



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN  
CIENCIAS QUÍMICAS**

**Comportamiento viscoelástico de mezclas gelana  
de bajo acilo-leche descremada en polvo**

TESIS  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
**MAESTRA EN CIENCIAS**

PRESENTA

Q. A. MARÍA DEL CARMEN ORTIZ TAFOYA



TUTOR: Dr. Alberto Tecante Coronel

AÑO: 2010



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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

A mi asesor de tesis, Dr. Alberto Tecante Coronel, por el tiempo dedicado, por su orientación en todas y cada una de las etapas de este proyecto, por su amistad y porque si su ayuda este trabajo no hubiera sido posible.

Al Biol. Gabriel Orozco Hoyuela, Técnico Académico Asociado y a la Dra. Araceli Patrón, Jefa del departamento de Microscopía del Instituto de Fisiología Celular, por su apoyo durante las observaciones en el microscopio confocal de barrido láser.

A la Q. Araceli Tovar, Responsable del Laboratorio de Absorción Atómica de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación de la Facultad de Química-UNAM, por el apoyo brindado para la realización del análisis de iones metálicos.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico que me fue otorgado para el estudio de la maestría que hoy concluyó.

**A Dios, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante toda la vida.**

## **Jurado Asignado**

Presidente	Dra. Amelia Farrés González-Saravia
Vocal	Dra. Adela Rodríguez Romero
Vocal	Dra. Edith Ponce Alquicira
Vocal	Dr. Ángel Enrique Chávez Castellanos
Secretario	Dra. Laura Patricia Martínez Padilla

Candidata al grado      Q.A. María del Carmen Ortiz Tafoya

Asesor                      Dr. Alberto Tecante Coronel

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 313. Departamento de Alimentos y Biotecnología.  
Facultad de Química, Ciudad Universitaria.

## **INDICE**

	Páginas
RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
2. COMPONENTES DEL SISTEMA	5
2.1 Gelana	5
2.1.1 Estructura y mecanismo de gelificación	5
2.2 Leche	12
2.2.1 Proteínas de la leche	12
2.2.1.1 Caseína	12
2.2.1.1.1 Tipos de caseína	13
2.2.1.1.2 Micelas de caseína	19
2.2.1.1.2.1 Modelos estructurales de la micela de caseína	20
2.2.1.1.2.2 Mecanismo de estabilización de la micela de caseína	22
2.2.1.2 Proteínas del suero	25
3. ESTUDIOS PREVIOS	29
3.1 Propiedades funcionales	29
3.2 Floculación por agotamiento	30
3.3 Sistemas carrageninas-caseína	34
3.3.1 $\kappa$ -carragenina-caseína	36
3.3.2 $\iota$ -carragenina-caseína	37
3.3.3 Carragenina híbrida-caseína	38
3.4 Otros polisacáridos y caseína	39
3.4.1 Goma guar y caseína	40
3.4.2 Pectinas y caseína	42
3.5 Proteínas del suero y polisacáridos	45
4. HIPÓTESIS	49
5. OBJETIVOS	50
5.1 Principal	50
5.2 Particulares	50
6. ESTRATEGÍA EXPERIMENTAL	51
6.1 Diagrama general	51
6.2 Materiales	51
6.3 Métodos	51
6.3.1 Análisis proximal de la leche	52
6.3.2 Análisis de la gelana	52
6.3.3 Desarrollo de las formulaciones de estudio	54

6.3.4	Preparación de geles de gelana y mezclas gelana-leche descremada	56
6.3.4.1	Preparación	56
6.3.5	Determinaciones reológicas	57
6.3.6	Determinación de la temperatura de transición sol-gel	58
6.4	Tratamiento de datos	59
6.4.1	Concentración iónica total	59
6.4.2	Fuerza iónica	60
6.4.3	Análisis estadístico	61
6.5	Microscopía confocal de barrido láser	61
6.5.1	Preparación gelana marcada	62
6.5.2	Preparación leche marcada	63
6.5.3	Mezclas gelana-leche descremada marcadas	63
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	64
7.1	Clasificación de geles	64
7.1.1	Geles débiles y geles fuertes	64
7.1.2	Geles fluidos	65
7.2	Gelana	66
7.3	Mezclas gelana-leche descremada	72
7.3.1	Propiedades reológicas de mezclas gelana-leche descremada	74
7.4	Mezclas gelana-KCl	90
7.5	Fuerza iónica	95
7.6	Microscopía confocal de barrido láser	98
8.	CONCLUSIONES	112
9.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	114
10.	ANEXOS	122
10.1	Anexo A. Valores de la zona de viscoelasticidad lineal para todas las formulaciones	122
10.2	Anexo B. Dependencia de los módulos dinámicos con respecto a la frecuencia	125
10.3	Anexo C. Análisis de varianza (ANOVA)	128
10.4	Anexo D. Concentración total y fuerza iónica para las formulaciones elaboradas	133

## **FIGURAS**

	Páginas	
Figura 1.	Principales tendencias en la interacción en sistemas de proteínas-polisacáridos	3
Figura 2.	Estructura química de la gelana nativa	6
Figura 3.	Representación esquemática para predecir la conformación y la interacción de la gelana	7
Figura 4.	Dependencia de la viscoelasticidad dinámica $G'$ y $\tan \delta$ con la temperatura para una solución acuosa de gelana al 1.0% en presencia de 0.1 M de KCl	8
Figura 5.	Modelos esquemáticos de los mecanismos de gelificación de la gelana	9
Figura 6.	Modelo para la gelificación basado en mediciones de dispersión de luz	10
Figura 7.	Modelo molecular de la gelana en hélice sencilla y doble hélice y agregación de las dobles hélices	11
Figura 8.	Estructura primaria de la $\alpha_{s1}$ -caseína B	14
Figura 9.	Estructura primaria de la $\alpha_{s2}$ -caseína	15
Figura 10.	Estructura primaria de la $\beta$ -caseína	16
Figura 11.	Estructura primaria de la $\kappa$ -caseína	18
Figura 12.	Modelos esquemáticos de la micela de caseína	21
Figura 13.	Floculación de la caseína nativa, en función de las condiciones de calentamiento de la leche de vaca	24
Figura 14.	Estructura primaria de la $\beta$ -lactoglobulina	26
Figura 15.	Estructura primaria de la $\alpha$ -lactoalbúmina	28
Figura 16.	Diagrama esquemático de la floculación por agotamiento	31
Figura 17.	Ilustración esquemática de la floculación por agotamiento	33
Figura 18.	Representación esquemática de la microestructura de geles de leche- $\kappa$ -carragenina	37
Figura 19.	Representación esquemática de la microestructura de geles de leche- $\lambda$ -carragenina	38
Figura 20.	Representación esquemática de la microestructura de geles de carragenina híbrida-leche	39
Figura 21.	Microestructura de mezclas que contienen goma guar y caseína micelar	41
Figura 22.	Interacción por agotamiento entre dos partículas coloides	42
Figura 23.	Diagrama general de la investigación	51
Figura 24.	Esquema de la preparación de geles	56
Figura 25.	Barridos de deformación de las formulaciones de gelana	66
Figura 26.	Espectros mecánicos de formulaciones de gelana	68
Figura 27.	Parámetros de la función potencia para los módulos dinámicos de	69



	formulaciones de gelana	
Figura 28.	tan $\delta$ para las formulaciones de gelana	71
Figura 29.	Espectros mecánicos de las formulaciones con 0.01% de gelana	75
Figura 30.	Espectros mecánicos de las formulaciones con 0.05% de gelana	77
Figura 31.	Espectros mecánicos de las formulaciones con 0.1% de gelana	77
Figura 32.	Espectros mecánicos de las formulaciones con 0.3% de gelana	78
Figura 33.	Espectros mecánicos de las formulaciones con 0.5% de gelana	79
Figura 34.	Espectros mecánicos de las formulaciones con 0.6% de gelana	79
Figura 35.	Espectros mecánicos de las formulaciones con 0.7% de gelana	80
Figura 36.	Variación del módulo complejo ( $G^*$ ) y la tan $\delta$ en función de la concentración de gelana	81
Figura 37.	Variación del módulo complejo ( $G^*$ ) y la tan $\delta$ en función de la concentración de leche	82
Figura 38.	Barrido de temperatura de la formulación con 0.7% de gelana y 5.0% de leche	85
Figura 39.	Diagrama de transición sol-gel, para la sal de potasio de la gelana	86
Figura 40.	Espectros mecánicos para las formulaciones elaboradas a partir de mezclas gelana-KCl	90
Figura 41.	Módulo complejo ( $G^*$ ) en función del contenido de gelana, leche y KCl	92
Figura 42.	Diagrama de transición sol-gel, para la sal de potasio de la gelana	93
Figura 43.	Micrografías de formulaciones elaboradas con gelana. a) 0.3%, b) 0.1%	99
Figura 44.	Micrografía de una solución con 5% de leche descremada	99
Figura 45.	Micrografías de formulaciones elaboradas con a) 0.3% de gelana y 5% de leche descremada b) 0.1% de gelana y 5% de leche descremada	100
Figura 46.	Micrografías de formulaciones elaboradas con a y b) 0.3% de gelana y 5% de leche descremada marcada, c y d) 0.3% de gelana y 5% de leche descremada sin marcar	102
Figura 47.	Espectros de excitación y emisión de fluoróforos orgánicos	103
Figura 48.	Micrografías de la formulación con 0.3% de gelana y 5% de leche descremada. a) gelana, b) leche descremada	104
Figura 49.	Micrografías de la formulación con 0.1% de gelana y 5% de leche descremada. A) gelana, b) leche descremada	105
Figura 50.	Micrografías de formulaciones elaboradas con a) 0.1% de gelana y 5% de leche b) 0.3% de gelana y 5% de leche; ambas formulaciones con gelana sin marcar	106
Figura 51.	Representación esquemática de las interacciones de las proteínas lácteas y la gelana en distintas concentraciones y a temperatura ambiente ( $\approx 22^\circ\text{C}$ )	109

## **CUADROS**

		Páginas
Cuadro 1.	Resultados del análisis proximal de la leche descremada en polvo	53
Cuadro 2.	Resultados del análisis de la gelana	54
Cuadro 3.	Formulaciones desarrolladas para el estudio	55
Cuadro 4.	Blancos desarrollados para el estudio	55
Cuadro 5.	Zona de viscoelasticidad lineal para las formulaciones elaboradas a partir de gelana si adición de iones ni leche descremada	122
Cuadro 6.	Zona de viscoelasticidad lineal para las formulaciones a base de las mezclas de gelana-leche descremada	123
Cuadro 7.	Zona de viscoelasticidad lineal para las formulaciones de mezclas gelana-KCl	124
Cuadro 8.	Dependencia de los módulos dinámicos en función de la frecuencia para las formulaciones de gelana	125
Cuadro 9.	Dependencia de los módulos dinámicos en función de la frecuencia para las formulaciones de mezclas gelana-leche descremada	126
Cuadro 10.	Dependencia de los módulos dinámicos en función de la frecuencia para las mezclas de gelana-KCl	127
Cuadro 11.	Análisis de varianza para el módulo elástico ( $G'$ ), en función de la frecuencia, la concentración de leche y la concentración de gelana	129
Cuadro 12.	Análisis de varianza para el módulo viscoso ( $G''$ ), en función de la frecuencia, la concentración de leche y la concentración de gelana	130
Cuadro 13.	Análisis de varianza para la tangente de delta ( $\tan \delta$ ), en función de la frecuencia, la concentración de leche y la concentración de gelana	130
Cuadro 14.	Notación utilizada en un diseño 2x3	132
Cuadro 15.	Concentración total (CT) y fuerza iónica (I) para las formulaciones de estudio	134
Cuadro 16.	Comparación de fuerza iónica (I) entre las formulaciones con leche y sus respectivos controles con iones potasio	135

## **RESUMEN**

Mediante pruebas de cizalla de baja amplitud y microscopía confocal de barrido láser, se estudió el comportamiento de mezclas de gelana de bajo acilo (GBA) y leche descremada (LD), de mezclas de GBA y cloruro de potasio (KCl) y de disoluciones de GBA sola preparadas a 90 °C. Las formulaciones de las mezclas se definieron con base en el diagrama de transición sol-gel de GBA disponible en la literatura. En dicho diagrama se seleccionaron las concentraciones de GBA para las cuales no se forman geles a temperatura ambiente, para posteriormente agregar LD o KCl como inductor de la gelificación de la GBA con el objetivo de determinar si existe algún efecto de las proteínas de la LD sobre la GBA. El análisis estadístico realizado mostró la existencia de interacciones entre los factores que se modificaron en las formulaciones, es decir entre la concentración de LD y GBA. Las formulaciones con GBA sola presentaron el comportamiento típico de disoluciones macromoleculares, mientras que la presencia de LD en las formulaciones modificó su comportamiento reológico hasta exhibir un carácter predominantemente elástico cuando la concentración de LD agregada llegó a 5%. Las formulaciones con KCl mostraron en su mayoría el comportamiento de geles; sin embargo, los módulos  $G'$  y  $G''$  presentaron valores menores que los de las formulaciones con GBA y LD en todos los casos, muchas veces con más de un ciclo logarítmico de diferencia. Las temperaturas de transición fueron mayores para las mezclas GBA-LD en comparación con las mezclas de GBA-KCl. Las micrografías obtenidas muestran la existencia de interacciones entre la gelana y las proteínas de la LD, por lo que es posible concluir que las propiedades viscoelásticas se ven afectadas por la presencia de LD en las formulaciones, aunque se hace necesario tener en cuenta la fuerza iónica de los sistemas de estudio para corroborar que las modificaciones reológicas observadas se deben en su mayoría a las interacciones proteína-polisacárido.

## 1. INTRODUCCIÓN

Los productos alimenticios contienen un número limitado de componentes principales: proteínas, lípidos, carbohidratos, agua, iones y aire. Las propiedades de los productos están determinadas por una selección cuidadosa de componentes basados en sus propiedades físicas y químicas en combinación con las condiciones de procesamiento. La microestructura resultante determina, entre otras, la apariencia, la percepción del sabor, la reología, la vida útil y forma el puente entre las propiedades moleculares de los componentes individuales y las propiedades macroscópicas deseadas en el producto. El conocimiento profundo de la microestructura en relación con las propiedades macroscópicas de los productos ofrece formas de mejorar los productos existentes y el diseño de otros nuevos (Blonk y van Aalst, 1993)

En la industria alimentaria, los polisacáridos son muy utilizados como gelificantes, emulsificantes y estabilizantes, para modificar la textura de alimentos. Debido a su amplia aplicación en la formulación de alimentos, el interés en sistemas proteína-polisacárido ha ido en aumento durante los últimos años (Bertolini *et al.*, 2005).

Las interacciones con polisacáridos pueden influir en propiedades funcionales como solubilidad, actividad superficial, estabilidad conformacional, capacidad para formar geles, propiedades emulsificantes y espumantes de las proteínas de los alimentos. Durante el proceso de manufactura, las interacciones entre proteínas y polisacáridos, así como las interacciones competitivas con otros componentes del sistema (agua, lípidos, azúcares, iones metálicos, surfactantes, etc.), determinan la relación entre la estructura y las propiedades del alimento. Las interacciones no específicas entre proteínas y polisacáridos pueden dividirse en dos grupos: formación de complejos e incompatibilidad termodinámica. Como las interacciones ocurren en disolución, la formación de complejos y la incompatibilidad termodinámica se ven influenciadas primeramente por el pH, la fuerza iónica, la conformación de los polímeros, la densidad de carga, el contenido de

azúcar, la temperatura de procesamiento, la historia térmica de la muestra, la concentración tanto de proteína como de polisacárido, el peso molecular, la longitud de la cadena de los polímeros, y la sustitución funcional.

Las propiedades funcionales de los biopolímeros individuales generalmente mejoran por la formación de complejos con otros biopolímeros. Algunos trabajos de interacciones de proteínas en productos lácteos han demostrado que las proteínas del suero y las caseínas interactúan con polisacáridos a pH bajo para formar coacervados complejos solubles o insolubles, nanopartículas estables o precipitados sólidos.

Las mezclas de proteínas y polisacáridos son inestables, lo cual lleva a la separación de la mezcla en dos fases, como se observa en la Figura 1.

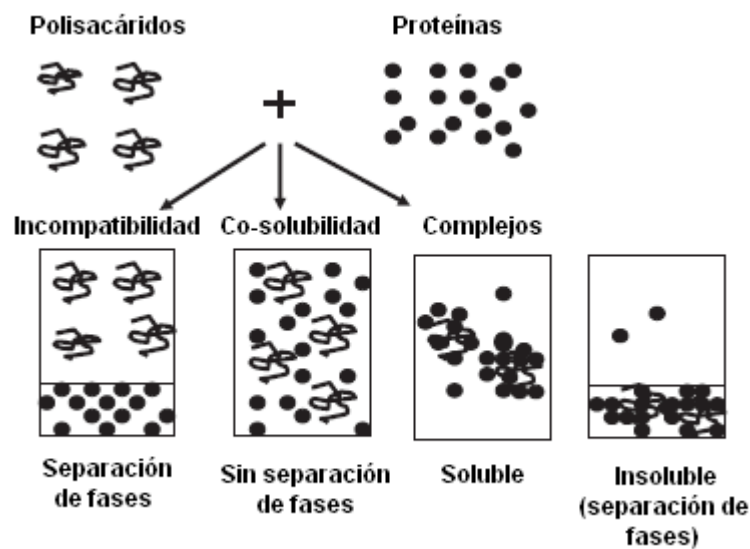


Figura 1. Principales tendencias en la interacción en sistemas de proteínas-polisacáridos (Ye, 2008).

Una mezcla de proteína-polisacárido diluida no interacciona y puede codisolverse y formar una disolución estable. Sin embargo, si las proteínas y los polisacáridos son incompatibles termodinámicamente (por ejemplo: se repelen entre ellos) ocurre una separación de fases también conocida como segregación. La separación de fases resulta en una mezcla que exhibe dos fases: una rica en proteína y otra rica en polisacárido. En

contraste, si las proteínas y los polisacáridos muestran una atracción neta, usualmente a través de interacciones electrostáticas (cuando tienen grupos con cargas opuestas), ocurre la coacervación compleja o una separación de fases asociativa, dando lugar a la formación de complejos proteína-polisacárido. La mezcla se separa en dos fases: la fase de abajo contiene el complejo proteína-polisacárido y la fase superior contiene principalmente al disolvente (Ye, 2008).

En el caso de la gelificación de las proteínas o de los polisacáridos, se forma un sistema homogéneo macroscópico en el cual la separación de fases es llevada a un nivel microscópico. Por lo tanto, la microestructura final obtenida es un equilibrio entre la separación de fases y el proceso de gelificación. La gelificación de la proteína se aplica comúnmente para obtener geles mixtos de proteínas y polisacáridos. Se utilizan varios métodos químicos y físicos para obtener la gelificación de las proteínas, como calor, acidificación, entrecruzamiento químico o enzimático o adición de sales (De Jong, Jan Klok y van de Velde, 2009).

La traducción de la sensación de textura de los alimentos en estructura y propiedades reológicas, que pueden ser medidas con instrumentos, logra proporcionar información importante en la percepción de la textura. Los geles multicomponentes proporcionan un buen modelo para productos alimenticios naturales y fabricados, que suelen contener grandes cantidades de agua (50-90%). Su consistencia semisólida puede atribuirse a la presencia de biopolímeros, redes que contienen grandes cantidades de agua. Muchos ingredientes pueden alterar la estructura de los geles multicomponentes. Sin embargo, las proteínas y polisacáridos son los materiales más importantes de construcción. La combinación de las proteínas nativas o desnaturalizadas con polisacáridos neutros o aniónicos utilizados en los alimentos puede dar un gran número de diferentes estructuras que pueden considerarse como modelos de arreglos de alimentos muy relevantes en la industria alimenticia (van den Berg *et al.*, 2007).

## 2. COMPONENTES DEL SISTEMA

### 2.1 Gelana

La gelana es un polisacárido microbiano utilizado ampliamente en las industrias debido a su capacidad de formar geles claros, resistentes al calor y al ácido y termo-reversibles y, desde un punto de vista científico, a menudo considerado como un sistema modelo para investigar los mecanismos de gelificación de polisacáridos que forman hélices como la agarosa y las carrageninas en general (Ikeda *et al.*, 2004). Las aplicaciones de la gelana en la industria de los alimentos incluyen confitería, mermeladas, jaleas, fabricación de alimentos, geles a base de agua, rellenos de pastel, cremas, y diversos productos lácteos como helados y yogurt. La mayoría de las aplicaciones de la gelana se basan en su capacidad de formación de geles en presencia de determinados cationes y en concentraciones más bajas en comparación con la mayoría de los demás polisacáridos (Noda *et al.*, 2008).

#### 2.1.1 Estructura y mecanismo de gelificación

La gelana es un polisacárido aniónico extracelular secretado por la bacteria *Sphingomonas paucimobilis* (anteriormente *Pseudomonas elodea*, ATCC31461). Consiste en unidades repetidas de un tetrasacárido (Figura 2), formado por residuos de glucosa, ácido glucurónico y ramnosa en una relación molar de 2:1:1, respectivamente, unidos en una cadena lineal ( $[(\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D}\text{-Glucosa}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D}\text{-Ácido Glucurónico}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D}\text{-Glucosa}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L}\text{-Ramnosa}\text{-}(1\rightarrow)]_n$ ), Nickerson, Paulson y Speers, 2004).

En su forma nativa hay aproximadamente uno y medio residuos O-acilo por unidad repetida. Originalmente se pensó que el sustituyente O-acilo era solo un O-acetilo, dando como resultado diversas formas de la gelana a las que se referían como alto y bajo acetilo. Estudios posteriores (Kuo, Dell y Mort, 1986) sugieren que la gelana contiene dos

sustituyentes, el O-acetilo y el O-glicerilo en cada tercera glucosa enlazada en el polímero, la forma tentativa los asigna en la posición 6 y en la posición 2, respectivamente, predominando este último (Sanderson, 1990).

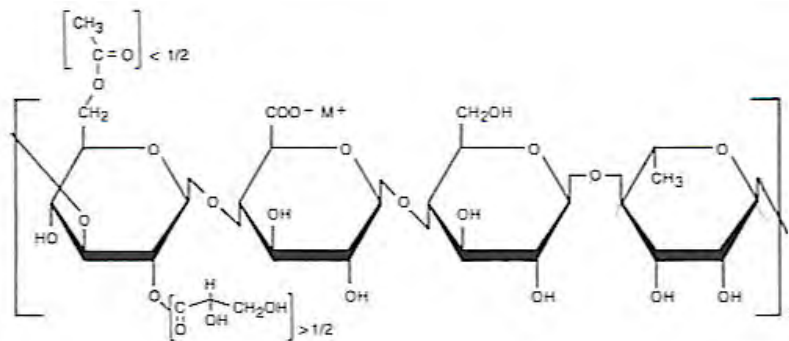


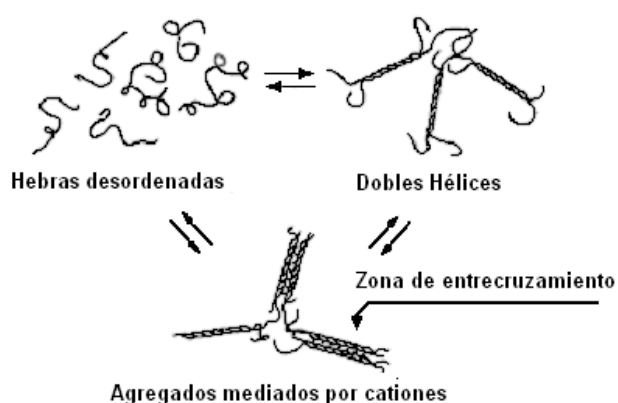
Figura 1. Estructura química de la gelatina nativa (Sanderson, 1990).

Comercialmente la gelatina ha sido clasificada en dos categorías: gelatina de alto acilo (GAA) y gelatina de bajo acilo (GBA). De las dos, sólo la GAA tiene grupos glicerato y acetato en los residuos de glucosa. Las diferencias estructurales entre la GAA y la GBA resultan en una gran disparidad en las propiedades reológicas y funcionales de estos dos productos (Huang *et al.*, 2004). El tipo desacilado forma geles duros y quebradizos en presencia de cationes, mientras que las formas nativas forman geles suaves y elásticos, incluso en ausencia de cationes (Noda *et al.*, 2008). Dado que en este estudio se usó GBA, la discusión se limita a esta forma del polisacárido.

Un estudio de rayos X de la sal de Li-gelatina (Chandrasekaran y Radha, 1995), mostró que la estructura molecular es una doble hélice, la cual está formada por el entrelazamiento de dos cadenas helicoidales hacia la izquierda con una longitud de 54.6 Å (5.64 nm) en forma paralela. Esta asociación se fortalece por puentes de hidrógeno intercadena a lo largo de la hélice, entre los grupos hidroximetil del enlace 4-glucosil de una cadena y los grupos carboxilato de la otra. Debido a la baja energía de dispersión de los rayos X del ión  $\text{Li}^+$ , las posiciones de los cationes y las moléculas de agua no fueron



reveladas. Sin embargo, una investigación posterior, confirmó la morfología de la sal de potasio de gelana y se reveló la posición de los iones  $K^+$ , los cuales se encuentran en la vecindad del grupo carboxilato de cada unidad del tetrasacárido. Este ión está coordinado octaédricamente, rodeado por tres ligandos en una cadena (los dos átomos de oxígeno de carboxilato y un grupo hidroxilo), dos ligandos de la otra cadena (dos grupos hidroxilo) y una molécula de agua. Este arreglo confiere excelente estabilidad estructural a la doble hélice de la gelana.



*Figura 2. Representación esquemática para predecir la conformación y la interacción funcional de la gelana gobernada por procesos de calentamiento y enfriamiento en presencia y en ausencia de cationes, (Nakajima, Ikehara y Nishi, 1996).*

En el proceso general de gelificación de la gelana, se considera la participación de dos pasos termo-reversibles. Las moléculas de gelana se encuentran en desorden en forma de hebra aleatoria (una sola cadena) en el momento del calentamiento en disoluciones acuosas. Las moléculas se transforman en una conformación ordenada de forma helicoidal posterior al enfriamiento, seguida de asociaciones entre las hélices a través de interacciones débiles, tales como puentes de hidrógeno y fuerzas de atracción de van der Waals, las cuales conducen a asociaciones moleculares y, por tanto, a la formación de geles débiles termo-reversibles. En presencia de cationes promotores de geles (Figura 3),

que apantallan las repulsiones electrostáticas entre las hélices, las asociaciones helicoidales se refuerzan a través de puentes de hidrógeno con un aumento de la estabilidad térmica, lo que lleva a la histéresis térmica en calentamiento y enfriamiento (Noda *et al.*, 2008), como se puede apreciar en la Figura 4.

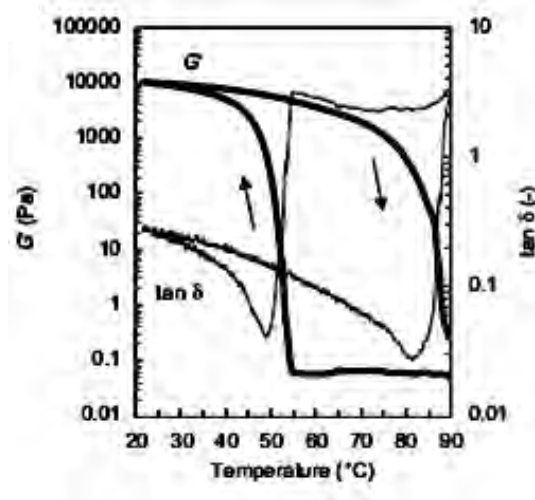
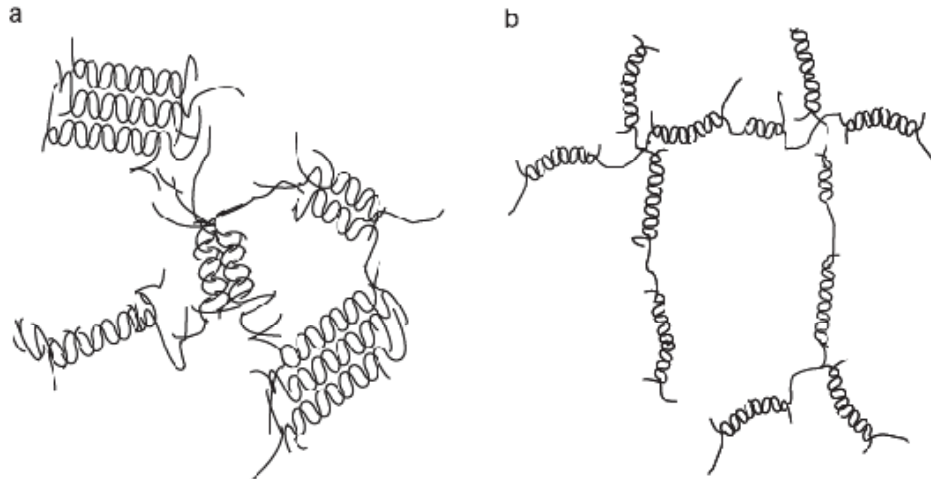


Figura 3. Dependencia de la viscoelasticidad dinámica  $G'$  y  $\tan \delta$  con la temperatura para una solución acuosa de gelana al 1.0% p/p en presencia de 0.1 M de KCl, (Noda *et al.*, 2008).

Tanto los cationes monovalentes como los divalentes estabilizan la red tridimensional a través de entrecruzamiento de las dobles hélices de la gelana vía los grupos carboxilato de las moléculas de gelana. Sin embargo, los cationes monovalentes y divalentes siguen mecanismos diferentes para la gelificación de la gelana. Los cationes divalentes ( $M^{++}$ ) forman entrecruzamiento de las dobles hélices directamente (doble hélice- $M^{++}$ -doble hélice) mientras que los cationes monovalentes ( $M^+$ ) lo hacen de forma indirecta (doble hélice- $M^+$ -agua- $M^+$ -doble hélice). Como resultado de los diferentes mecanismos de gelificación, los cationes divalentes son más efectivos en la formación del gel que los cationes monovalentes, debido a que se generan enlaces hélice-hélice más cortos y con menor número de cationes involucrados, lo cual explica la capacidad de los cationes divalentes de generar geles de fuerza y textura similar a los formados a partir de cationes monovalentes pero con fuerza iónica significativamente menor (Huang *et al.*, 2004).



*Figura 4. Modelos esquemáticos de los mecanismos de gelificación de gelatina. a) Modelo convencional, b) Modelo fibroso (Noda et al., 2008).*

Se han propuesto dos mecanismos para la gelificación de la gelatina. Uno propone la formación de distintos sitios de unión, con cadenas flexibles desordenadas del polímero conectando sitios de unión adyacentes. En este modelo, las asociaciones inter-helicoidales contribuyen a la formación de sitios de unión ordenados “como en los cristales” los cuales se facilitan y estabilizan por los enlaces con iones. En este caso, la elasticidad podría incrementarse por contribuciones entrópicas de estas cadenas poliméricas flexibles. La dependencia de la elasticidad con la temperatura también se explica con las bases de este modelo, el cual atribuye los cambios al número de segmentos de cadenas enredados dentro de los sitios de unión ver Figura 5a, (Noda et al., 2008).

Basados en mediciones de dispersión de luz y estudios de microscopía de fuerza atómica, Gunning y Morris (1990), propusieron otro mecanismo llamado “modelo fibroso”, sin asumir la presencia de los sitios de unión desordenados y las cadenas flexibles del polímero (Figura 5b).

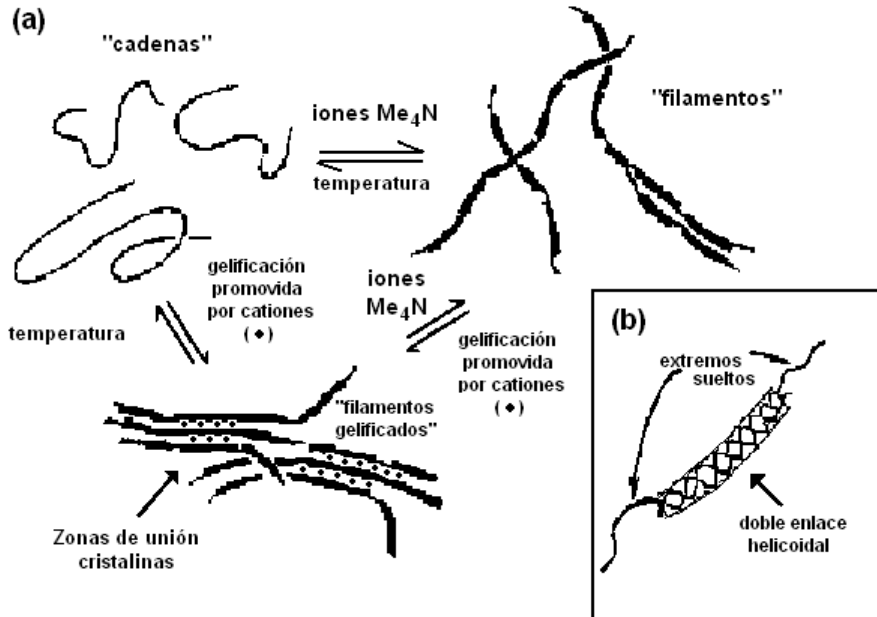
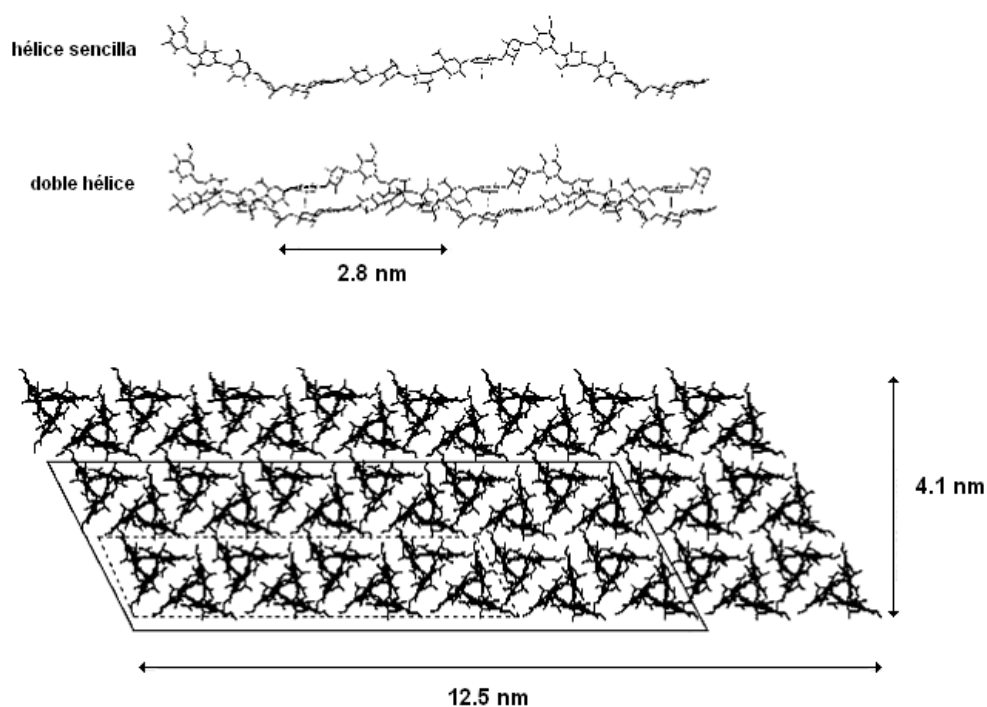


Figura 5. Modelo para la gelificación de gelana basado en mediciones de dispersión de luz. (a) Esquema de gelificación, (b) mecanismo de asociación por la formación de dobles hélices entre los extremos terminales de las moléculas (Gunning y Morris, 1990).

En la Figura 6 se presenta de manera más detallada este mecanismo. En el modelo se observa que en ausencia de cationes que promuevan la gelificación, el calentamiento y el enfriamiento favorecen la formación de fibrillas producidas por la formación de dobles hélices entre las moléculas vecinas terminales (Figura 6a). A altas concentraciones de fibrillas el sistema se podría bifurcar o espesar por la formación ocasional de enlaces entre los extremos y la parte media de las cadenas (Figura 6b). La adición de cationes promotores de geles, conduce a la cristalización de estas fibras y la formación de geles permanentes. En el caso de la gelana de alto acilo, el sustituyente glicerato podría actuar restringiendo la cristalización en pequeñas regiones de cada fibra, lo cual produce geles elásticos y suaves.

Por otro lado, utilizando mediciones de dispersión de rayos X de bajo ángulo (SAXS), Yuguchi, Urakawa y Kajiwara (2002) observaron que cuando se agrega KCl a la gelana, ésta forma dobles hélices, las cuales se agregan posteriormente para formar dominios de entrecruzamientos. El modelo molecular de la representación de dichos

entrecruzamientos se encuentra en la Figura 7. Se observó además que el grado de entrecruzamiento crece con la cantidad de sal de KCl agregada. Se piensa que las cadenas de gelana prefieren la estructura de doble hélice en un estado ordenado, y estas dobles hélices se agregan una al lado de la otra. La naturaleza electrostática de los grupos carboxilo también influye en la conformación de la cadena de gelana así como en la forma de agregación. Los grupos carboxilo son atacados en un lado del triángulo, como se observa en el modelo molecular que se construyó mediante cristalografía de rayos X, y se presenta en la Figura 7. Por lo tanto, las dobles hélices de gelana tienden a agregarse una al lado de la otra cuando están mediadas por cationes metálicos, de acuerdo a la posición de los grupos carboxilo. Dado que el espacio entre las cadenas individuales de gelana puede limitarse, se especula la agregación y por lo tanto el crecimiento de una capa en etapas iniciales. La agregación entre capas seguirá si se añaden más sales.



*Figura 6. El dibujo de arriba es el modelo molecular de la gelana en hélice sencilla y doble hélice. El dibujo de abajo muestra la agregación de las dobles hélices visto verticalmente, donde el paralelogramo con líneas punteadas muestra una capa compuesta de 8 dobles hélices y la línea sólida muestra una doble capa de 24 dobles hélices (Yuguchi, Urakawa y Kajiwara, 2002).*

## **2.2 Leche**

Debido a que en todos los estudios que se han realizado con productos lácteos los componentes que tienen una mayor importancia son las proteínas, esta revisión sólo se enfocará en este tema.

### **2.2.1 Proteínas de la leche**

Las proteínas más simples de la leche son las holoproteínas, que no contienen más que  $\alpha$ -aminoácidos, las más importantes del lactosuero son:  $\beta$ -lactoglobulina y  $\alpha$ -lactoalbúmina. Las proteínas más abundantes de la leche son las fosfoproteínas: caseína  $\alpha$  y caseína  $\beta$ , en tanto la caseína  $\kappa$  es una fosfoglicoproteína (Alais, 1985).

