



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN
Y DE LA SALUD ANIMAL**

**APLICACIÓN DE CRIOGELES PARA EL CONTROL DEL
CRECIMIENTO DE CRISTALES DURANTE LA
CONGELACIÓN DE CARNE DE CERDO**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

JONATHAN CORIA HERNÁNDEZ

COMITÉ TUTOR

ABRAHAM MÉNDEZ ALBORES
(FES-Cuautitlán)

JOSÉ LUIS ARJONA ROMÁN
(FES-Cuautitlán)

VIRGINIA ARAGÓN FERNÁNDEZ
(IRTA-CRESA)

ADRIANA LLORENTE BOUSQUETS
(FES-Cuautitlán)

ROSALÍA MELÉNDEZ PÉREZ
(FES-Cuautitlán)



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.

DEDICATORIAS

A mi familia, ya que este logro también les pertenece y en parte es suyo, Ángela, Martha, Laura, Antonio, Diana, Michelle y Marco, mi corazón y alma siempre está con ustedes.

A mi gran amiga y fuerza impulsora **Rosalía Meléndez Pérez**, por ser mi pilar de fortaleza, mi consejera, mi compañera, pero, sobre todo por ser mi amiga y mi modelo por seguir, por hacerme entender que para el cariño no existe *la barrera de la edad*, por enseñarme a amar, respetar y honrar mi profesión, nunca me voy a cansar de agradecerle tanto cariño y conocimiento que me ha brindado.

A mi querido amigo **José Luis Arjona Román**, gracias por todo lo que ha hecho por mí, por ayudarme a lograr mis sueños, por su peculiar forma de demostrarme su cariño y apoyo, por enseñarme a ser mejor persona y profesional, por sus conocimientos y enseñanzas, por decirme las palabras correctas en el momento exacto como sólo usted sabe hacerlo, estoy eternamente agradecido, por tanto.

A mi extraordinaria amiga **Marta Rosas Mendoza**, mi querida y gran amiga gracias por compartir bellos momentos a su lado y abrirme las puertas de su corazón, ahora no tengo duda de que *“hay amistades que traspasan las líneas del espacio-tiempo”*, gracias por los consejos y tanto cariño.

Al Dr. **Abraham Méndez**, por ser un excelente tutor y compañero, por sus consejos y guía, por demostrarme el amor que tiene a su profesión y por permitirme compartir este proyecto a su lado.

Mi muy querida amiga y compañera **Ana María De la Cruz**, no existen palabras para agradecer tanto cariño, tantos conocimientos que me ha brindado y tanta paz, sin duda sus consejos y compañía me llenan de la fortaleza espiritual que tanta falta me hace.

Mi muy querida *amiga del corazón* **Laura Cortazar**, a la cual admiro no sólo profesional, si no también personalmente, sin duda un día espero poder llegar a lograr tantito de lo que usted ha logrado.

Mi querida amiga y compañera **Maritza Rocandio**, gracias por las palabras, compañía, apoyo, sinceridad y buenos momentos que sin duda seguiremos compartiendo, te admiro mucho.

A mi amiga **Ana María Soto**, por las charlas amenas y los viajes compartidos, por sus palabras y apoyo incondicional, es un privilegio poder contar con su cariño y amistad.

A la memoria de mi querido amigo, profesor y compañero **Víctor Manuel Ávalos[†]**, sé que en ese lugar donde te encuentras te sientes orgulloso de mí, así como yo lo sigo estando de ti, por tus enseñanzas, compañía, consejos y amistad.

A la **Dra. Adriana Llorente**, por sus palabras y apoyo profesional, por inculcarme el amor a la investigación y *hacerme ver lo que yo no era capaz de ver en mí*.

A mis muy queridos amigos, por enseñarme a que la ciencia también es muy divertida, estoy muy orgulloso de todos ustedes:

Ana Elvia Sánchez, gracias por tanto cariño y por la compañía, por esos momentos donde perdí la cabeza y estuviste a mi lado, no alcanzarían las palabras para expresar mi agradecimiento y cariño hacia ti, por abrirme las puertas de tu casa y de tu familia... te quiero.

Christian Ávalos, gracias por esas palabras y risas, tu “característica” sinceridad, esa compañía y ese cariño que sin merecer siempre me haz brindado, la vida es muy sabia al ponerte en mi camino, te quiero mucho.

Bruno Solís, sin duda alguna eres un ser humano extraordinario, gracias por escucharme y ser parte de este proyecto de vida, tu cariño y amistad son invaluable.

Daniel Hernández, gracias por esos momentos de esparcimiento, me permitiste conocer al gran amigo que eres.

[REDACTED]
[REDACTED] **Ricardo Hernández**, [REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

A todos mis alumnos, ya que ellos son mis principales motivaciones para seguir luchando por ser mejor día a día, ojalá la vida me permita seguir inculcándoles el amor y pasión a la Ingeniería de los alimentos.

A la Familia **Sánchez Mendoza**, [REDACTED]
[REDACTED]

A las personas que siempre me brindaron palabras de aliento, un abrazo reconfortante y una sonrisa invaluable... este logro es la suma de todos los que han cruzado uno (o miles) de instantes por mi vida y me han dado las lecciones de vida más importantes.

