquellas con 0.5% de κ -carragenina a 25 °C. En todos los casos, se obtuvieron valores mayores de ambos módulos (G' y G'') a 9 °C que a 25 °C con 4% de almidón, G' fue más independiente de la frecuencia ($G' \propto \omega^{0.03}$). La doble hélice es más rígida que la hebra aleatoria y por ello se ve afectado el comportamiento reológico de estas mezclas. Debido al poco margen que se obtiene para manejar diferentes concentraciones de KCl a esta concentración de κ -carragenina y mantener la condición de

doble hélice sin formar agregados, no fue posible estudiar el efecto del KCl, sin embargo, consideramos que es un punto interesante para poder seguir estudiando estos sistemas.

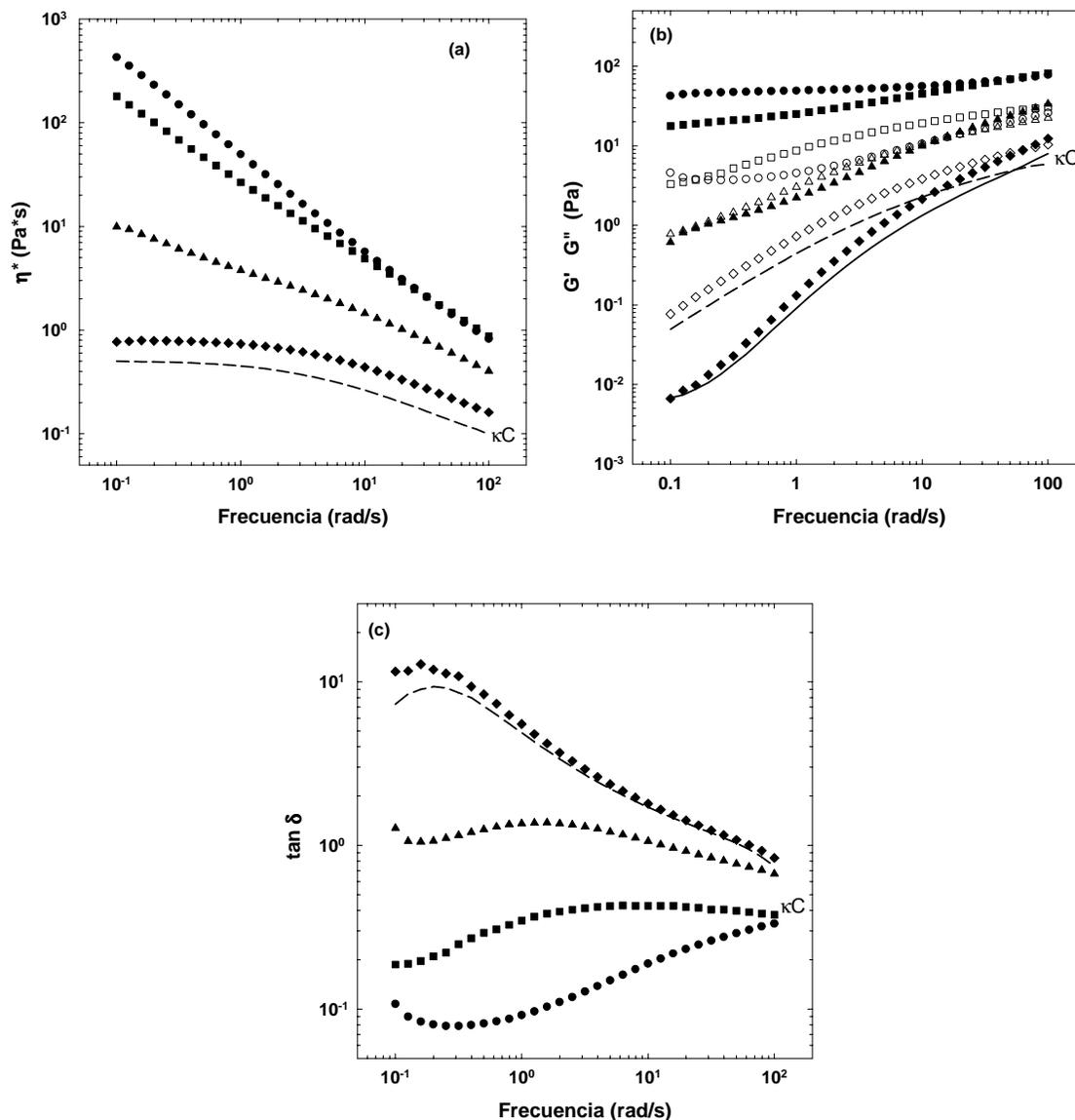


Figura 79. Efecto de la concentración de almidón sobre los módulos dinámicos de mezclas con 0.4% de κ -carragenina-almidón a 9 °C. (a) η^* (b) G' (símbolos llenos y línea continua) y G'' (símbolos vacíos y línea discontinua) (c) $\tan \delta$. Concentración de almidón(%): 1 (diamantes), 2 (triángulos), 3 (cuadros) y 4 (círculos). κ C (κ -carragenina sola). Condiciones experimentales E en la Figura 23.

5.3.4 Ultraestructura

5.3.4.1 Efecto de la concentración de κ -carragenina sobre el almidón

Primero se examinó el efecto de la concentración de κ -carragenina sobre los gránulos de almidón sin la presencia de KCl por medio de una colocalización de imágenes. La Figura 80 muestra resultados típicos para la mezcla κ -carragenina 0.5%-almidón 1%. En todas las imágenes, la zona donde no existe fluorocromo se muestra como negro. En la Figura 80a se observan los gránulos de almidón marcados con el FITC. El crecimiento de los gránulos marcados fue similar al de aquellos sin fluorocromo; en ambos casos se observó un crecimiento radial homogéneo sin ruptura. La Figura 80b muestra la κ -carragenina y su localización en la mezcla. Se observa como ésta se concentra en el contorno de los gránulos de almidón, sin embargo, dado que ambos componentes están marcados con diferentes fluorocromos se observan a diferentes longitudes de onda. En una colocalización (o sobreposición) de ambas figuras, Figura 80c, se observa la ubicación de cada uno de los polisacáridos. Como puede apreciarse la κ -carragenina se depositó en la superficie de los gránulos de almidón. En este caso particular no se observó una estructura de red tridimensional debido a que no se incorporó K^+ al sistema.

La Figura 80d muestra un ejemplo de mezcla en la que el hidrocoloide dextrana pudo penetrar los gránulos. La imagen corresponde al marcado no covalente de almidón con RITC (12.5 g/L) y dextrana 1% marcada en forma covalente con FITC. La imagen muestra la ubicación del RITC en el contorno de los gránulos de almidón, la presencia de dextrana en toda la fase continua y al interior de los gránulos. La imagen fue obtenida por el grupo del Dr. J. L. Doublier (INRA Nantes, Francia). En forma similar, se obtuvieron las respectivas imágenes para concentraciones menores de κ -carragenina, sin embargo aquí sólo se incluyen las imágenes de colocalización de las mezclas.

En lo sucesivo únicamente se incluyeron las imágenes correspondientes a la colocalización o sobreposición de las imágenes individuales de la κ -carragenina con la respectiva imagen del almidón. Las Figuras 81 y 82 muestran la secuencia del efecto de 1 a 0.005% de κ -carragenina en dispersiones con 1% de almidón. La disminución de la concentración de κ -carragenina produjo que gradualmente se perdiera el tono rojo de las imágenes comenzando en un tono rojo-ladrillo (0.5% de κ -carragenina) hasta llegar al tono verde del FITC (0.005% de κ -carragenina). La elevada intensidad del tono amarillo

(obtenido al mezclar el rojo con el verde) en el contorno de los gránulos de almidón es la evidencia de que la κ -carragenina se ubicó en el contorno de los gránulos de almidón. A partir de la concentración 0.1%, se observaron algunos remanentes de κ -carragenina que no se adhirieron a los gránulos. En ninguno de los casos se observó que estos remanentes se ubicaran al interior de los gránulos hinchados del almidón.