#### **2.2.1.1 Caseína**

La caseína entera es el complejo proteínico fosforado, de carácter ácido, que precipita a pH 4.6 (Alais, 1985). Las caseínas son hidrofóbicas; tienen una carga bastante elevada, muchos residuos de prolina y pocos de cistina. Sólo forman hélices  $\alpha$  cortas y casi no presentan estructura terciaria. Esto no significa que las moléculas estén enrolladas al azar, pero en disoluciones diluidas las cadenas están parcialmente desplegadas. Como quedan expuestos muchos grupos hidrofóbicos, se establecen fácilmente enlaces hidrofóbicos entre las moléculas. Por ello, las caseínas muestran amplias asociaciones, tanto en el interior de una misma molécula como entre ellas. Las moléculas de caseína prácticamente no pueden ser desnaturalizadas porque casi no tiene estructura terciaria ni secundaria. Por esta razón, la caseína no se vuelve insoluble por el calentamiento a temperaturas inferiores de 100 °C y sí lo hace a temperaturas más altas, aunque a esas condiciones pueden tener lugar un gran número de reacciones.

La alta carga de las proteínas se debe en parte a los grupos fosfato, que están en su mayoría esterificados con los residuos de serina; a pH próximo al de la leche, se encuentran fundamentalmente ionizados. Los grupos ligan fuertemente iones divalentes como el  $\text{Ca}^{2+}$ , especialmente a pH más alto, la unión del  $\text{Ca}^{2+}$  a los agregados ocasiona una descarga (eléctrica) y deshidratación concomitante de esta región, alterando el equilibrio de las interacciones hidrofóbicas y de fuerzas repulsivas electrostáticas. Por esta razón, las caseínas  $\alpha_{s1}$  y  $\beta$  precipitan a concentraciones de actividad de calcio iónico bastante bajas (Walstra *et al.*, 2001). En la leche están presentes diferentes tipos de caseína:  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ -,  $\beta$ - y  $\kappa$ -caseína. Las principales características de estas proteínas se mencionan a continuación.

#### **2.2.1.1.1 Tipos de caseínas**

La caseína  $\alpha_{s1}$  presenta la carga más alta y el mayor contenido de fosfato, se asocia fuertemente en dos fases a pH 6.6 y una fuerza iónica de 0.05 M y tiene un peso de 23,623 Da (Farrell *et al.*, 2004). El punto isoeléctrico de esta proteína se encuentra entre 4,44 - 4,76 de pH y la estructura primaria se presenta en la Figura 8. La estructura primaria nos revela que esta proteína está formada por tres regiones hidrofóbicas, con dos de ellas situadas en los extremos (aminoácidos 1-41, 90-113 y 132-199), y una zona muy polar (entre los aminoácidos 42 y 80), en la que se encuentran todos los grupos fosfato menos uno, lo que le da una carga neta negativa muy importante al pH de la leche (alrededor de 6,6). Esta caseína  $\alpha_{s1}$  contiene 17 restos de prolina, distribuidos a lo largo de toda la cadena, lo que hace que tenga muy pocas zonas con estructura secundaria organizada. La asociación con otras moléculas de caseína se produce a través de interacciones hidrofóbicas en las que está implicada fundamentalmente la zona situada entre los aminoácidos 136 y 196 (Swaisgood, 2003).

1	10	20
H-Arg-Pro-Lys-His-Pro-Ile-Lys-His-Gln-Gly-Leu-Pro-Gln-Glu-Val-Leu-Asn-Glu-Asn-Leu-		
21	30	40
Leu-Arg-Phe-Phe-Val-Ala-Pro-Phe-Pro-Glu-Val-Phe-Gly-Lys-Glu-Lys-Val-Asn-Glu-Leu-		
----- (α <sub>S1</sub> -CN A)		
41	50	60
<b><i>Ser</i></b> *-Lys-Asp-Ile-Gly- <b><i>Ser</i></b> -Glu- <b><i>Ser</i></b> -Thr-Glu-Asp-Gln-Ala-Met-Glu-Asp-Ile-Lys-Gln-Met-		
(α <sub>S1</sub> -CN D) - <b><i>Thr</i></b> - (α <sub>S1</sub> -CN E) -Glu-		
61	70	80
Glu-Ala-Glu- <b><i>Ser</i></b> -Ile- <b><i>Ser</i></b> - <b><i>Ser</i></b> - <b><i>Ser</i></b> -Glu-Glu-Ile-Val-Pro-Asn- <b><i>Ser</i></b> -Val-Glu-Gln-Lys-His-		
81	90	100
Ile-Gln-Lys-Glu-Asp-Val-Pro-Ser-Glu-Arg-Tyr-Leu-Gly-Tyr-Leu-Glu-Gln-Leu-Leu-Arg-		
101	110	120
Leu-Lys-Lys-Tyr-Lys-Val-Pro-Gln-Leu-Glu-Ile-Val-Pro-Asn- <b><i>Ser</i></b> -Ala-Glu-Glu-Arg-Leu-		
121	130	140
His-Ser-Met-Lys-Glu-Gly-Ile-His-Ala-Gln-Gln-Lys-Glu-Pro-Met-Ile-Gly-Val-Asn-Gln-		
141	150	160
Glu-Leu-Ala-Tyr-Phe-Tyr-Pro-Glu-Leu-Phe-Arg-Gln-Phe-Tyr-Gln-Leu-Asp-Ala-Tyr-Pro-		
161	170	180
Ser-Gly-Ala-Trp-Tyr-Tyr-Val-Pro-Leu-Gly-Thr-Gln-Tyr-Thr-Asp-Ala-Pro-Ser-Phe-Ser-		
181	190	199
Asp-Ile-Pro-Asn-Pro-Ile-Gly- <b><i>Ser</i></b> -Glu-Asn- <b><i>Ser</i></b> -Glu-Lys-Thr-Thr-Met-Pro-Leu-Trp-OH		
(α <sub>S1</sub> -CN C; α <sub>S1</sub> -CN E) -Gly-		

Figura 7. Estructura primaria de la α<sub>S1</sub>-caseína B. La supresión o sustitución para las variantes A, C, D y E, respectivamente, se indican en la secuencia. Los sitios de fosforilación están indicados con *itálicas* y **negritas**. El asterisco indica la localización de otros sitios de fosforilación en especies de menor importancia de esta proteína, (Swaisgood, 2003).

Existen diversas variantes de la caseína α<sub>S2</sub> que difieren en el número de ésteres de fosfato, contienen dos residuos de cisteína (que forman puentes disulfuro –S-S-) y ningún grupo carbohidrato. Son bastantes sensibles al Ca<sup>2+</sup> y constituye cerca del 10% de las fracciones de caseína, su peso molecular es de 25,238 Da. Esta caseína es la más hidrofílica de las fracciones de caseína, como resultado de tres regiones de carga neta negativa debidas a la presencia de grupos aniónicos compuestos de residuos fosfoserilo y glutamilo, una de ellas en el extremo N-terminal y es también muy susceptible al ataque



de la quimosina y la plasmina, es decir que sufre proteólisis muy fácilmente (Farrell *et al.*, 2004).



Figura 8. Estructura primaria de la  $\alpha_{s2}$ -caseína. Los residuos serilo identificados como fosforilados en la caseína  $\alpha_{s2}$  A-11P están indicados con *itálicas y negritas*. Los residuos que se encuentran parcialmente fosforilados se presentan en *itálicas*. Los residuos potencialmente fosforilados de acuerdo a la especificidad de la caseína cinasa se indican con un asterisco, (Swaisgood, 2003).

La máxima fosforilación afecta a 12 serinas y una treonina. Esta caseína tiene un puente disulfuro entre las cisteínas que ocupan las posiciones 36 y 40 de la secuencia, y es más hidrofílica que la caseína  $\alpha_{s1}$ . En la zona del extremo C-terminal se sitúan aminoácidos hidrofóbicos y con carga neta positiva, esto se aprecia más claramente en la secuencia de aminoácidos que se presenta en la Figura 9.



Figura 9. Estructura primaria de la  $\beta$ -caseína A<sup>2</sup>-5P indicando la sustitución de los aminoácidos para las variantes A<sup>1</sup>, A<sup>3</sup>, B, C, D, E y F. Los sitios de fosforilación están indicados con *itálicas en negritas*. Los sitios de hidrólisis por la plasmina se indican con una flecha hacia abajo, (Swaigood, 2003).

La caseína  $\beta$  es la más hidrofóbica y contiene un gran número de residuos de prolina, además la carga esta heterogéneamente distribuida, posee un peso molecular de 23,988 Da. Entre pH's de 4.83 y 5.07 se encuentra su punto isoelectrico. Las micelas están formadas por 20 ó 30 moléculas, cuya asociación es muy dependiente de la temperatura y de la fuerza iónica. La agrupación de los residuos polares y de los hidrofóbicos en

regiones separadas de la secuencia primaria sugiere la formación de distintos dominios de naturaleza polar e hidrofóbica, que genera una estructura anfipática. La que corresponde al extremo C-terminal es particularmente hidrofóbica, mientras que los aminoácidos más hidrofílicos, y todos los grupos fosfato unidos a serinas, se concentran en el extremo N-terminal. En disoluciones aisladas de caseínas, tanto las  $\beta$ -caseínas como las  $\kappa$ -caseínas se auto-asocian para formar grandes complejos esféricos muy similares a una micela de detergente. Los dominios polares de las caseínas sensibles al calcio presentan una alta proporción de residuos fosfoserilo que, al pH de la leche, portan una gran carga negativa neta. La variante genética más común en la vaca está formada por 209 aminoácidos, con cinco grupos fosfato, la secuencia de aminoácidos de esta proteína se presenta en la Figura 10.

La caseína  $\kappa$  es muy distinta del resto de las caseínas. La caseína  $\kappa$  es una fracción menor (13%) que permite la existencia del estado disperso y presenta un peso molecular de 19,006 Da y un punto isoeléctrico entre 5.45 y 5.77. Sólo contiene dos residuos de cisteína capaces de formar puentes disulfuro intermoleculares y, por esta razón, la caseína  $\kappa$  se encuentra en la leche en forma de oligómeros que contienen 5-11 monómeros. Aproximadamente dos tercios de las moléculas contienen un grupo carbohidrato que está esterificado a una de las treoninas y tiene galactosamina, galactosa, y uno o dos residuos de ácido N-acetil-neuramínico, este grupo glicósido aporta carga neta a la caseína kappa; cada uno de estos grupos puede tener una o dos cargas negativas y son bastante hidrofílicos. Una particularidad de esta caseína es la presencia de una zona con carga neta positiva entre los aminoácidos 20 y 115. Esta zona con carga neta positiva permite la interacción de la caseína con polisacáridos como las carrageninas, que tienen carga negativa, ver Figura 11. La caseína  $\kappa$  se asocia

fuertemente para formar micelas que contienen más de 30 moléculas, entre las que se incluyen grupos hidratos de carbono protuberantes (Walstra *et al.*, 2001).



Figura 10. Estructura primaria de la  $\kappa$ -caseína B indicando la sustitución de los aminoácidos para las variantes A, C, E, F, F<sup>1</sup> y G. Los sitios de fosforilación están indicados con *itálicas en negritas* y los sitios de glicosilación se indican con *negritas*. El sitio específico de ruptura se indica con una flecha hacia abajo, (Swaisgood, 2003).

Como consecuencia de sus características estructurales diferenciales, existe una serie de propiedades reservadas a la  $\kappa$ -caseína, que condicionan sus interacciones y su funcionalidad: (1) Interacción con las caseínas sensibles al calcio para formar micelas, ya que actúa estabilizándolas frente al  $\text{Ca}^{2+}$ ; (2) Presenta estructura anfipática, pero con un dominio polar inerte que no precipita en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ . (3) Presencia de una secuencia de reconocimiento específica para la proteólisis limitada por la enzima

quimosina, que permite la eliminación selectiva del dominio polar, induciendo la coagulación de las micelas, localizada en los residuos Phe 105 y Met 106. Estas tres características morfofuncionales son la base que permite la formación de las micelas de caseína nativa por interacción de las caseínas en presencia de calcio, regulando la estabilidad micelar en función de determinados factores desestabilizantes, que determinan el estado sol/gel de la leche.

La  $\kappa$ -caseína, insensible al calcio, es también muy anfipática por la presencia de distintos dominios individuales hidrofóbicos y polares; sin embargo, el dominio polar de esta caseína no contiene ningún agrupamiento aniónico (Castillo-Zambudio, 2001).

Además de lo mencionado anteriormente, la caseína  $\kappa$  actúa como hidrocoloide protector; se dice que tiene “poder estabilizador”, impidiendo la precipitación de la caseína  $\alpha_s$  hasta la relación  $\kappa/\alpha_s = 1/10$  (Dalgleish, 1998).

#### **2.2.1.1.2 Micelas de caseína**

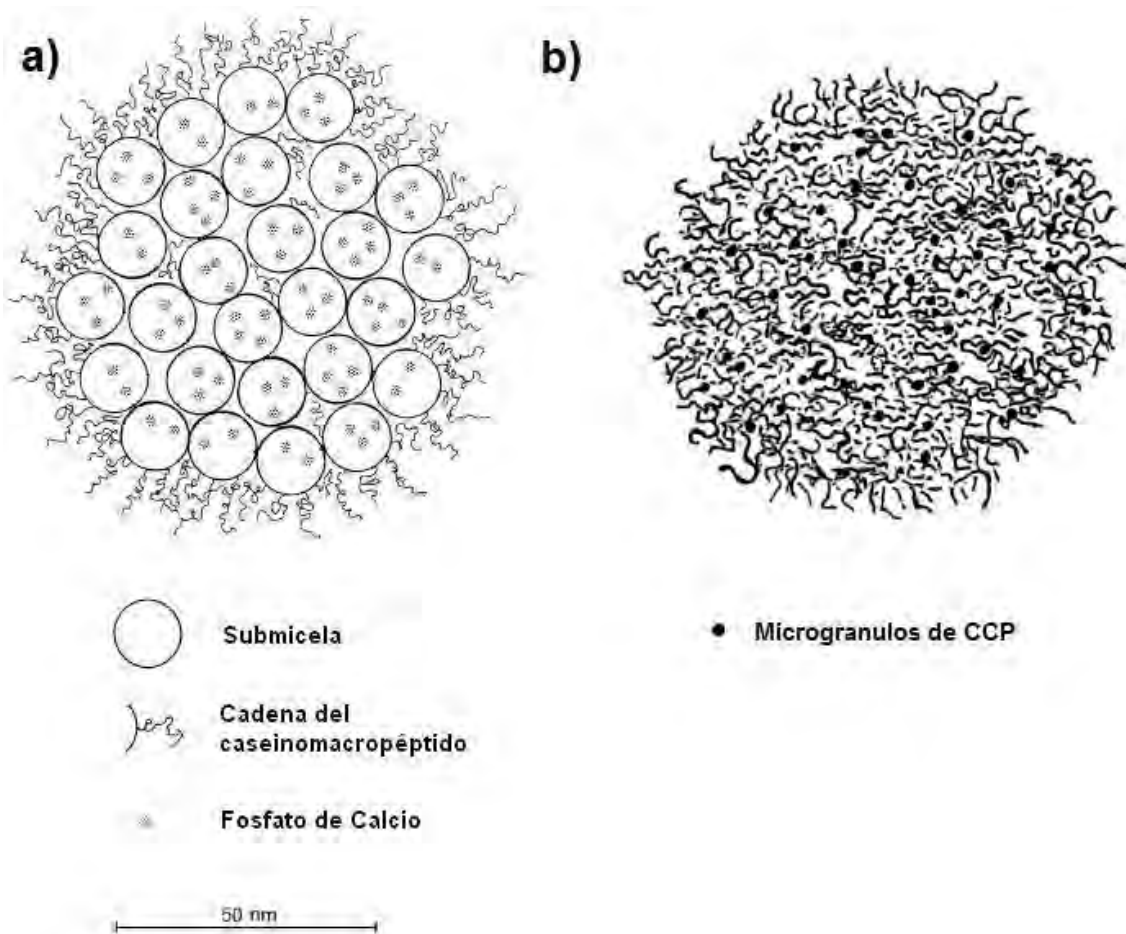
En la leche, casi todas las caseínas están presentes en forma de agregados que se conocen como micelas. Cada micela contiene diferentes moléculas de caseína:  $\alpha_{s1}^-$ ,  $\alpha_{s2}^-$ ,  $\beta^-$  y  $\kappa$ -caseína, la última casi exclusivamente localizada en la superficie de la micela de caseína y cuya proporción molar es de 4:1:4:1.6 (van Vliet, Lakemond y Visschers, 2004). Las micelas de caseína son muy estables en su ambiente natural. Las micelas de caseína son estructuras sólidas y esponjosas de tamaño coloidal dispersas en un medio acuoso (hidrosol), que por presentar gran variabilidad de tamaño (50 a 500 nm) se clasifican como sistema polidisperso. Las micelas de caseína son básicamente de naturaleza proteínica (92%), si bien contienen 8% de sales, principalmente fosfato cálcico y cantidades significativas de  $Mg^{2+}$  y citrato. Estos componentes iónicos se conocen conjuntamente como fosfato cálcico coloidal o *CCP* (Castillo-Zambudio, 2001). La

estabilización interna de la micela es debida principalmente a interacciones específicas de caseínas con fosfato cálcico coloidal, a la hidrofobicidad, a la formación de puentes de hidrógeno y a repulsiones electrostáticas (Schorsch, Jones y Norton, 2000). Recientemente, se ofrece una visión clara y rigurosa de las interacciones tan peculiares que presentan las caseínas entre sí y con los iones de calcio y las sales cálcicas, que contribuyen a la formación de las micelas de caseína y definen sus propiedades funcionales. Las estructuras primaria y terciaria singulares de estas proteínas, dan lugar a la formación de agregados aniónicos en las “caseínas sensibles al calcio. La unión del  $\text{Ca}^{2+}$  a los agregados aniónicos neutraliza la carga en dichas regiones, con la consiguiente deshidratación, lo que altera el equilibrio de las interacciones hidrofóbicas y de las fuerzas de repulsión electrostáticas, facilitando su interacción (Castillo-Zambudio, 2001).

#### 2.2.1.1.2.1 Modelos estructurales de la micela de caseína

La estructura de la micela de caseína ha atraído la atención de muchos investigadores por muchos años. El conocimiento de la estructura de caseína es importante porque las reacciones que experimentan las micelas de caseína son centrales en muchos de los productos lácteos y procesos (ej. elaboración de queso; estabilidad de leches esterilizadas, endulzadas y reconstituidas; y productos congelados). Debido a lo anterior, se han propuesto dos modelos para explicar la estructura de las micelas de caseína; el modelo de submicelas y el modelo de nanoagregados (Fox y Kelly, 2004).

En el primer modelo, las micelas de caseína están compuestas de pequeñas subunidades proteínicas, las submicelas, unidas entre sí por medio de CCP. En la Figura 12a, se observa el modelo submicelar tradicional con la salvedad de que el CCP se encuentra dentro de las submicelas en lugar de actuar como cemento intermicelar (Castillo-Zambudio, 2001).



*Figura 11. a) Modelo esquemático (seccionado transversalmente) de una micela de caseína (Walstra, 1999); b) Modelo de una micela de caseína según Holt, 1994, y modificado por Fox y McSweeney, 1998 (Fox y Kelly, 2004).*

En el segundo modelo, mostrado en la Figura 12b, las subunidades son nanoagregados de CCP distribuidos aleatoriamente en una red homogénea de caseína. Ambos coinciden en que las cadenas moleculares del C terminal de la  $\kappa$ -caseína son las protuberancias en la superficie de la micela, lo que forma la capa pilosa. Esta capa hidrofílica es la responsable de la estabilidad de las micelas ante la floculación por repulsiones estéricas y electrostáticas. Sin embargo, hay evidencias de que ambos modelos son poco satisfactorios para explicar todas las propiedades funcionales de las micelas de caseína, como la gelificación ácida y la floculación inducida por etanol. Se ha demostrado, además, que las micelas de caseína están organizadas como una red

entrecruzada y no como submicelas globulares, por lo que el modelo de submicelas es más y más cuestionable (Marchin *et al.*, 2007).

#### 2.2.1.1.2.2 Mecanismo de estabilización de la micela de caseína

En ausencia de caseína  $\kappa$  y presencia de calcio no se forman micelas con las otras caseínas, por lo que los caseinatos insolubles precipitan. El calcio contribuye a la formación de micelas cuando está presente en pequeña proporción, como en la leche (0.03 M). Una concentración diez veces mayor provoca, por el contrario, la disolución del complejo Ca- $\alpha_s$ - $\beta$ - $\kappa$ , y la precipitación de las caseínas sensibles al calcio (Dalglish, 1998).

En general, la estructura y las propiedades de las micelas de caseína son muy resistentes al calentamiento medio y moderadamente severo, pero el calentamiento muy severo, por ejemplo a 140 °C, causa la disociación, la agregación, y eventualmente la coagulación, de las micelas. La característica de la leche para soportar procesos a altas temperaturas sin el mayor cambio sensorial o fisicoquímico es uno de sus principales atributos tecnológicos.

El calentamiento a temperaturas > 75 °C tiene importantes efectos en las micelas de caseína. En principio, ocurre la desnaturalización de las proteínas del suero: de particular importancia es el desplegamiento de la  $\beta$ -lactoglobulina, lo cual resulta en la formación de un enlace disulfuro formando un complejo  $\kappa$ -caseína-proteínas del suero a través de una reacción de intercambio sulfidrido-disulfuro, en la superficie de la micela o en el suero de la leche, dependiendo de la temperatura y el pH. Esto trae varias implicaciones profundas para las propiedades de las micelas de caseína. Por ejemplo, las propiedades de coagulación de leche calentada bajo condiciones suficientes que resulten en el ataque de las proteínas desnaturalizadas, se deterioran. El tratamiento térmico también causa la



precipitación del fosfato de calcio soluble, probablemente como  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , con la salida concomitante de  $\text{H}^+$  y disminuyendo el pH.

Las micelas de caseína son relativamente estables a altas temperaturas, coagulando a  $140\text{ }^\circ\text{C}$  después de 15-20 minutos al pH normal de la leche. Esta coagulación no se debe a la desnaturalización de la proteína en el sentido estricto, pero se debe a los cambios que ocurren en el sistema como resultado de dicho tratamiento térmico. Por ejemplo, se presenta una disminución en el pH debido a la pirolisis de la lactosa, principalmente a ácido fórmico, la desfosforilación de la caseína, la fragmentación de la  $\kappa$ -caseína, la desnaturalización de las proteínas del suero y su interacción y precipitación sobre las micelas de caseína, y la precipitación del fosfato de calcio soluble como  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (Fox y Kelly, 2004).

La Figura 13 muestra la relación entre la temperatura y la duración del calentamiento que provoca la floculación de la caseína nativa, en la leche de vaca normal; (1) La presencia de iones minerales tiene una concentración crítica, que provoca un descenso de la curva de la Figura 13. A concentraciones relativamente débiles (hacia 0.2 M), el cloruro de sodio destruye las micelas y precipita parcialmente la caseína, sin fraccionamiento, a la temperatura ordinaria; (2) El descenso de la temperatura modifica la estructura de las micelas; el enlace de la caseína  $\beta$  es el más frágil y puede liberarse en el plasma  $\beta$ -caseinato de calcio soluble, al mismo tiempo que fósforo y calcio inorgánicos. De ello se sigue una disminución del tamaño de las micelas y una mayor hidratación. Se aumenta la estabilidad de la fase micelar de la leche; se manifiesta especialmente por el alargamiento del tiempo de coagulación por el cuajo, en las condiciones de la quesería (Alais, 1985).

La mayoría de los geles elaborados a partir de leche dependen de una de las siguientes características del sistema de la caseína: (1) insolubilidad en la región del punto isoeléctrico (pH = 4.6) el cual es muy utilizado en la producción de leches

fermentadas y algunos quesos frescos; (2) inestabilidad en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  seguida de una proteólisis específica por la acción de proteasas, lo cual es muy utilizado en la manufactura de muchos quesos (Fox y Mulvihill, 1990).

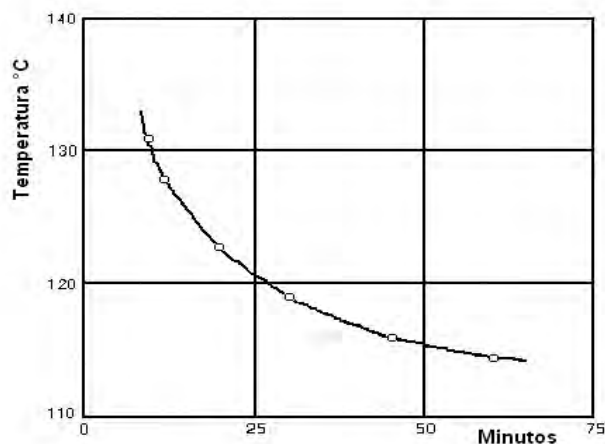


Figura 12. Floculación de la caseína nativa, en función de las condiciones de calentamiento de la leche de vaca fresca y normal (pH 6.5-6.7, concentración de calcio 26-32 mmol/kg), valores medios (Alais, 1985).

Las condiciones que impone el procesado, como cambios de temperatura, pH y concentración, alteran el equilibrio dentro del sistema salino, dentro del sistema proteínico y entre sales y proteínas, por ejemplo, las micelas se hacen menos estables en presencia de alcohol o incremento en la actividad de  $\text{Ca}^{2+}$ . La pasteurización (71.7 °C durante 15 s) o el procesado UHT (142-150 °C durante 3-6 s) incrementan irreversiblemente la cantidad de fosfato cálcico coloidal a expensas tanto del calcio soluble como ionizado y del fosfato soluble. Consecuentemente también se reduce el pH debido a la liberación de protones de los fosfatos primario y secundario. El calcio transformado en fosfato cálcico terciario no procede totalmente del suero porque el calentamiento causa también la disociación del calcio ligado a proteína. Por ello, la pasteurización y especialmente la esterilización, afectan a la distribución del tamaño de las micelas, lo que conduce a un incremento en la abundancia tanto de micelas grandes como de micelas pequeñas. El enfriamiento a 0-4 °C tiene el efecto opuesto, causando un incremento de calcio y fosfato solubles y un

aumento del pH. Parte de la  $\beta$  y de la  $\kappa$ -caseína también se disocian de la micela durante el enfriamiento. Sin embargo, estos cambios inducidos por el frío son en gran parte reversibles (Fennema y Tannenbaum, 1999).

### 2.2.2 Proteínas del suero

Las proteínas del lactosuero forman una fracción compleja. Son las sustancias no dializables contenidas en el “suero isoelectrico” (obtenido tras la precipitación de la caseína a pH 4.7) y en el “suero de la cuajada” (aunque éste también contiene caseino-macropéptido). Si se elimina una parte de las glicoproteínas (específicamente  $\kappa$ -caseino-macropéptido), las proteínas del lactosuero precipitan casi en su totalidad con el ácido tricloracético al 12%. Estas proteínas representan 17% de la materia nitrogenada de la leche de vaca (Alais, 1985). Las proteínas principales del suero son  $\beta$ -lactoglobulina y  $\alpha$ -lactoalbúmina. La  $\beta$ -lactoglobulina es una proteína globular de 162 residuos de aminoácidos en una cadena simple, mientras que la  $\alpha$ -lactoalbúmina es una proteína globular de 123 residuos de aminoácidos con una conformación muy estable entre pH 5.4 y 9 (Bottomley, Evans y Parkinson, 1990).

En la leche de vaca la  $\beta$ -lactoglobulina es la proteína del suero más abundante (2.5 a 3.1 g/L, aproximadamente el 10% del total de las proteínas de la leche). Es una pequeña proteína cuyo peso molecular es próximo a 18,360 Da. Este peso es de hecho el de un monómero; en la zona de pH que va de 3 a 7 se encuentra un dímero poco asociado que justifica el valor de PM = 36,000 Da. Se conocen cuatro variantes genéticas de la  $\beta$ -lactoglobulina de la leche de vaca. Las variantes A y B son las más frecuentes. Muestran diferencias notables en sus propiedades fisicoquímicas; la variante B es mucho más soluble en el agua en el punto isoelectrico (B = 3.1 y A = 0.6 g/L). Las estructuras primaria y terciaria de la  $\beta$ -lactoglobulina se conocen completamente. La cadena está plegada

sobre sí misma, mediante dos puentes S–S intramoleculares y queda un grupo sulfhidrilo libre, el correspondiente a la cisteína que ocupa el lugar 121 en la secuencia, ver Figura 14. Este tiol es muy importante en la asociación de la  $\beta$ -lactoglobulina con otras moléculas, especialmente con la  $\kappa$ -caseína durante el calentamiento de la leche.

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

Figura 13. Estructura primaria de la  $\beta$ -lactoglobulina A. La sustitución de los aminoácidos en las variantes genéticas está indicada. Hay un enlace disulfuro entre las cisteínas 66 y 160. El otro enlace disulfuro está formado entre las cisteínas 119 y 121. Hay una distribución del 50:50 del enlace entre las posiciones 119 y 121. La cisteína en la posición 121 siempre está involucrada en el enlace, (Swaisgood, 2003).

El complejo formado por ambas proteínas es más estable que sus componentes por separados; el enlace se realiza mediante un puente disulfuro. La  $\beta$ -lactoglobulina es el principal portador de grupos sulfhidrilo, que son modificados o separados en el curso de la desnaturalización y que intervienen en la formación del “gusto cocido” de la leche tratada térmicamente.

La  $\alpha$ -lactoalbúmina, es el componente proteínico más característico del suero lácteo, pues parece estar presente en la leche de todos los mamíferos. La  $\alpha$ -lactoalbúmina es una pequeña proteína de un peso molecular próximo a 14,200 Da que contiene 4 puentes –S–S– y con un punto isoeléctrico de alrededor de 4,8. Se ha observado la presencia de dos variantes genéticas A y B. La variación no se refiere más que a un aminoácido. Desde

el punto de vista funcional, la  $\alpha$ -lactoalbúmina es el factor de regulación de un sistema enzimático original: la proteína A, que es en sí misma una enzima que transfiere galactosa sobre la glucosamina (para formar lactosamina u otros derivados); la proteína B es idéntica a la  $\alpha$ -lactoalbúmina; se enlaza con la proteína A por simple adsorción y tiene el papel de modificador de la especificidad. El complejo formado por las dos proteínas transfiere la galactosa a la glucosa asegurando así la síntesis de la lactosa. La  $\alpha$ -lactoalbúmina es considerablemente rica en triptófano: cuatro residuos por mol, o sea, alrededor de 6%. Puesto que la  $\alpha$ -lactoalbúmina no contiene grupos -SH libres no debería poder ligarse a otras proteínas por puentes disulfuro; a pesar de ello, ciertos autores sugieren que puede tomar parte en la formación de complejos con la caseína  $\kappa$ , lo que implicaría una modificación estructural (Alais, 1985).

La  $\alpha$ -lactalbúmina tiene un ión calcio unido, que es imprescindible en el mantenimiento de su estructura y de su actividad como reguladora de la galactosiltransferasa. La eliminación del calcio produce la estructura llamada "molten globule", un estado intermedio de desnaturalización que ha sido muy utilizado como modelo en la desnaturalización de proteínas. Este estado, con la proteína en forma "apo", es mucho menos resistente que la forma saturada con calcio a agentes desnaturalizantes, como el calentamiento, la secuencia de aminoácidos de esta proteína se presenta en la Figura 15.

La gelificación de las proteínas del suero es el resultado de dos tipos de interacciones; físicas (electrostáticas e hidrofóbicas) y químicas (puentes disulfuro) entre las moléculas constitutivas de las proteínas. La desestabilización del plegamiento terciario nativo de las proteínas aumenta sus interacciones a un nivel que causa en última instancia la formación de una red y gelificación estables. La desestabilización puede inducirse por la adición de químicos, presión hidrostática, calentamiento, enfriamiento e hidrólisis enzimática parcial.

Cada uno de estos procesos induce un desplegamiento parcial o total resultando en la agregación de las proteínas y finalmente la formación del gel (van Vliet, Lakemond y Visschers, 2004).

<b>1</b>										<b>Arg in Variant B</b>									
Glu	Gln	Leu	Thr	Lys	Cys	Glu	Val	Phe	<b>Gln</b>	Glu	Leu	Lys	Asp	Leu	Lys	Gly	Tyr	Gly	Gly
<b>21</b>										<b>31</b>									
Val	Ser	Leu	Pro	Glu	Trp	Val	Cys	Thr	Thr	Phe	His	Thr	Ser	Gly	Tyr	Asp	Thr	Glu	Ala
<b>41</b>										<b>51</b>									
Ile	Val	Glu	Asn	Asn	Gln	Ser	Thr	Asp	Tyr	Gly	Leu	Phe	Gln	Ile	Asn	Asn	Lys	Ile	Trp
<b>61</b>										<b>71</b>									
Cys	Lys	Asn	Asp	Gln	Asp	Pro	His	Ser	Ser	Asn	Ile	Cys	Asn	Ile	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr
<b>81</b>										<b>91</b>									
Leu	Asn	Asn	Asp	Leu	Thr	Asn	Asn	Ile	Met	Cys	Val	Lys	Lys	Ile	Leu	Asp	Lys	Val	Gly
<b>101</b>										<b>111</b>									
Ile	Asn	Tyr	Trp	Leu	Ala	His	Lys	Ala	Leu	Cys	Ser	Glu	Lys	Leu	Asp	Gln	Trp	Leu	Cys
<b>121</b>		<b>123</b>																	
Glu	Lys	Leu	OH																

Figura 14. Estructura primaria de la  $\alpha$ -lactoalbúmina B. La posición del aminoácido que se sustituye en la variante genética A está indicada. Los enlaces disulfuro están formados entre los siguientes pares de residuos de cisteína: 6 y 120, 28 y 111, 61 y 77 y 73 y 91, (Swaisgood, 2003).

Numerosos estudios sobre la estabilidad térmica de la leche han demostrado que los niveles de disociación de la  $\kappa$ -caseína de las micelas de caseína son progresivamente más elevados conforme el pH de la leche se incrementa por encima de pH 6,7 antes del tratamiento térmico. Esta disociación de la  $\kappa$ -caseína se ha utilizado para explicar la inusual pH-dependencia de la estabilidad térmica de la leche a altas temperaturas (por encima de unos 120 °C).

Se sabe que las proteínas de suero de leche desnaturalizadas interactúan con la  $\kappa$ -caseína a través de reacciones de intercambio tiol-disulfuro. Esta disociación de la  $\kappa$ -caseína a pH superior a 6.7 puede explicar los bajos niveles de proteína desnaturalizada de suero de leche que interactúa con las micelas de caseína a pH elevado (Anema, 2007).

### **3. ESTUDIOS PREVIOS**

Antes de comenzar con la recopilación de la información existente para sistemas de proteínas-polisacáridos es conveniente aclarar algunos términos que se utilizan a lo largo de este texto.

#### **3.1 Propiedades funcionales**

En primer lugar es importante definir las propiedades funcionales. Durante las dos últimas décadas, el término funcional se ha dado principalmente a un gran grupo de productos y componentes que contribuyen a modificar las propiedades reológicas y sensoriales de los alimentos; sin embargo, también se les llama así a los alimentos nutraceuticos o a los alimentos para uso específico de la salud, que se utilizan para mejorar la salud o potenciar el rendimiento del organismo humano. Este documento se enfocara en el primer grupo. Las propiedades funcionales reflejan atributos intrínsecos de los materiales alimenticios tales como: composición, estructura, así como las posibles interacciones con otros componentes de los alimentos. Las propiedades funcionales pueden ser afectadas por variables de su entorno físico, químico, pH, temperatura, fuerza iónica, etc. (Sikorski y Piotrowska, 2007).

En otra definición, una propiedad funcional es “toda propiedad no nutricional que influye en el comportamiento de algunos componentes de un alimento”. Las propiedades funcionales se pueden clasificar en:

- Propiedades sensoriales.
- Propiedades reológicas.

### 3.2 Floculación por agotamiento

El segundo concepto que se debe precisar es el de floculación por agotamiento, puesto que éste es el mecanismo más utilizado para explicar las interacciones que se presentan entre las proteínas y los polisacáridos.

Cuando se introduce un polímero dentro de un sistema coloidal, muy comúnmente se observa la floculación. Esta inestabilidad de las partículas puede deberse a uno de dos mecanismos diferentes – floculación por agotamiento o floculación por unión.

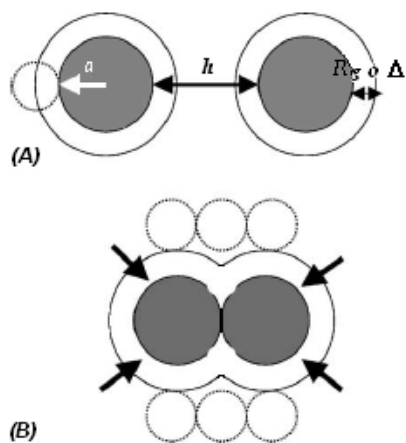
Para comprender la naturaleza del tipo de inestabilidad inducida por la adición de polímero necesitamos comprender el concepto de parámetro de interacción superficial,  $\chi_s$ . Esta cantidad es una medida de las interacciones netas entre la superficie del polímero y el disolvente. Un valor positivo de  $\chi_s$  lleva a la adsorción del polímero sobre la superficie de las partículas. A bajas concentraciones de polímero, donde la adsorción del polímero es insuficiente para dar plena cobertura superficial, una cadena de polímero puede adsorberse en dos partículas discretas, causando una agregación. A esto se le llama floculación por unión.

Sin embargo,  $\chi_s$  puede ser menor que el valor crítico de  $\chi_{s,crit}$ , entonces la adsorción del polímero sobre la superficie es desfavorable. En estas circunstancias, el centro de masa de la hebra del polímero se desplaza de interfase, produciendo una zona de “polímero agotado”. Este fenómeno se ha denominado “agotamiento” y puede inducir una agregación de partículas débil y reversible (Jenkins y Snowden, 1996).

La comprensión moderna de la floculación por agotamiento se encuentra resumida en un artículo publicado por Radford y Dickinson (2004) en el cual explican que la definición de este mecanismo se originó por Asakura y Oosawa en 1958, ellos consideraron una disolución de macromoléculas no adsorbentes (esferas duras) entre dos platos (dos grandes esferas duras) en función de la distancia de separación. Entre más cerca se



dibujen las superficies de los platos (o grandes esferas), la distancia entre las dos superficies comienza eventualmente a ser menor que el “diámetro” de las macromoléculas (o esferas pequeñas,  $< 2R_g$ ) y sólo el disolvente está presente en el espacio intersticial (Figura 16A). Si las macromoléculas no adsorbentes son polímeros flexibles estos son excluidos como resultado de la reducción en la entropía conformacional, conforme la abertura disminuye, lo cual no es compensado por la energía de adsorción. La concentración de las entidades no adsorbentes se incrementa afuera de la abertura y crea un gradiente de presión osmótica entre el espacio intersticial y el resto de la disolución. Como consecuencia, las partículas coloidales se ponen en contacto (Figura 16B). Las especies no adsorbentes forman eficazmente un radio de exclusión alrededor de cada partícula grande. Esto se conoce como capa de agotamiento ( $\Delta$ ) con un espesor característico ( $R_g$ ) que dependen del tamaño de las especies no adsorbentes (Figura 16).