Veni, vidi, vici, unguis et rostrum... Ad astra per aspera, donec perficiam

AGRADECIMIENTOS A LOS PROYECTOS:

CONACYT CB-220710

“INACTIVACIÓN QUÍMICA IN VITRO DE AFLATOXINA B1 EN MEDIO ÁCIDO: EVALUACIÓN CITOTÓXICA Y GENOTÓXICA DE LOS PRODUCTOS DE REACCIÓN”

PAPIIT IT-201417

“APLICACIÓN DE ULTRASONIDO Y CRIOGELES EN LA CONGELACIÓN DE CORTES DE CARNE PARA EL CONTROL DEL TAMAÑO DE CRISTALES DE AGUA”

PIAPI 1820

“ANÁLISIS TÉRMICO DE MATERIALES Y ALIMENTOS Y SU RELACIÓN CON PROCESOS DE TRANSFERENCIA DE CALOR Y MASA”

AGRADECIMIENTO ESPECIAL AL CONACYT POR LA BECA **391944** OTORGADA PARCIALMENTE DURANTE LA ESTANCIA EN EL POSGRADO

AGRADECIMIENTOS

POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU

A la Universidad Nacional Autónoma de México por ser mi segundo hogar y brindarme la posibilidad de culminar un sueño por tercera ocasión.

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por abrirme sus puertas por tanto tiempo.

A la Unidad de Investigación Multidisciplinaria (UIM), particularmente al Laboratorio 13 de Análisis Térmico y Estructural de Alimentos y Materiales y Laboratorio 14 de Alimentos Micotoxinas y Micotoxicosis donde se planteó, desarrolló y culminó el proyecto.

Al Honorable Jurado Revisor por los comentarios y observaciones atinadas en el mejoramiento del documento escrito.

PRODUCTOS DERIVADOS DEL PROYECTO DE DOCTORADO

PATENTE

Solicitud de registro ante el IMPI: **MX/a/2017/014304** “Uso de criogeles con difusión asistida por ultrasonido para limitar el crecimiento de cristales de hielo en la congelación de alimentos”

ARTÍCULOS EN REVISTAS INDEXADAS

Jonathan Coria-Hernández, Rosalía Meléndez-Pérez, Marta E. Rosas-Mendoza, Adriana Llorente-Bousquets and José Luis Arjona-Román. (2017). Analysis of the color profile and shear force in ultrasonicated pork meat (*Longissimus thoracis*). *Interciencia Journal*, **42**(7), 22-32.

Jonathan Coria-Hernández, Abraham Méndez-Albores, Rosalía Meléndez-Pérez, Marta Elvia Rosas-Mendoza and José Luis Arjona-Román. (2018). Thermal, Structural, and Rheological Characterization of Waxy Starch as a Cryogel for Its Application in Food Processing. *Polymers*, **10**, 359.

TRABAJOS EN CONGRESOS INTERNACIONALES

- Betancourt, S.R., Rosas, M.M.E., Meléndez, P.R., Coria, H.J. and Arjona, R.J.L. Evaluation of the Cryoprotectant Effect of Cryogel of Waxy Starch Incorporated with Ultrasound on Pork Meat. LatinFood 2016. IAFP's 5th Latin American Symposium in Food Safety. 7th Food Science, Biotechnology and Safety Meeting. Cancún Q. Roo, México. 9-11 November 2016.
- Coria, H.J., Méndez, A.A., Meléndez, P.R., Rosas, M.M.E., Rocandio, P.M. and Arjona, R.J.L. Polymer-based Cryogel Applications During Food Freezing Processes. LatinFood 2016. IAFP's 5th Latin American Symposium in Food Safety. 7th Food Science, Biotechnology and Safety Meeting. Cancún Q. Roo, México. 9-11 November 2016.

- Olalde, P.S., Rosas, M.M.E., Meléndez, P.R., Coria, H.J. and Arjona, R.J.L. Xhantan's Cryogel Protection Effect in Crystallization and Roast of Pork Meat. LatinFood 2016. IAFP's 5th Latin American Symposium in Food Safety. 7th Food Science, Biotechnology and Safety Meeting. Cancún Q. Roo, México. 9-11 November 2016.
- Coria, H.J., Meléndez, P.R., Méndez, A.A. and Arjona, R.J.L. FTIR, SEM and MDSC Analysis of Xanthan Cryogels. LatinFood 2018. 8th Food Science, Biotechnology and Safety Congress. Puerto Vallarta, México. 14-16 November 2018.
- Meléndez, P.R., Coria, H.J., Méndez, A.A. and Arjona, R.J.L. Application a Waxy Starch Cryogel by Ultrasound to Control the Freezing Process of Pork Meat in Chamber. LatinFood 2018. 8th Food Science, Biotechnology and Safety Congress. Puerto Vallarta, México. 14-16 November 2018.