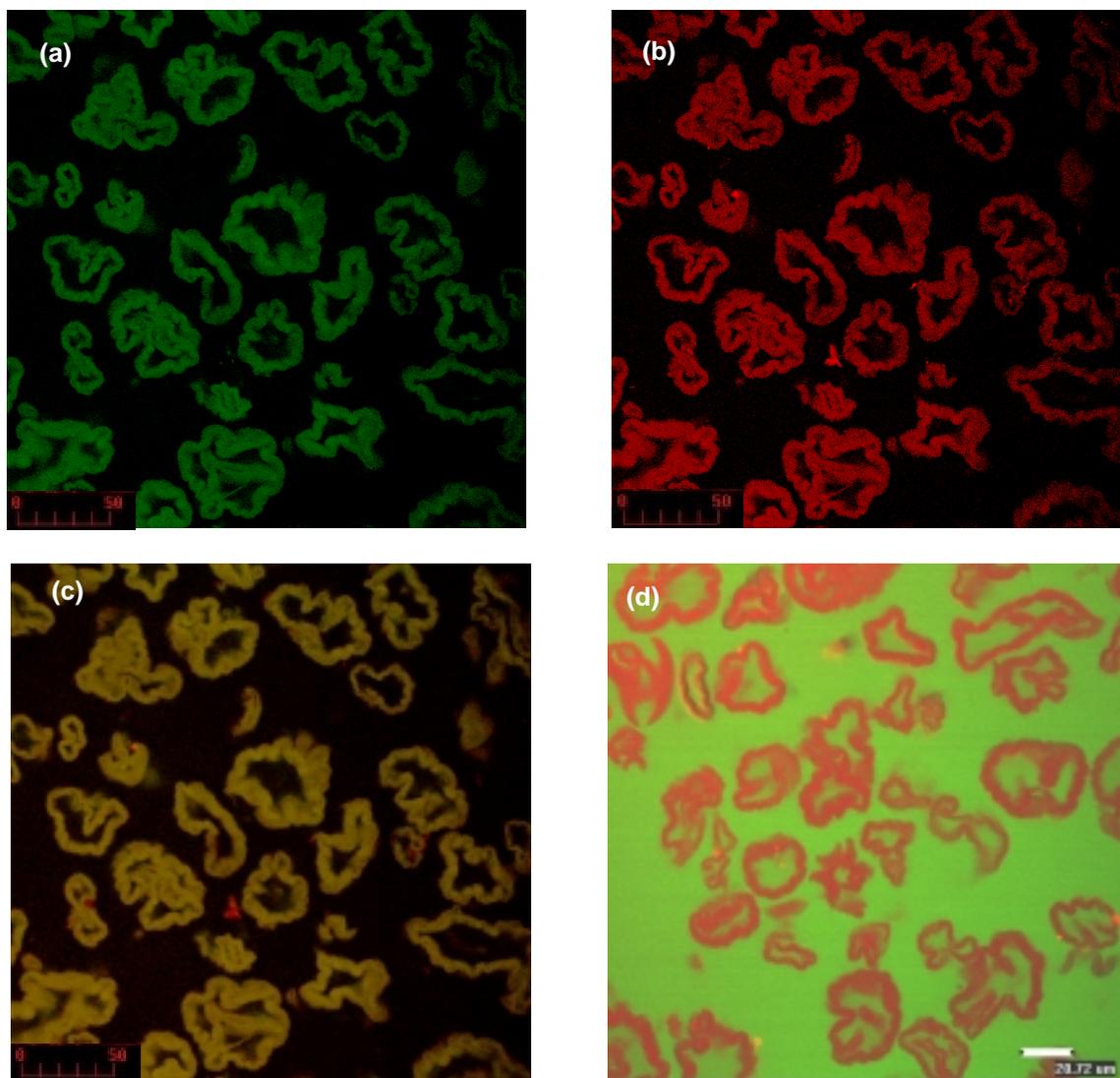


Figura 80. Microscopia confocal de barrido láser de 0.5% de κ -carragenina-1% de almidón sin KCl. (a) $\lambda = 488$, (b) $\lambda = 540$ nm, (c) colocación de imágenes y (d) colocación de imágenes de una mezcla de almidón de maíz-FITC + dextrana-FITC.

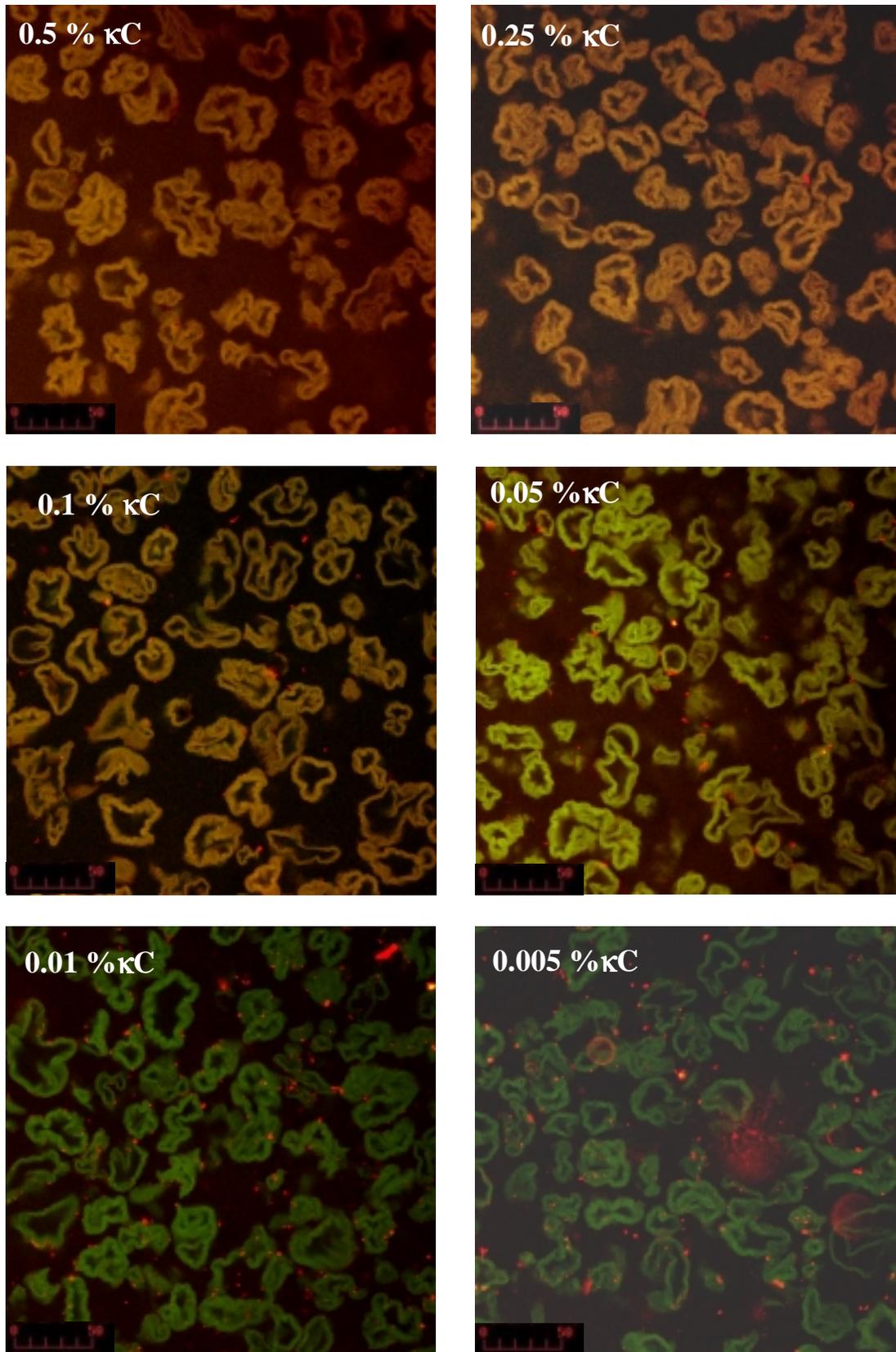


Figura 81. Colocalización en microscopía confocal de barrido láser en mezclas de almidón-κ-carragenina (κC). La escala corresponde a μm.

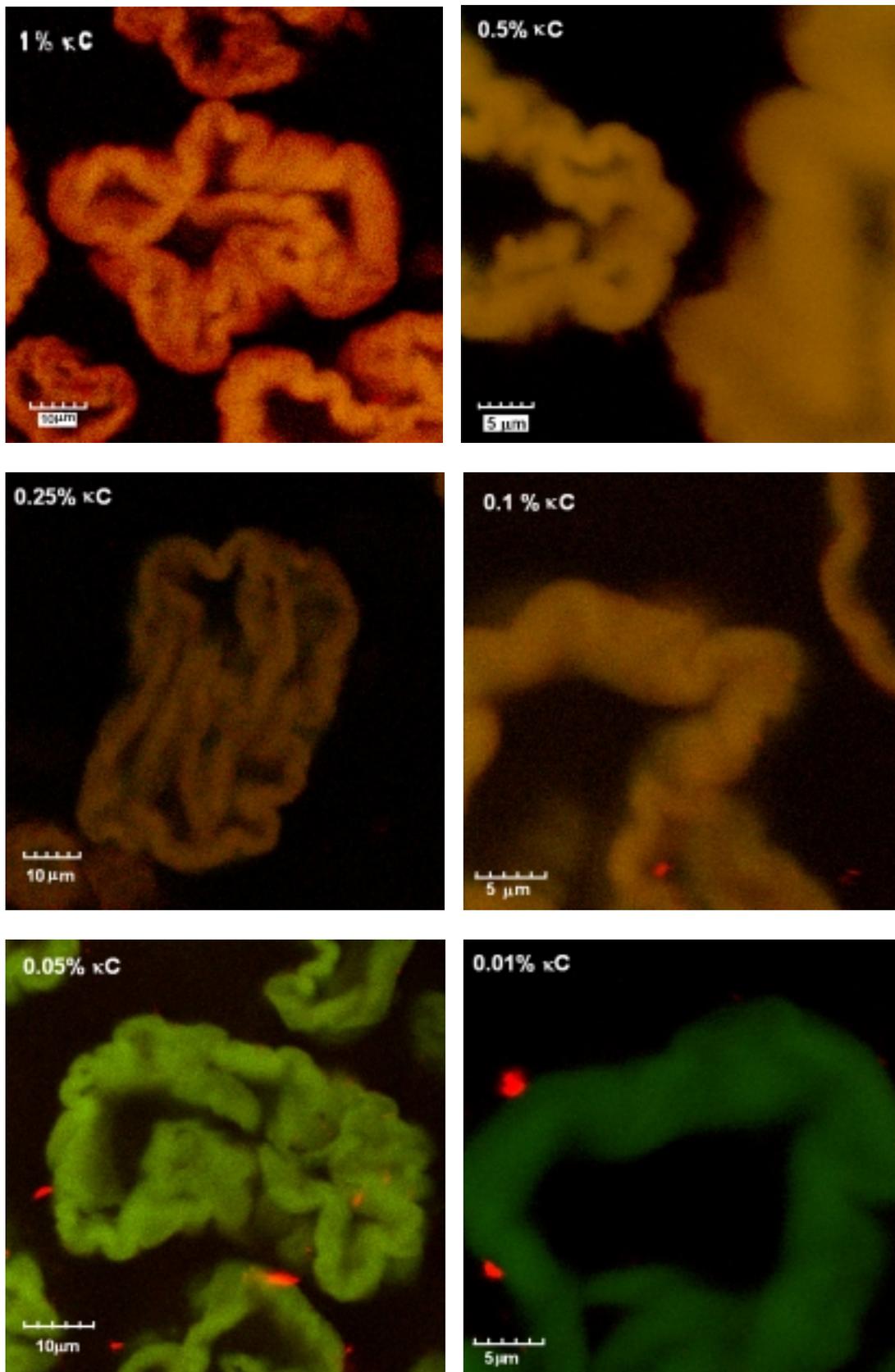


Figura 82. Imágenes complementarias de colocalización en microscopia confocal de barrido láser en mezclas de almidón- κ -carragenina (κ C).