*Figura 1. Diagrama esquemático de la floculación por agotamiento. (A) Dos esferas grandes (radio  $a$ ) separadas por una distancia de superficie a superficie,  $h$ , poseen una capa de floculación ( $\Delta$ ) de un espesor del orden del radio  $R_g$  de la especie no adsorbida (círculos punteados). (B) La presión osmótica externa del medio empuja a las grandes esferas en dirección a las flechas uniéndolas. Para mayor claridad, esté diagrama no es a escala: el tamaño del radio de las grandes esferas de las especies no adsorbidas es generalmente mucho mayor (Radford y Dickinson, 2004).*

El espesor de la capa de agotamiento es una medida del intervalo de la interacción por agotamiento; por lo tanto, cuanto más grande es la especie no adsorbente, más grande es

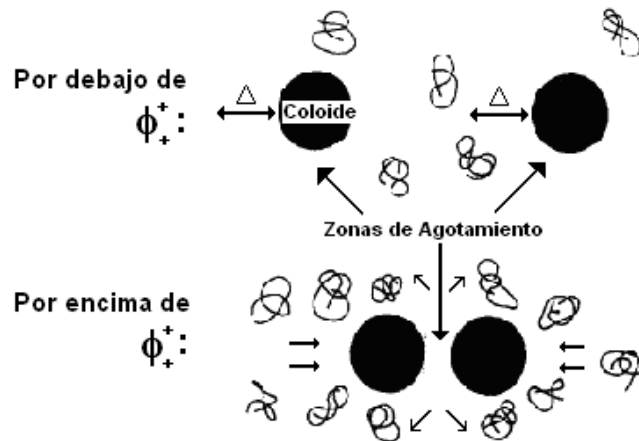
el intervalo de la fuerza. Asakura y Oosawa predijeron que, además del tamaño, la forma de las macromoléculas no adsorbentes era importante, así pues, la especie más eficiente para llevar a cabo el agotamiento tiene una conformación de varilla rígida. Posteriormente se encontró que el modelo de Asakura y Oosawa era inexacto a altas concentraciones de especies no adsorbentes, donde se ha postulado que ocurre el fenómeno de “estabilización por agotamiento”.

Después se estudiaron principalmente dos tipos de teorías: (1) teorías de exclusión de volumen y (2) modelos de densidad de segmentos de polímero. Las teorías de exclusión de volumen asumen que las especies no adsorbentes son completamente excluidas de su espacio intersticial, mientras que en las teorías de densidad de segmentos de polímero las especies no adsorbentes se reducen más gradualmente conforme la abertura interpartícula comienza a ser más pequeña.

Algunos investigadores modificaron la teoría de Asakura y Oosawa de agotamiento por exclusión de volumen de paredes de esferas duras para tomar en cuenta las altas concentraciones de polímero no adsorbido.

Vrij usó el segundo coeficiente virial ( $B_2$ ) para describir los cambios en el radio de giro ( $R_g$ ) del polímero no adsorbente a altas concentraciones de polímero (y bajo condiciones pobres de disolvente). Se demostró que, por el cambio de  $B_2$ , la molécula de polímero no adsorbente comienza a ser efectivamente más pequeña, disminuyendo el intervalo de la fuerza de agotamiento. Sin embargo, la estabilización por agotamiento no puede predecirse. El modelo de Sperry, el cual también se menciona en el artículo de Radford y Dickinson (2004) desarrolla la idea de un incremento del intervalo de la fuerza de agotamiento (espesor de la capa de agotamiento,  $\Delta$ ) por medio de un incremento en el peso molecular (y por lo tanto  $R_g$ ) del polímero no adsorbente. Cuanto mayor es el tamaño del polímero no adsorbente, mayor es el valor de  $\Delta$  y menor es la fracción del volumen

crítico del polímero no adsorbente ( $\phi^+$ ) requeridos para causar la floculación. Otros autores predijeron la estabilización del polímero no adsorbente a altas concentraciones, vía una pequeña barrera cinética a la floculación. Esta condición se denota en la literatura por la cantidad  $\phi_+^+$ , la fracción de volumen crítico de polímero para la floculación. Debido al gran número de macromoléculas presentes, algunos polímeros probablemente residan en el espacio intersticial y generen una presión osmótica extra que balancea la presión osmótica externa de la disolución restante. Algunas capas del polímero en la abertura de separación podrían prevenir la floculación. Esta es la base de la barrera cinética de la floculación; la condición de equilibrio termodinámico es la floculación fuerte en el mínimo intervalo atractivo. La Figura 17 ilustra este fenómeno para fracciones volumen de un polímero por encima y por debajo de la fracción de volumen crítica del polímero requerida para inducir la floculación,  $\phi_+^+$ .



*Figura 2. Ilustración esquemática de la floculación por agotamiento.  $\phi_+^+$  es la fracción volumen crítica de polímero requerida para la floculación. Para fracciones volumen mayores a  $\phi_+^+$ , ocurre la sobreposición de las zonas de agotamiento (Jenkins y Snowden, 1996).*

Según Jenkins y Snowden (1996) para concentraciones suficientemente bajas de partículas, la disolución fuera de la zona de agotamiento retiene la mayor cantidad de

polímero. Como las partículas de enfoque, el volumen de la zona de agotamiento disminuye y por lo tanto, el disolvente es desplazado de la región interparticular hacia la disolución. La energía libre del sistema es por lo tanto menor ya que el disolvente se transfiere de una región de alto potencial químico a una con menor potencial químico.

Otros investigadores, desarrollaron el perfil de densidad de segmentos de polímeros para la floculación por agotamiento de esferas rígidas. Feigin y Napper también predijeron una fuerza repulsiva pequeña que inhibe la floculación del polímero no adsorbente a altas concentraciones. En la teoría de Fleer-Scheutjens-Vincent, sin embargo, se confirma que cualquier agotamiento “re-estabilizado” es termodinámicamente, en origen, debido a la carencia de suficientes fuerzas atractivas. La fuerza impulsora osmótica para la floculación por agotamiento ocasiona la disminución del tamaño efectivo del polímero no adsorbente, llevando a la reducción del intervalo de la interacción por agotamiento (Radford, 2004).

### **3.3 Sistemas carrageninas-caseína**

El conocimiento de las interacciones de los complejos entre proteínas y polisacáridos y, posteriormente, las funcionalidades de los complejos derivados de estas interacciones es todavía algo limitado para polisacáridos como carrageninas y pectinas, que son actualmente los polisacáridos gelificantes más utilizados en la industria alimentaria. Es importante la comprensión de las interacciones que se presentan entre la gelana y las proteínas lácteas; sin embargo, no hay información en la literatura, por lo cual se presentan antecedentes de polímeros con un comportamiento similar al de dicho sistema. Las carrageninas son polisacáridos sulfatados que se obtienen de las algas rojas y se clasifican en tres tipos –  $\lambda$ -,  $\iota$ -,  $\kappa$ -carragenina – de acuerdo con el número de grupos sulfato por unidad de disacárido repetitiva de  $\beta$ -1,3- y  $\alpha$ -1,4- residuos de galactosa unidas;

tres, dos y uno, respectivamente. Los grupos sulfato dan una carga negativa a las carrageninas lo que afecta su funcionalidad. La  $\lambda$ -carragenina no forma geles, la  $\iota$ -carragenina forma geles suaves y elásticos, mientras que la  $\kappa$ -carragenina forma geles fuertes y quebradizos. La gelificación de la  $\iota$ -carragenina en disoluciones acuosas ocurre por una transformación de hebra aleatoria a doble hélice. Para la  $\kappa$ -carragenina, la formación del gel depende de una posterior agregación de las dobles hélices.

Las carrageninas se usan extensamente en productos lácteos ya que son capaces de estabilizar y formar geles con las proteínas de la leche en dosis bajas (0.03% para  $\kappa$ -carragenina y 0.05% para  $\iota$ -carragenina). Este efecto es causado debido a la interacción directa entre la micela de caseína y la  $\iota$ - o  $\kappa$ -carragenina. Este fenómeno, es llamado reactividad láctea, y se explica por la interacción entre las hélices cargadas negativamente de la carragenina y la  $\kappa$ -caseína situada en la periferia de la micela de caseína (Arltoft *et al.*, 2007).

Drohan *et al.* (1997) han sugerido que la gelificación de los productos lácteos con  $\kappa$ -carragenina puede deberse a la presencia de iones  $K^+$  y  $Ca^{2+}$  en la leche, ya que estos cationes son importantes en la gelificación del polisacárido. Encontraron que, para una concentración de carragenina superior a 0.018%, la formación del gel involucra principalmente enlaces carragenina-carragenina y no enlaces carragenina-caseína o caseína-caseína. Sin embargo, no descartaron totalmente la posibilidad de una interacción electrostática entre la  $\kappa$ -caseína y la  $\kappa$ -carragenina.

En otro estudio, Langendorff *et al.* (1997) consideraron la posibilidad de la adsorción de las cadenas de  $\iota$ -carragenina en la parte exterior de la micela de caseína, y propusieron un mecanismo que involucra el recubrimiento de las micelas por cadenas de  $\iota$ -carragenina, lo que lleva a un sistema estable. Después de la adición de un exceso de  $\iota$ -carragenina, puede ocurrir un proceso secundario de floculación por agotamiento,

llevando a la sedimentación de las micelas de caseína cubiertas con  $\iota$ -carragenina. Sin embargo, mencionan que el mecanismo de floculación por agotamiento por él mismo puede explicar el comportamiento de estos sistemas.

En años recientes, Arltoft *et al.* (2007) estudiaron el comportamiento reológico y la microestructura de geles elaborados a partir de,  $\iota$ -,  $\kappa$ - o carragenina híbrida en baja (0.2–0.25%) y alta (0.7–1.0%) concentración en leche descremada y encontraron que:

### **3.3.1 $\kappa$ -carragenina-caseína**

Cuando la concentración de carragenina en leche es baja, la fase continua se compone de micelas agregadas y hélices de  $\kappa$ -carragenina asociadas en su superficie. Sin embargo, aunque la carragenina interacciona con la superficie de la micela, son las interacciones carragenina-carragenina las interacciones dominantes y por lo tanto las que mantiene al gel unido (Figura 18A). Sin embargo, las interacciones entre las hélices asociadas y las micelas le proporcionan fuerza adicional al gel. Por otro lado, cuando la concentración de carragenina es alta; las hélices asociadas de la  $\kappa$ -carragenina se unen a las micelas y las hélices restantes inducen la floculación. Así pues, se puede suponer que estará presente una saturación de la capa de  $\kappa$ -carragenina en la superficie de las micelas o agregados micelares, causando la formación de una capa suave hacia los límites de la fase continua de  $\kappa$ -carragenina (Figura 18B). Se puede asumir que estas diferencias son el resultado combinado de dos factores: las asociaciones de dobles hélices de  $\kappa$ -carragenina con las micelas y la floculación de las micelas. En este caso las características del gel están dominadas por interacciones de  $\kappa$ -carragenina.

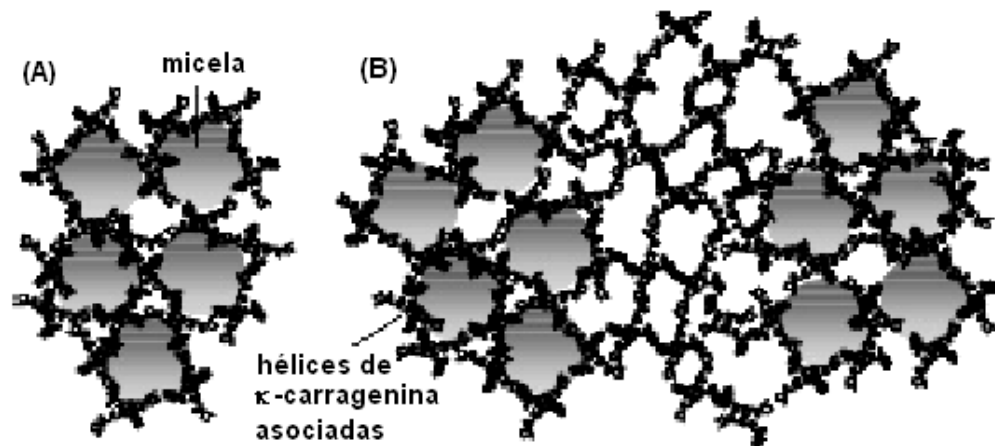


Figura 3. Representación esquemática de la microestructura de geles de leche-κ-carragenina de (A) 0.2% de κ-carragenina, (B) 0.7% de κ-carragenina (Artoft et al., 2007).

### 3.3.2 ι-carragenina-caseína

Cuando la concentración de carragenina en leche es baja, los autores proponen la formación de una red verdadera entre las micelas de caseína y la ι-carragenina como consecuencia de que las hélices de ι-carragenina interactúan con las micelas de caseína. La diferencia principal con la κ-carragenina es que la ι-carragenina a bajas concentraciones se encuentra en forma de hélice y no sufre de agregaciones, por lo cual las características del gel están dominadas por interacciones entre la ι-carragenina y la micela (Figura 19A). Mientras que para altas concentraciones de ι-carragenina la floculación ocurre, cuando se forma una saturación de la capa de ι-carragenina, y un gel de ι-carragenina-ι-carragenina constituye la fase continua, como sucedió para la κ-carragenina (Figura 19B). En este caso, al igual que en el anterior, las características del gel están dominadas por interacciones del tipo ι-carragenina-ι-carragenina.

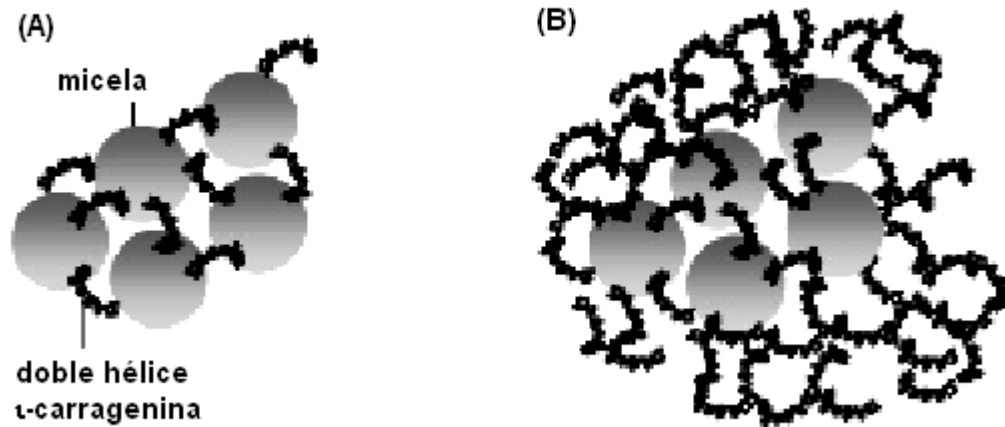
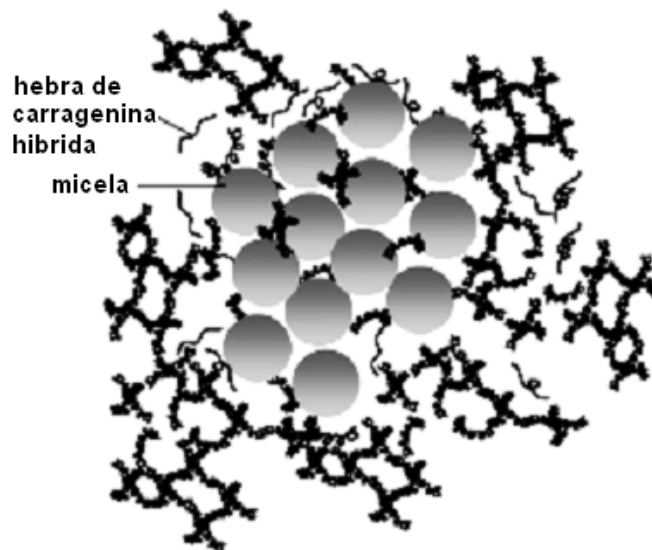


Figura 4. Representación esquemática de la microestructura de geles de leche- $\iota$ -carragenina de (A) 0.25% de  $\iota$ -carragenina, (B) 1.0% de  $\iota$ -carragenina (Artoft et al., 2007).

### 3.3.3 Carragenina híbrida-caseína

En contraste con la  $\kappa$ - y  $\iota$ -carragenina, a bajas concentraciones de carragenina híbrida (las carrageninas híbridas son una mezcla de unidades repetitivas de cadenas con  $\iota$  y  $\kappa$ -carrageninas en cada molécula) se observan grandes agregados. Esto sugiere que para carragenina híbrida ocurre una floculación inicial, antes de que la acumulación de interacciones carragenina-micela sea capaz de detenerla. Se sugiere que ocurren ambas interacciones (las de  $\iota$ - y  $\kappa$ -carragenina). Pero hay un número limitado de hélices disponibles y la carragenina híbrida en forma de hebra probablemente interfiere con la formación del gel. En el caso de alta concentración de carragenina, se puede asumir la presencia de un mayor número de hélices las cuales detienen el desarrollo de la microestructura en un estado de menor floculación (Figura 20).





*Figura 5. Representación esquemática de la microestructura de geles de 0.25% de carragenina híbrida-leche (Artoft et al., 2007).*

En conclusión,  $\kappa$ -,  $\iota$ - y la carragenina híbrida interactúan con las micelas de caseína, pero tienen diferente impacto, lo que determina la microestructura y textura finales.

Previo a este estudio, se concluyó que sin importar el tipo de carragenina utilizada, existía una interacción específica entre el grupo sulfato de la carragenina y una región muy pequeña cargada positivamente, situada entre los residuos 97 y 112 de la  $\kappa$ -caseína. Esta región específica está situada en los límites entre las partes hidrofóbicas (residuos 1-105) e hidrofílicas (residuos 106-169) de la  $\kappa$ -caseína. Cuando se trata de caseínas  $\alpha_S$  y  $\beta$  se pensó en una exclusión de volumen para explicar los cambios reológicos inducidos por la presencia de la proteína (Bourriot, Garnier y Doublier, 1999).

### **3.4 Otros polisacáridos y caseínas**

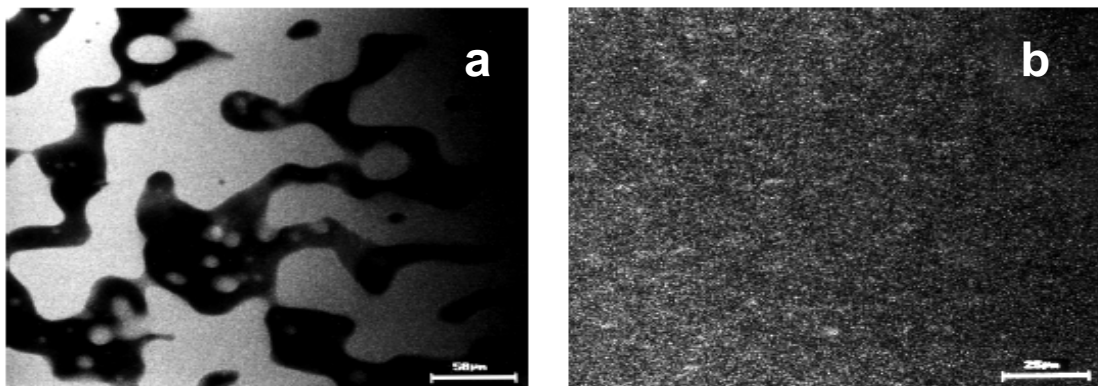
Aunque los sistemas carragenina-leche son los más estudiados, existen trabajos en los que se reporta la interacción de otros polisacáridos con las caseínas de la leche. A continuación se presentan algunos de estos trabajos.

### 3.4.1 Goma guar y caseína

Bourriot, Garnier y Doublier (1998) demostraron que el comportamiento de sistemas de caseína micelar y goma guar difiere significativamente del de los componentes individuales. Se observa una transición de un comportamiento de disolución macromolecular al de un sistema ligeramente estructurado cuando se adiciona caseína a la goma guar. Con base en observaciones microscópicas, se encontró que este fenómeno se debe sin duda a la separación de fases. Cuando se trata de separación de fases en sistemas de polímeros mixtos, el mecanismo más evocado es la incompatibilidad termodinámica. Sin embargo, cuando están implicadas partículas esféricas, la separación de fases también puede sugerir floculación por agotamiento. La incompatibilidad termodinámica implica la exclusión de volumen entre las especies de polímeros lo que requiere que las macromoléculas estén individualizadas y por lo tanto, disueltas. Esto está relacionado con la entropía del sistema y surge del hecho de que la energía libre de la mezcla se reduce al mínimo. Muchos sistemas de mezclas de biopolímeros exhiben separación de fases a través de este sistema. En el caso de la floculación por agotamiento, por otra parte, la estabilidad de una suspensión de partículas disminuye a causa de la adición de un polímero. Este tratamiento teórico explica cómo una suspensión de partículas flocula por la exclusión de una molécula de polímero a partir de un espacio estrecho entre las esferas. El resultado es una diferencia en la concentración del polímero entre el espacio interparticular y la región que rodea las partículas. La presión osmótica que rodea el polímero es por lo tanto mayor que en la zona excluida que contiene al disolvente puro. Las partículas son empujadas juntas debido a la fuerza osmótica atractiva adicional generada entre las partículas. Esta fuerza depende del tamaño y la forma de las moléculas de polímero. Los cálculos de los potenciales de interacción deberían permitir a una teoría describir estos mecanismos con base en la energía potencial total en

combinación de atracción de London-van der Waals, repulsión electrostática, repulsión estérica, y atracción por agotamiento.

Las micelas de caseína están organizadas en entidades supramoleculares grandes las cuales pueden ser consideradas como partículas esféricas. Están cubiertas por  $\kappa$ -caseína, la cual las estabiliza en una suspensión a través de repulsiones estéricas y electrostáticas. Sin embargo, la capa pilosa previene la adsorción de polímeros neutros en las micelas. Una dispersión que contiene caseína micelar, esta por lo tanto, cercana a una disolución macromolecular de partículas en suspensión. Cuando se adiciona goma guar a la suspensión de caseína, esta puede ser excluida del espacio entre las micelas, siempre que la concentración de caseína sea suficiente. La barrera energética puede cruzarse lo que lleva a la agregación de las micelas. Los flóculos de micelas de caseína tienden a agregarse libremente para formar una red, lo cual constituye la fase continua como se aprecia en las observaciones de microscopía confocal (CLSM, Figura 21). Esto explica por qué se observa un incremento en la viscosidad del medio y un cambio en las propiedades viscoelásticas cuando se adiciona caseína a la goma guar. En conclusión, el comportamiento reológico de estas mezclas está gobernado por una red de caseína floculada, el galactomanano que enriquece la fase continua contribuye en menor medida a la reología del sistema floculado.



*Figura 6. Microestructura de mezclas que contienen a) 0.2% de goma guar y 3% de caseína micelar, b) 0.2% de goma guar y 0.3% de caseína micelar. Observación en 364 nm (Bourriot, Garnier y Doublier, 1998).*

### 3.4.2 Pectinas y caseína

En otro estudio realizado por Marozziene y de Kruif (2000), con pectinas y micelas de caseína se demostró que las pectinas no se adsorben en las micelas de caseína presentes en leche descremada en su pH natural de 6.7. Se llegó a esta conclusión basado en que en las mediciones de dispersión de luz dinámica, el tamaño de partícula no cambia para concentraciones por arriba de 0.1% p/p. Sin embargo, en algunas muestras se observó separación de fases, como resultado de una interacción segregativa entre las micelas de caseína y las pectinas, la disolución de macromoléculas se separa en dos fases cerca de una cierta concentración de pectina.

Debido a que la pectina no se adsorbe a pH 6.7, los autores atribuyen la separación de fases a la llamada interacción de agotamiento. Este fenómeno se representa esquemáticamente en la Figura 22. Las moléculas de pectina (polímero) están agotadas en la superficie de la micela de caseína. La superposición de las capas lleva al agotamiento lo que pone a disposición un volumen extra de moléculas de pectina. Dicho de otro modo, en el volumen superpuesto la presión osmótica (polímero) efectiva se reduce y esto se traduce en una atracción efectiva de las micelas de caseína. Si la atracción por agotamiento es lo suficientemente fuerte el sistema se separa.

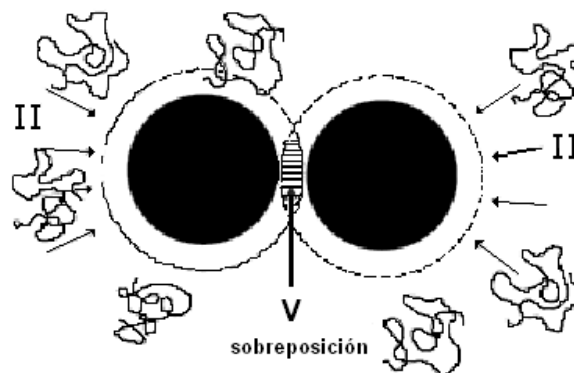


Figura 7. Interacción por agotamiento entre dos partículas coloidales inducida por un polímero disuelto (Marozziene y de Kruif, 2000).

Para sistemas de pectina y micelas de caseína a pH 5.3, el tamaño aparente de partícula muestra un máximo típico y después los valores permanecen constantes. Este comportamiento se atribuye a la adsorción y en particular a la floculación de la pectina. Sin embargo, la cantidad de pectina adsorbida depende de las propiedades de conformación de la pectina. Si la cantidad de pectina aumenta por encima de la cobertura, comienza la separación de fases del sistema debido a la floculación por agotamiento. Se puede observar la siguiente secuencia a pH 5.3 cuando se incrementa la concentración de pectina: estable–floculación–estable–floculación por agotamiento–gel estable.

Finalmente si el pH se incrementa lentamente desde 5.3 hasta 6.7 ocurre un proceso de desorción de las moléculas de pectina de la superficie de las micelas de caseína, lo que hace evidente que la adsorción de la pectina es un proceso reversible.

Con el fin de comparar los mecanismos de interacción de diversos polisacáridos, en años recientes, Everett y McLeod (2005) investigaron el mecanismo de estabilización de goma guar, goma de algarrobo, xantana, pectina de bajo metoxilo y  $\lambda$ -carragenina en yogurt, utilizando reometría dinámica oscilatoria y mediciones de capacidad de retención de agua.

Se encontró que a altas concentraciones de pectina de bajo metoxilo (por arriba de  $1 \text{ g L}^{-1}$ ) las unidades de proteína están cada vez más reguladas por la presencia del polisacárido y los agregados se estabilizan parcialmente por interacciones estéricas. Esto reduce la fracción de volumen efectiva, reduciendo la viscosidad aparente, e incrementando la capacidad de retención de agua conforme la red de caseína comienza a perder su integridad estructural y expulsa suero.

Para la  $\lambda$ -carragenina se observó una reducción en la viscosidad aparente y un incremento en la capacidad de retención de agua por arriba de  $3 \text{ g L}^{-1}$  de  $\lambda$ -carragenina debido probablemente a un mecanismo de estabilización estérica parcial con una

agregación residual. En este caso, la estructura se desdobla parcialmente para revelar agregados de caseínas con una fracción de volumen efectiva de agregados baja y una baja viscosidad.

Estos polímeros reaccionan por medio de mecanismos de adsorción con las micelas de caseína, por lo cual se plantea que para incrementos en la concentración de  $\lambda$ -carragenina y pectina de bajo metoxilo el mecanismo de estabilización-desestabilización sufre las siguientes transiciones (1) floculación, (2) estabilización estérica, (3) floculación por agotamiento del polisacárido no adsorbido en el suero y (4) agregados coloidales atrapados en la red del polímero viscoso.

Por otra parte, los polisacáridos neutros no presentan interacciones electrostáticas con los agregados de caseína, así pues conforme la concentración de goma guar aumenta a  $1 \text{ g L}^{-1}$  la estructura de micelas agregadas comienza a ser más compacta a causa de la floculación por agotamiento. La fracción de volumen efectiva resultante es menor reduciendo así la viscosidad aparente. La goma guar probablemente forma una fase continua en concentraciones de  $5 \text{ g L}^{-1}$  la cual atrapa los agregados compactos de caseína.

Para la goma de algarrobo se encontró un comportamiento similar al de la goma guar aunque los agregados no son atrapados tan eficientemente como para inhibir la ruptura de los enlaces entre agregados, como en el caso de la goma guar.

Por último la xantana presentó el mismo comportamiento que los polisacáridos anteriores. En este caso el mecanismo de floculación por agotamiento también tiene lugar.

Cuando aumenta la concentración de polisacáridos que no son adsorbidos a las micelas de caseína el mecanismo de estabilización-desestabilización sufre las siguientes transiciones: de floculación por agotamiento a partículas coloidales atrapadas en la red del polímero viscoso.

### 3.5 Proteínas del suero y polisacáridos

Syrbe, Bauer y Klostermeyer (1998) estudiaron disoluciones de polisacáridos aniónicos y proteínas del suero incluyendo, pectina de alto metoxilo, alginato de sodio o carboximetilcelulosa de sodio, de pH 6 a 7. En este estudio se encontró que la segregación polimérica en estos sistemas no ocurre a menos que las proteínas del suero se desnaturalicen térmicamente o por tratamiento con altas presiones. Después ocurre de manera paralela la separación de fases y la gelificación de las proteínas y el sistema es atrapado en un estado de no-equilibrio. Dependiendo de las condiciones de procesamiento, las estructuras de los geles de las proteínas del suero pueden variar de redes de partículas fuertemente interconectadas a microgeles de esferas que fluyen libremente, claramente distintos a los geles de ramificaciones finas observados en ausencia de los polisacáridos aniónicos.

La gelificación térmica de disoluciones de  $\beta$ -lactoglobulina-pectina de bajo metoxilo se ve influenciada significativamente por iones calcio en ambos lados del punto isoeléctrico. A pH 3.5 el incremento de la auto-asociación de la pectina de bajo metoxilo en presencia de altos niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  reduce su habilidad para formar complejos insolubles con la región positiva de la  $\beta$ -lactoglobulina. A pH 6.5, el  $\text{Ca}^{2+}$  parece reducir las interacciones repulsivas entre la proteína y el polisacárido, llevando a geles más homogéneos y estructurados.

Posteriormente Bryant y McClements (2000) analizaron mezclas de proteínas de suero con xantana, en presencia y ausencia de iones (NaCl), por medio de propiedades ópticas y reológicas y observaron que al agregar xantana, en concentraciones tan bajas como 0.1% en peso, a disoluciones de proteína de suero desnaturalizada térmicamente, la xantana ocasiona un incremento apreciable en la opacidad, la velocidad de gelificación y la rigidez final de los sistemas. En dicho estudio se postula que el mecanismo

fisicoquímico responsable de este efecto es la incompatibilidad termodinámica de la xantana y la proteína de suero desnaturalizada térmicamente, la cual lleva a la separación de fases y a la formación de una emulsión agua en agua. Además se pudo observar que en ausencia de sal, la separación de fases eventualmente lleva a la formación de un sistema de dos capas, el cual probablemente disminuye la calidad del producto final. En presencia de sal, la separación de fases produce la formación de regiones ricas de xantana embebidas en un gel de proteína de suero, y por lo tanto se evita la formación del sistema de dos capas.

Recientemente Perez *et al.* (2009) estudiaron las interacciones que se presentan entre un concentrado de proteínas de suero (WPC) comercial y dos polisacáridos aniónicos (alginato de sodio (SA) y  $\lambda$ -carragenina ( $\lambda$ -C)) por medio de espectroscopia de absorción, espectroscopia de fluorescencia y microscopia confocal de barrido láser. Los resultados obtenidos sugieren que la dinámica molecular de los sistemas WPC/SA y WPC/ $\lambda$ -C está altamente afectada por las interacciones entre los polímeros en la fase acuosa. Estudios complementarios a estos mostraron diferencias significativas entre estos sistemas, las cuales dependen del tipo de polisacárido, y de su concentración relativa en la disolución acuosa. En el sistema de WPC/SA, el alginato de sodio promueve las interacciones proteína-proteína, los cuales se ponen de manifiesto por, (i) una alta tendencia a la agregación debido al incremento de la superficie hidrofóbica del WPC y (ii) por la tendencia a la segregación de las proteínas y el SA en microdominios separados. Por otro lado, la  $\lambda$ -carragenina produce una alta estructuración en los sistemas de WPC/ $\lambda$ -carragenina, la cual se rompe con el incremento de la cantidad de sal en la disolución. Las técnicas analíticas revelan la existencia de interacciones atractivas en sistemas de WPC/ $\lambda$ -carragenina en todo el intervalo de concentraciones manejado. Esto puede ser explicado por la existencia de “parches” (dominios cargados positivamente) en la proteína,



los cuales son capaces de interactuar asociativamente con la  $\lambda$ -carragenina formando entidades híbridas de biopolímeros. El análisis ultraestructural de las mezclas WPC/ $\lambda$ -carragenina también sugiere la existencia de una micro-separación de fases, que involucra la fracción de WPC agregada.

Finalmente podemos decir que las moléculas de polisacáridos se comportan como espaciadores estéricos entre las moléculas de proteínas protegiendo a las proteínas globulares contra la agregación bloqueando los sitios hidrofóbicos de unión en la superficie. A diferencia de la goma guar no interactiva, la  $\iota$ -carragenina y la pectina tienen una densidad de carga negativa. Cuando ambos biopolímeros, las proteínas y los polisacáridos tienen carga negativa, la atracción de cargas positivas localizadas en zonas de la proteína y las cargas negativas del polisacárido resulta en la formación de complejos solubles de proteína-polisacárido (Ibanoglu, 2005),

Además, la naturaleza de las interacciones que se llevan a cabo entre los polisacáridos y las proteínas lácteas (principalmente caseínas y  $\beta$ -lactoglobulina), varían en función de las características de los componentes; de las características específicas del alimento como el pH, la fuerza iónica, la presencia de otros componentes y, también de la concentración de los biopolímeros entre otros factores.

En el sistema que utilizamos para este estudio, el polisacárido empleado tiene cargas negativas debidas a los grupos carboxilo presentes en la molécula, por lo cual podemos suponer, con base en la información bibliográfica, que este polisacárido tendrá la capacidad de interactuar de manera similar a la carragenina o a las pectinas, las cuales también presentan cargas negativas, así pues, al agregar gelatina a la disolución con leche descremada, esta promoverá la floculación por agotamiento. Aunado a esto, la presencia de proteínas del suero aumentará el número de interacciones pues como se verá más

adelante, las condiciones utilizadas en el estudio favorecen la desnaturalización de las proteínas del suero, provocando el desdoblamiento de dichas proteínas y facilitando de esta manera las interacciones entre las proteínas y las cadenas del polisacárido.

En gran parte de las investigaciones presentadas, los sistemas empleados son más sencillos que el utilizado en este trabajo, debido principalmente a que en la mayoría de ellos se utiliza uno de los dos tipos de proteínas presentes en la leche, es decir, los resultados que se reportan son en su mayoría de mezclas polisacárido-caseína o polisacárido-proteínas del suero de leche. Sin embargo, en este trabajo, se utiliza leche descremada en polvo, en la cual están presentes la mayoría de los componentes (véase Cuadro 1), esto ocasiona que el tipo de interacciones presentes pueda cambiar ligeramente, sobre todo porque existen estudios en los que se aprecia el efecto de algunos azúcares sobre las propiedades reológicas y de transición de algunos polisacáridos como la gelana. En esos casos existen estudios (Nickerson, Paulson y Speers, 2004) en los que se observa que la presencia de componentes como la lactosa o la sacarosa incrementan la temperatura de transición gel-sol debido a que favorecen la creación de puentes de hidrógeno lo que hace más estable el sistema.

Finalmente, es importante mencionar que el empleo de polisacáridos en la industria alimentaria ha ido en aumento debido principalmente a los múltiples beneficios que se obtienen al incorporar estos ingredientes a los alimentos. A pesar de ello, el conocimiento de los mecanismos de interacción de muchos de estos polisacáridos es aún limitado y de ahí la necesidad de realizar este tipo de trabajos, puesto que la optimización de las concentraciones de los componentes, las temperaturas de preparación, la adición o no de sales, entre otros, es de suma importancia en el procesamiento de los alimentos.

#### **4. HIPÓTESIS**

Después de conocer las interacciones que tienen lugar en los sistemas proteína-polisacárido, es posible apreciar que los componentes de estos sistemas tienen un papel importante en las propiedades viscoelásticas de los productos elaborados a partir de dichos componentes, por ello se plantearon las siguientes hipótesis:

Si agregamos leche descremada en polvo a disoluciones de gelana que no gelifican en ausencia de iones y que presentan un comportamiento predominantemente líquido, entonces, los sistemas finales mostrarán un comportamiento viscoelástico en el cual el componente elástico (o comportamiento sólido) será más significativo que en aquellas disoluciones en las que no se haya agregado leche.

Si aumentamos la concentración de leche en las formulaciones de mezclas de gelana-leche descremada en polvo, entonces, el comportamiento sólido aumentará también.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 Principal**

- ❖ Determinar las propiedades viscoelásticas de mezclas gelana de bajo acilo (polisacárido aniónico) – proteínas lácteas (presentes en la leche descremada utilizada en este estudio), para establecer si existe un efecto de las proteínas sobre el comportamiento reológico de la gelana.

### **5.2 Particulares**

- ❖ Examinar por medio de pruebas de cizalla oscilatoria de baja amplitud el comportamiento viscoelástico de geles elaborados con diferentes concentraciones de polisacárido y leche descremada en polvo para conocer de qué manera la presencia de una matriz proteínica influye en las propiedades reológicas de un polisacárido gelificante.
- ❖ Determinar el efecto que la concentración de leche descremada en polvo tiene sobre el comportamiento viscoelástico de gelana para saber si existe o no una contribución significativa del componente proteínico sobre las propiedades reológicas de un polisacárido gelificante.
- ❖ Determinar por medio de pruebas reológicas si la presencia de proteínas modifica la temperatura de transición sol-gel de la gelana para establecer una probable interacción entre ambos componentes.
- ❖ Conocer la microestructura de los geles elaborados a partir de gelana y leche descremada en polvo mediante microscopia confocal de barrido láser.
- ❖ Elucidar las principales interacciones que se presentan entre las proteínas lácteas y la gelana de bajo acilo.

## 6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

### 6.1 Diagrama general

El diagrama general de la investigación realizada se presenta en la Figura 23. Más adelante se desarrollan cada uno de los puntos mostrados en dicho esquema.