5.3.4.2 Efecto de la concentración de κ -carragenina sobre almidón y 40 mM de KCl

Finalmente, se examinó el efecto de la concentración de κ -carragenina sobre los gránulos de almidón en presencia de KCl. Para tal efecto, se manejó una concentración de 1% de almidón en presencia de 40 mM de KCl y diferentes concentraciones de κ -carragenina (1 a 0.1% masa). Las Figuras 83 y 84 muestran las imágenes obtenidas mediante la colocación de imágenes para $\lambda = 488$ nm (FITC - almidón) y $\lambda = 540$ nm (RITC- κ -carragenina). Las imágenes muestran un rojo intenso en la fase continua en las concentraciones de 1 y 0.5% κ -carragenina (Fig. 83a y b) así como zonas de rojo ladrillo sobre los gránulos de almidón (Figuras 83b y d). Lo anterior muestra que la κ -carragenina forma una red tridimensional en la fase continua por la adhesión de KCl así como su adhesión a la superficie de los gránulos aún en presencia de la sal. En la mezcla con 0.25% κ -carragenina, el tono rojo disminuye, sin embargo se sigue observando la κ -carragenina en la superficie del gránulo (Fig. 83e y f).

Finalmente, la mezcla con 0.1 % κ -carragenina (Figura 84) muestra pequeñas zonas en la superficie del gránulo con zonas de rojo más intenso, en contraste con la zona negra donde no existe fluorocromo. Es muy posible que la κ -carragenina únicamente se adhiera en la superficie de los gránulos pero no penetre al interior de los mismos. El fenómeno de adhesión de la κ -carragenina sobre la superficie de los gránulos de almidón fue sugerido por Nayouf (2003) al marcar κ -carragenina con azul de toluidina.

Con lo anterior, se observa que una vez enfriada la muestra y formado el gel, la concentración de κ -carragenina en la fase continua no corresponde con el valor inicial de la misma e inclusive, probablemente, haya una mayor concentración con la posible existencia de un gradiente de concentraciones de hidrocoloide en la fase continua. En mezclas de diferentes hidrocoloides con almidón, se ha demostrado la penetración de moléculas pequeñas, como la sacarosa, al interior de los gránulos de almidón de maíz (Gonera y Cornillon, 2002), sin embargo, los polisacáridos con una gran masa molecular mayor de 1000 g/mol o con un radio hidrodinámico mayor de 0.6 nm no pueden penetrar en éstos (Planchot *et al.*, 2000).

Así, en el caso de la xantana, el efecto observado fue de adsorción sobre la superficie de los gránulos de almidón de maíz (Conde-Petit y Escher, 1997; Gonera y Cornillon, 2002) y de tapioca (Chaisawang y Supphantharika, 2006).

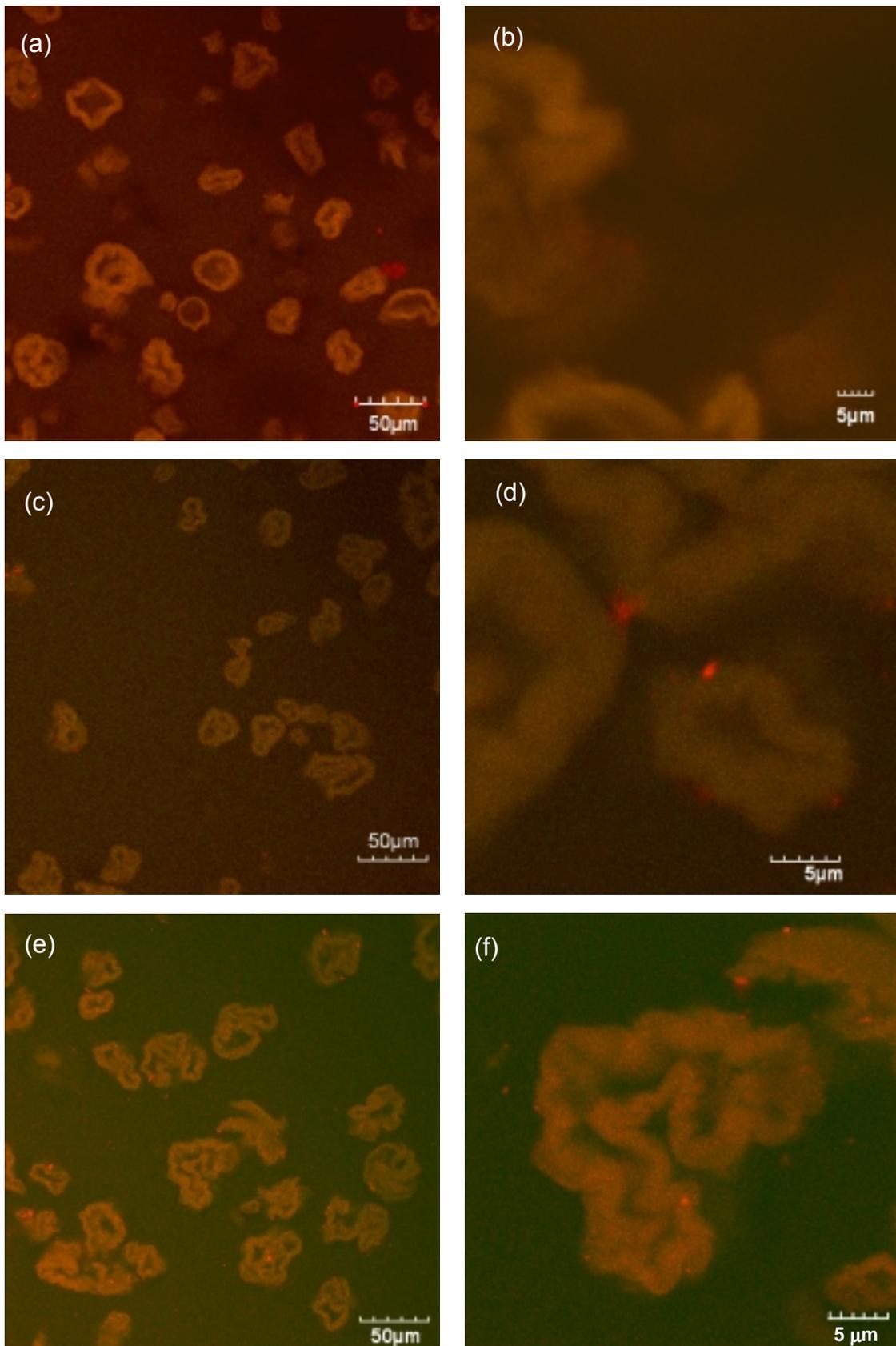


Figura 83. Colocalización en microscopía confocal de barrido láser en mezclas con 1% almidón- 40 mM de KCl. Concentración de κ -carragenina: (a) y (b) 1%, (c) y (d) 0.5 %, (e) y (f) 0.25%.

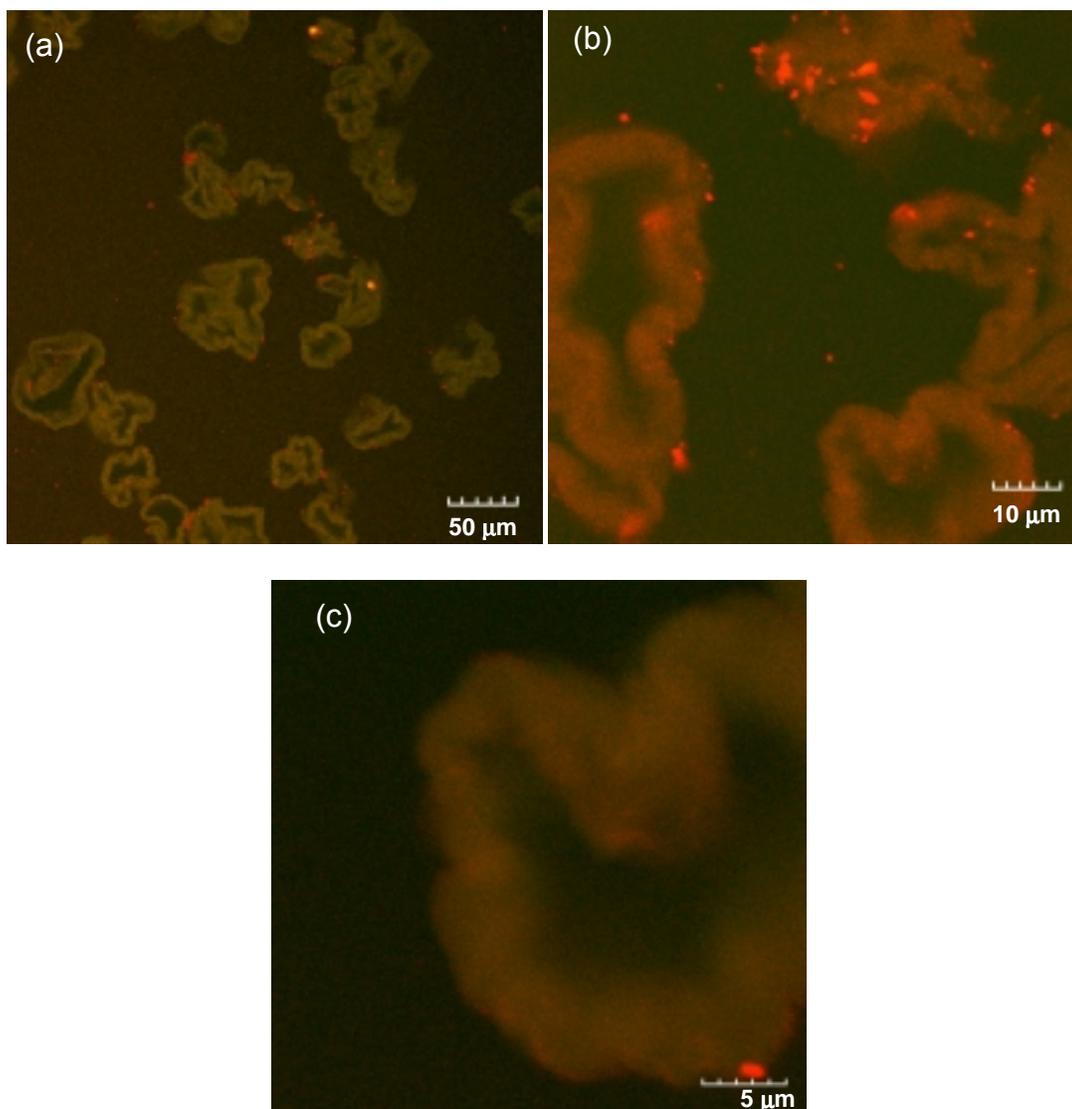


Figura 84. Colocalización en microscopía confocal de barrido láser de mezclas on 1 % de almidón – 40 mM de KCl y 0.1% κ -carragenina.

La adsorción también puede ocurrir en partes muy específicas como la gelana adsorbida en las paredes interiores de almidón entrecruzado gelatinizado (van de Velde *et al.*, 2003). En esta mezcla, se consideró que durante la gelatinización, los gránulos de almidón se rompieron y permitieron la introducción de la gelana a través de su pared. Si bien es comprobable la adsorción de la xantana en almidones, mediante SEM se observó que la xantana no se adsorbió en un almidón de tapioca modificado a una forma aniónica (Chaisawang y Supphantharika, 2006), lo que nos lleva a considerar que no sólo es importante la naturaleza de los hidrocoloides incorporados en las mezclas, sino también de los almidones empleados, su resistencia a los tratamientos térmicos y sus modificaciones químicas.

CONCLUSIONES GENERALES

La determinación del comportamiento reológico de la κ -carragenina mostró que éste depende de la C_T y de la temperatura de medición. Cuando $C_T > C^*$ y $T < T_{gel}$, este hidrocoloide tiene la capacidad de formar una red tridimensional aún en concentraciones bajas (0.1% de κ -carragenina) en presencia de 40 mM de KCl. Concentraciones menores del hidrocoloide produjeron una discontinuidad en la red. Durante su gelificación, la κ -carragenina sufre una transición desorden - orden de un estado de hebra aleatoria a una doble hélice. En el presente trabajo se encontró que cuando no existe la cantidad suficiente de K^+ , pequeñas proporciones de κ -carragenina agregada coexisten con las dobles hélices sin formar agregados. Al incrementar la cantidad de K^+ , la agregación de las dobles hélices se da paulatinamente, y la proporción de hélices agregadas se incrementa, produciendo un incremento en las temperaturas y entalpías de gelificación y de fusión de los geles. La adición de K^+ por abajo de 100 mM produce un rápido incremento en la rigidez de los geles. Una vez alcanzada la saturación de la κ -carragenina con el K^+ , el aumento de la rigidez de los geles se hace marginal por la sobresaturación del hidrocoloide con el K^+ . El nivel de saturación de la κ -carragenina con el K^+ depende de la concentración del hidrocoloide empleado: en una concentración al 0.1% de κ -carragenina fue de 60 mM de KCl, 0.5% de κ -carragenina 100 mM KCl, y para 1% de κ -carragenina de 150 mM de KCl.

Cuando $T > T_{gel}$, la κ -carragenina existe en un estado desordenado. En este estado, la presencia de K^+ produce una disminución del volumen hidrodinámico de la κ -carragenina lo que se refleja en una disminución de la viscosidad. Finalmente, el estudio reológico de la κ -carragenina demostró su existencia en una conformación ordenada cuando $C_T < C^*$ y $T < T_{d-o}$. En esta conformación, la κ -carragenina presenta el doble de la viscosidad intrínseca que en una conformación de hebra aleatoria similar al estado ordenado en una solución de NaI, debido a la conformación de una doble hélice. El comportamiento reológico de esta condición fue de una solución macromolecular, tendiente a un líquido viscoelástico, sin embargo, tanto la viscosidad intrínseca como la c^* fueron dependientes de la C_T : una mayor C_T produjo una disminución en la $[\eta]$ y un aumento en c^* . Con estos resultados se cubrió el primer objetivo planteado de la presente investigación.

Por su parte, el estudio del comportamiento reológico de las pastas de almidón solo, así como el efecto que puede ejercer el K^+ en sus propiedades térmicas y reológicas

mostraron que las condiciones térmico-mecánicas de cocción del almidón empleadas en el presente trabajo, no produjeron ruptura en el almidón de maíz utilizado. Por su parte, el K^+ no produjo cambios en la distribución del tamaño de partícula por debajo de 40 mM de KCl. La temperatura y la entalpía de gelatinización del almidón no se vieron influidas por la presencia de K^+ , aun en altas concentraciones, tales como 300 mM de KCl. La forma esférica y la rigidez de los gránulos obtenidos permitieron el empleo de la relación de diámetros, $(D/D_0)^3$, como el poder de hinchamiento usado en el cálculo de ϕ . Las concentraciones empleadas de almidón, 1 a 4%, permitieron tener una $\phi < 1$, lo que aseguró que los gránulos tuvieran el agua suficiente para poder hidratarse completamente durante su cocción.

El comportamiento reológico de las pastas de almidón es antitixotrópico con un probable pseudo esfuerzo inicial, mismo que fue dependiente de la fracción volumen que ocupan los gránulos de almidón en la fase continua. Los gránulos de almidón presentan un comportamiento anisotrópico tipo II, donde existe una reorientación de las partículas en la suspensión por la aplicación de cizalla. El comportamiento de la cizalla oscilatoria depende de ϕ : para $\phi = 0.18$ y 0.38 la fase continua domina en comportamiento reológico, $\phi = 0.57$ y 0.74 la fase dispersa domina sobre la fase continua y determina el comportamiento reológico, mismo que es independiente de la temperatura de medición.

Los resultados de distribución de tamaño de partícula, microDSC, y CLSM mostraron que en las mezclas almidón-hidrocoloide, es muy probable que este último se concentre durante la cocción del almidón y exista un efecto de la adhesión de la κ -carragenina en la superficie del almidón. Este efecto se produce tanto en condiciones de cocción en conjunto como con sus mezclas posteriores cuando los componentes se cocieron en forma independiente. Aunado a esto, la presencia de la κ -carragenina produjo que el almidón no absorbiera toda el agua que hubiera absorbido si éste se hubiera cocido en forma independiente.

Hasta el momento no se había proporcionado una explicación al incremento del tamaño de las partículas del almidón, por lo que esta observación es una contribución original del presente trabajo. La manifestación macroscópica del fenómeno de adhesión se determinó con base en la fracción volumen de los gránulos dispersos en el medio continuo. En las mezclas, para $\phi < 1$, la fase dispersa determina el comportamiento reológico de las mezclas, y la presencia de κ -carragenina en el almidón refleja un efecto sinérgico en ambos módulos, sin embargo, el carácter líquido sigue predominando. En las mezclas con $\phi > 1$, la fase dispersa determina el comportamiento reológico, y la presencia

de la κ -carragenina produce pastas más fluidas que el almidón solo. En este caso no se aprecia un efecto sinérgico en las mezclas de almidón- κ -carragenina con respecto al almidón solo. Un efecto similar mostró una conformación ordenada de dobles hélices de la κ -carragenina en sus mezclas con el almidón.

La presencia del potasio afecta el comportamiento reológico del sistema dependiendo de la conformación en que se encuentre la κ -carragenina. Cuando se encuentra en hebra aleatoria, produce una disminución de los módulos y en la viscosidad compleja por el efecto del K^+ . Si existe la suficiente cantidad de κ -carragenina y K^+ para formar una red tridimensional, la adición de bajas concentraciones de κ -carragenina produce un rápido aumento en la rigidez de los geles obtenidos. Cuando el K^+ satura la κ -carragenina y permite que toda se encuentre en una forma de dobles hélices agregadas, el incremento en la rigidez de los geles es marginal, aun en presencia de almidón. En estos sistemas, el almidón refuerza la estructura tridimensional de la κ -carragenina, lo que permite interpretar su comportamiento reológico como un "composite".

Por su parte, la CLSM permitió la observación de los gránulos de almidón, de la κ -carragenina, así como la adhesión de esta última sobre la superficie del almidón, constituyendo una herramienta útil en la comprensión de la estructura de los alimentos compuestos por uno o varios componentes. Con base en los resultados obtenidos y las observaciones realizadas, se alcanzaron los objetivos propuestos inicialmente en el presente estudio.

RECOMENDACIONES PARA TRABAJOS FUTUROS

Existen varias líneas de investigación con las que se pueden ampliar los resultados del presente trabajo. En el caso de la κ -carragenina y su interacción con el K^+ , es importante conocer el nivel de saturación de la red tridimensional formada por el hidocoloide a diferentes concentraciones del mismo, lo que permitirá establecer las cantidades necesarias de K^+ para obtener los geles más rígidos en los sistemas alimenticios. Por otro lado, sería de gran interés estudiar los diagramas de transición sol-gel de la κ -carragenina con otros iones monovalentes y divalentes, tales como el Na^+ y el Ca^{2+} , tanto por métodos reológicos como calorimétricos.

A partir de las observaciones de la adhesión de la κ -carragenina en la superficie de los gránulos de almidón, es importante conocer la fracción volumen de ésta en la fase continua y diferenciarla de la amilopectina disuelta en la fase acuosa. Una de las técnicas propuestas es el uso de cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC). Otra de las vertientes es poder cuantificar de qué manera la presencia de la κ -carragenina evita que todos los gránulos de almidón crezcan completamente. Probablemente el empleo de potencial z sea de utilidad para esta medición.