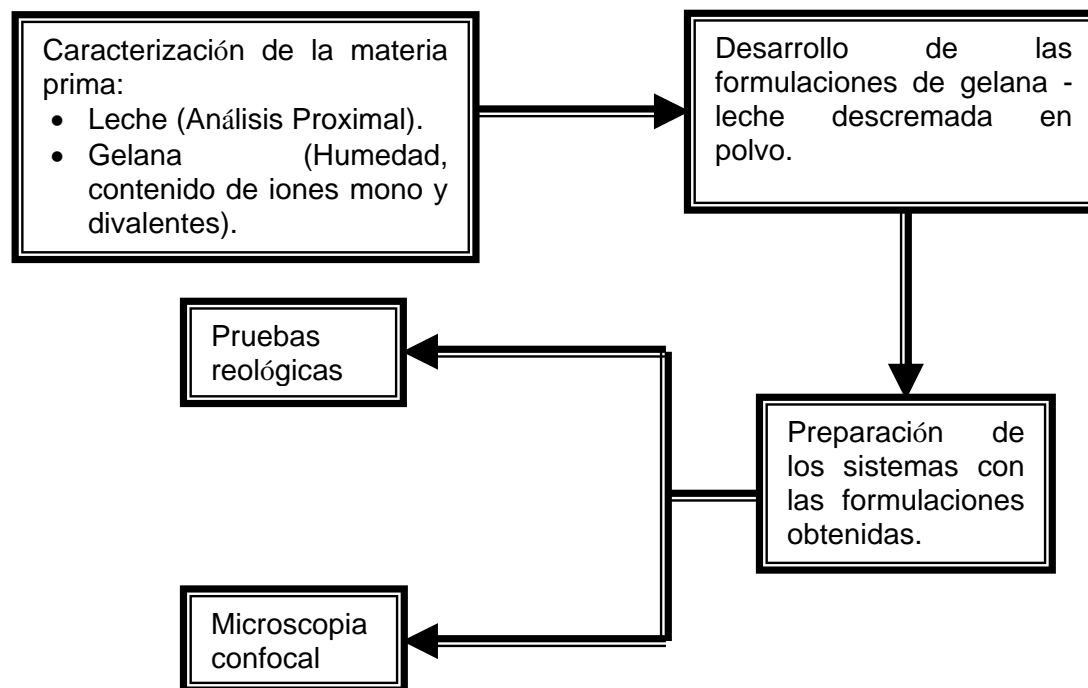


Figura 1. Diagrama general de la investigación.

### 6.2 Materiales

Gelana de bajo acido (Kelcogel grado alimenticio, CPKelco, Lote No. 07254A, USA), leche descremada en polvo (Central de Abastos), cloruro de potasio gránulos (Productos Químicos Monterrey, México) y agua desionizada.

### 6.3 Métodos

Previo a la mezcla de los componentes fue necesario conocer la composición proximal de la materia prima. Para el caso de la gelana, sólo fue necesario conocer su humedad y contenido de iones mono y divalentes, principalmente sodio, potasio, calcio y magnesio.

En el caso de la leche descremada fue necesario conocer su composición (proteínas, grasa, hidratos de carbono, humedad, cenizas y contenido de iones mono y divalentes).

### 6.3.1 Análisis proximal de la leche

**Proteínas.** (AOAC Official Method 930.29 Protein in Dried Milk).

Se determinó en 0.1 g de muestra por el método Micro-Kjeldahl (proteína = N x 6.38). (Nota: El ácido bórico debe contener la siguiente mezcla de indicadores fenolftaleína, rojo de metilo y verde de bromocresol). Lo demás se realizó según el método mencionado.

**Cenizas.** (AOAC Official Method 930.30 Ash of Dried Milk)

**Grasa.** Método Mojonnier modificado (AOAC Oficial method 989.05 Fat in Milk.)

**Humedad** (AOAC Official Method 927.05 Moisture of Dried Milk)

**Hidratos de carbono.** El porcentaje de los hidratos de carbono presentes en la muestra se obtuvo por diferencia.

**Absorción atómica (Método de flama).** Este análisis fue realizado en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI), en el Laboratorio de Absorción Atómica con un espectrofotómetro Varian SpectrAA 220 y la muestra se digirió en un horno de microondas.

### 6.3.2 Análisis de la gelana

**Humedad.** Se pesó 1 g de muestra en un crisol metálico con tapa, a peso constante, se colocó en una estufa de secado a una temperatura de  $90\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ , durante 2 h y después hasta peso constante. Se tomó el peso de la muestra y por diferencia de pesos se calculó el contenido de humedad (%).

**Absorción atómica.** Se utilizó el procedimiento de determinación de iones metálicos (Martínez-Cruz, 2002), con las siguientes modificaciones.

Patrones de Magnesio: Para obtener una disolución madre con 1000 ppm de magnesio, una masa de 398.7 mg de la sal se disolvió en agua y se aforó a 100 mL. En cuatro matraces aforados se vertieron con micropipetas, 10, 20, 40 y 80  $\mu$ L de la disolución madre y se aforó a 10 mL, para obtener patrones de 1, 2, 4 y 8 ppm.

Patrones de Calcio: Una masa de 279.4 mg se disolvió y se aforó a 100 mL. A partir de esta disolución madre de 1000 ppm, se colocaron 30, 60, 90 y 120  $\mu$ L en matraces aforados y se llevó a un volumen final de 10 mL. Se obtuvieron así patrones de 3, 6, 9 y 12 ppm. La determinación de sodio y potasio se hizo en un espectrofotómetro de absorción atómica (Atomic Absorption Spectrometer 3110 Perkin Elmer) y se usó como blanco agua. Fueron determinados con el quemador de aire-acetileno; el sodio a una longitud de onda de 330.2 nm y una ranura o ancho de ventana de 0.7 nm; mientras que el potasio se determinó a una longitud de onda de 404.4 nm y una ranura de 0.7 nm.

Los resultados obtenidos para la caracterización de las materias primas se muestran en los Cuadros 1 y 2:

*Cuadro 1. Resultados del análisis proximal de la leche descremada en polvo.*

<b>Parámetro</b>	<b>Promedio (%)</b>	<b>C. V. (%)</b>
Humedad	3.92	1.94
Cenizas	7.21	0.71
Proteína	35.4	0.64
Grasa	1.53	0.98
Hidratos de carbono	51.9	-
Calcio	1.07	-
Sodio	0.43	-
Potasio	1.66	-
Magnesio	0.11	-

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

*Cuadro 2. Resultados del análisis de la gelana.*

<b>Parámetro</b>	<b>Promedio (%)</b>	<b>C. V. (%)</b>
Humedad	8.27	3.58
Calcio	0.374	2.09
Sodio	1.10	5.0
Potasio	4.50	4.95
Magnesio	0.173	2.91

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

### **6.3.3 Desarrollo de las formulaciones de estudio**

Inicialmente las formulaciones se plantearon con base en un arreglo ortogonal  $L_8$ , en el que se variaron tres factores: concentración de gelana, concentración de leche descremada y concentración de calcio, en dos niveles: para gelana 0.1 y 0.5%, para leche 2 y 5% y para calcio 0.05 y 0.1%, obteniéndose así ocho formulaciones, más los respectivos blancos que consistían de gelana y calcio únicamente. Sin embargo, después de analizar los resultados obtenidos, se concluyó que no había diferencias significativas entre las formulaciones (resultados no presentados), presumiblemente por la presencia de calcio. Debido a lo anterior y con base en los resultados experimentales, se planteó una nueva serie de formulaciones en las que se pudiera ver el efecto de la leche sobre las propiedades reológicas del polisacárido. En este caso se decidió preparar las formulaciones sin la adición de calcio ni ninguna otra sal. Las concentraciones de gelana se eligieron basándonos en un diagrama de transición obtenido por Milas y Rinaudo en 1996 (presentado en los resultados, Figura 39); en dicho diagrama se buscaron aquellas concentraciones de gelana a las que a temperatura ambiente ( $\approx 22$  °C) no hubiera gelificación en ausencia de iones agregados, por otro lado la concentración de leche vario entre 0.5% y 5.0%, finalmente se obtuvieron 35 formulaciones, las cuales se presentan en el Cuadro 3:



*Cuadro 3. Formulaciones desarrolladas para el estudio.*

<b>Formulación</b>	<b>Gelana (%p/p)</b>	<b>Leche (%p/p)</b>	<b>Formulación</b>	<b>Gelana (%p/p)</b>	<b>Leche (%p/p)</b>
<b>1</b>	0.01	0.0	<b>19</b>	0.3	2.0
<b>2</b>	0.01	0.5	<b>20*</b>	0.3	5.0
<b>3</b>	0.01	1.0	<b>21</b>	0.5	0.0
<b>4</b>	0.01	2.0	<b>22*</b>	0.5	0.5
<b>5</b>	0.01	5.0	<b>23</b>	0.5	1.0
<b>6</b>	0.05	0.0	<b>24</b>	0.5	2.0
<b>7</b>	0.05	0.5	<b>25*</b>	0.5	5.0
<b>8</b>	0.05	1.0	<b>26</b>	0.6	0.0
<b>9</b>	0.05	2.0	<b>27*</b>	0.6	0.5
<b>10*</b>	0.05	5.0	<b>28</b>	0.6	1.0
<b>11</b>	0.1	0.0	<b>29</b>	0.6	2.0
<b>12</b>	0.1	0.5	<b>30*</b>	0.6	5.0
<b>13</b>	0.1	1.0	<b>31</b>	0.7	0.0
<b>14</b>	0.1	2.0	<b>32*</b>	0.7	0.5
<b>15*</b>	0.1	5.0	<b>33</b>	0.7	1.0
<b>16</b>	0.3	0.0	<b>34</b>	0.7	2.0
<b>17*</b>	0.3	0.5	<b>35*</b>	0.7	5.0
<b>18</b>	0.3	1.0			

\*Formulaciones para las cuales se preparó un blanco con KCl.

Adicionalmente, se prepararon otras formulaciones a las que se agregó la cantidad de KCl necesario para igualar la cantidad de potasio presente en la leche que se adicionó a las mezclas de gelana-leche descremada en polvo (Cuadro 4).

*Cuadro 4. Blancos desarrollados para el estudio.*

<b>Blanco</b>	<b>Gelana (%p/p)</b>	<b>KCl (%p/p)*</b>	<b>Blanco</b>	<b>Gelana (%p/p)</b>	<b>KCl (%p/p)*</b>
<b>Formulación 36</b>	0.05	0.083	<b>Formulación 41</b>	0.5	0.083
<b>Formulación 37</b>	0.1	0.083	<b>Formulación 42</b>	0.6	0.0083
<b>Formulación 38</b>	0.3	0.0083	<b>Formulación 43</b>	0.6	0.083
<b>Formulación 39</b>	0.3	0.083	<b>Formulación 44</b>	0.7	0.0083
<b>Formulación 40</b>	0.5	0.0083	<b>Formulación 45</b>	0.7	0.083

\*La concentración de 0.0083% de KCl equivale a 0.5% de leche, mientras que 0.083% de KCl es equivalente a 5% de leche.

### 6.3.4 Preparación de geles de gelana y mezclas gelana-leche descremada

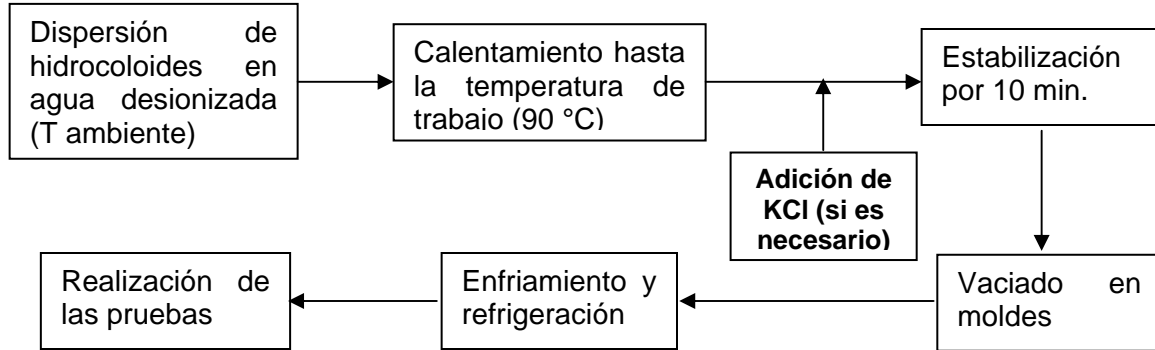


Figura 2. Esquema de la preparación de geles.

#### 6.3.4.1 Preparación

La gelana y la leche descremada en polvo se dispersaron simultáneamente en agua desionizada a temperatura ambiente ( $\approx 22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) en una parrilla con agitación continua (Thermolyne, Type 1000 Stir plate). Para evitar la formación de grumos la gelana se adicionó muy lentamente esparciéndola alrededor del vórtice generado por la agitación del agua, la gelana fue adicionada en primer lugar y después de 10 minutos aproximadamente, siguiendo la misma técnica, se adicionó la leche descremada; la mezcla se mantuvo en agitación para permitir la hidratación del polímero y lograr así una buena dispersión (el tiempo promedio para crear una dispersión adecuada fue alrededor de 30 minutos). Para lograr la completa disolución de los hidrocoloides, especialmente la gelana, las dispersiones se calentaron desde temperatura ambiente hasta  $90\text{ }^{\circ}\text{C}$  con una velocidad de calentamiento de  $1.5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  (en un baño Cole-Parmer, Polystat, Constant temperature circulator). Cuando se llegó a la temperatura deseada, se agregó el cloruro de potasio (cuando así se requirió) en cantidad adecuada para tener una concentración iónica total equivalente a la cantidad de potasio proporcionada por la leche y entonces la disolución se mantuvo en esta temperatura durante 10 minutos. Se vaciaron las disoluciones calientes en moldes de 26.1 mm de diámetro interno y 114 mm de longitud.

Los moldes se dejaron enfriar hasta temperatura ambiente y después se colocaron en refrigeración ( $\approx 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) por 24 horas para su análisis posterior, el diagrama condensado de esta explicación se presenta en la Figura 24 (Rodríguez-Hernández, 1997).

### **6.3.5 Determinaciones reológicas**

Se llevaron a cabo pruebas de cizalla oscilatoria de baja amplitud a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  en un reómetro de deformación controlada (ARES-RFS III, TA Instruments, USA), usando, cuando las formulaciones presentaban gelificación, geometrías de placas paralelas estriadas (PPE, 25 mm de diámetro y 3 mm de espacio entre placas) o placas paralelas (PP, diámetro 50 mm) con un sistema Peltier que permite un control rápido de la temperatura y cilindros concéntricos de doble pared (CCDP, Copa diámetro interno 27.94 mm, diámetro externo 34 mm; Cilindro diámetro interno 29.5, diámetro externo 32 mm, Espacio nominal entre la superficie interior y la superior 1 mm) o geometría de cono y plato (CP, Cono 50 mm de diámetro y ángulo de  $2.3^{\circ}$ , equivalente a 0.04 radianes) para los materiales fluidos. Los discos de gel para las placas paralelas, se obtuvieron de moldes cortándolos de un espesor de 3 mm. Dichos discos se colocaron en la placa inferior del reómetro y la placa superior se hizo descender lentamente. Las pruebas reológicas se realizaron a todas las formulaciones planteadas anteriormente las cuales fueron sometidas a una cinética de calentamiento, la cual se menciona en el apartado anterior, durante el cual se tuvo especial cuidado de pesar el gel antes y después para conocer la pérdida de agua al calentar. Cuando fue necesario se repuso la misma, con el propósito de evitar un aumento en la concentración de los componentes de las mezclas.

Las determinaciones realizadas fueron: (1) Barrido de deformación para verificar que las mediciones se llevaran a cabo en la zona de viscoelasticidad lineal (ZVL), es decir, en la zona en la cual la relación esfuerzo-deformación es lineal y por lo tanto las funciones materiales son constantes. Para esto, se impuso un movimiento oscilatorio de frecuencia

constante (6.28 rad/s o 1 Hz) y amplitud variable sobre la placa inferior; (2) Barrido de frecuencia a la amplitud para la cual se observó la ZVL. El intervalo de frecuencia fue de 0.1 rad/s a 100 rad/s para los geles y de 1.0 rad/s a 100 rad/s para las soluciones. (3) Barrido de temperatura para determinar la temperatura de gelificación: de 85 a 25 °C y la temperatura de fusión: de 25 a 85 °C a una frecuencia de 6.28 rad/s y deformación constante en la región lineal, con una tasa de calentamiento o enfriamiento lineal y constante de 5 °C/min. Los barridos de deformación y frecuencia se hicieron por triplicado, mientras que el de temperatura se hizo al menos por triplicado. En todas las pruebas el borde de las placas paralelas se cubrió con parafina líquida para evitar la evaporación de agua.

#### **6.3.6 Determinación de la temperatura de transición sol-gel**

Para determinar la temperatura de transición sol-gel se utilizaron algunas de las formulaciones que presentaron gelificación. Se eligieron todas las concentraciones de gelana, sin embargo se trabajó únicamente con el mayor y menor contenido de leche descremada (para determinar el intervalo de temperaturas en el cual se encontraba la transición) y además se utilizaron los blancos que se presentan en el cuadro 4. La cantidad de potasio se calculó con base a la cantidad de potasio que la leche proporcionaba en cada una de las formulaciones. Estas últimas formulaciones se realizaron como control para observar el comportamiento de la gelana sin los sólidos lácteos, específicamente para determinar si el efecto observado en los geles con leche era debido a los componentes de la leche o al potasio presente. Las muestras se prepararon como se explicó anteriormente. Se eligió potasio, porque fue el ión presente en mayor concentración tanto en la leche como en la gelana.

## 6.4 Tratamiento de datos

Una vez que se realizaron todas las determinaciones reológicas se obtuvieron gráficas de los barridos de deformación, de frecuencia y de temperatura (de estos datos obtuvimos las temperaturas de transición, a partir del punto de cruce de los módulos ( $G'$  y  $G''$ , como se verá más adelante en los resultados); además, se hicieron los siguientes cálculos para la determinación de la temperatura de transición de las formulaciones analizadas.

### 6.4.1 Concentración iónica total

La concentración iónica total que está dada por

$$C_T = C_S + \gamma C_P$$

donde  $C_T$  es la concentración iónica total,  $C_S$  es la concentración total de iones, los agregados, más los presentes en el polímero, más los presentes en la leche,  $\gamma$  es el coeficiente de actividad promedio,  $(\gamma_{\text{desorden}} + \gamma_{\text{orden}})/2$ , cuyo valor depende del ión agregado y que en el caso del ión potasio es 0.76 y  $C_P$  es la concentración del polímero.

Por otra parte la actividad total está dada por la ecuación

$$a_T = \gamma_0 C_T$$

donde,  $a_T$ , es la actividad total (eq/L),  $C_T$ , es la concentración total (eq/L) y  $\gamma_0$  es el coeficiente de actividad. En el caso de soluciones de baja concentración (<1%) es posible suponer que  $\gamma_0 = 1$  (Sánchez-Basurto, 2006) y entonces:

$$a_T = C_T$$

La temperatura obtenida en grados Celsius debe pasarse a grados Kelvin y sacar su inverso, según la siguiente ecuación:

$$T^{-1}(K^{-1}) = \frac{1}{T(^{\circ}C) + 273}$$

Una vez obtenidos los valores, se construye la gráfica de  $C_T$  o  $a_T$  (eq/L) vs.  $1/T$  (1/K).

Aunado a este cálculo también se determinó la fuerza iónica de las formulaciones puesto que en el diagrama de transición sólo consideramos la presencia del ión potasio. Sin embargo, tanto en la leche como en la gelana se encontraban presentes iones de calcio, sodio y magnesio y estos iones también tienen influencia sobre la gelificación de la gelana. Dichos cálculos se realizaron de acuerdo a lo siguiente:

#### 6.4.2 Fuerza iónica

La fuerza iónica,  $I$ , de una disolución es una función de la concentración de todos los iones presentes en el medio, definida como:

$$I_C = \frac{1}{2} \sum_{B=1}^n c_B z_B^2$$

donde  $c_B$  es la concentración de iones B,  $z_B$  es la carga de cada ión, y la sumatoria se refiere a cada una de las especies iónicas presentes en el medio.

Dado que en las disoluciones no ideales los volúmenes no son estrictamente aditivos, es aconsejable trabajar con molalidad como unidad de concentración. En este caso, la fuerza iónica quedaría definida como:

$$I_m = \frac{1}{2} \sum_{B=1}^n m_B z_B^2$$

### 6.4.3 Análisis estadístico

Con la finalidad de saber si existían diferencias significativas entre las formulaciones estudiadas se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con la ayuda del programa de paquetería Excel.

## 6.5 Microscopía confocal de barrido láser

Con la finalidad de conocer la microestructura de los sistemas, estos se observaron mediante la técnica de microscopía confocal de barrido láser la cual (CSLM, por sus siglas en inglés) es una técnica de microscopía óptica recientemente desarrollada que permite observar a distintas profundidades en el interior de la muestra. CSLM mejora la resolución a lo largo del eje de observación y permite el fraccionamiento óptico de la muestra. La preparación de la muestra no requiere de tratamientos laboriosos, y por lo tanto, altera muy poco la estructura de la misma. Esto permite la visualización de las estructuras implicadas en procesos cinéticos originados en alimentos sometidos a situaciones de estrés (Ferrando y Spiess, 2000). El principio básico de un microscopio confocal es que forma las imágenes por medio de la luz reflejada desde un discreto plano focal. Todas las superficies de la luz reflejada lejos del centro se descartan del plano por medio de un orificio de apertura que está ópticamente conjugado con el plano focal. La profundidad focal de un tramo es una función del diámetro de este orificio y la longitud de onda de la luz incidente. Por medio de un motor centrado de cabeza el objetivo de la lente se desplaza a través del eje vertical y se producen secciones ópticamente centradas. Como se sabe la posición de cada punto de luz registrados, las secciones se pueden procesar

en conjunto para crear imágenes del objeto en tres dimensiones (Evans y Donahue, 2008).

### **6.5.1 Preparación de la gelana marcada**

La gelana fue etiquetada con un fluoróforo para las observaciones de Microscopía confocal láser. Para ello se utilizó isotiocianato de fluoresceína (FIT-C), el cual fue unido covalentemente a la molécula de gelana mediante los procedimientos reportados por Rodríguez-Hernández (2004) y Pérez-Campos (2008).

La reacción de etiquetado consistió en disolver 2 g de gelana en 300 mL de agua desionizada con agitación magnética a temperatura ambiente, posteriormente se adicionaron 75 mL de dimetilsulfóxido (DMS) (Sigma Aldrich 472301) manteniendo una agitación lenta. El valor de pH de esta permaneció entre 5 y 7. Posteriormente se adicionaron 28.1 mg de fluoresceínamina (Isómero I, Fluka 46950) previamente disuelta en un pequeño volumen de dimetilsulfóxido, 28.1  $\mu\text{L}$  de ciclohexilisocianida (Sigma Aldrich 133302) y 28.1  $\mu\text{L}$  de acetaldehído (Sigma Aldrich 402788). La mezcla reactiva se mantuvo en agitación magnética a temperatura ambiente durante 5 h, posteriormente se precipitó el polímero con dos volúmenes de acetona fría; esta mezcla se mantuvo en refrigeración aproximadamente 15 horas para favorecer la precipitación de todo el polisacárido y obtener así un mejor rendimiento. Transcurrido este tiempo al precipitado se le realizaron varios lavados con acetona en un filtro de vidrio poroso conectado al vacío hasta obtener efluentes cristalinos y el polímero deshidratado. El compuesto deshidratado obtenido se seco en un desecador convencional durante aproximadamente 16 h a temperatura ambiente. Una vez seco el polímero, se disperso en 100 mL de agua desionizada a temperatura ambiente y se dializado contra agua desionizada (membrana



con corte molecular de 12,000 - 14,000 Da) hasta no detectar un color amarillo en el agua de diálisis.

Concluida la diálisis, el polímero se secó en una estufa de vacío a 40 °C y una presión de vacío de 70 kPa. Después de esto el producto obtenido se pulverizó y se realizaron las mezclas de gelana-leche descremada.

### **6.5.2 Preparación de la leche marcada**

Para el caso de la leche se utilizó como fluoróforo isotiocianato de rodamina B (Sigma Aldrich R1755), compuesto que se une de manera no covalente a las proteínas de la leche. Para marcar la leche se preparó una disolución stock con una concentración de rodamina de 0.01% m/m, de esta disolución se agregaron cantidades diferentes a las mezclas de gelana-leche descremada, en función del contenido de leche presente en la mezcla y del volumen de la misma, las cuales fueron determinadas mediante diluciones.

### **6.5.3 Mezclas gelana-leche descremada marcadas**

Las mezclas de los polímeros marcados se realizaron de la misma forma que las formulaciones elaboradas con los polímeros sin marcar; sin embargo, antes de poner a calentar las mezclas se adicionó un volumen conocido de la disolución stock de rodamina B al 0.01% m/m, dicha cantidad en función del contenido de proteína, así por ejemplo, para las mezclas elaboradas con 5.0% de leche descremada se adicionaron 100  $\mu$ L por cada 10 mL de disolución, para obtener una concentración final de fluoróforo de  $1 \times 10^{-4}$ %.

## **7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Para comenzar es conveniente hacer una breve introducción de conceptos que se utilizarán a lo largo del análisis de resultados, para facilitar la comprensión de dicho análisis y evitar confusiones posteriores.

### **7.1 Clasificación de geles**

#### **7.1.1 Geles débiles y geles fuertes**

Los geles se clasifican generalmente como un grupo de sustancias que exhiben propiedades de sólidos cuando hay una cantidad suficiente de disolvente. La gelificación de los polisacáridos surge de entrecruzamientos físicos por interacciones polímero-polímero. Estos sistemas se clasifican como geles físicos. Típicamente, los geles de polisacáridos contienen más del 90% de peso en agua o soluciones acuosas electrolíticas. Suelen distinguirse dos clases de geles, denominados “geles verdaderos” o “geles fuertes” y “geles débiles”, dependiendo de su comportamiento macroscópico. Como regla general, un gel verdadero puede auto-sostenerse y surge de una red tridimensional. En contraste, la naturaleza sólida de los geles débiles es menos aparente, ya que presenta flujo cuando se somete a un gran esfuerzo. Probablemente existe una red muy tenue, pero se rompe fácilmente. Para ambos sistemas, los espectros mecánicos de los geles de polisacáridos se caracterizan por tener una nula dependencia del módulo de almacenamiento ( $G'$ ) con la frecuencia en todo el intervalo de frecuencias accesibles. A menudo, la dependencia del módulo de pérdida ( $G''$ ) no se describe. Debido a su valor tan bajo con respecto al módulo de almacenamiento ( $G' \gg G''$ ),  $G''$  se considera menos importante que  $G'$  (Doublier y Cuvelier, 2006). Para hacer una distinción entre geles fuertes y geles débiles, frecuentemente se utilizan los barridos de deformación porque la dependencia con la deformación de estos sistemas es muy diferente. Una gran

deformación en geles “fuertes” lleva a la ruptura, mientras que los geles “débiles” fluyen y muestran carácter sólido (Ross-Murphy, 1995).

Clark y Ross-Murphy (1987), propusieron otra clasificación para geles de biopolímeros, hicieron una distinción entre las redes formadas por polímeros desordenados (ej. gelatina, carrageninas, alginatos, pectinas, almidón) y sistemas que involucran interacciones específicas entre partículas densas y menos flexibles (ej. proteínas globulares térmicamente desnaturalizadas, agregados proteínicos por acción enzimática o química). En la primera categoría, la transición se produce por una disminución de la temperatura (gelatina, carragenina) o por un cambio en la composición del disolvente por la adición de iones específicos (alginatos, pectinas de bajo metoxilo). Estos geles pueden considerarse como homogéneos a nivel molecular y han sido descritos como “redes asociadas”. En la segunda categoría, los geles se describen como particulados, la gelificación puede ser inducida por un incremento en la temperatura (proteínas desnaturalizadas) o por vías enzimáticas (cuajada de leche). En todos los caso, los entrecruzamientos entre las cadenas originan interacciones físicas, frecuentemente son puentes de hidrógeno, pero también existen interacciones electrostáticas, fuerzas de Van der Waals e interacciones hidrofóbicas que también son importantes (Doublier y Cuvelier, 2006).

### **7.1.2 Geles fluidos**

Es más difícil dar una clara definición de estos sistemas que para los geles verdaderos. Las soluciones macromoleculares pueden confundirse con los geles fluidos, sin embargo, no son iguales, puesto que existen sistemas que tienen propiedades entre los geles verdaderos y las soluciones macromoleculares. Estos sistemas se utilizan como geles reversibles en productos lácteos o para la estabilización de partículas en un medio aparentemente fluido. Dichos sistemas pierden su rigidez durante el proceso cuando se aplica un esfuerzo, y recuperan parte de sus propiedades de gel casi tan pronto como se

remueve dicho esfuerzo. Generalmente se refieren a estos geles como tixotrópicos. Algunos investigadores también se refieren a ellos como “geles fluidos” (Doublier y Cuvelier, 2006).

## 7.2 Gelana

La Figura 25 muestra los barridos de deformación de las formulaciones elaboradas únicamente con gelana y en ellos se observa el efecto de la deformación y la concentración de la gelana sobre los módulos  $G'$  o elástico y  $G''$  o viscoso. Los barridos de deformación se utilizan para determinar la zona de viscoelasticidad lineal (ZVL), es decir, la zona en la cual la relación esfuerzo-deformación es lineal y por lo tanto las funciones materiales no dependen de dichas variables. Sin embargo, estos barridos también son útiles para determinar el comportamiento viscoelástico del material. Los intervalos de la ZVL y el valor de deformación en el cual se realizaron los correspondientes barridos de deformación se muestran en el anexo A, cuadro 5.

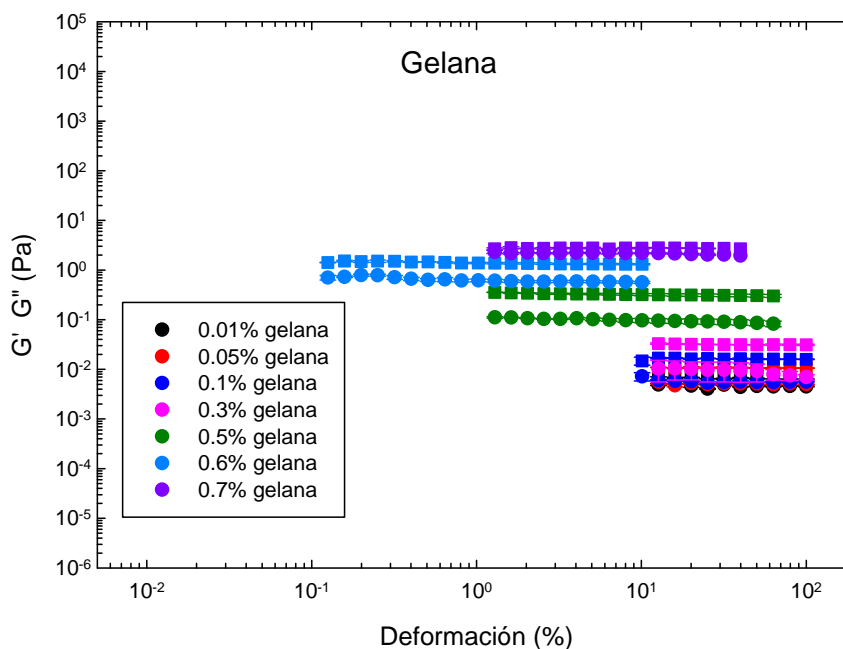


Figura 1. Barridos de deformación de las formulaciones elaboradas con gelana a 25 °C y 6.28 rad/s, los cuadros representan  $G''$  y los círculos  $G'$ .

En las curvas de la Figura 25 es posible advertir que las formulaciones exhiben principalmente un comportamiento viscoso, de ello resulta que la zona de viscoelasticidad lineal se extiende a valores de hasta 100% de deformación. También se observa que a medida que la concentración de gelana aumenta (0.5 y 0.6%), los valores límite de la zona de viscoelasticidad lineal disminuyen con respecto a aquellas muestras con menores concentraciones de gelana (0.01, 0.05, 0.1 y 0.3%), lo que aunado al aumento en los valores de los módulos dinámicos conforme se incrementa la concentración de gelana, muestra una disminución en el comportamiento viscoso del material, y por lo tanto un incremento en el comportamiento elástico. La formulación con 0.7% de gelana es un caso especial debido a que se encuentra en el punto crítico del gel.

En la Figura 26, se presentan los espectros mecánicos de las mismas formulaciones analizadas en la figura anterior, en dichas gráficas es posible observar que dichas formulaciones exhiben el comportamiento característico de una disolución macromolecular:

- A bajas frecuencias, el módulo de pérdida ( $G''$ ) es mayor que el módulo de almacenamiento ( $G'$ ) y ambos parámetros varían ampliamente con la frecuencia:  $G''(\omega)$  y  $G'(\omega^2)$ . Por lo cual se dice que el sistema exhibe un comportamiento líquido.
- Conforme se incrementa la frecuencia,  $G'(\omega)$  y  $G''(\omega)$  se cruzan; se dice entonces que el comportamiento que exhibe el material por arriba de la frecuencia de cruce es el de un sólido.

Este comportamiento, (véase Figura 27), es típico de una disolución macromolecular con agregados. Dentro del intervalo de frecuencia examinado se puede observar la zona terminal (a baja frecuencia) y el principio de la zona conocida como plateau (a alta frecuencia). Esto significa que la reología de soluciones de polisacáridos está gobernada principalmente por los agregados de macromoléculas individuales (Doublie y Cuvelier, 2006).

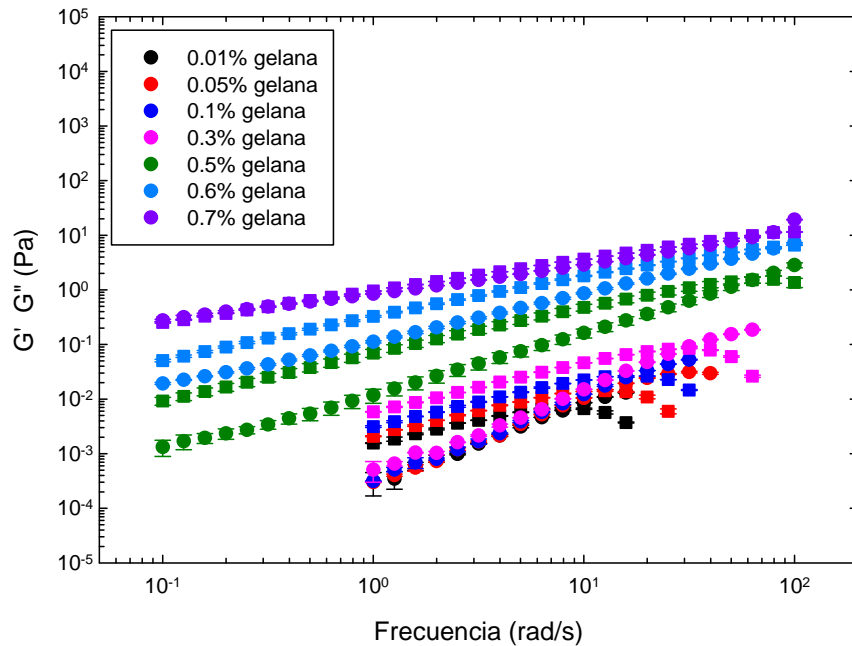


Figura 2. Espectros mecánicos de formulaciones de gelatina sin adición de iones o leche descremada a 25 °C, los cuadros representan  $G'$  y los círculos  $G''$ .

Considerando las ecuaciones que se presentan en el anexo B, se construyeron las gráficas que se presentan en la Figura 27, con la finalidad de conocer la dependencia de los módulos dinámicos con la frecuencia, los resultados tabulados pueden consultarse en el anexo B, cuadro 8. Analizando estas gráficas es posible concluir que las soluciones de gelatina sin adición de iones o leche descremada tienen un comportamiento que se ajusta al de las soluciones macromoleculares, basados en que todas las formulaciones son altamente dependientes de la frecuencia ( $0.54 < \alpha < 1.57$  y  $0.57 < \beta < 0.85$ , con  $r > 0.990$ ) y  $G''$  es mayor que  $G'$  en casi todo el intervalo de frecuencia empleado para las mediciones.

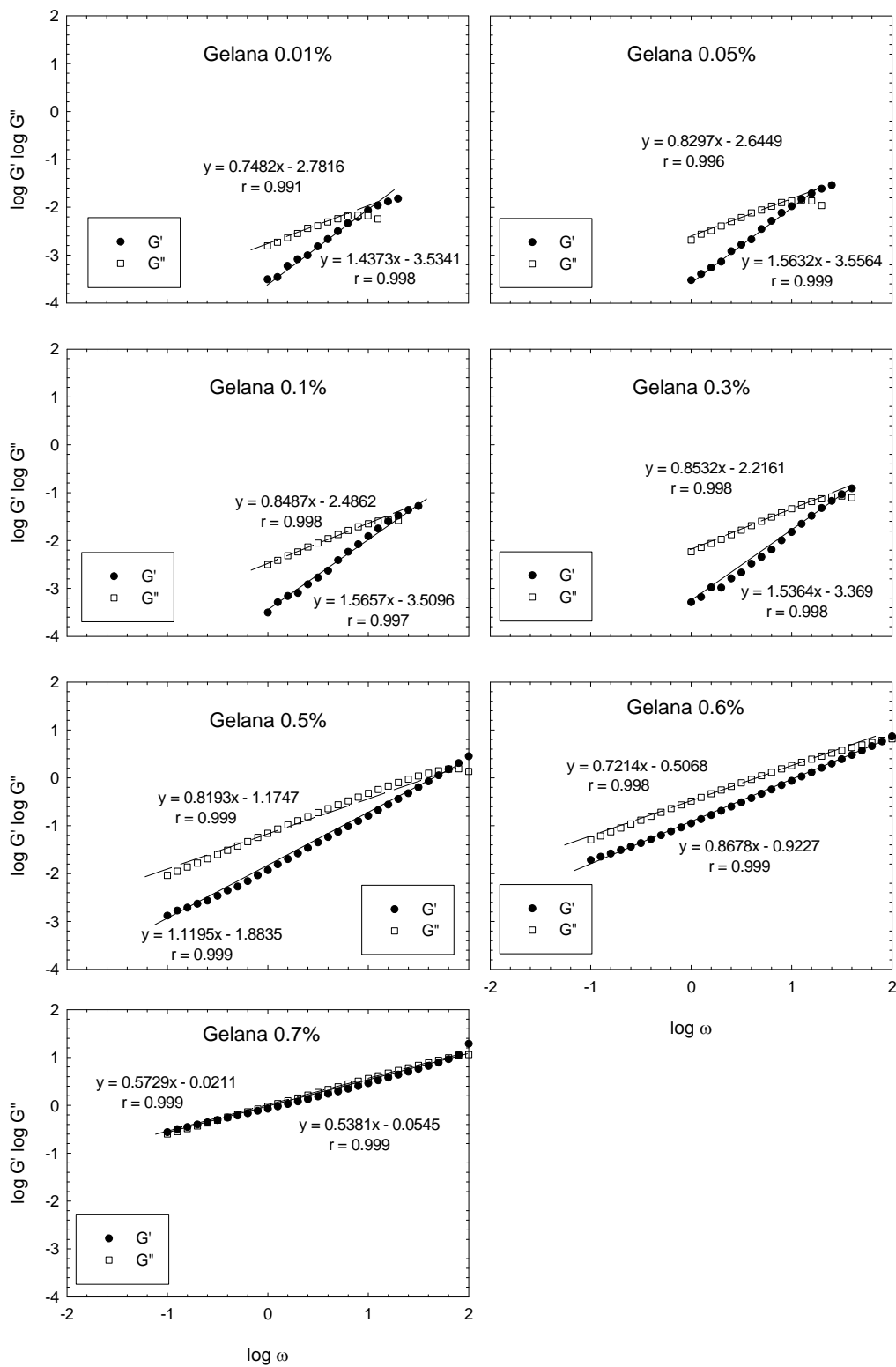


Figura 3. Parámetros de la función potencia para los módulos dinámicos de formulaciones elaboradas a partir de gelatina sin adición de iones y leche descremada.