El fluorocromo empleado para la observación del almidón se depositó en la superficie de los gránulos, sin embargo, sería de gran interés utilizar otro marcador que se introduzca en los gránulos y poder realizar la observación y proyección tridimensional del interior de los gránulos de almidón con el empleo de la CLSM.

Finalmente, sería de gran aporte complementar el estudio reológico y calorimétrico del efecto de la concentración iónica total en las mezclas κ -carragenina-almidón cuando el hidocoloide se encuentre en una conformación ordenada a $9\text{ }^{\circ}\text{C}$ y analizar el efecto de la presencia de K^+ en este sistema, debido a que en muchas ocasiones, en estas condiciones es como consumimos los productos que contienen carrageninas, en particular las bebidas tipo yogurt.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdulmola, N.A., Hember, M.W.N., Richardson, R.K. & Morris, E.R. (1996a). Application of polymer blending laws to starch gelatin composites. *Carbohydrate Polymers*, 31, 53-63.
- Abdulmola, N.A., Hember, M.W.N., Richardson, R.K. & Morris, E.R. (1996b). 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.
- 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.
- Alloncle, M. & Doublier, J. L. (1991). Viscoelastic properties of maize starch/hydrocolloid pastes and gels. *Food Hydrocolloids*, 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.
- Amici, E., Clark, A.H., Normand, V. & Johson, N.B. (2001). Interpenetrating network formation in agarose-sodium gellan gel composites. *Carbohydrate Polymers*, 46, 383-391.
- Baeza, R.I., Carp, D.J., Pérez, O.E. & Pilosof, A.M.R. (2002). κ -Carrageenan - protein interactions: effect of proteins on polysaccharide gelling and textural properties. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 35, 741-747.
- 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.
- Baker, A.A., Miles, M.J. & Helbert, W. (2001). Internal structure of the starch granule revealed by AFM. *Carbohydrate Research*, 330, 249-256.
- Barnes, H. (1995). A review of the slip (wall depletion) of polymer solutions, emulsions and particle suspensions in viscometers: its cause, character and cure. *Journal of Non-Newtonian Fluids Mechanics*, 56, 221-251.
- Barnes, H. (1999). The yield stress –a review or “ $\pi\alpha\nu\tau\alpha\rho\epsilon\iota$ ” –every thing flows?. *Journal of Non-Newtonian Fluids Mechanics*, 81, 133-178.
- Bayley, S.T. (1955). Hydrated K^+ ions and sulphate groups X-ray and infrared studies on carrageenan. *Biochemistry Biophysics Acta*. 17, 194, citado por Rochas, C. (1982). Etude de la transition sol-gel du kappa-carraghenane. These Docteur. Institute National Polytechnique de Grenoble. France.
- Beer, M.U., Wood, P.J. & Weiz, J. (1999). A simple and rapid method for evaluation of Mark-Houwink-Sakurada constants of linear random coil polysaccharides using molecular weight and intrinsic viscosity determined by high performance size exclusion chromatography: application to guar galactomannan. *Carbohydrate Polymer*, 39, 377-380.
- Belzung, B., Lequeux, F., Vermant, J. & Mewis, J. (2000). Flow-induced anisotropy in mixtures of associative polymers and latex particles. *Journal of Colloid and Interface Science*, 224, 179-187.
- 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.
- Blennow, A., Hansen, M., Schulz, A., Jørgensen, K., Donald, A.M. & Sanderson, J. (2003). The molecular deposition of transgenically modified starch in the starch granule as imaged by functional microscopy. *Journal of Structural Biology*, 143, 229-241.

- Borström, J., Piculell, L., Viebke, C. & Talmon, Y. (1996). On the structure of aggregated kappa-carrageenan helices. A study by cryo-TEM, optical rotation and viscometry. *International Journal of Biological Macromolecules*, 18, 223-229.
- Buléon, A., Colonna, Planchot, V. & Ball, V. (1998a). Starch granules: structure and biosynthesis. *Internacional Journal of Biological Macromolecules*, 23, 85-112.
- Buléon, 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.
- Boutebba, A., Milas, M. & Rinaudo, M. (1997). Order-disorder conformational transition in succinoglucan: calorimetric measurements. *Biopolymers*, 42, 811-819.
- Camacho, M.M., Martínez-Navarrete, N. & Chiralt, A. (2005). Rheological characterization of experimental dairy creams formulated with locust bean gum (LBG) and λ -carrageenan combinations. *International Dairy Journal*, 15, 243-248.
- Carnali, J.O. & Zhou, Y. (1996). An examination of the composite model for starch gels. *Journal of Rheology*, 40, 221-234.
- Chaisawang, M. & Suphantharika, M. (2006). Pasting and rheological properties of native and anionic tapioca starches as modified by guar gum and xanthan gum. *Food Hydrocolloids*, 20, 641-649.
- Chambon, F., & Winter, H.H. (1987). Linear viscoelasticity at the gel point of a crosslinked PDMS with imbalanced stoichiometry. *Journal of Rheology*, 31, 683-697.
- 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. pp. 158, 162 y 183.
- Chang, Y.H., Lim, S.T. & Yoo, B. (2004). Dynamic rheology of corn starch-sugar composites. *Journal of Food Engineering*, 64, 521-527.
- Chel-Guerrero, L. & Betancur, A.D. (1998). Cross-linkage of *Canavalia ensiformis* starch with adipico acid: chemical and functional properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 2087-2091.
- Chen, Y., Liao, M.L., Boger, D.V. & Dunstan, D.E. (2001). Rheological characterisation of κ -carrageenan/locust bean gum mixtures. *Carbohydrate Polymers*, 46, 117-124.
- Chen, Y., Ming-Long, L. & Dustan, D.E. (2002). The rheology of K^+ - κ -carrageenan as a weak gel. *Carbohydrate Polymers*, 50, 109-116.
- 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.
- Christianson, D.D., Hodge, J. E., Osborne, D. & Detroy, R. W. (1981). Gelatinization of wheat starch as modified by xanthan gum, guar gum and cellulose gum. *Cereal Chemistry*, 58, 513-517.
- Chronakis, I.S., Doublier, J.L. & Piculell. (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.
- Chronakis, I., Piculell, L. & Borgström, J. (1996). Rheology of kappa-carrageenan in mixtures of sodium and cesium iodide: two types of gels. *Carbohydrate Polymers*, 31, 215-225.
- Closs, C.B., Conde-Petit, B., Roberts, I.D., Tolstoguzov, V.B. & Escher, F. (1999). Phase separation and rheology of aqueous starch/galactomannan systems. *Carbohydrate Polymers*, 39, 67-77.
- Conde-Petit, B.F. & Escher, F. (1997). Influence of xanthan on the rheological properties of aqueous starch-emulsifier systems. *Food Hydrocolloids*, 11, 393-399.

- Cordobés, F., Partal, P. & Guerrero, A. (2004). Rheology and microstructure of heat-induced egg yolk gels. *Rheologica Acta*, 43, 184-195.
- Da Silva, P.M.S. Oliveira, J. C. & Rao, M. A. (1997). Granule size distribution and rheological behaviour of heated modified waxy and unmodified maize starch dispersions. *Journal of Texture Studies*, 28, 123-138.
- Damasio, M.H., Fiszman, S.M., Costell, E. & Duran, L. (1990). Influence of composition on the resistance to compression of kappa carrageenan-locust bean gum-guar gum mixed gels: relationship between instrumental and sensorial measurements. *Food Hydrocolloids*, 3, 457-464.
- De Belder, A.N. & Granat K. (1973). Preparation and properties of fluorescein-labelled dextrans. *Carbohydrate Research*, 30, 375-378.
- Descamps, O. Langevin, P. & Combs, D.H. (1986). Physical effect of starch/carrageenan interactions in water and milk. *Food Technology*, 40, 81-87.
- Donald, A.M., Waigh, T.A., Jenkins, P.J., Guidley, M.J., Debet, M. & Smith, A. (1997). Internal structure of starch granules revealed by scattering studies. En "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. (1981). Rheological studies on starch flow behaviour of wheat starch pastes. *Starch/Starke*, 33, 416-420.
- 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. & Cuvelier, G. (1996). Gums and hydrocolloids: Functional aspects. En "Carbohydrates in Food". A. C. Eliasson (ed). New York: Marcel Dekker, pp. 312-313.
- Dreveton, E., Monot, F., Lecourtier, J., Ballerini, D. & Choplin, L. (1996). Influence of fermentation hydrodynamics on gellan gum physico-chemical characteristics. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 82, 272-276.
- Dubois, M., Gill, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. & Smith, F. (1956). Colorimetric methods of determination of sugars and related substance. *Analytical Chemistry*, 28, 350-356.
- Dunstan, D.E., Chen, Y., Liao, M.L., Salvatore, R., Boger, D.V. & Prica, M. (2001). Structure and rheology of the κ -carrageenan/locust bean gum gels. *Food Hydrocolloids*, 15, 475-484.
- Eidam, D., Kuliche, W.M., Kuhn, K. & Stute, R. (1995). Formation of maize starch gels selectively regulated by the addition of hydrocolloids. *Starch*, 47, 378-384.
- Eldridge, J.E. & Ferry, J.D. (1954). Studies of the cross-linking process in gelatin gels. III. Dependence of melting point on concentration and molecular weight. *Journal of Physical Chemistry*, 58, 992-995.
- Ellis, H.S., Ring, S.G. & Whittam, M.A. (1989). A comparison of the viscous behaviour of wheat and Maite starch pastes. *Journal of Cereal Science*, 10, 33-44.
- Eliason, A.C. (1986). Viscoelastic behaviour during the gelatinisation of starch. 1. Comparison of wheat, maize, potato and waxy barley starches. *Journal of texture Studies*, 17, 253-265.
- Evans, I.D. & Haisman, D.R. (1979). Rheology of gelatinised starch suspensions. *Journal of Texture Studies*, 10, 347-370.
- Fennema, O. R., (2002). Química de los Alimentos 3a Edición. Ed. Acribia S.A., Zaragoza.
- Ferry, J. D. (1980). Viscoelastic properties of polymers 3a ed. John Wiley & Sons, Nueva York.
- Fitton, M.G., & Gonze, M. (1988). Procedimiento para la preparación de almidón reticulado. Patente No. 157601. Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial. México.