Como se menciona anteriormente el comportamiento de la formulación elaborada con 0.7% de gelana es distinto al resto, en dicho espectro es posible apreciar que  $G' \approx G''$  y los parámetros de la función potencia tiene valores similares;  $\alpha = 0.54$  y  $\beta = 0.57$ , por lo que se puede suponer que se encuentra en el punto crítico de gel del polisacárido de estudio, ya que en este punto el sistema se caracteriza por un comportamiento crítico donde  $G'(\omega)$  y  $G''(\omega)$  obedecen la misma función potencia (Doublier & Cuvelier, 2006):

$$G'(\omega) \sim G''(\omega) \sim \omega^n$$

$$\tan \delta = G''(\omega)/G'(\omega) = \text{constante} = \tan(n\pi/2)$$

En la Figura 28 se presentan las curvas de las  $\tan \delta$  de las formulaciones de gelana sola, siendo delta el ángulo de desplazamiento o desfase y una función que ayuda a describir el comportamiento viscoelástico. En el caso de un sólido elástico (Hooke) el esfuerzo cortante está en fase con la deformación (ángulo =  $0^\circ$ ), mientras que para un líquido viscoso (Newton) existe un desfase de  $\pi/2$  radianes (ángulo =  $90^\circ$ ). Por lo tanto un fluido viscoelástico presentará un desfase entre cero y  $\pi/2$ , que indicará la relación entre elasticidad y viscosidad, y dependerá de la frecuencia de oscilación. Los valores de  $\tan \delta$  o los del ángulo  $\delta$  permiten saber cuál de estos dos comportamientos es el que predomina. Por ejemplo, a frecuencias muy altas, correspondientes a tiempos muy cortos, el material no tiene tiempo de relajarse y su comportamiento se acerca al de un sólido elástico, con un ángulo de desfase pequeño ( $\tan \delta$  cercana a cero). Por el contrario, a frecuencias bajas, el material tiene tiempo para relajarse y fluir y, por tanto, su comportamiento es más viscoso, lo que implica un ángulo de desfase mayor ( $\tan \delta$  muy grande o indefinida; Maestro-Garriga, 2002).

En dicha gráfica es fácil percibir que los valores del ángulo  $\delta$  varían en un intervalo muy amplio, sin embargo, la mayoría de los datos se encuentran en valores que están más cercanos a los  $90^\circ$ , lo que indica la prevaecía del comportamiento líquido de estos



sistemas, específicamente el ángulo  $\delta$  tiene valores que están comprendidos entre los  $8^\circ$  (para altas frecuencias) y  $85^\circ$  (a bajas frecuencias). Estos resultados confirman que los sistemas mencionados muestran un comportamiento predominantemente líquido a bajas frecuencias y que cuando la frecuencia aumenta comienza a apreciarse el carácter sólido de dichos sistemas (zona de plateau), tal como lo predice la teoría (Doublie & Cuvelier, 2006).

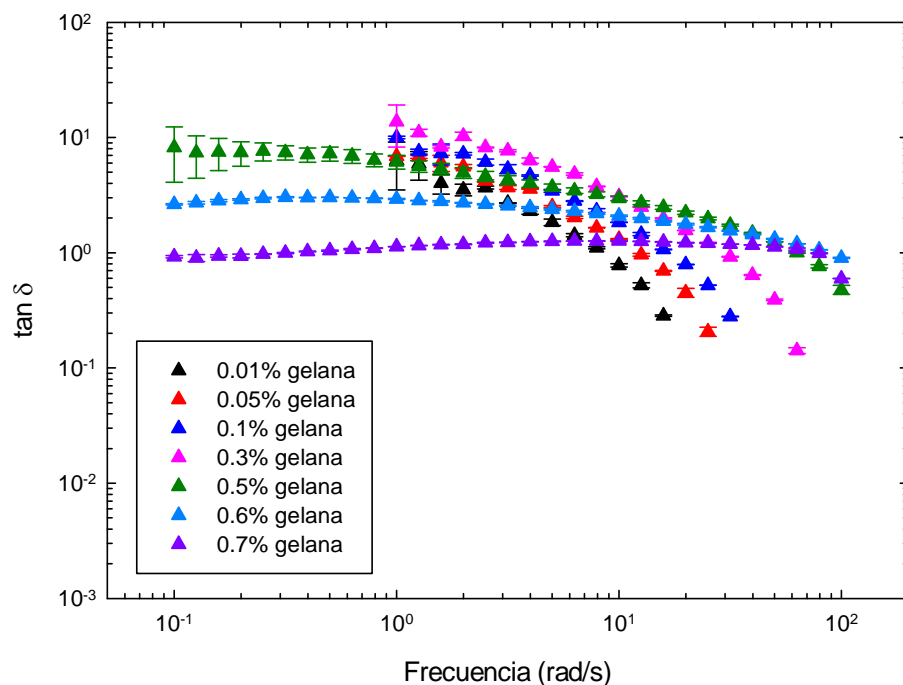


Figura 4.  $\tan \delta$  para las formulaciones elaboradas a partir de gelatina sin adición de iones ni leche descremada.

En resumen las formulaciones elaboradas únicamente con gelatina presentan un comportamiento predominantemente viscoso. Por debajo de 0.6% de gelatina las formulaciones se comportan como soluciones macromoleculares, es decir,  $G'$  es mayor que  $G''$  y ambos módulos son altamente dependientes de la frecuencia en todo el intervalo analizado. Sin embargo, para la concentración que se encuentra por arriba de 0.6% es posible apreciar una transición sol-gel, ya que los módulos tienen valores muy parecidos y

la dependencia con la frecuencia disminuye, esta transición se debe al incremento en la concentración de gelana, es decir, la concentración crítica para la gelana sin iones debe estar alrededor de 0.7%.

### **7.3 Mezclas gelana-leche descremada**

Una vez terminado el análisis reológico de las formulaciones elaboradas únicamente con gelana y conociendo el comportamiento reológico del material señalado, empezaremos el análisis de las formulaciones de las mezclas de gelana y leche descremada. Así pues, con los resultados obtenidos del barrido de frecuencia para cada una de las formulaciones se realizó, inicialmente, un análisis de varianza para determinar si existía diferencia significativa entre las formulaciones estudiadas. Para dicho análisis se tomaron en cuenta tres factores, la concentración de leche, la concentración de gelana y la frecuencia, esta última, debido a que algunas formulaciones presentaron dependencia con la frecuencia, por lo cual fue necesario considerar este factor como una variable más en los sistemas de estudio, puesto que en algunos casos la dependencia de los módulos con respecto a la frecuencia fue muy significativa.

Los resultados del análisis estadístico realizado se presentan en el anexo C. En dicho anexo, se observan los cuadros (11, 12 y 13) que contienen el resumen del análisis de varianza para cada uno de los módulos dinámicos ( $G'$  y  $G''$ ) y para la tangente de delta ( $\tan \delta$ ). Se encontró que existen diferencias significativas entre todas las medias de los efectos simples (A, B y C). Sin embargo, las conclusiones obtenidas para las interacciones que se presentan entre los factores analizados difieren un poco. Es muy importante tener en cuenta que, si la interacción no es significativa, la interpretación de las pruebas sobre los efectos principales es directa (Spiegel, 1991). Sin embargo, cuando la interacción es significativa, los efectos principales que participan en la interacción no

tienen mucho valor interpretativo práctico. El conocimiento de la interpretación es, en general, más importante que los efectos principales (Montgomery y Runger, 1996).

Así se tiene que:

1. Módulo elástico ( $G'$ ). No hay interacciones de AB, AC y ABC, sin embargo, si se observa la existencia de una interacción entre BC, es decir, entre la concentración de leche descremada y la concentración de gelana (cuadro 11, anexo C).
2. Módulo viscoso ( $G''$ ). Hay interacciones entre todos los factores analizados, como se observa en el cuadro 12 del anexo C.
3. Tangente delta ( $\tan \delta$ ). Hay interacciones entre AB, BC y AC, sin embargo, no existe interacción entre los tres factores (cuadro 13, anexo C).

Con base en estas observaciones y en los cuadros presentados en el anexo C es posible apreciar que:

- $G'$  se modifica debido principalmente a las interacciones presentes entre la gelana y los componentes de la leche descremada en polvo, debido a esto se puede asegurar que el efecto de la leche no es el mismo para todos los niveles de concentración de gelana y viceversa. Además la frecuencia no tiene un efecto significativo sobre la concentración de gelana y la concentración de leche y tampoco existe una interacción importante entre los tres factores. En este caso es posible afirmar que existe un efecto sinérgico entre la gelana y la leche, es decir, la suma de los valores de  $G'$  por separado son menores que los valores obtenidos a partir de las mezclas.
- $G''$  varía por efecto de todos los factores, en las gráficas en donde se presentan los barridos de frecuencia, de donde se obtuvieron los valores utilizados para el análisis de varianza, se observa que  $G''$  es más dependiente de la frecuencia en comparación con  $G'$ , tal como lo demuestran los resultados del ANOVA (ver anexo C, cuadros 11 y 12). Sin embargo, basados en el análisis de varianza el efecto más significativo es

aquel debido a la interacción de BC, es decir, a la interacción entre la concentración de leche y la concentración de gelana.

- La  $\tan \delta$  se altera por efecto de las interacciones de todos los factores, sin embargo, no hay una interacción entre los tres factores utilizados. Más adelante se presentan los gráficos de  $\tan \delta$  y en ellos es posible darse cuenta de que como en el caso de  $G''$ , la  $\tan \delta$ , también es dependiente de la frecuencia cosa que no ocurre de manera tan significativa con  $G'$ .

Finalmente tenemos que a pesar de que en  $G''$  y  $\tan \delta$  existen diferencias significativas debidas a la frecuencia, los efectos más significativos en los tres parámetros analizados son debidos a la interacción que se presenta entre la gelana y los componentes de la leche descremada, que finalmente es la interacción que más nos interesa analizar en este sistema.

Sobre las bases de los resultados anteriores se puede concluir que es de interés analizar como los componentes de las mezclas de estudio y la variación en la concentración de dichos componentes afectan las propiedades reológicas del sistema.

### **7.3.1 Propiedades reológicas de las mezclas gelana-leche descremada**

En esta sección no se muestra la variación de los módulos dinámicos en función de la deformación para las formulaciones elaboradas a partir de gelana y sus respectivas mezclas de gelana-leche descremada, ya que muestran una tendencia similar a la que exhiben los geles de gelana. Sin embargo, cabe mencionar que los módulos dinámicos ( $G'$  y  $G''$ ) aumentan al aumentar la concentración de leche descremada en las formulaciones, para todas las concentraciones de gelana utilizadas.

Los intervalos de la ZVL y los valores de deformación en la cual se realizaron las determinaciones para cada una de las formulaciones se presentan en el anexo A, cuadro 6 y en dicho cuadro es posible observar que todas las determinaciones subsecuentes se realizaron en la zona de viscoelasticidad lineal. Las Figuras 29 a la 35 muestran los espectros mecánicos de las 35 formulaciones elaboradas, agrupados en función de la concentración de gelana presente en cada mezcla.

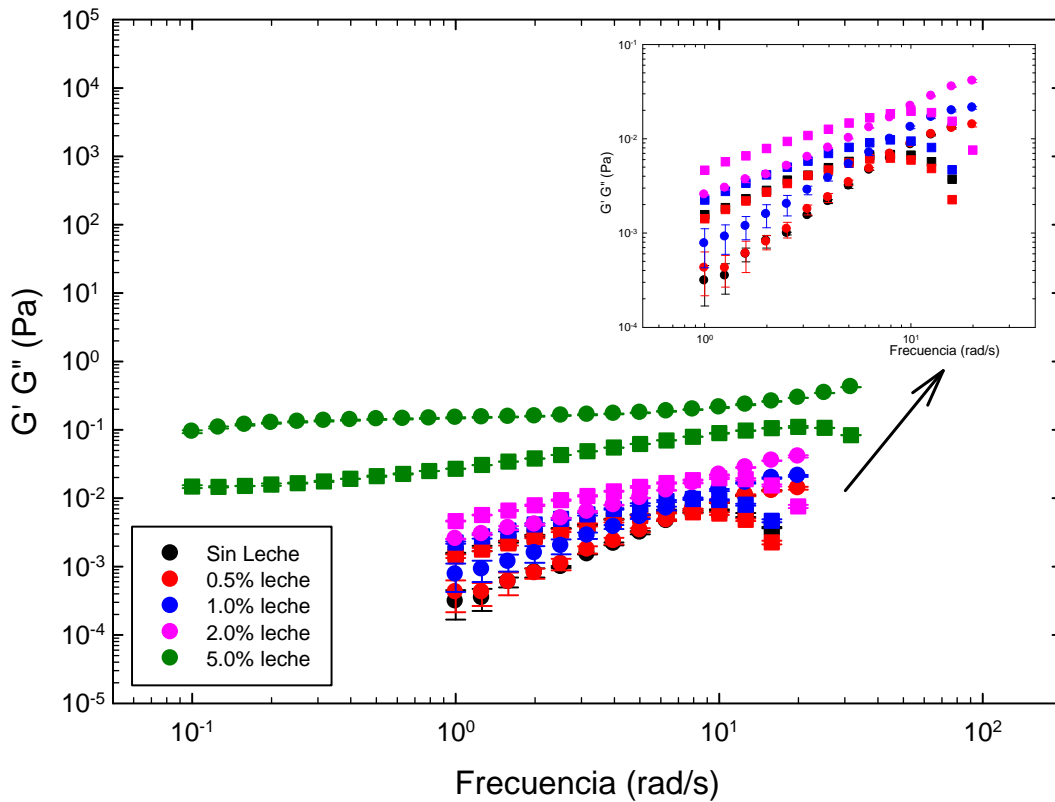


Figura 5. Espectros mecánicos de formulaciones con 0.01% de gelana y diferentes concentraciones de leche descremada a 25 °C, los cuadros representan G'' y los círculos G'.

En la Figura 29, se observa la variación de G' y G'' en función de la frecuencia para todas las mezclas con 0.01% de gelana. Es fácil apreciar que la mayoría de estos sistemas presentan un comportamiento predominantemente viscoso, es decir, prevalece el carácter líquido, puesto que  $G'' > G'$  y ambos módulos son altamente dependientes de

la frecuencia (véase anexo B, cuadro 9). Sin embargo, también es posible distinguir el incremento y la inversión en los módulos en la formulación con 5.0% de leche descremada ( $G' > G''$ ), además existe una menor dependencia de los módulos con la frecuencia para esta formulación, en comparación con las de menor contenido de leche (anexo B, cuadros 8 y 9).

En la Figura 30, es fácil distinguir una tendencia parecida a la observada en la Figura 29, es decir, al aumentar el contenido de leche aumentan los módulos dinámicos, la dependencia de dichos módulos con respecto a la frecuencia disminuye (anexo B, cuadro 9) y además los materiales cambian su comportamiento de líquido a sólido, como se aprecia en las formulaciones con 0.05% de gelana y 1.0, 2.0 y 5.0% de leche descremada. Sin embargo, a pesar de que estos sistemas presentan un comportamiento reológicamente sólido no tienen la capacidad de auto-sostenerse y físicamente se aprecian más como “geles fluidos”, ya que predominan las características anteriormente mencionadas para este tipo de materiales.

A medida que aumentamos la concentración de gelana, el incremento en los módulos dinámicos se aprecia más claramente y los sistemas comienzan a evolucionar de “geles fluidos” a “geles débiles” y finalmente a “geles verdaderos” o “geles fuertes”, como se puede ver en las Figuras 31-35.

En dichas figuras (31-35) se puede distinguir claramente el aumento de los módulos dinámicos debido al incremento de la concentración de gelana y además el incremento debido al aumento en la concentración de leche descremada. Esto es posible comparando los resultados en una misma gráfica y posteriormente entre las gráficas. Como se mencionó anteriormente, el comportamiento de las primeras 10 formulaciones (con 0.01 y 0.05% de gelana), es predominantemente líquido, sin embargo, dicho comportamiento es sólido a altas concentraciones de leche (5%) no obstante, la mayoría físicamente tenían apariencia de líquidos.

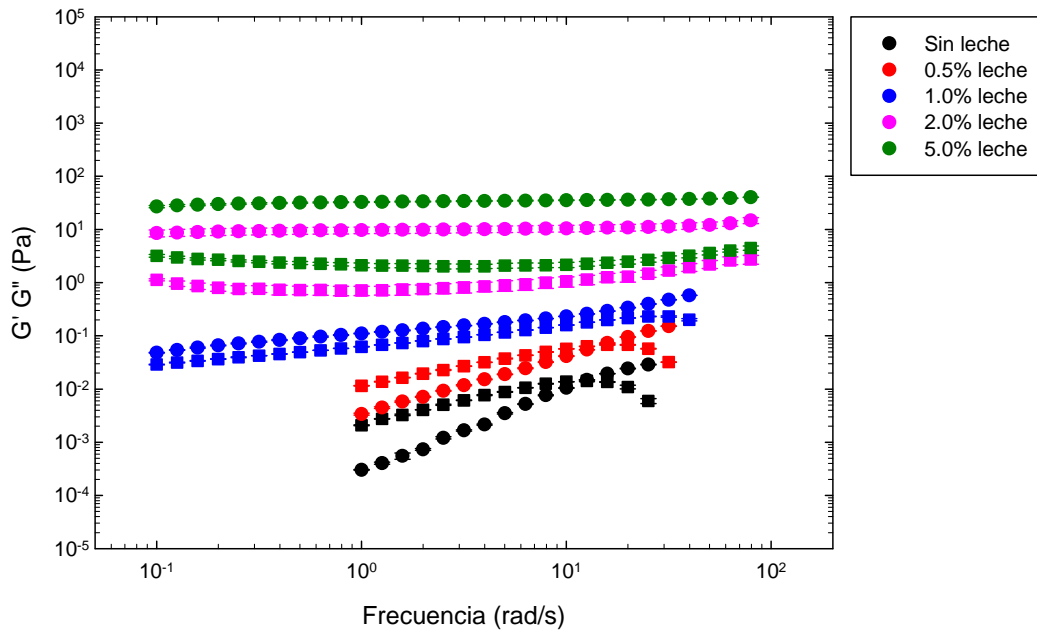


Figura 6. Espectros mecánicos de formulaciones con 0.05% de gelatina y diferentes concentraciones de leche descremada a 25 °C, los cuadros representan G' y los círculos G''.

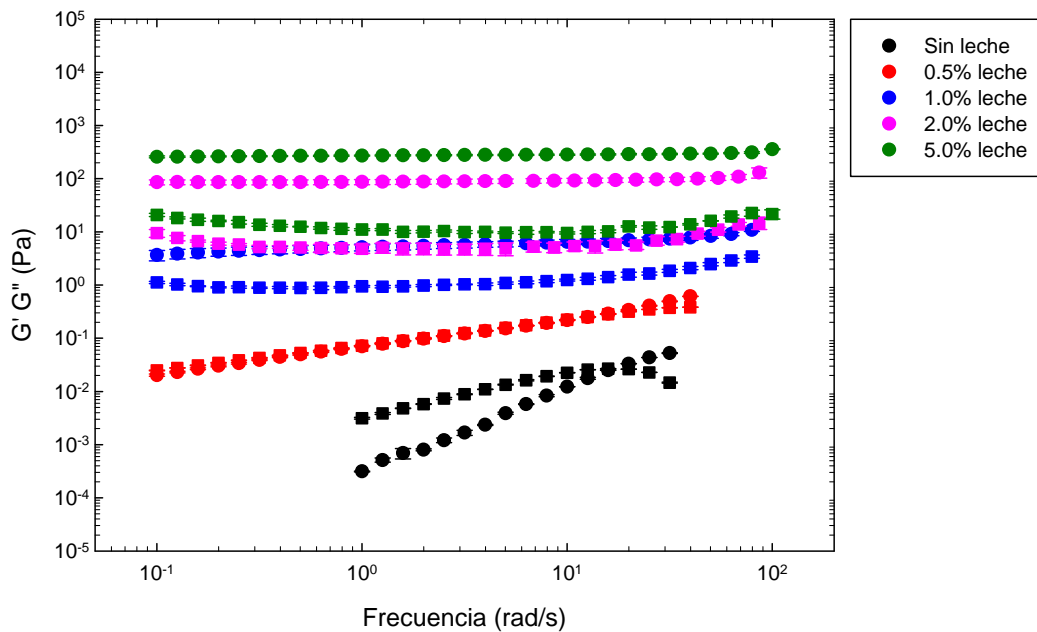


Figura 7. Espectros mecánicos de formulaciones con 0.1% de gelatina y diferentes concentraciones de leche descremada a 25 °C, los cuadros representan G' y los círculos G''.

En la Figura 31 el comportamiento comienza a invertirse claramente, en este caso, 3 formulaciones presentan un carácter predominantemente sólido, una formulación (la que contiene 0.5% de leche), está en el punto crítico de gel y sólo la disolución con gelana en ausencia de leche presenta el comportamiento de una disolución macromolecular. En los siguientes casos (Figuras 32-35) todas las formulaciones con leche exhiben un comportamiento predominantemente sólido, y sólo aquellas formulaciones elaboradas a partir de gelana únicamente presentan el comportamiento de disolución macromolecular.

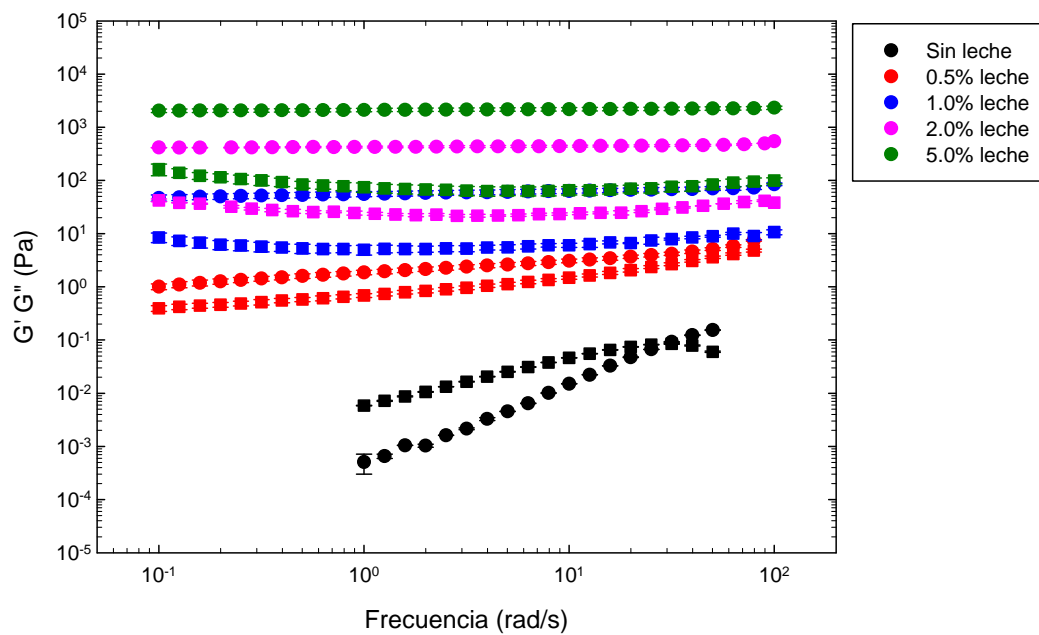


Figura 8. Espectros mecánicos de formulaciones con 0.3% de gelana y diferentes concentraciones de leche descremada a 25 °C.



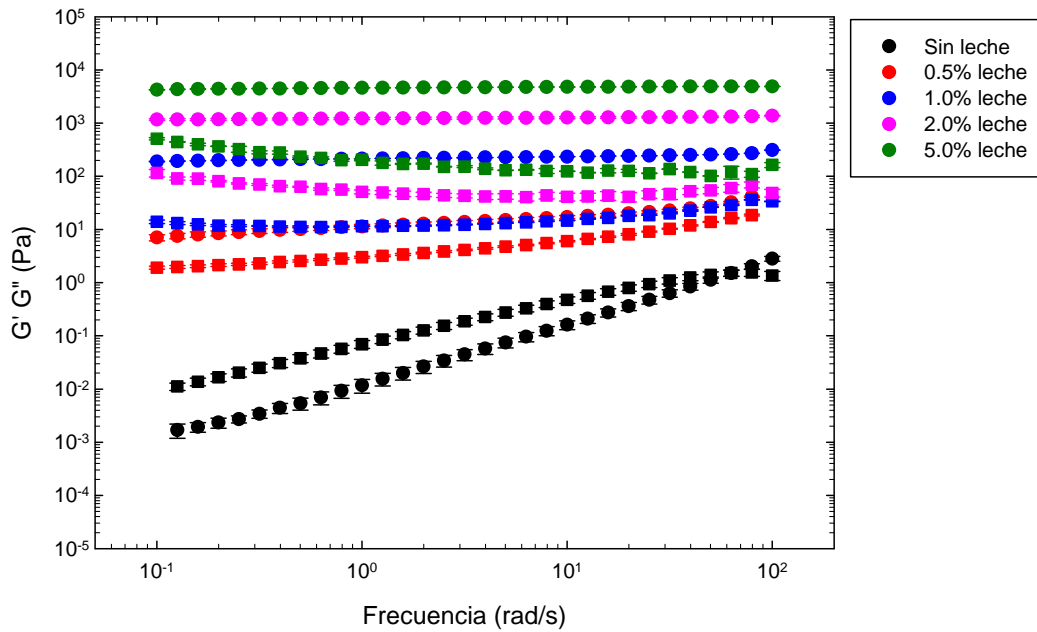


Figura 9. Espectros mecánicos de formulaciones con 0.5% de gelatina y diferentes concentraciones de leche descremada a 25 °C, los cuadros representan G'' y los círculos G'.

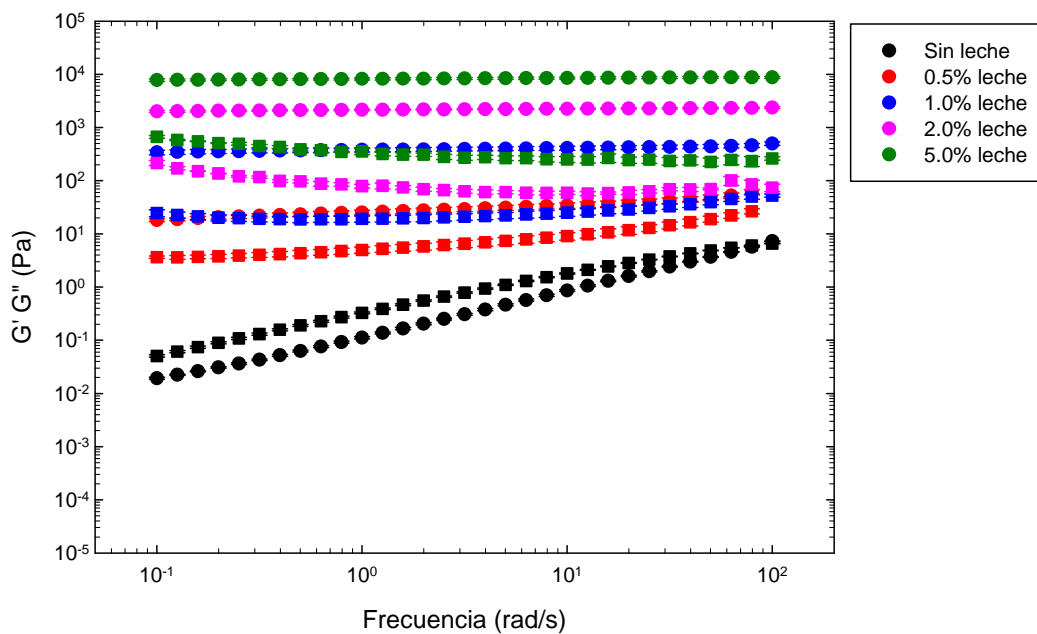


Figura 10. Espectros mecánicos de formulaciones con 0.6% de gelatina y diferentes concentraciones de leche descremada a 25 °C, los cuadros representan G'' y los círculos G'.

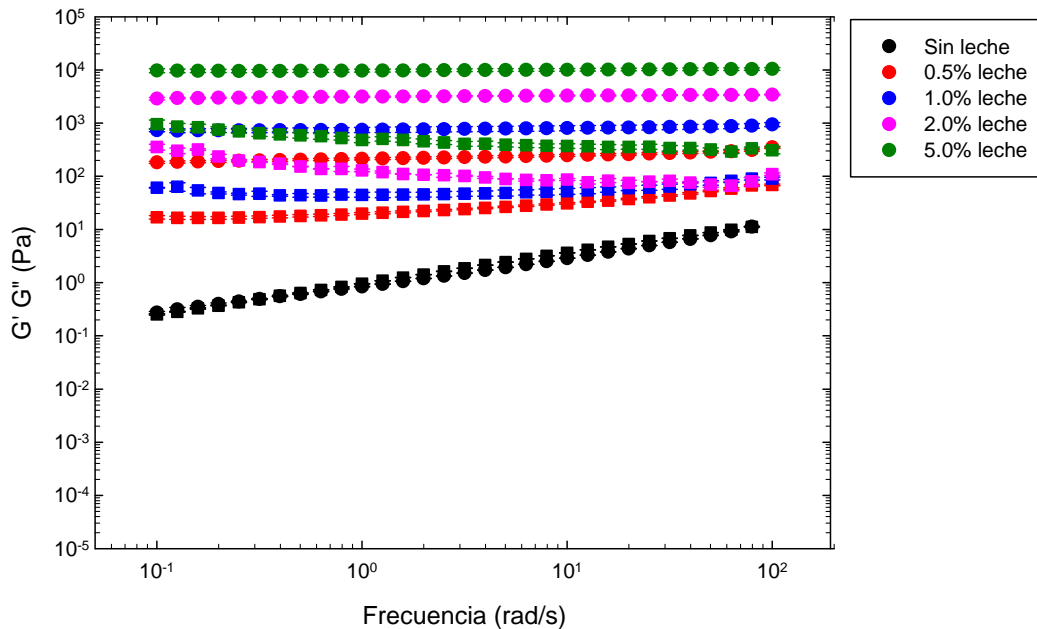


Figura 11. Espectros mecánicos de formulaciones con 0.7% de gelana y diferentes concentraciones de leche descremada a 25 °C, los cuadros representan  $G'$  y los círculos  $G''$ .

Como se observó en el análisis de varianza (anexo C), existen diferencias significativas entre las formulaciones al variar el contenido de leche, el contenido de gelana y en algunos casos al variar la frecuencia (este efecto se observa principalmente en el caso de las soluciones macromoleculares y en las mezclas con bajo contenido de gelana y leche).

Lo anterior se puede advertir en la Figura 36, en esta figura se puede observar cómo se modifica el módulo complejo (Figura 36a, el módulo complejo ( $G^*$ ) es la medida de la resistencia total del material a la deformación permanente, cuando dicho material es expuesto a pulsos repetidos de tensiones de cizallamiento y está definido como  $G^* = \sqrt{((G')^2 + (G'')^2)}$  y la  $\tan \delta$  (Figura 36b) en función del contenido de gelana. Por ejemplo, si se toman todas aquellas formulaciones con 5.0% del leche, se puede ver que los valores de  $G^*$  van desde 0.2 Pa (para 0.01% de gelana) hasta 10000 Pa (para 0.7% de gelana), mientras que para la  $\tan \delta$  los valores van desde 3 hasta 0.02; con esto es posible confirmar la existencia de un efecto de la concentración de gelana y leche descremada

sobre los valores de  $G'$  y  $G''$ . El conjunto de estas gráficas nos permite observar que se está incrementando el carácter elástico de los sistemas por lo que el módulo que presenta un mayor incremento es el módulo elástico.

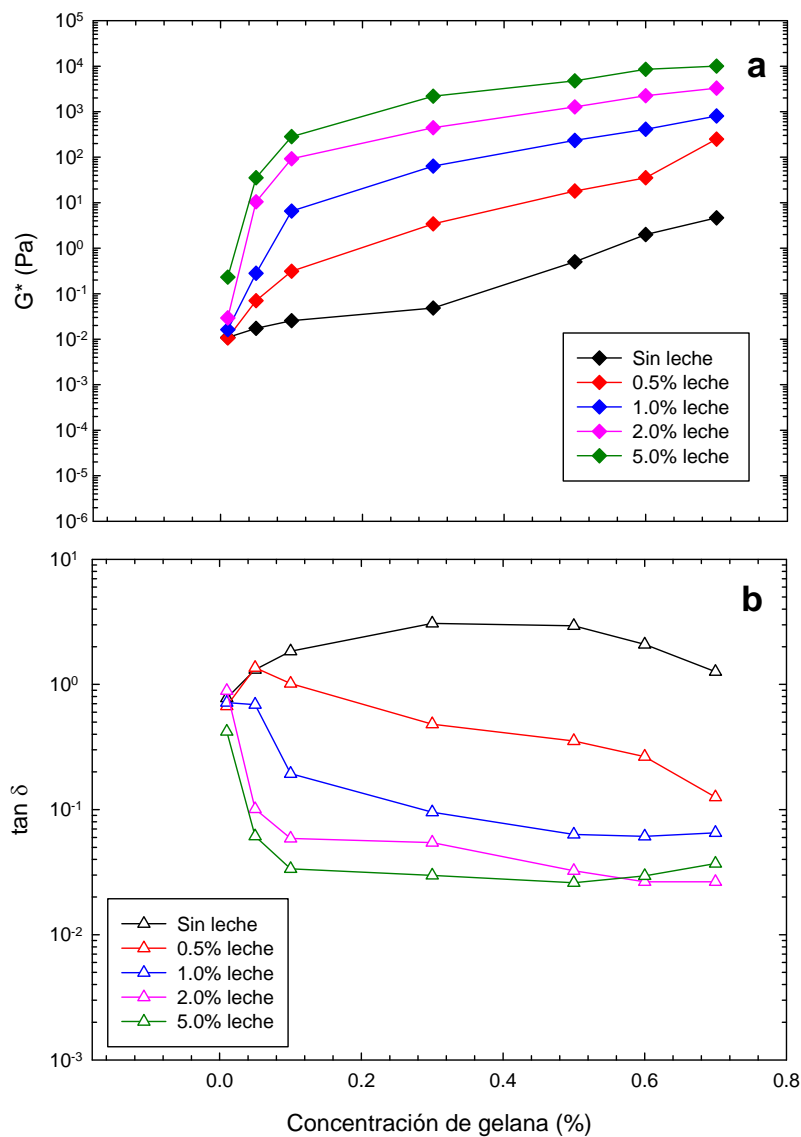


Figura 12. Variación de a) módulo complejo ( $G^*$ ) y b)  $\tan \delta$  en función de la concentración de la gelatina a diferentes concentraciones de leche, (frecuencia 10 rad/s, % de deformación entre 0.5 y 50).

En la Figura 37a también es posible percibir que para formulaciones por arriba de 0.5% de gelatina el incremento en  $G^*$  es menos marcado, el incremento en  $G^*$  hasta esta

concentración es 20000 veces mayor al de la formulación con 0.01% de gelana, sin embargo entre 0.5% de gelana y 0.7% de gelana los módulos sólo incrementan el doble, por lo cual la utilización en la industria de concentraciones por arriba de 0.5% de gelana no sería recomendable, debido a que los beneficios ya no serían significativos. El mismo comportamiento se observa para los valores de  $\tan \delta$  (Figura 37b).

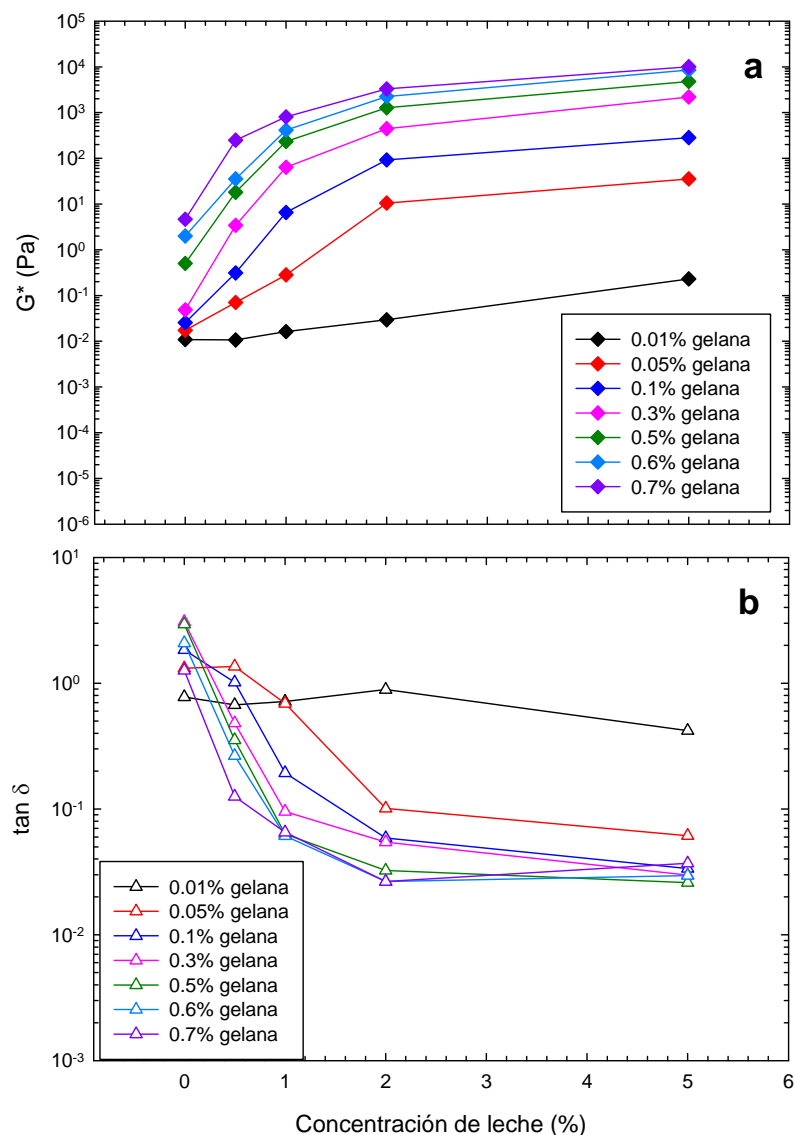


Figura 13. Variación de a) módulo complejo ( $G^*$ ) y b)  $\tan \delta$  en función de la concentración de leche a diferentes concentraciones de gelana (frecuencia 10 rad/s, % de deformación entre 0.5 y 50).

En los resultados presentados para todas las formulaciones, se puede observar que la leche tiene un efecto sobre las propiedades viscoelásticas de la gelana, ya que cuando se tiene la gelana sola, en todos los casos el comportamiento predominante es el de disolución macromolecular, sin embargo, cuando se adiciona leche, en la mayoría de las formulaciones, dichas soluciones se transforman en geles que van desde los geles débiles hasta los geles verdaderos. Por lo tanto, basados en los resultados hasta ahora presentados es posible suponer que los componentes de la leche pueden estar interactuando con el polisacárido, de tal manera que aumenten la estabilidad de la red debido posiblemente a dos factores:

- La concentración iónica total aumenta (ver anexo D, cuadro 15), debido al contenido de sales presentes en la leche descremada en polvo, el cual se determinó por medio de absorción atómica, promoviéndose así la gelificación de la gelana, ya que como se había visto al inicio de este documento, la gelana gelifica en presencia de iones, sin embargo, los iones divalentes son más efectivos para la formación del gel por el tipo de enlace involucrado en este proceso.
- Pueden existir interacciones entre los componentes de la leche descremada, específicamente las proteínas de la leche, las interacciones a las que más alusión se hace son las interacciones entre los grupos carboxilo de la gelana y la región cargada positivamente de la caseína, sin embargo la presencia de proteínas del suero también podrían estar modificando el comportamiento reológico de los sistemas obtenidos, debido principalmente a la temperatura a la que se realizan los geles, pues por arriba de 70 °C las proteínas del suero sufren una desnaturalización lo que favorece su interacción con la gelana.