- Fuchs, T., Richtering, W., Buchard, W., Kajiwara, K., & Kitamura, S. (1997). Gel point in physical gels: rheology and light scattering from thermoreversibly gelling schizophyllan. *Polymer Gels and Networks*, 5, 541-559.
- Funami, T., Kataoka, Y., Omoto, T., Goto, Y., Asai, I. & Nishinari, K. (2005). Food hydrocolloids control the gelatinization and retrogradation behavior of starch. 2a. Function of guar gums with different molecular weights on the gelatinization behavior of corn starch. *Food Hydrocolloids*, 19, 15-24.
- Gallant, D.J., Bouchet, B. & Baldwin, P.M. (1997). Microscopy of starch: evidence of a new level of granule organization. *Carbohydrate Polymer*, 32, 177-191.
- Genovese, B.D. & Rao, M.A. (2003). Apparent viscosity and first normal stress of starch dispersions: role of continuous and dispersed phases, and prediction with the Goddard-Miller model. *Applied Rheology*. 13, 183-190.
- Gérard, C., Colonna, P., Bouchet, B., Gallant, D.J. & Planchot, V. (2001). A multi-stages biosynthetic pathway in starch granules revealed by ultrastructure of maize mutant starches. *Journal of Cereal Science*, 34, 61-71.
- Giboreau, A., Cuvelier, G. & Launay, B. (1994). Rheological behaviour of three biopolymer/water systems, with emphasis on yield stress and viscoelastic properties. *Journal of Textures Studies*. 25, 119-137.
- Gidley, M. J. (1989). Molecular mechanisms underlying amylose aggregation and gelation. *Macromolecules*, 22, 351-358.
- Gonera, A. & Cornillon. (2002). Gelatinization of starch/gum/sugar systems studied by using DSC, NMR, and CSLM. *Starch/Stärke*, 54, 508-516.
- Goycoolea, F.M., Milas, M. & Rinaudo, M. (2001). Associative phenomena in galactomannan-deacetylated xanthan systems. *International Journal of Biological Macromolecules*, 29, 181-192.
- Harding, S.E., Day, K., Dhimi, R. & Lowe, P.M. (1996). Further observations on the size, shape and hydration of kappa-carrageenan in dilute solution. *Carbohydrate Polymers*, 32, 81-87.
- Heertje, I., & Pâkes, M. (1995). Advances in Electron Microscopy in New physico-chemical techniques for the characterization of complex food systems. E.Dickinson (ed). London. pp. 1-52.
- Hermansson, A.M., Eriksson, E. & Jordansson, E. (1991). Effects of potassium, sodium and calcium on the microstructure and rheological behaviour of κ -carrageenan gels. *Carbohydrate Polymers*, 16, 297-320.
- Hirsch, J.B. & Kokini, J.L. (2002). Understanding the mechanism of cross-linking agents (POCl₃, STMP and EPI) through swelling behavior and pasting properties of cross-linked waxy maize starches. *Cereal Chemistry*, 79, 102-107.
- Hizukuri, S. (1986). Polymodal distribution of the chain lengths of amylopectins and its significance. *Carbohydrate Research*, 147, 342-347.
- Hossain, K., Miyanaga, K., Maeda, H. & Nemoto, N. (2001). Sol-gel transition behavior of pure ι -carrageenan in both salt-free and added salt states. *Biomacromolecules*, 2, 442-449.
- Hsu, S. (1999). Rheological studies on gelling behavior of soy protein isolates. *Journal of Food Science*, 64, 136-140.
- Hsu, S., Lu, S. & Huang, C. (2000). Viscoelastic changes of rice starch suspensions during gelatinization. *Journal of Food Science*, 65, 215-220.
- Huber, K.C. & BeMiller, J.N. (2000). Channels of maize and sorghum starch granules. *Carbohydrate Polymers*, 41, 269-276.

- Huber, K.C. & BeMiller, J.N. (2001). Location of sites of reaction within starch granules. *Cereal Chemistry*, 78, 173-180.
- Hung, P.V. & Morita, N. (2005). Physicochemical properties of hydroxypropylated and cross-linked starches from A-type and B-type wheat starch granules. *Carbohydrate Polymers*, 59, 239-246.
- Ikeda, S., Morris, V. & Nishinari, K. (2001). Microstructure of aggregated and nonaggregated κ -Carrageenan helices visualized by atomic force microscopy. *Biomacromolecules*, 2, 1331-1337.
- Ikeda, S. & Nishinari, K. (2001). "Weak gel"-type rheological properties of aqueous dispersions of nonaggregated κ -carrageenan helices. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 49, 4436-4441.
- Jampen, S., Britt, I. & Tung, M.A. (2000). Gellan polymer solution properties: dilute and concentrated regimes. *Food Research International*. 33, 579-586.
- Jane, J., Chen, Y.Y., Lee, L.F., McPherson, A.E., Wong, K.S., Radosavljevic, 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). Gelatinisation of starch: a combined SAXS/WAXS/DSC and SANS study. *Carbohydrate Research*, 308, 133-147.
- Jiménez-Ávalos, H.A., Ramos-Ramírez, E.G. & Salazar-Montoya, J.A. (2005). Viscoelastic characterization of gum arabic and maize starch mixture using the Maxwell model. *Carbohydrate Polymers*, 62, 11-18.
- 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, J. & Singh, N. (2005). Effect of cross-linking on some properties of potato (*solanum tuberosum* L.) starches. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 1945-1954.
- Kavanagh, G.M & Ross-Murphy, S.B. (1998). Rheological characterisation of polymer gels. *Progress Polymer Science*, 23, 533-562.
- Kim, C., Lee, S. & Yoo, B. (2006). Dynamic rheology of rice starch-galactomannan mixtures in the aging process. *Starch/Stärke*, 58, 35-43.
- Krüger, A., Ferrero, C. & Zaritzky, N. (2003). Modelling corn starch swelling in batch systems: effect of sucrose and hydrocolloids. *Journal of Food Engineering*, 58, 125-133.
- Labropoulos, A.E. & Hsu, S-H. (1996). Viscoelastic behavior of whey protein isolates at the sol-gel transition point. *Journal of Food Science*, 61, 65-68.
- 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.
- Lai, L., Liu, Y. & Lin, P. (2003). Rheological/textural properties of starch and crude hsian-tso leaf gum mixed systems. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83, 1051-1058.
- Launay, B., Cuvelier, G. & Martínez-Reyes, S. (1984). Xanthan gum in various solvent conditions: intrinsic viscosity and flow properties. En "Gums and stabilizers for the food industry 2". G. O. Phillips, D. J. Wedlock and P.A. Williams (eds), Oxford: Pergamon Press. pp. 79-85..
- Launay, B., Cuvelier, G. & Martínez-Reyes, S. (1997). Viscosity of locust bean, guar and xanthan gum solutions in the Newtonian domain: a critical examination of the $\log (\eta_{sp})_0 - \log C$ master curves. *Carbohydrate Polymers*. 3-4, 385-395.

- Lawal, O.S. & Adebowale, K.O. (2005). Physicochemical characteristics and thermal properties of chemically modified jack bean (*Canavalia ensiformis*) starch. *Carbohydrate Polymer*, 60, 331-341.
- Leach, H. W., McCowen, L.D. & Schoch, T.J. (1959). Structure of the starch granule I. Swelling and solubility patterns of various starches. *Cereal Chemistry*, 36, 534-544.
- Li, J. & Yeh, A. (2001). Relationships between thermal, rheological characteristics and swelling power for various starches. *Journal of Food Engineering*, 50, 141-148.
- Lii, Ch., Tomasik, P., Hung, W.L. & Lai, V. (2002). Revised look at the interaction of starch with electrolyte: effect of salts of metals from the first non-transition group. *Food Hydrocolloids*, 16, 35-45.
- Liu, H. & Lelievre, J. (1992). Differential scanning calorimetric and rheological study of the gelatinization of starch granules embedded in a gel matrix. *Cereal Chemistry*, 69, 597-599.
- Liu, Q., Weber, E., Currie, V. & Yada, R. (2003). Physicochemical properties of starches during potato growth. *Carbohydrate Polymer*, 51, 213-221.
- Liu, H., Yu, L., Xie, F. & Chen, L. (2006). Gelatinization of cornstarch with different amylose/amylopectin content. *Carbohydrate Polymer*, 65, 357-363.
- Loisel, C., Tecante, A., Cantón, P. & Doublier, J. L. (2000). Effect of temperature on the rheological properties of starch/carrageenan mixtures. En "Gums and Stabilizers for the Food Industry 10". P.A. Williams & G.O. Phillips. (eds). Cambridge, The Royal Society of Chemistry. pp. 181-187.
- Lundin, L. & Hermanson, A.M. (1997). Rheology and microstructure of Ca- and Na- κ -carrageenan and locust bean gum gels. *Carbohydrate Polymers*, 34, 365-375.
- MacArtain, P., Jaacquier, J.C. & Dawson, K.A. (2003). Physical characteristics of calcium induced κ -carrageenan networks. *Carbohydrate Polymers*, 53, 395-400.
- Macosko, C. (1994). Rheology: Principles, measurements and applications. Wiley VCH Publishers, N.Y. pp 141-143.
- Maleki, N., Nayebi, A.M. & Garjani, A. (2005). Effects of central and peripheral depletion of serotonergic system on carrageenan-induced paw edema. *International Immunopharmacology*, 5, 1723-1730.
- Mangione, M.R., Glacomazza, D., Bulone, D., Martorana, V. & Biario, P.L. (2003). Thermoreversible gelation of κ -carrageenan: relation between conformational transition and aggregation. *Biophysical Chemistry*, 104, 95-105.
- Marrs, W.M. (1986). Structural characterization of carrageenans. En "Gums and Stabilisers for the Food Industry 3". E. Phillips, G.O. Wedlock D.J. & Williams P.A (eds). Elsevier Applied Science Publishers, London, pp. 69-77.
- Mazen, F., Milas, M. & Rinaudo, M. (1999). Conformational transition of native and modified gellan. *Biological Macromolecules*, 26, 109-118.
- Medina-Torres, L., Brito-De La Fuente, E., Torrestiana-Sánchez, B. & Alonso, S. (2003). Mechanical properties of gels formed by mixtures of mucilage gum (*Opuntia ficus indica*) and carrageenans. *Carbohydrate Polymers*, 52, 143-150.
- 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.
- Meunier, V., Nicolai, T., Durand, D. & Parker, A. (2002). Light scattering and viscoelasticity of aggregating and gelling κ -carrageenan. *Macromolecules*, 23, 2610-2616.

- Michel, A-S., Mestdagh, M.M. & Axelos, M.A.V. (1997). Physicochemical properties of Carrageenan gels in the presence of various cations. *International Journal of Biological Macromolecules*, 21, 195-200.
- Michon, C., Cuvelier, G., & Launay, B. (1993). Concentration dependence of the critical viscoelastic properties of gelatin at the gel point. *Rheologica Acta*, 32, 94-103.
- Michon, C., Cuvelier, G., Launay, B. & Parker, A. (1995). Sol-gel transition of iota-carrageenan and gelatin systems. Dynamic viscoelastic characterization. En "Food Macromolecules and Colloids". E. Dickinson (ed.). The Royal Society of Chemistry, pp. 462.
- 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.
- Miyoshi, E. & Nishinari, K. (1999). Non-Newtonian flow behaviour of gellan gum aqueous solutions. *Colloid Polymer Science*, 277, 727-734.
- Miyoshi, E., Takaya, T. & Nishinari, K. (1996). Rheological and thermal studies of gel-sol transition in gellan gum aqueous solutions. *Carbohydrate Polymers*, 30, 109-119.
- 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*, 38, 329-335.
- Mohammed, Z.H., Hember, M.W.N., Richardson, R.K. & Morris, E. R. (1998). Co-gelation of agarosa and waxy maize starch. *Carbohydrate Polymers*, 36, 37-48.
- Morris, E.R. (1983). Rheology of Hydrocolloids. En "Gums and stabilizers for the food industry 2". G.O. Phillips, D.J. Wedlock & P.A. Williams (eds). Pergamon Press, Oxford. pp. 60;
- Morris, E.R. (1990). Mixed polymer gels en P. Harris, Food gels. Elsevier Science Publishing Co., Inc. pp. 291-359.
- Nadison, J. & Doreau, A. (1991). Carrageenan/starch interaction in cream desserts. En "Gums and stabilizers for the food industry 6". Phillips, G.O., Williams, P.A. & Wedlock, D (eds). The Royal Society of Chemistry. Cambridge, pp. 287-294.
- Nakamura, K., Tanaka, Y. & Sakurai, M. (1996). Dynamic mechanical properties of aqueous gellan solutions in the sol-gel transition region. *Carbohydrate Polymers*, 30, 101-108.
- Nayouf, M. (2003). Etude rhéologique et structurale de la qualité texturante du système amidon/kappa-carraghenane en relation avec le traitement thermomécanique. Ecole Nationale des Ingénieurs des Techniques des Industries Agricoles et Alimentaires. Thèse de Doctorat.
- 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.
- Ndjouenkeu, R., Goycoolea, F.M., Morris, E.R. & Akingbala, J.O. (1996). Rheology of okra (*Hibiscus esculentus* L.) and dika nut (*Irvingia gabonensis*) polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 29, 263-269.
- Nerurkar, J., Jun, H.W., Price, J.C. & Park, M.O. (2005). Controlled-release matrix tablets of ibuprofen using cellulose ethers and carrageenans: effect of formulation factors on dissolution rates. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 61, 56-689.
- Nishinari, K. (1996). Properties of gellan gum. En "Gums and stabilizers for the food industry 8". G.O. Phillips, P.A. Williams & D.J. Wedlock (eds). The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp. 371-383.
- Nishinari, K. (1997). Rheological and DSC study of sol-gel transition in aqueous dispersions of industrially important polymers and colloids. *Colloid Polymer Science*, 275, 1093-1107.

- Nishinari, K. & Takahashi, R. (2003). Interaction in polysaccharide solutions and gels. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 8, 396-400.
- Nitta, Y., Kim, Bo S. & Nishinari, K. (2003). Synergistic gel formation of xyloglucan/gellan mixtures as studied by rheology, DSC and circular dichroism. *Biomacromolecules*, 4, 1654-1660.
- Norton, I.T., Goodall, D.M., Morris, E.R. & Rees, D.A. (1983). Role of cations in the conformation of iota and kappa Carrageenan. *Journal of Chemical Society. Faraday Transactions*. 1, 79, 2489-2500.
- Núñez-Santiago, M.C., Bello-Pérez, L.A. & Tecante, A. (2004). Swelling-solubility characteristics, granule size distribution and rheological behavior of banana (*Musa paradisiaca*) starch. *Carbohydrate Polymers*, 56, 65-75.
- Parker, R. & Ring, S.G. (2001). Aspects of the physical chemistry of starch. *Journal of Cereal Science*, 34, 1-17.
- Paterson, J.L., Hardacre, A., Li, P. & Rao, M.A. (2001). Rheology and granule size distributions of corn starch dispersions from two genotypes and grown in four regions. *Food Hydrocolloids*, 15, 453-459.
- Planchot, V., Roger, P. & Colonna, P. (2000). Suitability of starch granule porosity for biosynthesis and amyolysis susceptibility. *Starch/Stärke*, 52, 333-339.
- Rao, M.A. & Tattiyakul, J. (1999). Granule size and rheological behaviour of heated tapioca starch dispersions. *Carbohydrate Polymers*, 38, 123-132.
- Reginald, H. W. (1998). Polysaccharide dispersions: Chemistry and Technology on Food. R.H. Walter (ed). Academic Press. New York.
- Reyes, G.A.L. (2002). Comportamiento mecánico y estructura de geles de gelana y k-carragenina con almidón de maíz ceroso reticulado químicamente. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
- Richardson, R. & Goycoolea, F. (1994). Rheological measurement of κ -carrageenan during gelation. *Carbohydrate Polymers*. 24, 223-225.
- Ridout, M.J., Gunning, A.P., Parker, M.L., Wilson, R.H. & Morris, V.J. (2002). Using AFM to image the internal structure of starch granules. *Carbohydrate Polymer*, 50, 123-132.
- Rinaudo, M. (2001). Relation between the molecular structure of some polysaccharides and original properties in sol and gel states. *Food Hydrocolloids*, 15, 422-440.
- Robinson, G., Ross-Murphy, S.B. & Morris, E.R. (1982). Viscosity-molecular weight relationships, intrinsic chain flexibility and dynamic solution properties of guar galactomannan. *Carbohydrate Research*, 107, 17.
- Rochas, C. (1982). Etude de la transition sol-gel du kappa-carraghenane. These Docteur es Sciences Physiques. Université Scientifique et Médicale et Institut National Polytechnique du Grenoble. France.
- Rochas, C. & Landry, S. (1987). Molecular organization of kappa carrageenan in aqueous solution. *Carbohydrate Polymers*, 7, 435-447.
- Rochas, C. & Rinaudo, M. (1982). Calorimetric determination of the conformational transition of kappa carrageenan. *Carbohydrate Research*, 105, 227-236.
- Rodríguez-Hernández, A.I., Durand, S., Garnier, C., Tecante, A. & Doublier, J.L. (2003). Rheology-structure properties of gellan systems: evidence of network formation at low gellan concentrations. *Food Hydrocolloids*, 17, 621-628.
- Rodríguez-Hernández, A.I., Tecante, A. & Doublier, J.L. (2001). Viscoelastic behavior of waxy maize starch-gellan mixtures under small amplitud oscillatory shear. Proceedings of the Eighth International Congress on Engineering and Food. (Ed. Technomic Publising Co., Inc). 509-513.