Las curvas para la  $\tan \delta$ , no se presentan en este documento; sin embargo, se puede decir que mientras que en las soluciones de gelana predominaba el comportamiento

viscoso, en las formulaciones con leche, el comportamiento predominante fue el elástico con tangentes de delta cercanas a cero, es decir, ángulos de delta entre los 1.2° y los 23.4°, acercándonos cada vez más a valores más cercanos a cero a medida que se incrementaba la concentración de gelana y leche. Además en algunos casos fue posible encontrar tan  $\delta$  con valores iguales a 1, en estos casos, se dice que los módulos dinámicos son iguales e independientes de la frecuencia y este fenómeno ocurre debido a la existencia de una transición conformacional, producida por uno de dos factores, la concentración del polímero, en este caso la concentración de gelana o la concentración de gelana más leche descremada, y/o la temperatura.

Cuando se observó dicho fenómeno, se atribuyó a la concentración de gelana o a la concentración de la gelana más la leche, ya que ninguna de las determinaciones se realizó a una temperatura diferente a los 25 °C.

Posterior a estas determinaciones se realizaron barridos de temperatura a 10 formulaciones. La primera formulación que se eligió fue aquella que presentó gelificación con el menor contenido de iones, es decir, la relación gelana-leche descremada más baja, a partir de esta se eligieron 2 formulaciones para cada concentración de gelana una con 0.5% de leche y otra con 5.0% de leche.

La Figura 38 presenta uno de los barridos de temperatura obtenidos. En él se muestran los puntos en donde se tomaron la temperatura de gelificación y la temperatura de fusión para cada uno de los geles. Dicho punto se tomaba en donde  $G'$  y  $G''$  eran iguales e independientes de la frecuencia; ya que en este punto existe una transición conformacional debida al aumento o disminución de la temperatura.

Es importante hacer notar que las temperaturas de transición no son valores puntuales, sino intervalos de temperatura, sin embargo, para facilitar el análisis de los resultados

obtenidos en este trabajo, se consideró la temperatura de transición como un único valor de temperatura.

Una vez que se realizaron todos los barridos de temperatura para las formulaciones seleccionadas se realizó un gráfico en el que se presenta el diagrama de transición sol-gel para la sal de potasio de la gelana, en dicho gráfico se presentan también los valores experimentales para la transición sol-gel de la sal potásica de gelana obtenidos experimentalmente por Millas *et al.* (1996).

Se escogió la sal de potasio debido a que era el ión que se encontraba presente en mayor cantidad en ambos componentes de las mezclas.

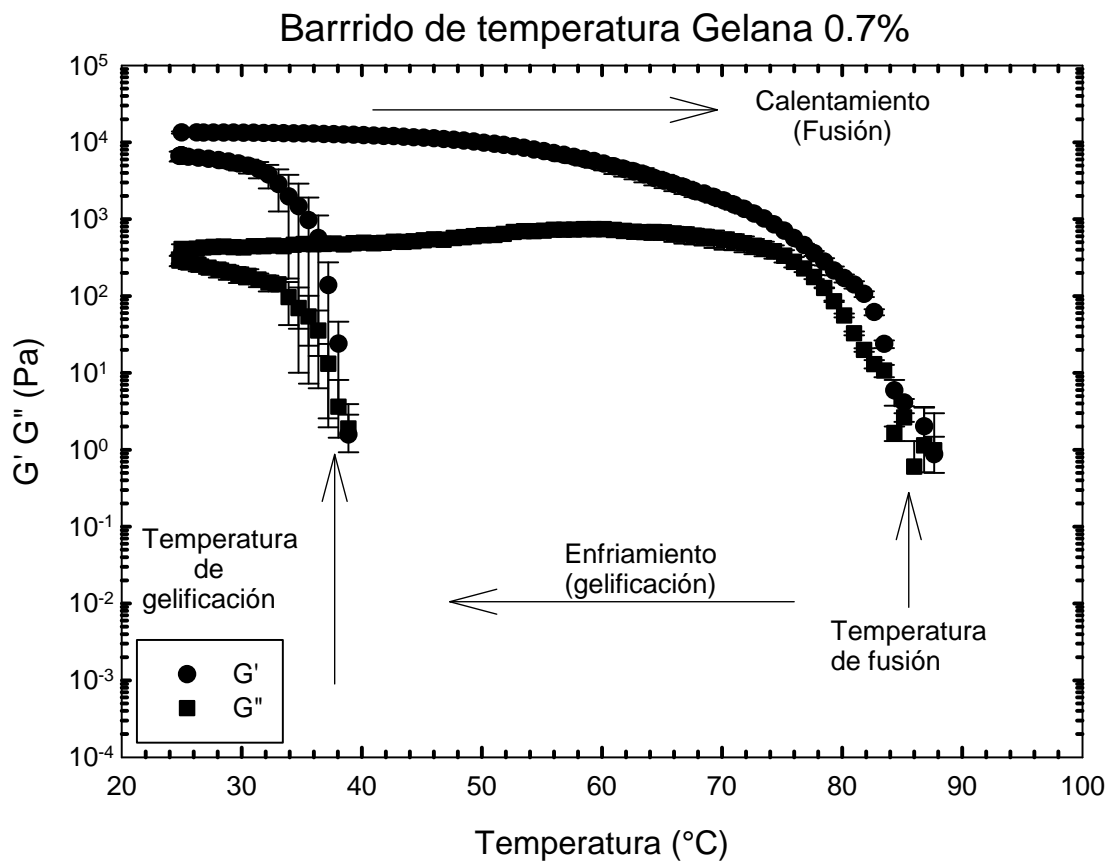


Figura 14. Barrido de temperatura de la formulación con 0.7% de gelana y 5.0% de leche, en calentamiento (25-90 °C) y en enfriamiento (90-25 °C), frecuencia 6.28 rad/s y deformación 0.1%.

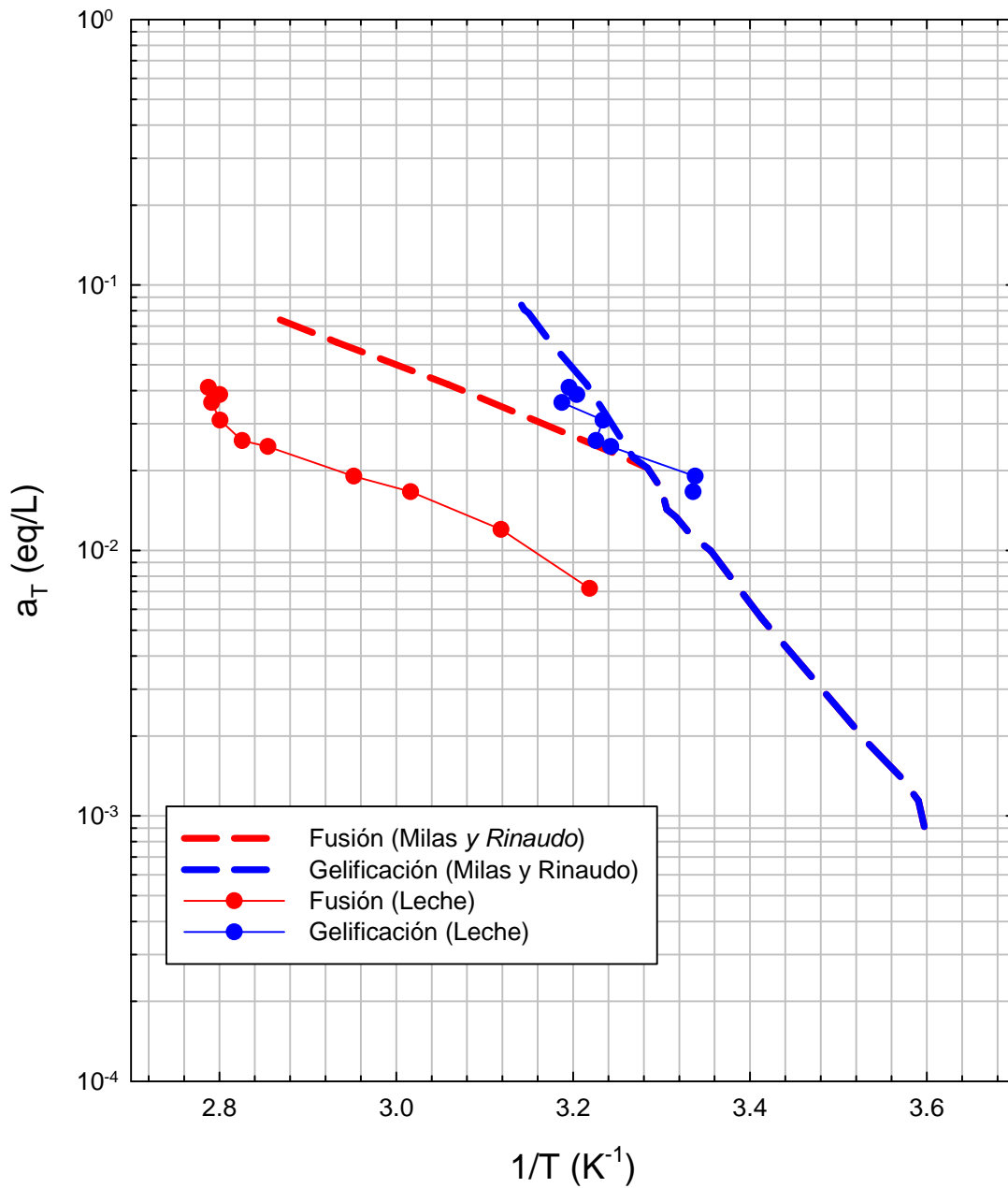


Figura 15. Diagrama de transición sol-gel, para la sal de potasio de la gelana comparando los valores con las temperaturas de transición de diez mezclas de gelana-leche descremada en polvo.

La Figura 39 muestra el diagrama de transición sol-gel obtenido para diez formulaciones de mezclas gelana-leche descremada en polvo. En dicho diagrama se puede observar que la temperatura de transición sol-gel de la sal de potasio de gelana



difiere de la temperatura de transición sol-gel de las mezclas elaboradas a partir de gelana y leche en todos los casos.

En enfriamiento se presentan sólo 8 temperaturas de transición, ya que las dos temperaturas faltantes, se encuentran presumiblemente por debajo de los 25 °C, sin embargo, es posible apreciar que las temperaturas de gelificación, en todos los casos, presentan valores muy cercanos a los obtenidos por Milas y *Rinaudo (1996)*, es decir, las mezclas gelana-leche descremada, no modifican significativamente la temperatura de gelificación de gelana con iones potasio.

Por el contrario, todas las temperaturas de fusión de las mezclas gelana-leche descremada son significativamente superiores a aquellas obtenidas por Milas y *Rinaudo (1996)* para la sal de potasio de la gelana. Entonces, es posible sugerir que existe una interacción entre la gelana y los componentes de la leche descremada que modifican apreciablemente dichas temperaturas.

A pesar de las diferencias o no de los datos obtenidos en este estudio y los presentados por Milas y *Rinaudo (1996)*, las temperaturas de transición en todos los casos presentan un comportamiento proporcional con la temperatura, es decir, a medida que incrementa la concentración total o actividad total se incrementa también la temperatura de transición.

Las formulaciones elaboradas a partir de mezclas de gelana-leche descremada en polvo presentan, en su mayoría, un comportamiento que es predominantemente elástico. En este caso se puede observar que existe un efecto sinérgico entre la gelana y los componentes de la leche. Dentro de los componentes que más importancia tienen en las características finales del sistema se tiene a los iones, en especial los cationes como el calcio, el magnesio, el sodio y el potasio, y las proteínas de la leche que como se ha visto en numerosos estudios (*Schorsch, Jones y Norton 2000; Sedlmeyer et al., 2003;*

Spagnuolo *et al.*, 2005; Hemar *et al.*, 2002) tienen la capacidad de interactuar con los polisacáridos para incrementar la fuerza de los geles, y/o estabilizarlos.

Los iones juegan un papel importante al ser los sitios de unión para que ocurra el entrecruzamiento de las dobles hélices formadas por las cadenas de gelana.

Por otro lado, las proteínas pueden interactuar con los polímeros. En este caso es posible sugerir, basados en los resultados reológicos, que en la gelana se presenta el mismo fenómeno de adsorción a la superficie de la micela de caseína, como el que exhibe la  $\kappa$ -carragenina (Schorsch, Jones y Norton 2000; Baeza *et al.*, 2002; Heertje, 1993). Aunque, si bien es cierto, que las caseínas no se encuentran desnaturalizadas, debido a que se utilizó una temperatura de 90 °C para la preparación de las formulaciones, si presentan cierto grado de desdoblamiento (Heertje, 1993) que hace posible la interacción de dicho conjunto de proteínas con el polisacárido.

En este sistema no solo las caseínas son importantes, puesto que las proteínas del suero también pueden interactuar con la gelana ya que dichas proteínas están totalmente desnaturalizadas porque la temperatura que se utilizó en la elaboración de las mezclas fue de 90 °C y 10 min., y estas proteínas necesitan para desnaturalizarse entre 70 y 75 °C aplicados por al menos 3 min., por lo tanto la probabilidad de que interaccionen estos componentes (gelana y proteínas de suero) es mayor en comparación con la interacción que podría darse con las caseínas. Las proteínas más importantes para el sistema son la  $\beta$ -lactoglobulina y la  $\alpha$ -lactoalbúmina, ya que son las proteínas que se encuentran en mayor concentración en el lactosuero, aunado a esto, en diversos estudios realizados (Tavares y Lopes da Silva, 2003; Perez *et al.*, 2009; Pérez, Wargon y Pilosof, 2006; Lizarraga *et al.*, 2006; Bryant y McClements, 2000; Lutz *et al.*, 2009; Rocha *et al.*, 2009) se ha observado que las proteínas del suero interactúan con los polisacáridos para formar sistemas complejos los cuales tienen un comportamiento reológico diferente al de los polisacáridos solos en disolución. Unificando toda esta información, es posible

suponer que existan interacciones entre todos los componentes de la leche y la gelana, las cuales modifican de manera significativa las propiedades viscoelásticas y la temperatura de transición de los sistemas que se han venido analizando a lo largo de este documento.

Es de interés mencionar el complejo que se forma entre la  $\kappa$ -caseína y la  $\beta$ -lactoglobulina al someter a calentamiento la leche, debido principalmente a que este complejo podría facilitar la interacción entre la gelana y todo el conjunto de proteínas lácteas, presentes en la leche descremada, porque podría estar formando un puente de unión entre la gelana y las caseínas. Si se toma en cuenta que las proteínas del suero están parcialmente desnaturalizadas y que debido a esto tiene un gran número de residuos de aminoácidos expuestos, los cuales pueden tener grupos cargados positivamente o átomos capaces de formar puentes de hidrógeno, como oxígeno, azufre y nitrógeno, entonces es posible proponer la existencia de un incremento en el número y el tipo de interacciones que se presentan en el sistema de estudio. Una de las ventajas que estaría proporcionando el complejo al sistema, es la estabilidad, ya que dicho sistema es más estable que los componentes por separado, a causa del establecimiento de un puente disulfuro entre ambas proteínas. Este es un tema que no ha sido considerado, básicamente porque en la mayoría de los estudios realizados se trabaja con sistemas aislados, es decir, con mezclas polisacárido y sólo un tipo de proteína láctea, ya sea caseína o proteínas de suero. No obstante, podría ser una interacción importante en el sistema y uno de los factores que contribuyen a la modificación de las propiedades reológicas de las mezclas gelana-leche descremada.

Finalmente, es importante mencionar que las interacciones que parecen ser más importantes hasta este momento son las que se presentan entre las proteínas de la leche y la gelana, debido principalmente a las regiones cargadas que ambos biopolímeros poseen, lo que favorece las interacciones electrostáticas entre estos componentes.

## 7.4 Mezclas gelana-KCl

Como se pudo observar en el apartado anterior, a partir de los resultados mostrados es posible sugerir que existe un efecto sinérgico entre las proteínas de la leche y la gelana. Sin embargo, para corroborar que el efecto presentado no sea ocasionado por la presencia de iones en la materia prima se realizaron 10 formulaciones más, en las que se agregó la cantidad de potasio necesaria para igualar la concentración de iones potasio proporcionados por la leche.

Los intervalos de deformación de estos sistemas se presentan en el anexo A en el cuadro 7, en dicho cuadro también es posible apreciar el tipo de geometría que se utilizó para cada uno de los sistemas estudiados.

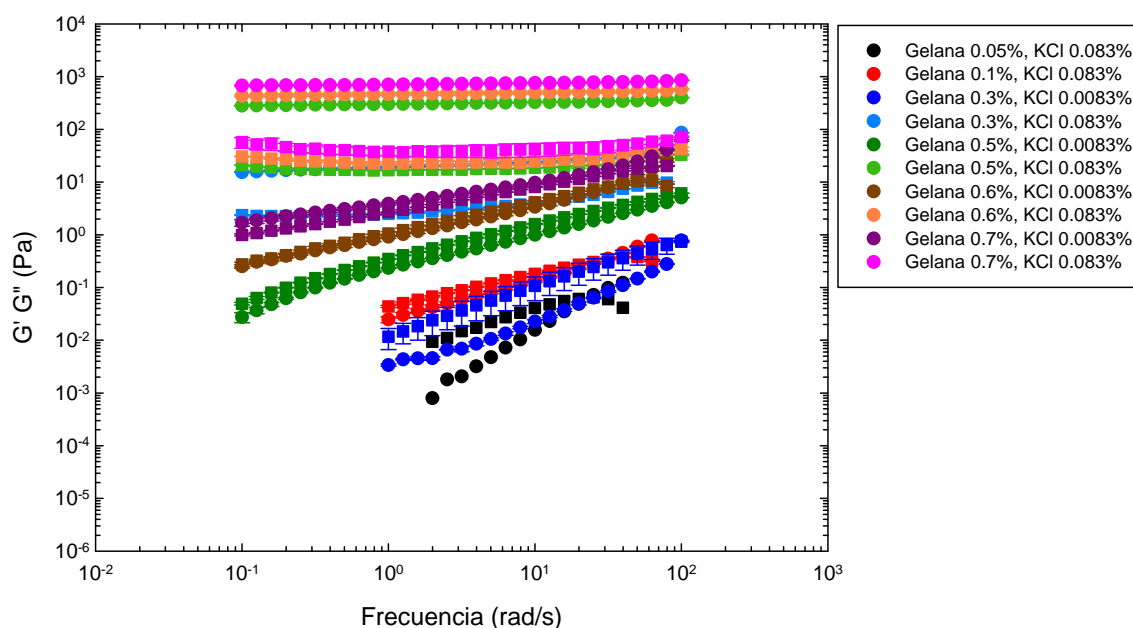


Figura 16. Espectros mecánicos para las formulaciones elaboradas a partir de mezclas gelana-KCl, los cuadros representan  $G''$  y los círculos  $G'$ .

La Figura 40 muestra los espectros mecánicos de las formulaciones a las cuales se les adicionó KCl. En esta gráfica se puede apreciar que cuatro de los sistemas presentan un comportamiento predominantemente elástico, tres formulaciones presentan un

comportamiento en el que predomina el carácter viscoso y los tres sistemas restantes se encuentran muy cercanos a el punto crítico de gel de la mezcla gelana-KCl, es decir, el predominio de un comportamiento sobre otro no es significativo o simplemente no existe.

Los sistemas que están cercanos al punto crítico de gel tienen una misma concentración de iones y lo único que varía es la concentración de gelana. Para el sistema con 0.5% de gelana y 0.0083% KCl (símbolos verde oscuro) el carácter viscoso predomina ligeramente, ya que  $G''$  esta por arriba de  $G'$  (ver anexo B cuadro 11) y ambos módulos son dependientes de la frecuencia, sin embargo los módulos están muy próximos. El siguiente sistema es el de 0.6% de gelana y 0.0083% de KCl (símbolos rosa oscuro) y éste se encuentra en el punto crítico de gel puesto que tanto  $G'$  como  $G''$  son iguales (ver parámetros en el anexo B, cuadro 10); y finalmente en el sistema de 0.7% de gelana y 0.0083% de KCl predomina ligeramente el carácter elástico, pero aunque  $G'$  es mayor que  $G''$ , dichos módulos siguen guardando una alta dependencia con respecto a la frecuencia (ver anexo B, cuadro 10) por lo que no es posible afirmar que sea un gel, aunque basados en los conceptos que se brindaron anteriormente se puede decir que se comporta como un gel fluido.

Si se comparan los valores de los módulos para estas formulaciones con las formulaciones equivalentes, pero con la presencia de leche en lugar de los iones es posible apreciar que existe una diferencia que es significativa, para las formulaciones con leche los módulos van desde 26.0 Pa hasta 10,500 Pa para  $G'$  y desde 3.0 Pa hasta 1000 Pa para  $G''$ , mientras que para las formulaciones elaboradas con KCl, los módulos varían entre 0.002 Pa y 850 Pa para  $G'$  y entre 0.01 Pa y 75 Pa para  $G''$ . Con estos resultados es posible apreciar la magnitud de la diferencia entre estas formulaciones. Hay que recordar que las formulaciones se elaboraron con la cantidad de KCl equivalente a la que proporcionaba la leche en las mezclas de gelana-leche descremada.

Para facilitar un poco la comparación entre las formulaciones elaboradas con leche y aquellas hechas con KCl, se presenta la Figura 41, en ella podemos observar el módulo complejo ( $G^*$ ) en función del contenido de gelana, leche descremada o KCl

En el caso de las formulaciones con bajo contenido de leche descremada o KCl, es posible percibir que la tendencia con la que el módulo incrementa es similar en ambos casos. Sin embargo, en las formulaciones realizadas con leche descremada el módulo complejo es dos órdenes de magnitud mayor que el módulo para las formulaciones elaboradas con KCl.

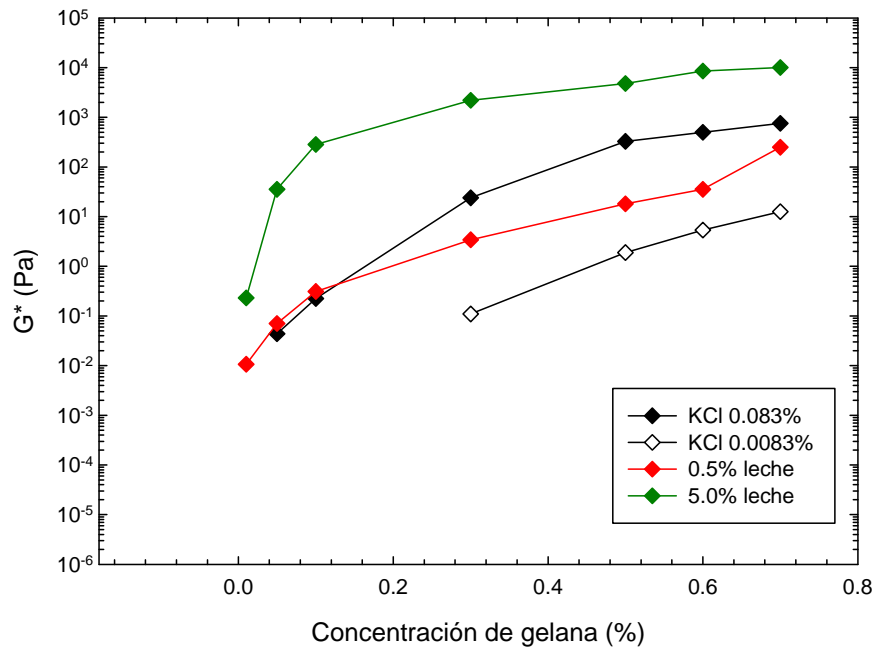


Figura 17. Módulo complejo ( $G^*$ ) en función del contenido de gelana, leche descremada y KCl, (frecuencia 10 rad/s, % de deformación entre 0.5 y 50).

Por otro lado, las formulaciones elaboradas con una alta concentración de leche o KCl tienen un comportamiento ligeramente diferente. Para las formulaciones con leche descremada el módulo complejo aumenta de manera significativa al aumentar la concentración de gelana; no obstante, después de concentraciones de gelana superiores a 0.3% el incremento ya no es significativo; no así en el caso de las formulaciones

elaboradas con KCl, para éstas, el aumento es continuo en un inicio y también deja de ser significativo para concentraciones superiores al 0.5% de gelana.

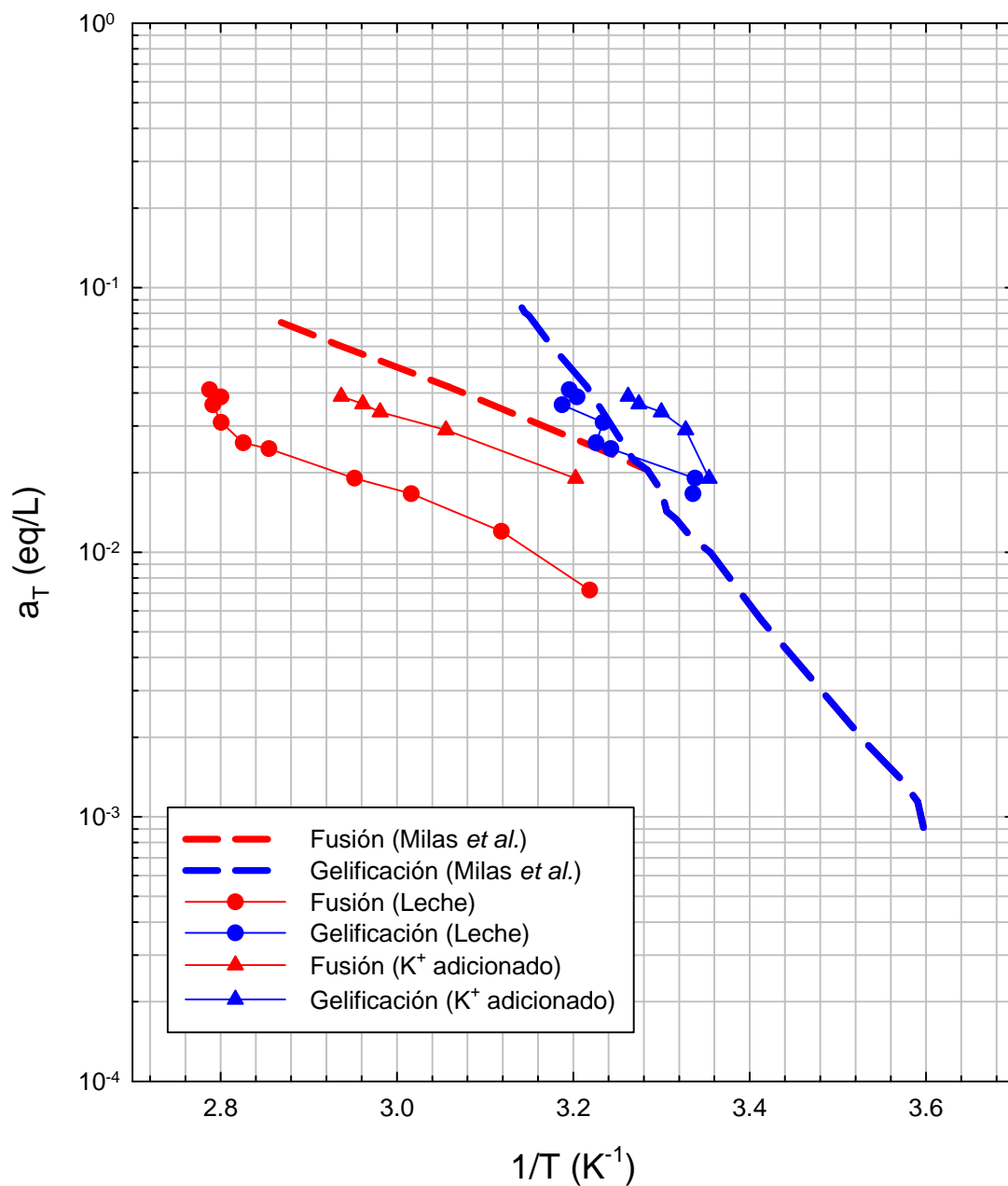


Figura 18. Diagrama de transición de la gelana como sal de potasio (líneas punteadas), de las formulaciones elaboradas con mezclas de gelana-leche descremada (círculos) y de las mezclas gelana-KCl (triángulos)

Es importante hacer notar que la diferencia entre estas formulaciones es, en la mayoría de los casos, de un orden de magnitud, aunque es importante recordar que la escala es logarítmica.

Con estos resultados es posible concluir que existe un efecto de la leche sobre las propiedades reológicas de la gelana, sin embargo para confirmar que se modificaban todas las propiedades reológicas también se realizaron barridos de temperatura a las formulaciones de mezclas gelana-KCl.

Con estos barridos se determinaron nuevamente las temperaturas de transición y dichas temperaturas se incorporaron al diagrama de transición sol-gel presentado anteriormente en la Figura 39, el diagrama de transición final se presenta en la Figura 42. En este diagrama es posible observar que existe un desplazamiento de las temperaturas de transición, en ambos casos, tanto en gelificación como en fusión y también es posible apreciar que las temperaturas en fusión se modifican de una manera más significativa, que las respectivas temperaturas de gelificación. Los valores de las temperaturas de gelificación en todos los casos (gelana-KCl, gelana-leche descremada y gelana como sal de potasio), son muy cercanos entre sí.

No obstante, las temperaturas de fusión varían notablemente entre las formulaciones elaboradas a partir de mezclas de gelana-KCl y aquellas hechas a base de gelana-leche descremada.

Con base en lo anterior es posible suponer que las interacciones que se presentan en los sistemas polisacárido-proteínas son más y/o más fuertes que aquellas formadas únicamente por gelana y KCl, esto ocasiona que se requiera de una mayor energía para romper las estructuras que se forman, lo que se traduce en un mayor consumo de calor para la ruptura de los enlaces. Pese a que como se ha mencionado anteriormente las interacciones presentes son del tipo de interacciones débiles, por ejemplo: interacciones



de van der Waals, puentes de hidrógeno, etc., el numero de enlaces que se forma es tan grande que se requieren altos niveles de energía para deshacerlos.

Finalmente, los sistemas formados a partir de mezclas gelana-KCl, presentaron en su mayoría un comportamiento viscoso, sólo 4 sistemas presentaron un carácter predominantemente elástico y esto fue debido a que, como se mencionó en los capítulos iniciales, la gelana requiere de la presencia de iones para promover el proceso de gelificación. Sin embargo, los valores de  $G'$  y  $G''$  obtenidos con estos sistemas se encuentran por debajo de los valores obtenidos para las formulaciones equivalentes pero con la presencia de leche y sin la adición de iones potasio. En algunos casos, los sistemas con cloruro de potasio se comportaron como soluciones macromoleculares, no así en las formulaciones con leche. Todas las formulaciones elegidas para hacer el diagrama de transición se comportaban como un gel.

Basados en lo anterior, se puede contemplar la existencia de interacciones proteína-polisacárido que están afectando las propiedades viscoelásticas de los sistemas analizados y no se trata solamente de la presencia de iones en la leche lo que hasta este punto, estaría modificando el comportamiento de la gelana al adicionar leche descremada al sistema.

## **7.5 Fuerza Iónica**

Pese a que todos los resultados mostrados anteriormente llevan a suponer la existencia de algún tipo de interacción que modifica las propiedades reológicas de los sistemas, aumentando el carácter elástico de todas las formulaciones al agregar leche, no se puede garantizar esta afirmación del todo, debido a que aún es necesario tomar en cuenta otro factor muy importante en el proceso de gelificación de la gelana, este factor es

la fuerza iónica (I). Los valores de fuerza iónica de todas las formulaciones elaboradas se presentan en el anexo D, cuadros 15 y 16.

En el primer cuadro (15), se presenta la fuerza iónica de las formulaciones de gelana sola y las respectivas mezclas gelana-leche descremada, es importante hacer notar que la fuerza iónica se calculó con base al contenido de calcio, sodio, magnesio y potasio presentes en las materias primas utilizadas para la elaboración de las mezclas y no sólo considerando la cantidad de iones potasio presentes como se realizó para el caso del diagrama de transición presentado anteriormente.

El segundo cuadro (16), por su parte, presenta las diferencias de fuerza iónica presentes en las formulaciones de las mezclas gelana-leche descremada seleccionadas para la realización del diagrama de transición y aquellas consideradas como sus respectivos blancos. En dicho cuadro es posible darse cuenta de que en los casos con un bajo contenido de leche, la diferencia de fuerza iónica llega a ser del 45%, siendo la fuerza iónica mayor en aquellas formulaciones que contenían leche. Por otro lado, para las formulaciones que contenían un mayor contenido de leche las diferencias presentan valores hasta de un 75%, siendo en este caso, también, valores mayores para las formulaciones a las que se les adicionó leche.

A partir de los resultados anteriores se puede pensar que el efecto que se observa en las propiedades viscoelásticas de las formulaciones analizadas es debido básicamente a la presencia de altas concentraciones de iones, provistos por la adición de leche descremada a las soluciones con gelana; sin embargo, esto tampoco es del todo posible debido a que no todos los iones presentes en la leche se encuentran presentes para interaccionar con las cadenas de gelana, se ha visto que tanto el calcio como el magnesio tienen la capacidad de asociarse con proteínas cargadas negativamente. Además, expresado en mol de iones por mol de caseína hay aproximadamente 18.0 mol de calcio

asociados con las micelas de caseína; 1.4 mol de  $Mg^{2+}$ ; 2.0 mol de  $K^+$  y 0.9 mol de  $Na^+$  (Walstra y Jenness, 1987), lo cual dificultaría que todos los iones presentes interaccionaran con la gelatina. No obstante, tampoco es posible asegurar que todos los iones estén formando parte de las micelas u otras estructuras en la leche; por lo cual hay que tener en cuenta que los iones tienen efectos sobre las propiedades reológicas de la gelatina. Por ejemplo, el efecto de los iones sobre la capacidad de gelificación de la gelatina o la dureza del gel. Se ha visto que la dureza de un gel de gelatina al 1%, después de concentraciones superiores a 100 mM para cationes monovalentes y 5 mM para cationes divalentes comienza a disminuir, es decir, se llega a un punto de saturación y después de este comienza a presentarse un fenómeno de competición por el agua de solvatación, en donde los iones tienen muchas más ventajas frente a la molécula de alto peso molecular que representa la gelatina. Para el mismo gel, se descubrió que la temperatura de gelificación, aumenta alrededor de 30 °C al incrementar de 10 mM a 500 mM la concentración de iones monovalentes, mientras que se ve el mismo incremento al pasar de una concentración 1 mM de iones divalentes a 25 mM (Kelco Applications bulletin CD-34). En el sistema de estudio no se utilizan concentraciones tan altas de gelatina, a pesar de ello, las modificaciones en el comportamiento reológico se ven afectadas del mismo modo. Para aclarar estas dudas sería conveniente igualar la fuerza iónica de las formulaciones, agregando cantidades y iones equivalentes a los proporcionados por la leche, y determinar las propiedades viscoelásticas, esto daría una clara respuesta de si existe o no un efecto de las proteínas de la leche descremada sobre las propiedades viscoelásticas de la gelatina o si el efecto que se observó fue debido a los iones presentes.

Basados en lo expuesto anteriormente no es posible confirmar que las interacciones planteadas entre las proteínas de la leche y la gelatina sean las responsables de las modificaciones en el comportamiento reológico de los sistemas estudiados, a pesar de esto, tampoco es posible descartarlas del todo.

Como herramienta final para tratar de aclarar un poco esta situación, se utilizó la microscopía confocal de barrido láser, la cual permite conocer un poco acerca de la microestructura de los sistemas, esta técnica puede proporcionar una respuesta a las interrogantes de la existencia o no de una interacción entre la gelana y las proteínas lácteas y de cómo varían estas interacciones en función de la concentración de la gelana y de la presencia de iones y/o leche descremada en las formulaciones analizadas.

## **7.6 Microscopía Confocal de Barrido Láser**

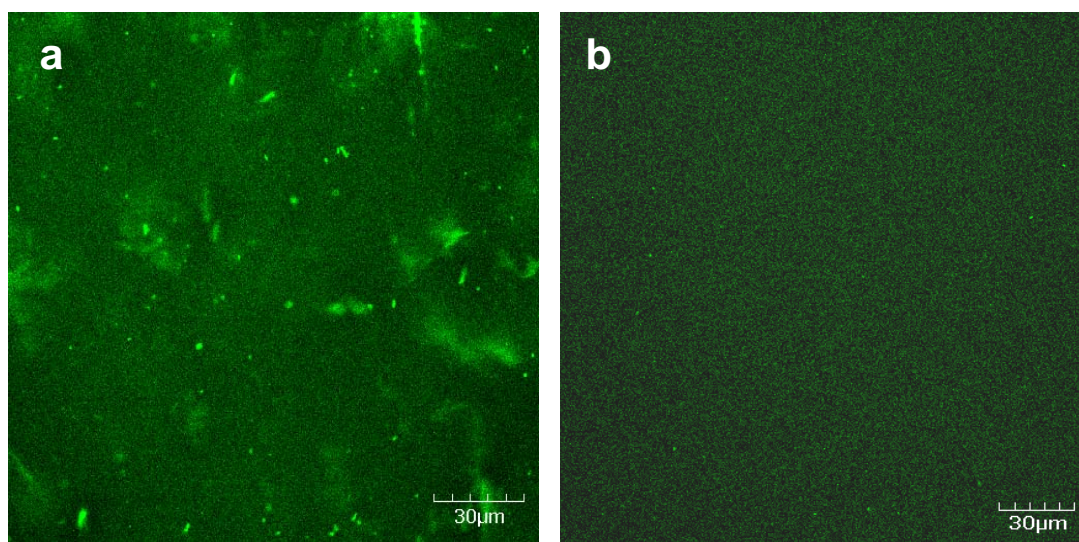
Para la realización de esta técnica se escogieron únicamente dos concentraciones de gelana y se prepararon en ausencia de iones y/o leche; con leche y con iones potasio. Con estas formulaciones pretendíamos abarcar todos los comportamientos observados en los resultados de las pruebas reológicas.

Para las formulaciones de 0.1 y 0.3% de gelana, sin adición de iones y/o leche, no fue posible obtener micrografías, se cree que esto se debe a que a esta concentración el polisacárido no presenta un sistema estructurado y por lo tanto, pese a que la concentración es relativamente alta por tratarse de un biopolímero, las hebras se encuentran dispersas aleatoriamente dificultándose así su localización, mediante esta técnica.

En la Figura 43, se presentan las micrografías de gelana al 0.1 y 0.3% de concentración con 0.083% de KCl (equivalente al potasio proporcionado por una concentración de 5% de leche), en estas imágenes es posible apreciar que al adicionar el ión al sistema, éste se estructura y además, es posible observar una mayor continuidad al aumentar la concentración del biopolímero de 0.1 a 0.3%.