- Roh, Y.H. & Shin, C.S. (2006). Preparation and characterization of alginate-carrageenan complex films. *Journal of Applied Polymer Science*, 99, 3483-3490.
- Rood, A.B., Dunstan, D.E., Ross-Murphy, S.B. & Boger, D.V. (2001) Dependence of linear viscoelastic critical strain and stress values on extent of gelation for a thermally activated gelling system. *Rheologica Acta*, 40, 23-29.
- Ross-Murphy, S.B. (1991). Incipient behaviour of gelatin gels. *Rheologica Acta*, 30, 401-411.
- Ross-Murphy, S.B. (1995). Structure-property relationships in food biopolymer gels and solutions. *Journal of Rheology*, 39, 1451-1463.
- Scanlan, J.C. & Winter, H.H. (1991). Composition dependence of the viscoelasticity of end-linked poly(dimethylsiloxane) at the gel point. *Macromolecules*, 24, 47-54.
- Singh, N, Chawla, D. & Singh. J. (2004). Influence of acetic anhydride on physicochemical, morphological and thermal properties of corn and potato starch. *Food Chemistry*, 86, 601-608.
- 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 physico-chemical, morphological, thermal and rheological properties of some chemically modified starches for food applications – A review. *Food Hydrocolloids*, 21, 1-22.
- Singh, J. & Singh N. (2003). Studies on the morphological and rheological properties of granular cold water soluble corn and potato starches. *Food Hydrocolloids*, 17, 63-72.
- Singh, N.S. & Singh, N. (2005). Characteristics of acetylated starches prepared using starches separated from different rice cultivars. *Journal of Food Engineering*, 70, 117-127.
- Singh, N., Singh, J., 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.
- Slootmaekers, D., De Jonghe & Raynaers, H. (1988). Static light scattering from κ -carrageenan solutions. *International Journal of Biological Macromolecules*, 10, 160-168.
- Smith, A.M. (2001). The biosynthesis of starch granules. *Biomacromolecules*, 2, 335-341.
- Snoeren, T.H.M. (1976). κ -Carrageenan. A study on its physico-chemical properties, sol-gel transition and interaction with milk proteins. Tesis doctoral. Wageningen, Holanda.
- 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.
- Sosa-Herrera, M.G., Tecante, A. & Doublier, J.L. (2001). Steady and small-deformation rheology of crosslinked waxy maize starch-gellan pastes and co-gels. Proceedings of the Eighth International Congress on Engineering and Food. J. Welti-Chanes, G.V. Barbosa-Cánovas, & J.M. Aguilera (eds). Technomic Publishing Co. Inc. Pennsylvania, pp. 514-518.
- Standing, M. & Hermansson, A.M. (1993). Rheological behaviour of mixed gels of κ -carrageenan-locust bean gum. *Carbohydrate Polymers*, 22, 49-56.
- Stanley, N.F. (1987). Carrageenans. En "Production and utilization of products from commercial seaweeds". Dennis J. McHugh (ed). FAO Fisheries Technical Papers.
- Sugiyama, M., Yuasa, C., Hara, K., Hiramatsu, N., Nakamura, A., Hayakawa, Y. & Maeda, Y. (1998). Structural change of κ -carrageenan gel near sol-gel transition point. *Physica B*, 241-243, 999-1001.

- Takaya, T., Sano, C. & Nishinari, K. (2000). Thermal studies on the gelatinisation and retrogradation of heat-moisture treated starch. *Carbohydrate Polymer*, 41, 97-100.
- Takayanagi, M., Harima, H. & Iwata. (1963). Viscoelastic behavior of polymer blends and its comparison with model experiments. *Mem. Fac. Engineering of Kyushu University*, 23, 1-13.
- Takeda, Y., Shibahara, S. & Hanashiro, I. (2003). Examination of the structure of amylopectin molecules by fluorescent labeling. *Carbohydrate Research*, 338, 471-475.
- 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, dc conductivity, and kHz dielectric relaxation. *Colloids and Surface B: Biointerfaces*, 38, 231-240.
- Tecante, A. & Doublier, J.L. (1999). Steady flow and viscoelastic behaviour of crosslinked waxy corn starch- κ -carrageenan pastes and gels. *Carbohydrate Polymers*, 67, 551-557.
- Tecante, A. & Doublier, J.L. (2002). Rheological investigation of the interaction between amylose and κ -carrageenan. *Carbohydrate polymers*, 49, 177-183.
- 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 Qi. (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 amylopectin branching. *Carbohydrate Polymers*, 43, 223-239.
- Torres, L. G., Brito, E., Galindo, E. & Choplin, L. (1993). Viscous behaviour of xanthan solutions from a variant strain of *Xanthomonas campestris*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 75, 58-64.
- Tromp, R.H., van de Velde, F., van Riel, J. & Paques, M. (2001). Confocal scanning light microscopy (CSLM) on mixtures of gelatine and polysaccharides. *Food Research International*, 34, 931-938.
- van de Velde, Rollema, H.S., Grinberg, N.V., Burova, T.V., Grinberg, V.Y. & Tromp, R.H. (2002). Coil-helix transition of ι -Carrageenan as a function of chain regularity, *Biopolymers*, 65, 299-323.
- 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.
- Verbeke, D., Thas, O. & Dewettinck, K. (2004). Textural properties of gelled dairy desserts containing κ -carrageenan and starch. *Food Hydrocolloids*, 18, 817-823.
- Vermeylen, 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.

- Viebke, C., Borgström, J., Carlsson, I., Piculell, 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. & Piculell, L. (1995). Characterisation of kappa- and iota- Carrageenan coils and helices by MALLS/GPC. *Carbohydrate Polymers*, 27, 145-154.
- Vreeman, H.J., Snoeren, T.H.M. & Payens, T.A.J. (1980). Physicochemical investigation of κ -carrageenan in the random state. *Biopolymers*, 19, 1357-1374.
- Whistler, R.L. & BeMiller, J.N. (1997). *Carbohydrate Chemistry for Food Scientists*. St. Paul. MN Egan Press. pp. 65.
- Winter, H.H. & Chambon, F. (1986). Analysis of viscoelasticity of a cross-linking polymer at the gel point. *Journal of Rheology*, 30, 367-382.
- Yoo, D., Kim, C. & Yoo, B. (2005). Steady and dynamic shear rheology of rice starch – galactomannan mixtures. *Starch/Stärke*, 57, 310-318.
- Yoshiaki, Y., Thanh, T.T.T., Urakawa, I. & Kajiwara, K. (2002). Structural characteristics of carrageenan gels: temperature and concentration dependence. *Food Hydrocolloids*, 16, 515-522.
- Yoshimoto, Y., Takenouchi, T. & Takeda, Y. (2002). Molecular structure and some physicochemical properties of waxy and low-amylose barley starches. *Carbohydrate Polymers*, 47, 159-167.
- Yu, L. & Christie, G. (2001). Measurement of starch thermal transition using differential scanning calorimetry. *Carbohydrate Polymer*, 46, 179-184.
- Yuguchi, Y., Thuy, T.T., Urakawa, H., & Kajiwara. (2002). Structural characteristics of carrageenan gels: temperature and concentrations dependence. *Food Hydrocolloid*, 16, 515-522.
- Yuguchi, Y., Urakawa, H. & Kajiwara. (2003). Structural characteristics of carrageenan gels: various types of counter ions. *Food Hydrocolloids*, 17, 481-485.
- Ziegler, G.R., Thomason, D.B. & Cassasnovas, J. (1993). Dynamic measurement of starch granule swelling during gelatinization. *Cereal Chemistry*, 30, 247-251.

Anexo A

Viscosidad de soluciones de κ -carragenina para diferentes concentraciones iónicas totales a 9 °C

$C_T=$	0.0072	eq / L	
$[\eta]=$	19.84	dL / g	
κ -carragenina	Viscosidad	Viscosidad	$c[\eta]$
% masa	mPa·s	específica	
0	1.4111		
0.005	1.559	0.105	0.09919
0.008	1.640	0.162	0.14878
0.010	1.720	0.219	0.19837
0.015	1.909	0.353	0.29756
0.020	2.140	0.517	0.39674
0.030	2.700	0.913	0.59511
0.040	3.267	1.315	0.79348
0.050	4.340	2.076	0.99185
0.065	6.071	3.302	1.28941
0.080	8.226	4.829	1.58696
0.090	8.615	5.105	1.78533
0.100	9.602	5.804	1.98370
0.120	15.056	9.670	2.38044
0.150	23.508	15.659	2.97555
0.200	65.760	45.602	3.96740
0.300	184.410	129.685	5.95110
0.400	386.100	272.616	7.93480
0.500	1742.8	1234.065	9.91850

$C_T=$	0.0058	eq / L	
$[\eta]=$	23.39	dL/g	
κ -carragenina	Viscosidad	Viscosidad	$c[\eta]$
% masa	mPa·s	específica	
0	1.353		
0.005	1.532	0.132	0.11695
0.008	1.632	0.206	0.17543
0.010	1.735	0.282	0.23390
0.015	1.930	0.426	0.35085
0.020	2.154	0.592	0.46780
0.030	2.7	0.996	0.70170
0.040	3.2	1.365	0.93560
0.050	3.876	1.865	1.16950
0.065	5.190	2.836	1.52035
0.080	8.370	5.186	1.87120
0.085	8.886	5.568	1.98815
0.090	9.796	6.240	2.10510
0.100	12.086	7.933	2.33900
0.150	26.530	18.608	3.50850
0.200	48.200	34.625	4.67800
0.250	81.650	59.347	5.84750
0.300	139.480	102.089	7.01700
0.400	363.5	267.625	9.35600

$C_T =$		0.0043eq /L		
$[\eta] =$		30.58dL/g		
κ -carragenina % masa	Viscosidad mPa·s	Viscosidad específica	$c[\eta]$	
0	1.341			
0.000	1.341	0.000	0.00000	
0.0050	1.556	0.160	0.15290	
0.0075	1.679	0.252	0.22935	
0.0100	1.806	0.347	0.30580	
0.0150	2.048	0.527	0.45870	
0.0200	2.324	0.733	0.61160	
0.0300	2.553	0.904	0.91740	
0.0400	3.100	1.312	1.22320	
0.0500	4.694	2.500	1.52900	
0.060	5.384	3.015	1.83480	
0.065	5.450	3.064	1.98770	
0.070	6.300	3.698	2.14060	
0.080	7.000	4.220	2.44640	
0.100	12.000	7.949	3.05800	
0.150	25.550	18.053	4.58700	
0.200	42.1	30.394	6.11600	
0.250	86.230	63.303	7.64500	
0.300	132.9	98.105	9.17400	

$C_T =$		0.0029eq /L		
$[\eta] =$		35.95dL/g		
κ -carragenina % masa	Viscosidad mPa·s	Viscosidad específica	$c[\eta]$	
0	1.311			
0.005	1.635	0.159	0.18	
0.0075	1.77	0.254	0.27	
0.010	1.901	0.347	0.36	
0.015	2.23	0.580	0.54	
0.020	2.52	0.786	0.72	
0.030	3.518	1.493	1.08	
0.040	4.434	2.142	1.44	
0.050	5.924	3.198	1.80	
0.060	7.798	4.526	2.16	
0.070	15.97	10.317	2.52	
0.080	11.47	7.128	2.88	
0.090	17.77	11.593	3.24	
0.100	20.98	13.868	3.60	
0.150	36.74	25.036	5.39	
0.200	27.93	18.793	7.19	