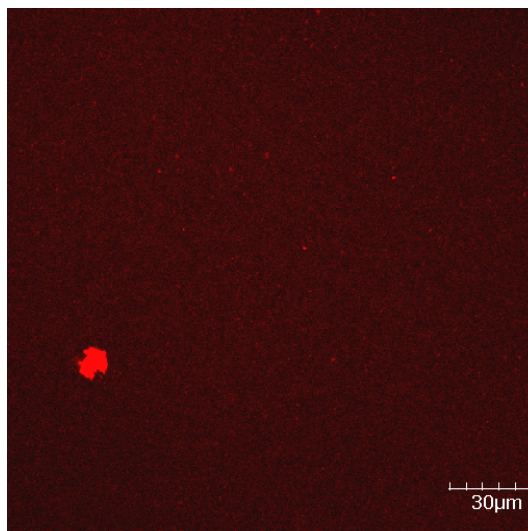
En dichas imágenes, es posible observar una mayor intensidad de fluorescencia en la micrografía que corresponde a la formulación con 0.3% de gelana, sin embargo, como se mencionó anteriormente, ambos sistemas son continuos y altamente estructurados, a

causa de la presencia de iones en el sistema. Cabe mencionar que en la formulación con 0.3% de gelana se observa la presencia de pequeños agregados, debidos a la alta concentración del biopolímero o a que se formaron grumos cuando se realizó la dispersión, sin embargo, los resultados no se ven muy afectados por esta cuestión.



*Figura 19. Micrografías de formulaciones elaboradas con gelana. a) 0.3%, b) 0.1%, ambas con 0.083% de KCl, objetivo 60x, zoom 4x.*

Por otro lado, en la Figura 44, se presenta la micrografía para una solución de leche únicamente. En este caso el sistema se aprecia homogéneo y continuo, aunque la intensidad de fluorescencia que se obtiene es muy baja, en comparación con las micrografías que se mostraran más adelante. Asimismo, se puede apreciar la presencia de un gránulo probablemente del fluoróforo utilizado para marcar las proteínas de la leche. Estas imágenes tienen como finalidad mostrarnos a cada uno de los componentes del sistema por separado y así poder distinguir los cambios ocurridos después de realizar la mezcla de ambos componentes.

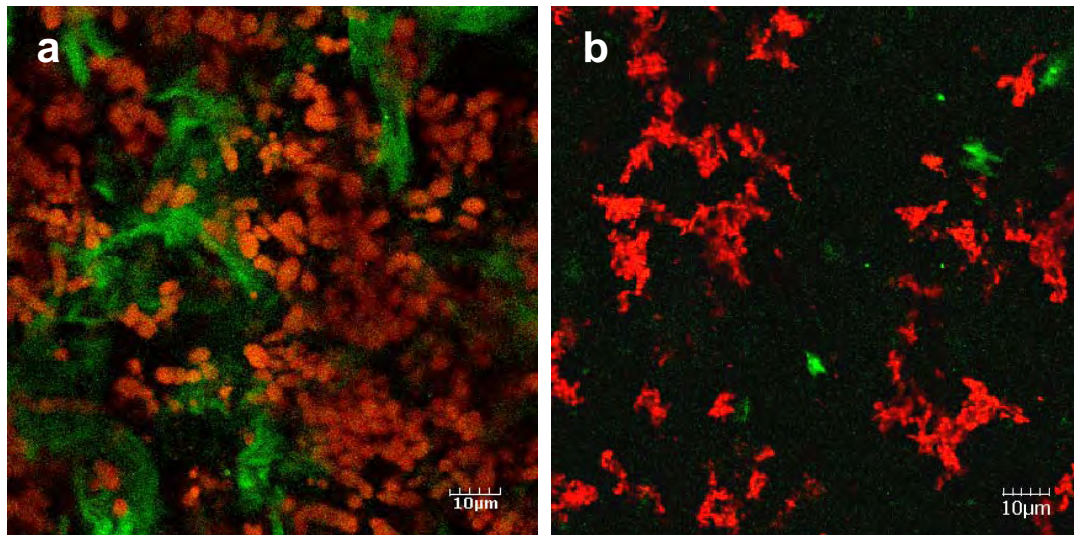


*Figura 20. Micrografía de una solución con 5% de leche descremada, objetivo 60x, zoom 4x.*

Las siguientes micrografías (Figura 45), son las de las formulaciones de mezclas gelana-leche descremada, en ellas se puede observar, que la estructura se modifica notablemente en comparación con la que presentaban cada uno de los componentes por separado. Además, dichas diferencias también se ven modificadas en función del contenido de gelana presente en las formulaciones. Para la obtención de estas micrografías se utilizó una herramienta conocida como colocalización, la cual permite apreciar a los dos fluoróforos en una misma imagen.

La imagen de la mezcla de 0.3% de gelana con 5% de leche descremada (Figura 45a) presenta la formación de agregados de proteína, que puede ser debida a interacciones electrostáticas de tipo repulsivo, lo que favorecería la interacción proteína-proteína en la leche. En este caso, es posible apreciar una fase continua y una fase dispersa, siendo la fase continua la gelana, la cual a pesar de que se encuentra en menor concentración aún tiene la capacidad de formar una red tridimensional, y la fase dispersa está conformada por la leche, la cual parece encontrarse embebida en la red de la gelana.

Por otro lado, en la formulación con 0.1% de gelana y 5% de leche descremada (Figura 45b), también es factible advertir la formación de agregados, sin embargo, dichos agregados no son tan compactos como los que se forman al tener 0.3% de gelana, en este punto es posible afirmar que la cantidad y forma de los agregados se deben a las interacciones repulsivas que se dan entre las cadenas de la proteína y las hélices de la gelana. Por otra parte, cuando se adiciona 0.1% de gelana a la formulación; la cantidad de gelana que se ve unida a la proteína de la leche es mucho menor en comparación con la formulación que contiene 0.3% de gelana.



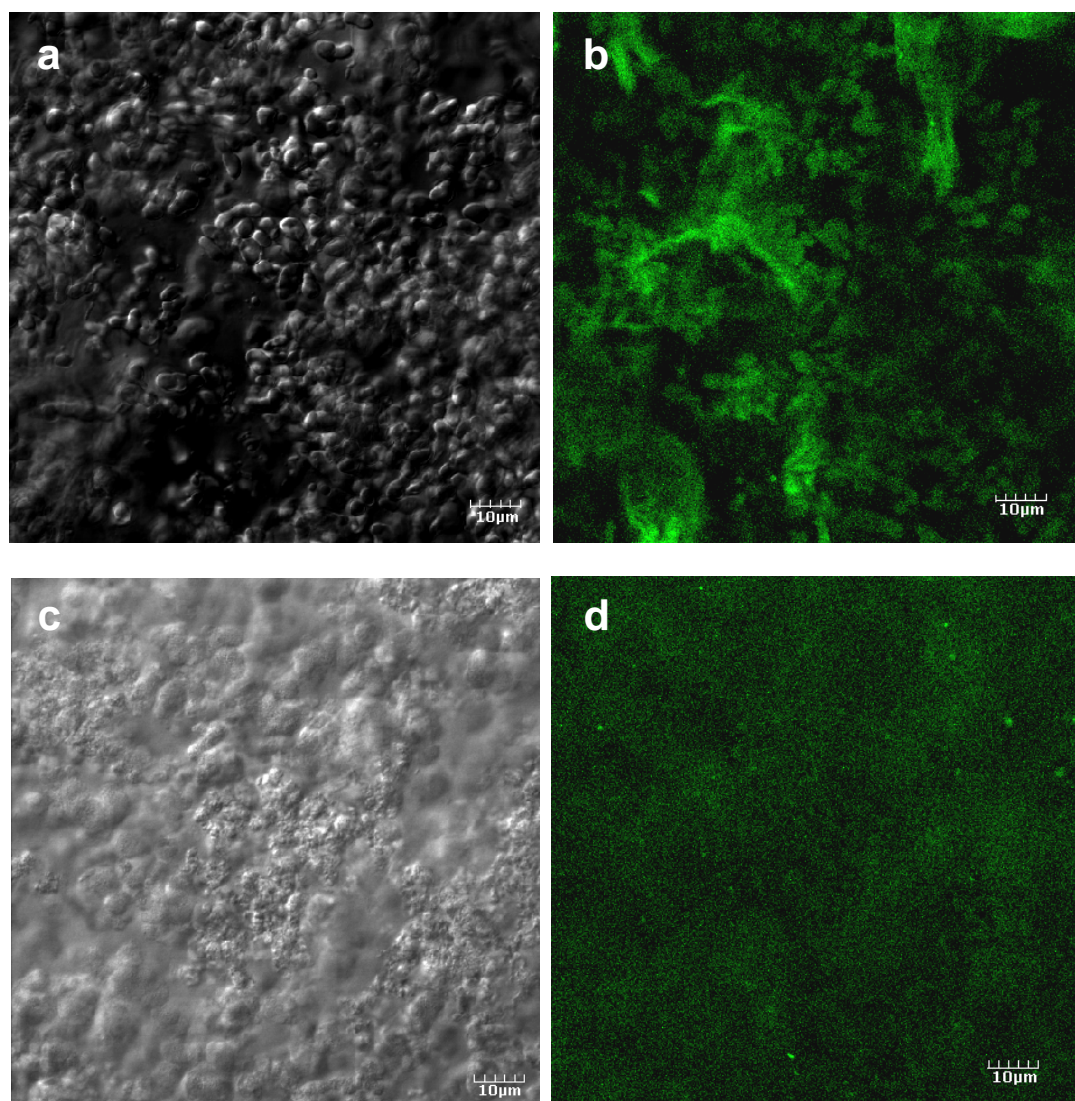
*Figura 21. Micrografías de formulaciones elaboradas con a) 0.3% de gelana y 5% de leche descremada, b) 0.1% de gelana y 5% de leche descremada, objetivo 60x, zoom 4x.*

En este punto, es necesario analizar los componentes de cada una de las formulaciones por separado. En la Figura 46 se muestran las micrografías para la formulación de 0.3% de gelana y 5% de leche descremada, la diferencia entre las formulaciones presentadas, radica en que a una de las formulaciones se le agregó rodamina, mientras que a la otra no. En este caso es de interés resaltar algunos puntos.

En primer lugar, sólo tomaremos la micrografía en la que se percibe la fluorescencia del FIT-C, es decir, en la que sólo observamos a la gelana (Figura 46a y 46b) en estas



imágenes el polisacárido aún presenta sitios de unión, es decir, existen zonas que aún pueden estar formando la red tridimensional que da origen al gel, a pesar de la presencia de los componentes de la leche. Sin embargo, también es posible apreciar la presencia de agregados, presumiblemente de las proteínas de la leche, no así en el caso de las imágenes 46c y 46d; no obstante, en la Figura 46d los agregados no se aprecian tan definidos como en la 46b.



*Figura 22. Micrografías de formulaciones elaboradas con a y b) 0.3% de gelatina y 5% de leche descremada marcada con rodamina, c y d) 0.3% de gelatina y 5% de leche descremada sin marcar, objetivo 60x, zoom 4x.*



En un inicio se pueden proponer dos teorías para este comportamiento; la primera, que parte del fluoróforo se unió a las proteínas de la leche y esto da como resultado la apariencia que se distingue; y la segunda, que la gelana se está adsorbiendo a la micela de caseína como se propone en diversos estudios (Schorsch, Jones y Norton, 2000; Baeza *et al.*, 2002; Heertje, 1993). La primera teoría no tiene mucho sustento debido al que el marcaje que se realizó entre la gelana y el FIT-C fue covalente.

La mejor forma de explicar las diferencias gráficas entre las dos imágenes mencionadas (46b y 46d) es que el fenómeno se debe quizá a la suma de la emisión de los fluoróforos adicionados a la formulación presentada. Esto es posible corroborarlo si se ven los espectros de excitación y de emisión de los fluoróforos utilizados.

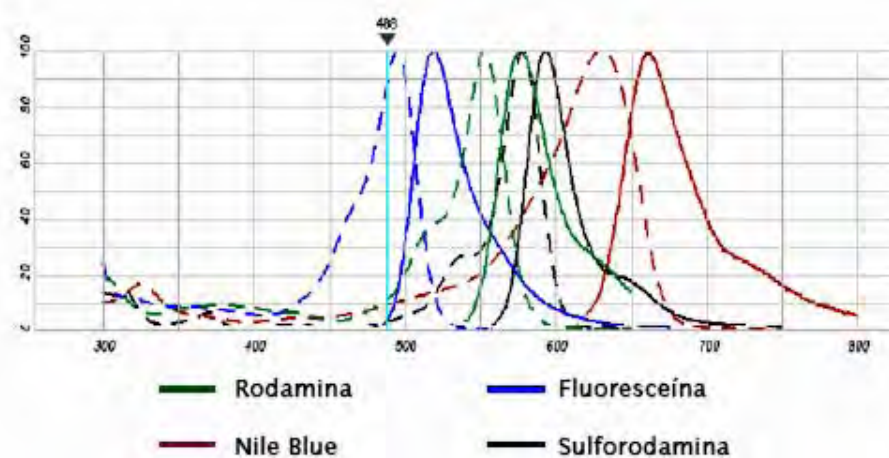
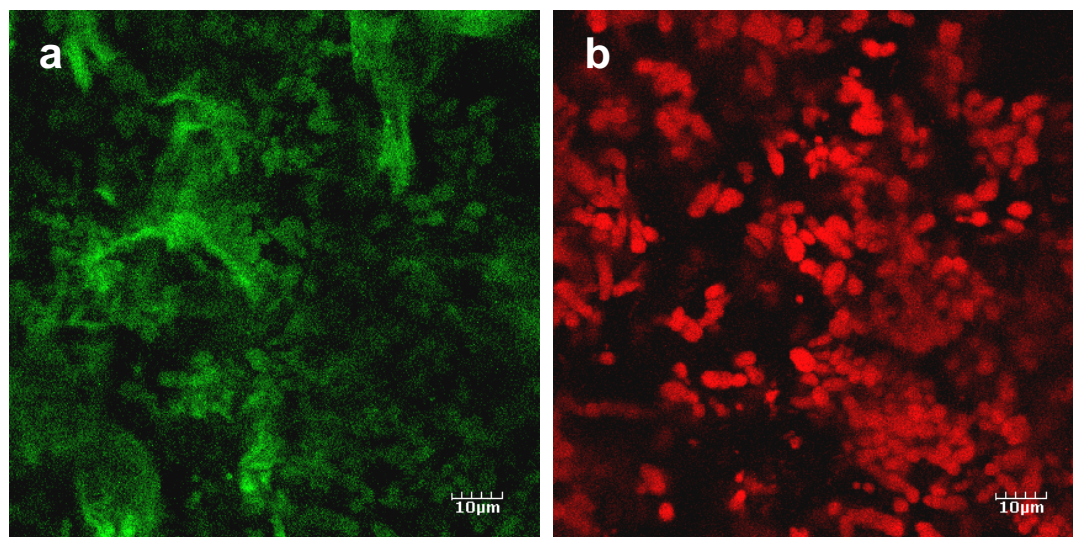


Figura 23. Espectros de excitación (líneas punteadas) y emisión (líneas compeltas) de fluoróforos orgánicos (excitación a 488 nm, Martín, 2007)

La figura anterior (47) presenta dichos espectros y en los espectros señalados se puede apreciar que tanto los espectros de excitación de ambos fluoróforos como los espectros de excitación se cruzan a varias longitudes de onda, lo que haría posible la presencia de fluorescencia residual que incremente la fluorescencia de cualquiera de los dos fluoróforos. Cabe mencionar que, para que en la micrografía se vean ambos fluoróforos, se utilizó una herramienta conocida como colocalización; y en este punto es

interesante hacer notar una diferencia sutil entre ambas micrografías, ya que éstas estarían implicando la interacción del polisacárido con las proteínas de la leche. Cuando el contenido de gelana es alto (Figura 45a), la rodamina (que fluoresce en color rojo) pareciera fluorescer de un color anaranjado a diferencia de la micrografía 45b en donde se aprecia claramente el color rojo, esto puede deberse a la adsorción de la gelana sobre la superficie de la micela de caseína. Esto no quiere decir que a bajas concentraciones la interacción no se lleve a cabo, lo único que estaría indicando es que la cantidad del polisacárido adsorbido a la superficie micelar es menor en comparación a cuando se tienen altas concentraciones de gelana. Cabe mencionar, que las micrografías presentadas en la Figura 46a y 46c, son imágenes obtenidas por transmisión y en ellas es factible apreciar que existe una gran similitud entre las dos formulaciones presentadas, lo que confirma que la razón por la cual se observan los agregados en la imagen 46b y no en la 46d es debido a la suma de fluorescencia de los fluoróforos utilizados.

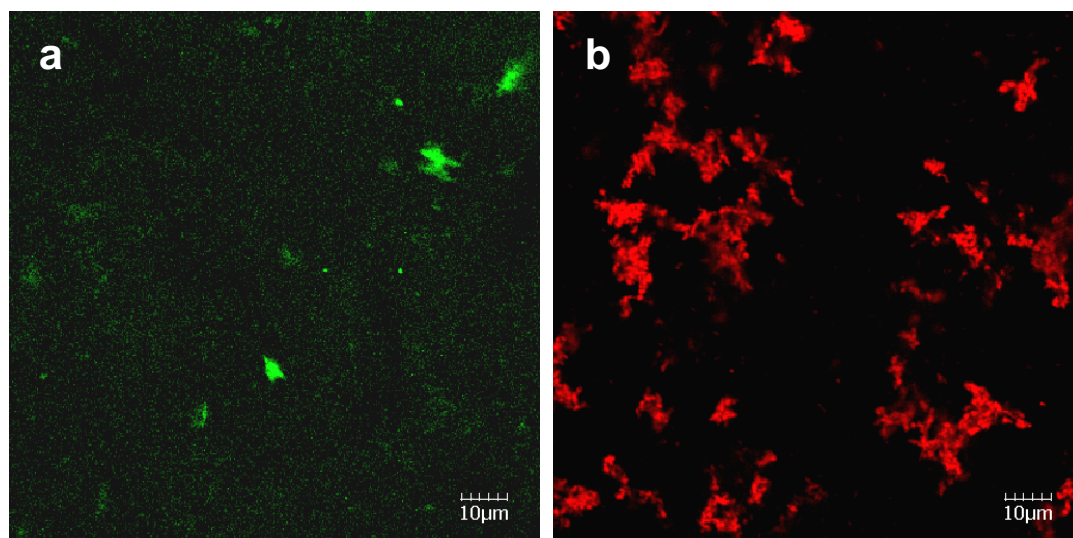


*Figura 24. Micrografías de la formulación con 0.3% de gelana y 5% de leche descremada. a) gelana (fluorescencia de FIT-C), b) leche descremada (fluorescencia de rodamina), objetivo 60x, zoom 4x.*

En la Figura 48, se presentan las micrografías de la gelana y la leche descremada por separado, estas imágenes se colocaron para dar como resultado la imagen

presentada en la Figura 45a. Con estas imágenes se puede corroborar lo que se ha mencionado, existe una interacción entre la gelana y las proteínas de la leche.

Pasando a la formulación con 0.1% de gelana y 5% de leche descremada (Figura 45b), existen diferencias muy marcadas entre ambos sistemas. En primer lugar, y como se mencionó anteriormente, el tamaño de los agregados cuando se tiene una menor concentración de gelana es mayor, es decir, las repulsiones electrostáticas son menores y por lo tanto la necesidad de las proteínas a agregarse es menor. Por otro lado, no se observa tan claramente la interacción entre la gelana y las proteínas de la leche, en este caso debido principalmente a que la concentración de gelana es tan baja que este tipo de interacciones no se ve tan favorecidas como las interacciones gelana-gelana, las cuales parecen establecerse primero y después cuando se tiene exceso del polisacárido se crean las interacciones entre la gelana y la leche descremada.

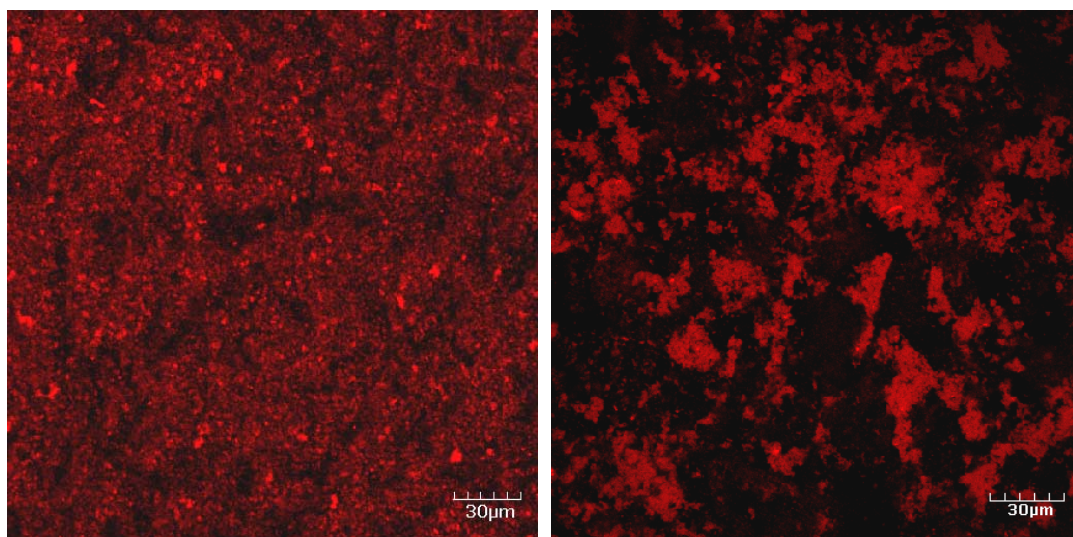


*Figura 25. Micrografías de la formulación con 0.1% de gelana y 5% del leche descremada. a) gelana (fluorescencia de FIT-C), b) leche descremada (fluorescencia de rodamina), objetivo 60x, zoom 4x.*

Como se puede apreciar en la Figura 49, la gelana (49a) sigue formando una red continua a estas concentraciones y pese a que existen zonas en las cuales se encuentran tanto la gelana como las proteínas lácteas, no se observa tan claramente la mezcla de

colores; como en el caso de la formulación con 0.3% de gelana, debida a la adsorción de la gelana en las proteínas, como consecuencia principal de que la concentración de gelana es mucho menor en este caso. A pesar de ello, es fácil darse cuenta de que existen interacciones entre estos componentes.

Finalmente y con el propósito de demostrar que la gelana tiene efecto sobre la formación y el tamaño de agregados en la leche descremada, se presenta la Figura 50, en la cual se observa cómo cambia la estructura de la leche en función de la concentración de gelana.



*Figura 26. Micrografías de formulaciones con a)0.1% de gelana y 5% de leche , b)0.3% de gelana y 5% de leche; ambas formulaciones se realizaron con gelana sin marcar. Objetivo 60x, zoom 4x.*

En estas imágenes se aprecia que los agregados que se forman cuando se tiene una mayor concentración de gelana son más compactos en comparación con aquellos formados cuando la concentración de gelana es igual a 0.1%. Este efecto se debe a que como se ha venido mencionado, existen repulsiones electrostáticas ocasionadas por la presencia de cargas negativas en ambos biopolímeros.

Con base en los resultados obtenidos a partir de las observaciones de la microestructura con la ayuda de la microscopía confocal, se puede plantear la existencia de dos tipos de interacciones principalmente entre los biopolímeros utilizados en la elaboración de las formulaciones analizadas en este estudio.

La primera de las interacciones es de tipo repulsivo y se da entre las cargas negativas que están presentes en ambos biopolímeros, esta interacción es la responsable de la presencia de agregados y de la presencia de una fase continua y una fase dispersa. Siendo, como se mencionó anteriormente, la fase continua debida a la gelana y la fase dispersa debido a la presencia de leche en el sistema.

El segundo tipo de interacción, que se propone, es de tipo atractivo, en este caso, se sugiere el mismo mecanismo que se ha propuesto para la interacción de la  $\kappa$ -carragenina con las micelas de caseína, en el cual participan interacciones electrostáticas entre las cargas negativas de la gelana y una región de cargas positivas localizada en la  $\kappa$ -caseína. En este punto, las proteínas del suero podrían jugar también un papel importante, pues si se forma el complejo entre la  $\kappa$ -caseína y la  $\beta$ -lactoglobulina, este complejo estabilizaría de manera más eficaz las interacciones entre el polisacárido y las proteínas lácteas. Al estar completamente desnaturalizada la proteína exhibe un mayor número de residuos capaces de interactuar con la gelana, por lo que es factible que se establezcan un mayor número de enlaces, independientemente del tipo del que se trate.

A lo largo de este documento se ha mencionado la posible influencia de las proteínas de la leche descremada sobre las propiedades viscoelásticas, la temperatura de transición sol-gel y la microestructura de la gelana de bajo acido. En el sistema que se utilizó es aún difícil aclarar si las modificaciones que se observaron son debidas a las interacciones que se han propuesto para otros sistemas como los de las carrageninas (Garnier *et al.*, 2003; Augustin, Puvanenthiran y McKinnon, 1999; Ji, Corredig y Goff, 2008; Bourriot, Garnier y

Doublier, 1999; Alexander y Dalgleish, 2007, Arltoft *et al.*, 2007), la pectina (Matia-Merino y Harjinder, 2007; Matia-Merino, Lau y Dickinson, 2004, Marozienne y de Kruif, 2000) o la xantana (Sanchez *et al.*, 2000; Hemar *et al.*, 2001) en donde el factor común son las proteínas lácteas, las cuales se utilizan en mezclas o solas. Las conclusiones a las que se han llegado a lo largo de todas estas investigaciones proponen la existencia de interacciones electrostáticas entre los polímeros cargados negativamente ( $\kappa$ , o  $\iota$ -carrageninas y pectinas de alto y bajo metoxilo) y una región cargada positivamente que se encuentra en la  $\kappa$ -caseína (aún a pH neutro), que como se señaló anteriormente, se encuentra localizada principalmente en la superficie de las micelas de caseína, estabilizando esta estructura. Además de este mecanismo también se sugiere la existencia de otro mecanismo conocido como floculación por agotamiento, el cual fue explicado previamente. Con base en lo anterior, es posible concluir que las interacciones que se presentan en sistemas de este tipo (proteína-polisacárido) se deben a la presencia de ambos mecanismos. Aunado a esto, se propone la existencia de una mayor estabilización por la presencia de proteínas del suero, de las cuales, la  $\beta$ -lactoglobulina es capaz de formar un complejo con  $\kappa$ -caseína al ser sometida la leche a un proceso de calentamiento. Este complejo es más estable que los componentes por separado debido al establecimiento de un puente disulfuro entre ambas moléculas y además podría favorecer las interacciones entre el conjunto de proteínas lácteas y la gelana, como consecuencia de que esta proteína se encuentra desnaturalizada y exhibe un mayor número de residuos de aminoácidos que logran interactuar con el polisacárido en cuestión.

Es importante mencionar la contribución que tiene la presencia de cationes mono y divalentes en la leche, los cuales sirven como sitios de unión e inducen la gelificación de la gelana. Es por esta razón por la cual se hace más difícil confirmar la existencia de

interacciones entre las proteínas y el polisacárido utilizados en la formación de los sistemas analizados; sin embargo, los resultados de la microscopía permiten demostrar que existe un tipo de interacción que de alguna manera afecta el comportamiento que cada uno de los componentes tiene por separado.

Finalmente, se propone que los mecanismos que facilitan el establecimiento de las interacciones entre las proteínas de la leche y la gelana de bajo acilo son principalmente dos: el primero se debe a interacciones atractivas entre las cargas negativas de la gelana y una región cargada positivamente de la  $\kappa$ -caseína; el segundo mecanismo se conoce como floculación por agotamiento, en el cual el exceso de un polímero provoca la floculación de otro lo que lleva a una separación de fases, que en este caso es a nivel microscópico razón por lo cual no se percibe macroscópicamente, para explicar más claramente dichos mecanismos se presenta la Figura 51.

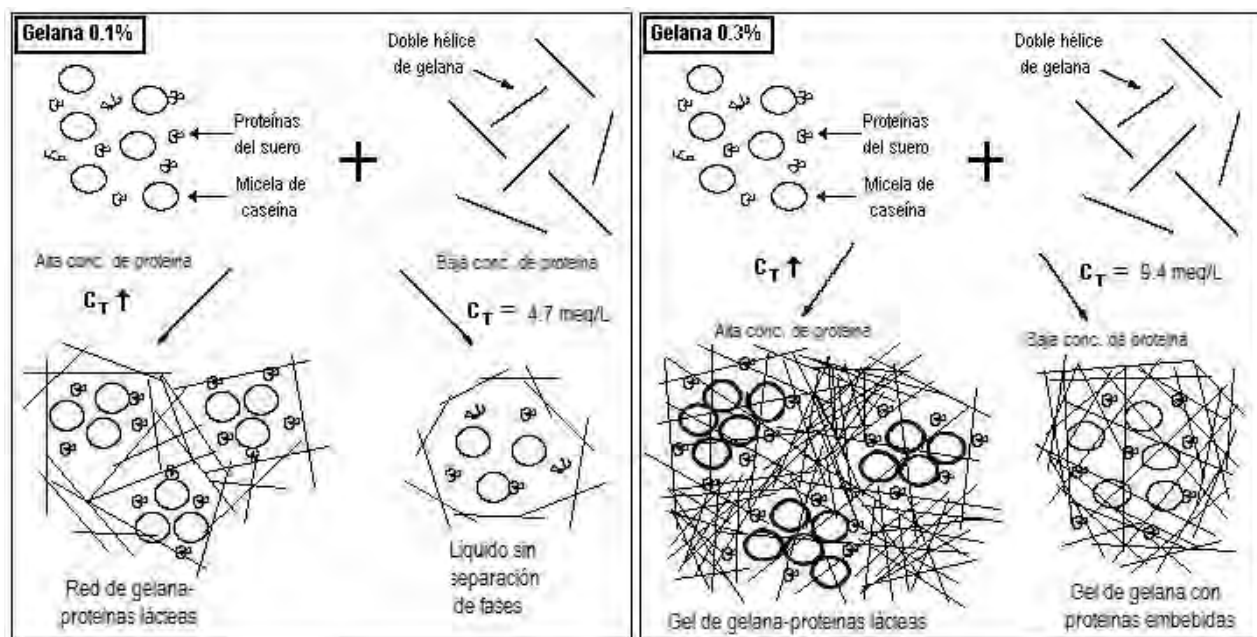


Figura 27. Representación esquemática de las interacciones de las proteínas lácteas y la gelana en distintas concentraciones y a temperatura ambiente ( $\approx 22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).



En dicha figura podemos ver básicamente 4 comportamientos, los cuales se explican a continuación:

- ♦ Cuando tenemos una alta concentración de proteína a una concentración de gelana de 0.1% podemos apreciar la formación de un sistema estructurado lo cual provoca que el sistema tenga el comportamiento de un gel. En este sistema también es posible apreciar la existencia del fenómeno de floculación por agotamiento, el cual se caracteriza por zonas en donde predomina el polisacárido y otras zonas en donde son las proteínas lácteas las que predominan.

- ♦ Por el contrario, cuando la concentración de proteína es baja el sistema se comporta reológicamente como un líquido; además, el número de interacciones que se establecen entre los biopolímeros que componen el sistema son menores e incluso inexistentes, no obstante el sistema es estable y no se observa una separación de fases a nivel macroscópico.

- ♦ Si aumentamos la concentración de gelana a 0.3% en presencia de una alta concentración de proteínas el sistema presenta un comportamiento reológico de gel, al igual que cuando la concentración de gelana es 0.1%; sin embargo, en este caso la floculación por agotamiento se aprecia mucho mejor por la formación de agregados más grandes, es decir, las zonas de cada uno de los biopolímeros están más marcadas. Aunado a esto, se establecen un mayor número de interacciones entre las proteínas y el polisacárido.

- ♦ Por último, a concentraciones de proteína baja el sistema también se comporta como un gel; sin embargo, de acuerdo al comportamiento reológico el gel formado puede considerarse como un gel débil, ya que los módulos presentan dependencia a la frecuencia y la  $\tan \delta$  tiene valores próximos a uno. En este caso, el comportamiento observado se puede atribuir casi exclusivamente a la alta concentración de gelana.



Es importante mencionar un factor que se toma en consideración en estos esquemas, la concentración iónica total ( $C_T$ ), la cual está relacionada con el contenido de iones. En los esquemas es posible darnos cuenta de que al aumentar la  $C_T$  aumentan el número de interacciones y además los sistemas comienzan a ser más elásticos, por lo cual una vez más es fácil darnos cuenta de la importancia de los iones para el sistema de estudio.

Finalmente, hay que mencionar un componente que no ha sido considerado a lo largo de este documento. La grasa, este ingrediente de la leche podría presentar interacciones de tipo hidrofóbicas con la cadena de la gelatina y con residuos no polares presentes en las proteínas; sin embargo, la concentración que existe en el sistema final hace dudar un poco al respecto de la contribución de este componente en las características finales de los materiales. Existen estudios que se han llevado a cabo con leche descremada en polvo y polisacáridos como carrageninas (Ji, Corredig y Goff, 2008, Sedlmeyer y Kulozik, 2006, Hemar *et al.*, 2001) en los cuales la concentración de grasa presente es similar a la que se encuentra en la leche utilizada; pero, en esos casos tampoco se hace alusión a la presencia o posible interacción de la grasa con los demás componentes por la baja concentración en la que se encuentra, es por ello que no se tomo en cuenta a lo largo de este trabajo.

## **8. CONCLUSIONES**

- ❖ Las formulaciones elaboradas con gelana únicamente presentan en su mayoría un comportamiento de solución macromolecular, es decir, predomina el carácter viscoso en estos sistemas.
- ❖ Las formulaciones de mezclas gelana-leche descremada muestran un aumento en el valor de los módulos dinámicos presumiblemente por la adición de la leche, lo que favorece un incremento en el carácter elástico y en muchos casos, que este predomine sobre el carácter viscoso.
- ❖ Las formulaciones realizadas a partir de gelana-KCl, presentan un comportamiento similar a sus respectivas formulaciones con leche; sin embargo, los valores de los módulos son menores, lo que significa que los geles son más débiles cuando adicionamos KCl que en presencia de leche.
- ❖ El carácter elástico de los materiales se incrementó principalmente por dos factores: el incremento en la concentración de gelana y el incremento en la concentración de leche descremada.
- ❖ En cuanto a las temperaturas de transición, cuando hablamos de gelificación la diferencia entre las temperaturas para todos los tipos de mezclas utilizados es mínima, por lo cual, podríamos pensar que el proceso de gelificación llega a un mismo ordenamiento a pesar de la presencia o no de leche y/o cloruro de potasio. Sin embargo, las temperaturas de fusión sí varían cuando nos movemos a través de las matrices estudiadas. En este caso, las temperaturas de transición de las mezclas gelana-leche, son muy distintas a las obtenidas con KCl y las reportadas anteriormente por Milas y Rinaudo (1996), por lo que en este caso es fácil pensar que se formaron nuevos enlaces que ocasionan la modificación de la transición gel-sol.

- ❖ Las formulaciones elaboradas con gelana solamente no pudieron observarse en el microscopio a causa del poco ordenamiento por la falta de iones presentes en el medio y las concentraciones a las que se trabajó. Las formulaciones con gelana y KCl mostraron la presencia de sistemas estructurados y continuos debido a la formación del gel.
- ❖ Las formulaciones de mezclas gelana-leche descremada presentan en su microestructura la presencia de dos fases una continua y otra dispersa, la fase continua está formada principalmente de leche y la fase dispersa por la gelana de bajo acido. En estos sistemas se aprecia claramente la formación de agregados de proteínas de leche.

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alais, C. (1985). **Ciencia de la leche**. Principios de técnica lechera, Reverté, (Barcelona), pp. 106-150.
- Alexander, M. y Dalgleish, D. G. (2007). The interaction of casein micelles with  $\kappa$ -carrageenan studied by diffusing wave spectroscopy. **Food Hydrocolloids**, 21, 128-136.
- Anema, S. G. (2007). Role of  $\kappa$ -casein in the association of denatured whey proteins with casein micelles in heated reconstituted skim milk. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 55, 3635-3642.
- AOAC, (1995). Dairy Products, en Official Methods of Analysis of AOAC International, ed. Patricia Cunniff, AOAC International, (U.S.A.), pp. 10-12, 49-50.
- Arltoft, D., Ipsen, R., Madsen, F. y de Vries, J. (2007). Interactions between carrageenans and milk proteins: A microstructural and rheological study. **Biomacromolecules**, 8, 729-736.
- Asakura, S. y Oosawa, F. (1958). Interaction between particles suspended in solutions of macromolecules, **Journal of Polymer Science**, 33, 183-192.
- Augustin, M. A., Puvanenthiran, A. y McKinnon, I. R. (1999). The effect of  $\kappa$ -carrageenan conformation on its interaction with casein micelles. **International Dairy Journal**, 9, 413-414.
- Baeza, R. I., Carp, D. J., Pérez, O. E. y Pilosof, A. M. R. (2002).  $\kappa$ -Carrageenan-protein interactions: Effect of proteins on polysaccharide gelling and textural properties. **Lebensmittel-Wiss. u Technology**, 35, 741-747.
- Bertolini, A. C., Creamer, L. K., Eppink, M. y Boland, M. (2005). Some Rheological Properties of Sodium Caseinate-Starch Gels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 53, 2248-2254.
- Blonk, J. C. G. y van Aalst, H. (1993). Confocal scanning light microscopy in food research. **Food Research International**, 26, 297-311.
- Bottomley, R.C., Evans, M. T. A. y Parkinson, C.V., (1990). Whey proteins. En **Food Gels**, Harris, P. (ed) Elsevier Science, New York, pp. 201-231.

- Bourriot, S., Garnier, C. y Doublier, J. L. (1998). Phase separation, rheology and microstructure of micellar casein-guar gum mixtures. *Food Hydrocolloids*, 13, 43-49.
- Bourriot, S., Garnier, C. y Doublier, J. L. (1999). Micellar-casein- $\kappa$ -carrageenan mixtures. I. Phase separation and ultrastructure. *Carbohydrate Polymers*, 40, 145-157.
- Bryant, C. M. y McClements, D. J. (2000). Influence of xanthan gum on physical characteristics of heat-denatured whey protein solutions and gels. *Food Hydrocolloids*, 14, 838-390.
- Castillo-Zambudio, M., (2001). Predicción del tiempo de corte en la elaboración de queso mediante dispersión de radiación de infrarrojo próximo. Tesis de Doctorado, Universidad de Murcia, (España).
- Chandrasekaran, R. y Radha, A., (1995). Molecular architectures and functional properties of gellan gum and related polysaccharides. *Trends in Food Science & Technology*, 6, 143-148.
- Clark, A. H. y Ross-Murphy, S. B. (1987). Structural and mechanical properties of biopolymer gels. *Advances in Polymer Science*, 83, 57-192.
- Dalgleish, D. G. (1998). Casein micelles as colloids: Surface structures and stabilities. *Journal of Dairy Science*, 81, 3013-3018.
- De Jong, S., Jan Klok, H. y van de Velde, F. (2009). The mechanism behind microstructure formation in mixed whey protein-polysaccharide cold-set gels. *Food Hydrocolloids*, 23, 755-764.
- Doublier J. L. y Cuvelier G. (2006). Gums and hydrocolloids: Functional aspects En *Carbohydrates in Food*, Eliasson A. C. (ed), Taylor & Francis group, pp 233-272.
- Drohan, D., Tziboula, A., Mc Nulty, D. y Horne, D. S. (1997). Milk protein-carrageenan interactions. *Food Hydrocolloids*, 11, 101-107.
- Everett, D. W. y McLeod R. E. (2005). Interactions of polysaccharides stabilizers with casein aggregates in stirred skim-milk yoghurt. *International Dairy Journal*, 15, 1175-1183.
- Evans, A. A. y Donahue, R. E. (2008). Laser scanning confocal microscopy: a potential technique for the study of lithic microwear. *Journal of Archaeological Science*, 35, 2223-2230.

Farrell, H. M., Jimenez-Flores, R., Bleck, J. T., Brown, E. M., Butler, J. E., Creamer, L. K., Hicks, C. L., Hollar, C. M., Ng-Kwai-Hang, K. F. y Swaisgood, H. E. (2004). Nomenclature of the proteins of cows' milk-sixth revision. ***Journal of Dairy Science***, 87, 1641-1674.

Fennema, O. R. y Tannenbaum, S. R. (1999). ***Química de los Alimentos***, Acribia S.A. (España) pp. 1021-1025.

Ferrando, M. y Spiess, W. E. L. (2000). Confocal scanning laser microscopy. A powerful tool in food science: Review. ***Food science and technology international***, 6, 267-284.

Fox, P. F. y Kelly, A. L. (2004). The caseins. En ***Protein in food processing***, Yada, R. Y. Ed. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, pp. 29-71.

Fox, P. F. y Mulvihill, D.M., (1990). Casein. En ***Food Gels***, Harris, P. (ed) Ed. Elsevier Science, New York, pp. 121-169.

Garnier, C., Michon, C., Durand, S., Cuvelier, G., Doublier, J. L. y Launay, B. (2003). Iota carrageenan/casein micelles interactions: evidence at different scales. ***Colloids and Surfaces***, 31, 177-184.

Grasdalen, H. y Smidsrod, O. (1987). Gelation of gellan gum. ***Carbohydrate Polymers***, 7, 371-393.

Gunning, A. P. y Morris, V. J. (1990). Light scattering studies of tetramethyl ammonium gellan. ***International Journal of Biological Macromolecules***, 12, 338-341.

Heertje, I. (1993). Structure and function of food products: A review. ***Food Structure***, 12, 343-364.

Hemar, Y., Tamehana, M., Munro, P. A. y Singh, H. (2001). Viscosity, microstructure and phase behavior of aqueous mixtures of commercial milk protein products and xanthan gum. ***Food Hydrocolloids***, 15, 565-574.

Hemar, Y., Hall, C. E., Munro, P. A. y Singh, H. (2002). Small and large deformation rheology and microstructure of  $\kappa$ -carrageenan gel containing commercial milk protein products. ***International Dairy Journal***, 12, 371-381.

Huang, Y., Singh, P. P., Tang, J. y Swanson, B. G. (2004). Gelling temperatures of high acyl gellan as affected by monovalent and divalent cations with dynamic rheological analysis. **Carbohydrate Polymers**, 56, 27-33.

Ibanoglu, E. (2005). Effect of hydrocolloids on the thermal denaturation of proteins. **Food Chemistry**, 90, 621-626.

Ikeda, S., Nitta, Y., Temsiripong, T., Pongsawatmanit, R. y Nishinari, K. (2004). Atomic force microscopy studies on cation-induced network formation of gellan. **Food Hydrocolloids**, 18, 727-735.

Jenkins, P. y Snowden, M. (1996). Depletion flocculation in colloidal dispersions. **Advances in Colloid and Interface Science**, 68, 57-96.

Ji, S., Corredig, M. y Goff, H. D. (2008). Aggregation of casein micelles and  $\kappa$ -carrageenan in reconstituted skim milk. **Food Hydrocolloids**, 22, 56-64.

Kelco Applications bulletin CD-34, en [http://www accurx.net/Gelrite\\_Spec\\_Sheet.pdf](http://www accurx.net/Gelrite_Spec_Sheet.pdf), 25-agosto-2009.

Kilara, A. (2004). Whey proteins. En **Protein in food processing**, Yada, R. Y. Ed. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, pp. 72-99.

Kuo, M.S., Dell, A. y Mort A. J., (1986). Identification and location of L-glycerate, an unusual acyl substituent in gellan gum. **Carbohydrate Research**, 156, 173-187.

Langendorff, V., Cuvelier, G., Launay, B. y Parker, A. (1997). Gelation and flocculation of casein-micelle-carrageenan mixtures. **Food Hydrocolloids**, 11, 35-40.

Lizarraga, M. S., De Piante Vicin, D., González, R., Rubiolo, A. y Santiago, L. G. (2006). Rheological behaviour of whey protein concentrate and  $\lambda$ -carrageenan aqueous mixtures. **Food Hydrocolloids**, 20, 740-748.

Lutz, R., Aserin, A., Portnoy, Y., Gottlieb, M. y Garti, N. (2009). On the confocal images and the rheology of whey protein isolated and modified pectins associated complex. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 69, 43-50.

Maestro-Garriga, A. (2002). Reología de espesantes celulósicos para pinturas al agua: Modelización y mecanismo de espesamiento asociativo. Tesis de Doctorado, Facultad de Química-Universidad de Barcelona, (España).

Marchin, S., Putaux, J., Pignon, F. y Léonil, J., (2007). Effects of the environmental factors on the casein micelle structure studied by cryo transmission electron microscopy and small-angle x-ray scattering/ultras-small-angle x-ray scattering. *The Journal of Chemical Physics*, 126, 045101.

Marozienne, A. y de Kruif, C. G. (2000). Interaction of pectin and casein micelles. *Food Hydrocolloids*, 14, 391-394.

Martínez-Cruz, G., (2002). Reocinética de gelificación de gelana: Efecto de la concentración del polisacárido, tipo de contracción y fuerza iónica. Tesis de maestría, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan-UNAM, (México).

Matia-Merino, L., Lau, K. y Dickinson, E. (2004). Effects of low-methoxyl amidated pectin and ionic calcium on rheology and microstructure of acid-induced sodium caseinate gels. *Food Hydrocolloids*, 18, 271-281.

Matia-Merino, L. y Harjinder, S. (2007). Acid-induced gelation of milk protein concentrates with added pectin: Effect of casein micelle dissociation. *Food Hydrocolloids*, 21, 765-775.

Milas, M. y Rinaudo, M. (1996). The gellan sol-gel transition. *Carbohydrate Polymers*, 30, 177-184.

Montgomery, D. C. y Runger, G. C. (1996). *Probabilidad y Estadística Aplicadas a la Ingeniería*, Mc Graw-Hill, (México), pp. 696-719.

Nakajima, K., Ikehara, T. y Nishi, T., (1996). Observation of gellan gum scanning tunneling microscopy. *Carbohydrate Polymers*, 30, 77-81.

Nickerson, M.T., Paulson, A.T. y Speers, R.A., (2004). Time-temperature studies of gellan polysaccharide gelation in the presence of low, intermediate and high levels of co-solutes. *Food Hydrocolloids*, 18, 783-794.

Noda, S., Funami, T., Nakauma, M., Asai, I., Takahashi, R., Al-Assaf, S., Ikeda, S., Nishinari, K. y Phillips, G. O. (2008). Molecular structures of gellan gum imaged with atomic force



microscopy in relation to the rheological behavior in aqueous systems. 1. Gellan gum with various acyl contents in the presence and absence of potassium. **Food Hydrocolloids**, 22, 1148-1159.

Pardo, A., Garrido, J., Ruiz, M. A. y San Martín, R. (2007). La interacción entre factores en el análisis de varianza: errores de interpretación. **Psicothema**, 19, 343-349.

Perez, A. A., Carrara, C. R., Carrera-Sánchez, C., Santiago, L. G. y Rodríguez-Patino, J. M. (2009). Interfacial dynamic properties of whey protein concentrate/polysaccharide mixtures at neutral pH. **Food Hydrocolloids**, 23, 1253-1262.

Perez, A. A., Carrara, C. R., Carrera-Sánchez, C., Rodríguez-Patino, J. M. y Santiago, L. G. (2009). Interactions between milk whey protein and polysaccharide in solution. **Food Chemistry**, 116, 104-113.

Pérez-Campos, S. J. (2008). Propiedades reológicas dinámicas de dispersiones acuosas de gelana: efecto de la concentración de iones calcio en la formación de geles. Tesis de Licenciatura, UAEH, (Hidalgo).

Perez, E. O., Wargon, V. y Pilosof, A. M. R. (2006). Gelation and structural characteristics of incompatible whey proteins/hydroxypropylmethylcellulose mixtures. **Food Hydrocolloids**, 20, 966-974.

Radford, S. J. y Dickinson, E. (2004). Depletion flocculation of caseinate-stabilised emulsions: what is the optimum size of the non-adsorbed protein nano-particles?. **Colloids and Surfaces A: Physicochemistry Engineer Aspects**, 238, 71-81.

Rocha, C., Teixeira, J. A., Hilliou, L., Sampaio, P. y Gonçalves, M. P. (2009). Rheological and structural characterization of gels from whey protein hydrolysates/locust bean gum mixed systems. **Food Hydrocolloids**, 23, 1734-1745.

Rodríguez-Hernández, A. I. (1997). Propiedades reológicas dinámicas de geles formados por mezclas gelana-xantana y gelana- $\kappa$ -carragenina. Tesis de Maestría, Facultad de Química-UNAM, (México).

Rodríguez-Hernández, A. I. (2004). Reología y estructura de mezclas formadas por los polisacáridos almidón de maíz ceroso y gelana. Tesis de Doctorado, Facultad de Química-UNAM, (México).

Ross-Murphy, S. B., (1995). Structure-property relationships in food biopolymer gels and solutions. *Journal of Rheology*, 39, 1451-1463.

Sanchez, C., Zuniga-Lopez, R., Schmitt, S., Despond, S. y Hardy, J. (2000). Microstructure of acid-induced skim milk-locust bean gum-xanthan gum. *International Dairy Journal*, 10, 199-212.

Sánchez-Basurto González, B. E. (2006) Descripción reológica de la transición orden-desorden de gelatina en ausencia de contracción externo. Tesis de Maestría, Facultad de Química-UNAM.

Sanderson, G.R. (1990). Gellan Gum. En *Food Gels*, Harris, P. Ed. Elsevier Science. New York, pp. 201-231.

Schorsch C., Jones, M.G. y Norton, I.T. (2000). Phase behaviour of pure micellar casein/ $\kappa$ -carrageenan systems in milk salt ultrafiltrate. *Food Hydrocolloids* 14, 347-358.

Sedlmeyer, F., Daimer, K., Rademecher, B. y Kulozik, U. (2003). Influence of the composition of milk-protein  $\kappa/\lambda$ -hybrid-carrageenan gels on product properties. *Journal of Food Engineering*, 77, 943-950.

Sedlmeyer, F. y Kulozik, U. (2006). Impact in process conditions on the rheological detectable structure of UHT treated milk protein-carrageenan systems. *Colloids and Surfaces*, 31, 13-20.

Shim, J. y Mulvaney, S. J. (2001). Effect of heating temperature, pH, concentration and starch/whey protein ratio on the viscoelastic properties of corn starch/whey protein mixed gels. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81, 706-717.

Sikorski, Z. E. y Piotrowska, B. (2007). Food components and quality. En Chemical and functional properties of food components, Zdzislaw, E. y Sikorski, Z. E. Ed. CRC Press. Florida, pp. 1-14.

Spagnuolo, P. A., Dalgleish, D. G., Goff, H. D. y Morris, E. R. (2005). Kappa-carrageenan interactions in systems containing casein micelles and polysaccharide stabilizers. *Food Hydrocolloids*, 19, 371-377.

Spiegel, M. R. (1991). Teoría y Problemas de Probabilidad y Estadística, McGraw-Hill, México, pp. 306-338, 348.

Swaisgood, H. E. (2003) Chemistry of the caseins. En Advanced dairy chemistry, volume 1. Proteins, Fox, P. F. y McSweeney, P. L. H. Ed. Kluwer Academic / Plenum Publishers. New York, pp. 139-201.

Syrbe, A., Bauer, W. J. y Klostermeyer, H. (1998). Polymer science concepts in dairy systems—An overview of milk protein and food hydrocolloid interaction. *International Dairy Journal*, 8, 179-193.

Tavares, C. y Lopes da Silva, J. A. (2003). Rheology of galactomannan-whey protein mixed systems. *International Dairy Journal*, 13, 699-706.

van den Berg, L., van Vliet, T., van der Linden, E., van Boekel, M. A. J. S. y van de Velde, F. (2007). Breakdown properties and sensory perception of whey proteins/polysaccharide mixed gels as a function of microstructure. *Food Hydrocolloids*, 21, 961–976.

van Vliet, T., Lakemond, C. M. M. y Visschers, R. W. (2004). Rheology and structure of milk protein gels. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 9, 298-304.

Walstra, P. (1999). Casein sub-micelles: do they exist?. *International Dairy Journal*, 9, 189-192.

Walstra, P., Geurts, T. J., Noomen, A., Jellema, A. y van Boekel, M. A. J. S. (2001). *Ciencia de la Leche y Tecnología de los Productos Lácteos*, Acribia S.A., Zaragoza (España).

Walstra, P. y Jenness, R. (1987). *Química y Física Lactológica*, Acribia S.A., Zaragoza (España).

Ye, A. (2008). Complexation between milk proteins and polysaccharides via electrostatic interaction: principles and applications – a review. *International Journal of Food Science and Technology*, 43, 406-415.

Yuguchi, Y., Urakawa, H. y Kajiwara, K. (2002). The effect of the potassium salt on the structural characteristics of gellan gum gel. *Food Hydrocolloids*, 16, 191-195.

## 10. ANEXOS

### **10.1 ANEXO A. Valores de la Zona de Viscoelasticidad Lineal para todas las formulaciones**

La zona de viscoelasticidad lineal utilizada para la realización de los espectros mecánicos de las formulaciones estudiadas se determinó por medio de un barrido de deformación el cual se llevó a cabo a una frecuencia de oscilación constante (6.28 rad/s) y a una temperatura de 25 °C. Además, debido a la heterogeneidad de comportamientos presentados por las formulaciones desarrolladas se utilizaron diferentes tipos de geometrías, los cuales también se indican en los siguientes cuadros.

*Cuadro 1. Zona de viscoelasticidad lineal para las formulaciones elaboradas a partir de gelana sin adición de iones ni leche descremada.*

<b>% Gelana</b>	<b>Zona lineal (%<math>\gamma</math>)</b>	<b>Espectro mecánico (%<math>\gamma</math>)</b>	<b>Geometría</b>
0.01	10-100	50	CCDP
0.05	10-100	40	CCDP
0.10	10-100	40	CCDP
0.30	10-100	40	CCDP
0.50	1.0-60	30	CCDP
0.60	0.1-10	10	CCDP
0.70	1.0-40	20	PPE

PPE (Placas Paralelas Estriadas, 25 mm de diámetro) y CCDP (Cilindros Concéntricos de Doble Pared, Copa diámetro interno 27.94 mm, diámetro externo 34 mm; Cilindro diámetro interno 29.5, diámetro externo 32 mm, Espacio nominal entre la superficie interior y la superior 1 mm).

En los cuadros presentados en este anexo (5, 6 y 7), puede comprobarse la amplia gama de comportamientos exhibidos por las formulaciones analizadas en este estudio. En otras palabras es una muestra del amplio intervalo de texturas que se pueden obtener a partir de las mezclas de polisacáridos y proteínas y en otros casos por la adición de iones promotores de la gelificación.

Cuadro 2. Zona de viscoelasticidad lineal para las formulaciones a base de las mezclas gelana-leche descremada.

Formulaciones		Zona lineal (% $\gamma$ )	Espectro mecánico (% $\gamma$ )	Geometría
% Gelana	% Leche			
0.01	0.5	10-100	50	CCDP
	1.0	10-100	50	CCDP
	2.0	10-100	40	CCDP
	5.0	1-25	20	CCDP
0.05	0.5	5.0-100	40	CCDP
	1.0	1.0-20	20	CCDP
	2.0	1.0-10	8.0	PPE
	5.0	0.25-10	5.0	PPE
0.10	0.5	1.0-25	20	CCDP
	1.0	1.0-10	8.0	PPE
	2.0	0.1-2.0	1.0	PPE
	5.0	0.1-1.0	0.5	PPE
0.30	0.5	1.0-40	20	PPE
	1.0	0.1-2.0	1.0	PPE
	2.0	0.05-1.0	0.5	PPE
	5.0	0.03-0.5	0.3	PPE
0.50	0.5	0.1-10	10	PPE
	1.0	0.1-4.0	1.0	PPE
	2.0	0.01-0.4	0.2	PPE
	5.0	0.01-0.3	0.1	PPE
0.60	0.5	0.1-10	10	PPE
	1.0	0.1-4.0	1.0	PPE
	2.0	0.01-0.5	0.2	PPE
	5.0	0.01-0.1	0.1	PPE
0.70	0.5	0.1-4.0	2.0	PPE
	1.0	0.01-1.0	0.4	PPE
	2.0	0.01-0.2	0.1	PPE
	5.0	0.01-0.1	0.1	PPE

PPE (Placas Paralelas Estriadas, 25 mm de diámetro) y CCDP (Cilindros Concéntricos de Doble Pared, Copa diámetro interno 27.94 mm, diámetro externo 34 mm; Cilindro diámetro interno 29.5, diámetro externo 32 mm, Espacio nominal entre la superficie interior y la superior 1 mm).

*Cuadro 3. Zona de viscoelasticidad lineal para las formulaciones de mezclas gelana-KCl.*

Formulaciones		Zona lineal (% $\gamma$ )	Espectro mecánico (% $\gamma$ )	Geometría
% Gelana	% KCl			
0.05	0.083	10-100	50	CCDP
0.10	0.083	2.0-40	25	CP
0.30	0.083	0.1-10	5.0	CP
	0.0083	10-100	50	PP
0.50	0.083	0.05-3.0	1.0	PPE
	0.0083	1.0-40	20	PP
0.60	0.083	1.0-20	0.5	PPE
	0.0083	0.02-1.0	10	PPE
0.70	0.083	1.0-10	0.5	PPE
	0.0083	0.01-1.0	10	PPE

CCDP (Cilindros Concéntricos de Doble Pared, Copa diámetro interno 27.94 mm, diámetro externo 34 mm; Cilindro diámetro interno 29.5, diámetro externo 32 mm, Espacio nominal entre la superficie interior y la superior 1 mm), PPE (Placas Paralelas Estriadas, 25 mm de diámetro), CP (Cono y Plato, Cono 50 mm de diámetro y ángulo de 2.3°, equivalente a 0.04 radianes) y PP (Placas Paralelas, diámetro 50 mm).

## 10.2 ANEXO B. Dependencia de los módulos dinámicos con respecto a la frecuencia

La determinación de los parámetros  $\alpha$  y  $\beta$  es posible debido a las siguientes expresiones:

$$G' \propto \omega^\alpha \quad \text{y} \quad G'' \propto \omega^\beta$$

Para igualar los términos es necesaria la presencia de una constante, por lo tanto, las ecuaciones quedan:

$$G' = k'\omega^\alpha \quad \text{y} \quad G'' = k''\omega^\beta$$

y finalmente si sacamos el logaritmo a ambos lados tenemos:

$$\log G' = \log k' + \alpha \log \omega \quad \text{y} \quad \log G'' = \log k'' + \beta \log \omega$$

dichas ecuaciones se ajustan claramente a la ecuación de una recta del tipo  $y = mx + b$ , en este caso, la pendiente es igual al parámetro de la función potencia (Shim y Mulvaney, 2001). Para soluciones macromoleculares, la pendiente del módulo de almacenamiento es igual a dos, mientras que la pendiente del módulo de pérdida es igual a uno.

Es así como a partir de estas ecuaciones se obtuvieron los parámetros  $\alpha$  y  $\beta$  (cuadro 8) los cuales indican el grado de dependencia de los módulos dinámicos frente a la frecuencia.

*Cuadro 4. Dependencia de los módulos dinámicos en función de la frecuencia para formulaciones de gelana*

Gelana (%)	$\alpha$ (G')	r	$\beta$ (G'')	r
0.01	1.437	0.998	0.748	0.991
0.05	1.563	0.999	0.830	0.996
0.1	1.566	0.998	0.849	0.998
0.3	1.536	0.998	0.853	0.998
0.5	1.120	0.999	0.820	0.999
0.6	0.868	0.999	0.721	0.998
0.7	0.538	0.998	0.573	0.999

En el cuadro 9, es posible apreciar el valor de dichos parámetros para las formulaciones elaboradas a base de las mezclas gelana-leche descremada. Para estos sistemas en algunos casos el modelo no se ajusto al comportamiento obtenido.

*Cuadro 5. Dependencia de los módulos dinámicos en función de la frecuencia para formulaciones de mezclas gelana-leche descremada*

Formulación		$\alpha$ (G')	r	$\beta$ (G'')	r
Gelana (%)	Leche (%)				
0.01	0.5	1.413	0.996	0.808	0.995
	1.0	1.270	0.999	0.768	0.997
	2.0	0.971	0.997	0.671	0.998
	5.0	0.129	0.973	0.440	0.995
0.05	0.5	1.110	0.999	0.660	0.997
	1.0	0.330	0.998	0.380	0.998
	2.0	0.043	0.985	Mucha dependencia, no se ajusta al modelo	
	5.0	0.043	0.981		
0.1	0.5	0.513	0.999	0.473	0.999
	1.0	0.111	0.996		
	2.0	0.021	0.950	No se ajusta al modelo	
	5.0	0.021	0.996		
0.3	0.5	0.235	0.999	0.308	0.991
	1.0	0.061	0.999		
	2.0	0.016	0.990	No se ajusta al modelo	
	5.0	0.016	0.999		
0.5	0.5	0.190	0.997	0.276	0.990
	1.0	0.043	0.997		
	2.0	0.020	0.998	No se ajusta al modelo	
	5.0	0.019	0.975		
0.6	0.5	0.139	0.998	0.247	0.981
	1.0	0.040	0.995		
	2.0	0.022	0.991	No se ajusta al modelo	
	5.0	0.020	0.998		
0.7	0.5	0.071	0.993	0.190	0.977
	1.0	0.030	0.977	No se ajusta al modelo	
	2.0	0.022	0.988	No se ajusta al modelo	
	5.0	0.014	0.979	0.958 0.971	



El cálculo también se realizó para las formulaciones elaboradas a partir de mezclas gelana KCl y los resultados se presentan en el siguiente cuadro (cuadro 10).

*Cuadro 6. Dependencia de los módulos dinámicos en función de la frecuencia para las mezclas de gelana-KCl*

Formulación		$\alpha$ (G')	r	$\beta$ (G'')	r
Gelana (%)	KCl (%)				
0.05	0.083	1.667	0.998	0.806	0.992
0.1	0.083	0.795	0.997	0.579	0.998
0.3	0.0083	1.018	0.993	0.908	0.999
	0.083	0.105	0.977	0.196	0.927
0.5	0.0083	0.700	0.997	0.680	0.997
	0.083	0.038	0.964	No se ajusta al modelo	
0.6	0.0083	0.590	0.996	0.584	0.999
	0.083	0.033	0.983	No se ajusta al modelo	
0.7	0.0083	0.415	0.993	0.470	0.999
	0.083	0.030	0.981	No se ajusta al modelo	

### 10.3 ANEXO C. Análisis de Varianza (ANOVA)

Como se explico en los resultados en este análisis estadístico se tomó en cuenta tres factores, la frecuencia (A) la concentración de leche (B), la concentración de gelana (C), la frecuencia se considero debido a que existen variaciones de algunas formulaciones con respecto a la frecuencia, por lo que fue necesario introducir este factor dentro del análisis de varianza. Para cada uno de los factores de variación y para las interacciones entre los factores se plantearon dos hipótesis ( $H_0$  = hipótesis nula y  $H_1$  = hipótesis alterna), a continuación se muestran las hipótesis planteadas:

Para la frecuencia:

$$H_0 = \text{Todas las medias son iguales, es decir, } \mu_{1..} = \mu_{2..} = \dots = \mu_{i..}$$

$$H_1 = \text{Las medias no son iguales, es decir, } \mu_{1..} \neq \mu_{2..} \neq \dots \neq \mu_{i..}$$

Para la concentración de leche:

$$H_0 = \text{Todas las medias son iguales, es decir, } \mu_{.1.} = \mu_{.2.} = \dots = \mu_{.j.}$$

$$H_1 = \text{Las medias no son iguales, es decir, } \mu_{.1.} \neq \mu_{.2.} \neq \dots \neq \mu_{.j.}$$

Para la concentración de gelana:

$$H_0 = \text{Todas las medias son iguales, es decir, } \mu_{..1.} = \mu_{..2.} = \dots = \mu_{..k.}$$

$$H_1 = \text{Las medias no son iguales, es decir, } \mu_{..1.} \neq \mu_{..2.} \neq \dots \neq \mu_{..k.}$$

Para conocer si existe interacción entre el parámetro A y el B:

$$H_0 = \text{No hay interacciones entre la frecuencia y la concentración de leche}$$

$$H_1 = \text{Hay interacciones entre la frecuencia y la concentración de leche}$$

Para conocer si existe interacción entre el parámetro A y el C:

$$H_0 = \text{No hay interacciones entre la frecuencia y la concentración de gelana}$$

$$H_1 = \text{Hay interacciones entre la frecuencia y la concentración de gelana}$$

Para conocer si existe interacción entre el parámetro B y el C:

$$H_0 = \text{No hay interacciones entre la concentración de leche y la de gelana}$$

$H_1$  = Hay interacciones entre la concentración de leche y la de gelana

Para conocer si existe interacción entre los tres parámetros (A, B, C):

$H_0$  = No hay interacciones entre los factores analizados

$H_1$  = Hay interacciones entre los factores analizados

donde  $\mu_{i...}$  = media para las concentraciones de leche;  $\mu_{.j..}$  = media para las concentraciones de leche;  $\mu_{...k}$  = media para las concentraciones de gelana.

El resumen de los resultados obtenidos para el análisis de varianza de los módulos viscoso y elástico ( $G'$  y  $G''$ ) y para la tangente de delta ( $\tan \delta$ ), se presentan en los siguientes cuadros. En dichos cuadros (11, 12 y 13), es posible observar si existe o no diferencia significativa entre los efectos primarios y además si existe interacciones entre dichos efectos.

*Cuadro 7. Análisis de varianza para el módulo elástico ( $G'$ ), en función de la frecuencia, la concentración de leche y la concentración de gelana*

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Media de Cuadrados	F	$F_{tablas}$
Frecuencia (A)	264472.63	13	20344.05	3.15	1.74 <sup>1</sup>
Concentración de leche (B)	1902137094	4	475534273.5	73627.35	2.39 <sup>2</sup>
Concentración de gelana (C)	1140012753	6	190002125.6	29418.18	2.12 <sup>3</sup>
Interacción AB	375831.31	52	7227.53	1.12	1.37 <sup>4</sup>
Interacción AC	312914.54	78	4011.73	0.62	1.31 <sup>5</sup>
Interacción BC	2094894737	24	87287280.72	13514.76	1.54 <sup>6</sup>
Interacción ABC	406619.24	312	1303.27	0.20	1.18 <sup>7</sup>
Error	3164744.98	490	6458.66		
Total	5141569167	979			

\*Valores tomados de Spiegel (1991). <sup>1</sup>Con 13, 490 grados de libertad, <sup>2</sup>Con 4, 490 grados de libertad, <sup>3</sup>Con 6, 490 grados de libertad, <sup>4</sup>Con 52, 490 grados de libertad, <sup>5</sup>Con 78, 490 grados de libertad, <sup>6</sup>Con 24, 490 grados de libertad, <sup>7</sup>Con 312, 490 grados de libertad.

*Cuadro 8. Análisis de varianza para el módulo viscoso ( $G''$ ), en función de la frecuencia, la concentración de leche y la concentración de gelana.*

<b>Fuente de Variación</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Grados de libertad</b>	<b>Media de Cuadrados</b>	<b>F</b>	<b>F<sub>tablas</sub></b>
Frecuencia (A)	10604.24	13	815.71	5.17	1.74 <sup>1</sup>
Concentración de leche (B)	2500877.37	4	625219.34	3965.38	2.39 <sup>2</sup>
Concentración de gelana (C)	1788264.33	6	298044.06	1890.31	2.12 <sup>3</sup>
Interacción AB	39420.23	52	758.08	4.81	1.37 <sup>4</sup>
Interacción AC	18178.25	78	233.05	1.48	1.31 <sup>5</sup>
Interacción BC	3178704.21	24	132446.01	840.02	1.54 <sup>6</sup>
Interacción ABC	64561.31	312	206.93	1.31	1.18 <sup>7</sup>
Error	3164744.98	490	6458.66		
Total	5141569167	979			

\*Valores tomados de Spiegel (1991). <sup>1</sup>Con 13, 490 grados de libertad, <sup>2</sup>Con 4, 490 grados de libertad, <sup>3</sup>Con 6, 490 grados de libertad, <sup>4</sup>Con 52, 490 grados de libertad, <sup>5</sup>Con 78, 490 grados de libertad, <sup>6</sup>Con 24, 490 grados de libertad, <sup>7</sup>Con 312, 490 grados de libertad.

*Cuadro 9. Análisis de varianza para la tangente de delta ( $\tan d$ ), en función de la frecuencia, la concentración de leche y la concentración de gelana.*

<b>Fuente de Variación</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Grados de libertad</b>	<b>Media de Cuadrados</b>	<b>F</b>	<b>F<sub>tablas</sub></b>
Frecuencia (A)	156.08	13	12.01	14.95	1.74 <sup>1</sup>
Concentración de leche (B)	1284.79	4	321.20	399.90	2.39 <sup>2</sup>
Concentración de gelana (C)	148.70	6	24.78	30.85	2.12 <sup>3</sup>
Interacción AB	309.25	52	5.95	7.40	1.37 <sup>4</sup>
Interacción AC	99.35	78	1.27	1.59	1.31 <sup>5</sup>
Interacción BC	307.25	24	12.80	15.94	1.54 <sup>6</sup>
Interacción ABC	190.90	312	0.61	0.76	1.18 <sup>7</sup>
Error	393.57	490	0.80		
Total	2889.89	979			

\*Valores tomados de Spiegel (1991). <sup>1</sup>Con 13, 490 grados de libertad, <sup>2</sup>Con 4, 490 grados de libertad, <sup>3</sup>Con 6, 490 grados de libertad, <sup>4</sup>Con 52, 490 grados de libertad, <sup>5</sup>Con 78, 490 grados de libertad, <sup>6</sup>Con 24, 490 grados de libertad, <sup>7</sup>Con 312, 490 grados de libertad.

Como se mencionó en los resultados el conocimiento de la interpretación es, en general, más importante que los efectos principales, por lo cual cabe aclarar este concepto para lograr una buena comprensión del mismo.

### Concepto de interacción

El concepto de interacción entre factores admite varias formulaciones, todas ellas equivalentes. Desde un punto de vista *no formal*, se dice que EXISTE una interacción entre dos factores o más cuando el efecto de uno de ellos sobre la variable dependiente no es el mismo en todos los niveles del otro factor. Esto equivale a afirmar que existe interacción cuando el resultado de la combinación de dos o más factores difiere de la suma de los efectos principales de esos factores.

Para poder presentar una definición formal de la interacción, se debe considerar la siguiente notación (cuadro 14) para la configuración de un diseño factorial de 2x3, con los factores A y B (con niveles  $A_j$  y  $B_k$ ;  $j = 1,2$ ;  $k = 1,2,3$ ), la media total ( $\mu$ ), las medias marginales ( $\mu_{j+}$  y  $\mu_{+k}$ ) y las medias de las casillas ( $\mu_{jk}$ ).

En el modelo de ANOVA de efectos fijos, el efecto de interacción se define como:

$$(\alpha\beta)_{jk} = \mu_{jk} - \mu_{j+} - \mu_{+k} + \mu$$

De acuerdo con esta definición, existe interacción cuando  $(\alpha\beta)_{jk} \neq 0$  para algún  $j$  o  $k$ ; y no existe interacción cuando  $(\alpha\beta)_{jk} = 0$  para todo  $j$  y  $k$ . Ahora bien, existen al menos dos maneras alternativas de interpretar la definición:

1. Como la *desviación que experimentan las medias de las casillas respecto de los efectos principales de los factores*:
  - a. No interacción:  $\mu_{jk} = \mu_{j+} + \mu_{+k} + \mu$  (para todo  $j$  y  $k$ )
  - b. Interacción:  $\mu_{jk} \neq \mu_{j+} + \mu_{+k} + \mu$  (para algún  $j$  o  $k$ )

Según esta definición, existe interacción cuando la media de una o más casillas no es función directa de sus respectivas medias marginales. Esto significa que, si existe interacción, el efecto de la combinación de los factores A y B difiere de la suma de los efectos A y B

2. Como *diferencias entre las medias de las casillas y las medias marginales*:

a. No interacción:  $\mu_{jk} - \mu_{j'k} = \mu_{j+} - \mu_{j'+}$  (para todo j, j' o k)

b. Interacción:  $\mu_{jk} - \mu_{j'k} \neq \mu_{j+} - \mu_{j'+}$  (para algún j, j' o k)

Según esta definición, existe interacción cuando la diferencia entre las medias de dos casillas de la misma columna (lo mismo vale para las filas) no es igual que la diferencia entre sus correspondientes medias marginales.

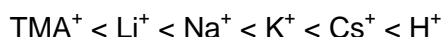
En conclusión, si existe interacción, la diferencia entre los niveles  $A_1$  y  $A_2$  no es la misma en los tres niveles de B; y lo mismo se puede decir de la diferencia entre los niveles  $B_1$ ,  $B_2$  y  $B_3$  en los dos niveles de A, es decir que el efecto de un factor no es el mismo en todos los niveles del otro y entonces puede afirmarse que el significado de los efectos principales de un diseño queda matizado por la presencia de una interacción significativa (Pardo *et al.*, 2007).

*Cuadro 10. Notación utilizada en un diseño 2x3 (Pardo, 2007).*

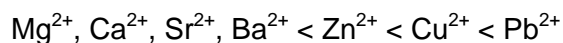
	<b>B<sub>1</sub></b>	<b>B<sub>2</sub></b>	<b>B<sub>3</sub></b>	
<b>A<sub>1</sub></b>	$\mu_{11}$	$\mu_{12}$	$\mu_{13}$	$\mu_{1+}$
<b>A<sub>2</sub></b>	$\mu_{21}$	$\mu_{22}$	$\mu_{23}$	$\mu_{2+}$
	$\mu_{+1}$	$\mu_{+2}$	$\mu_{+3}$	$\mu$

#### 10.4 ANEXO D. Concentración Total y Fuerza Iónica para de las formulaciones elaboradas

En los siguientes cuadros (15 y 16) se presentan los valores obtenidos para la concentración total y la fuerza iónica de las formulaciones elaboradas en este trabajo. El cálculo de concentración total se realizó para poder construir el diagrama de transición sol-gel, que se presentó en los resultados. En este caso solo consideramos la cantidad de iones potasio presentes en las formulaciones, ya que los diagramas de transición se construyen en base a un solo ión y por estar el ión potasio en mayor concentración en ambos componentes del sistema se decidió utilizar dicho ión como base para el diagrama de transición. Por otro lado, la fuerza iónica en estos sistemas es muy importante debido principalmente a que la gelificación de la gelana depende tanto de la naturaleza del catión como de su fuerza iónica (Grasdalen, 1987). Para iones monovalentes a una  $I = 0.1M$ , la rigidez del gel se incrementa en el orden:



Para iones divalentes la dependencia es:



Como se observa en los valores presentados en el cuadro 15, la fuerza iónica se incrementa al aumentar el contenido de leche descremada en las formulaciones elaboradas, además debido a que la gelana también tiene iones este incremento también se ve afectado por el incremento en el contenido de gelana.

Cuadro 11. Concentración total ( $C_T$ ) y fuerza iónica ( $I$ ) para las formulaciones de estudio

Gelana (%)	Leche (%)	$C_T$ (eq/L)	Fuerza iónica (m)
	0.0	0.0003	0.0001
	0.5	0.0025	0.0045
0.01	1.0	0.0047	0.0090
	2.0	0.0093	0.0180
	5.0	0.0236	0.0463
	0.0	0.0012	0.0005
	0.5	0.0034	0.0049
0.05	1.0	0.0057	0.0094
	2.0	0.0103	0.0184
	5.0	0.0246	0.0468
	0.0	0.0024	0.0010
	0.5	0.0047	0.0055
0.10	1.0	0.0069	0.0099
	2.0	0.0115	0.0190
	5.0	0.0259	0.0474
	0.0	0.0071	0.0030
	0.5	0.0094	0.0074
0.30	1.0	0.0117	0.0119
	2.0	0.0164	0.0210
	5.0	0.0309	0.0495
	0.0	0.0119	0.0050
	0.5	0.0142	0.0094
0.50	1.0	0.0166	0.0140
	2.0	0.0213	0.0231
	5.0	0.0360	0.0518
	0.0	0.0143	0.0060
	0.5	0.0166	0.0105
0.60	1.0	0.0190	0.0150
	2.0	0.0237	0.0241
	5.0	0.0386	0.0529
	0.0	0.0167	0.0070
	0.5	0.0191	0.0115
0.70	1.0	0.0214	0.0160
	2.0	0.0262	0.0252
	5.0	0.0412	0.0540



Por otra parte, se calculó también la fuerza iónica de las formulaciones en las que se agregó KCl y se comparo con aquellas que contenían leche. En este caso es fácil apreciar que la fuerza iónica de las formulaciones elaboradas a partir de las mezclas de leche descremada y gelana poseen una fuerza iónica que es de 30 a 75% mayor que para las formulaciones con KCl, por lo tanto se debe tener especial consideración con estos valores para la interpretación de los resultados obtenidos.

*Cuadro 12. Comparación de fuerza iónica (I) entre las formulaciones con leche y sus respectivos controles con iones potasio*

Componentes			Fuerza Iónica (mol/kg)		Diferencia	%
Gelana (%)	Leche (%)	KCl (%)	Adición de leche	Adición de K <sup>+</sup>		
0.05	5.0	0.0830	0.0468	0.0115	0.0353	75.4
0.1	5.0	0.0830	0.0474	0.0119	0.0355	74.9
0.3	0.5	0.0083	0.0074	0.0041	0.0033	44.6
	5.0	0.083	0.0495	0.0140	0.0355	71.7
0.5	0.5	0.0083	0.0094	0.0061	0.0033	35.1
	5.0	0.0830	0.0518	0.0160	0.0358	69.1
0.6	0.5	0.0083	0.0105	0.0071	0.0034	32.4
	5.0	0.0830	0.0529	0.0170	0.0359	67.9
0.7	0.5	0.0083	0.0115	0.0081	0.0034	29.6
	5.0	0.0830	0.0540	0.0180	0.0360	66.7