TESIS

- Aplicación de criogel de carboximetilcelulosa como crioprotectores para carne de cerdo (*Longissimus thoracis*) en congelación. Nadia Guadalupe García Muñoz. Tesis de Licenciatura en Ingeniería en Alimentos. UNAM-Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. 2017.
- Evaluación del efecto de la utilización de criogel de almidón waxy en congelación de carne de cerdo *Longissimus thoracis*. Ricardo Betancourt Santos. Tesis de Licenciatura en Ingeniería en Alimentos. UNAM-Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Registro de protocolo 53-2016.
- Análisis por bioimpedancia eléctrica en la congelación-descongelación de carne de cerdo adicionada con hidrogel protector. Jesús Jiménez Rodríguez. Tesis de Licenciatura en Ingeniería en Alimentos. UNAM-Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Registro de protocolo 75-2016.

RESUMEN

Los criogeles son una clase emergente de biomateriales que recientemente llamaron la atención debido a las aplicaciones que tienen en diversas áreas de investigación. Los criogeles son hidrogeles de polímeros que reorganizan su estructura en una forma más ordenada cuando se someten a ciclos de congelación-descongelación bajo condiciones controladas. En este trabajo, se preparó un criogel mediante criogelificación de almidón céreo utilizando cuatro ciclos de congelación y descongelación, en contacto indirecto con nitrógeno líquido a $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se obtuvieron los valores de entalpía (ΔH), calor específico (C_p), transiciones térmicas, parámetros reológicos, tamaño de poro, cambios estructurales y el grado de orden estructural. Los resultados se analizaron mediante medidas de tendencia central y dispersión, ANOVA de 1 y 2 vías, pruebas de hipótesis y regresiones lineales y no lineales. Se encontraron cambios significativos ($P < 0.05$) basados en el número de ciclos de congelación-descongelación, reflejados en modificaciones estructurales y una reorganización en la matriz del polímero, lo que indica que cada criogel tiene un comportamiento particular que define su posible compatibilidad con los diferentes sistemas biológicos en el que pueden ser utilizados. El almidón ceroso con dos ciclos de criogelificación presentó las mejores características estructurales y funcionales debido al orden de su estructura, lo que implica que genera termodinámica y químicamente microporos para formar cristales de tamaño controlado durante la congelación. El criogel de dos ciclos se aplicó a carne de cerdo, en condiciones variables para los ciclos y amplitudes, evitando daños que modifican las características de la carne. A partir de éstos resultados, se concluye que el almidón céreo tiene potencial como criogel para su aplicación en la industria cárnica.

PALABRAS CLAVE: Criogel, Almidón ceroso, Congelación, Ultrasonido, Carne de cerdo, Calidad.

ABSTRACT

Cryogels are an emergent class of biomaterial that have recently drawn attention because of the applications they have in diverse research areas. Cryogels are hydrogels of polymers that rearrange its structure in a more ordered form when subjected to freeze-thaw cycles under controlled conditions. In this work, a cryogel was prepared through the cryogelification of waxy starch (WS) using four cycles of freezing and thawing in indirect contact with liquid nitrogen at -150 °C. The values of enthalpy (ΔH), specific heat (C_p), thermal transitions, rheological parameters, pore size, structural changes and the degree of structural order were obtained. Results were analyzed by measures of central tendency and dispersion, 1 and 2-way ANOVA, hypothesis testing and both linear and non-linear regressions. Significant changes were found ($P < 0.05$) based on the number of freeze-thaw cycles, reflected in structural modifications and a rearrangement in the polymer matrix, which indicates that each cryogel has a particular behavior that defines its possible compatibility with the different biological systems in which they can be used. The waxy starch with two cryogelification cycles presented the best structural and functional characteristics due to the ordering of its structure, which implies that thermodynamically and chemically generates micro-pores to form controlled size crystals during freezing. The cryogel of two cycles was applied to pork meat under varying conditions for cycles and amplitudes, avoiding damages that modify the characteristics of the meat. From these results, it is concluded that waxy starch has potential as a cryogel for application in the meat industry.

KEYWORDS: Cryogel, Waxy Starch, Freezing, Ultrasound, Pork Meat, Quality.

CONTENIDO

PRODUCTOS DERIVADOS DEL PROYECTO DE DOCTORADO	5
RESUMEN	7
ABSTRACT	8
ÍNDICE DE FIGURAS	12
ÍNDICE DE TABLAS	14
CAPÍTULO 1 MARCO TEÓRICO	15
1.1 MÉTODOS DE CONSERVACIÓN DE CARNE.....	16
1.2 CONGELACIÓN DE LA CARNE	16
1.2.1 EFECTO DE LOS SOLUTOS EN EL PROCESO DE CONGELACIÓN	21
1.3 NUEVAS TECNOLOGÍAS EN LA CONSERVACIÓN DE LA CARNE	23
1.3.1 ULTRASONIDO (US)	24
1.3.2 CRIOPROTECTORES.....	27
1.4 POLÍMEROS.....	29
1.4.1 PROPIEDADES DE LOS POLÍMEROS.....	30
1.5 ALCOHOL POLIVINÍLICO (PVA).....	33
1.6 GOMA XANTANA.....	35
1.7 GOMA KARAYA	38
1.8 ALMIDÓN.....	40
1.8.1 ALMIDÓN CEROSO (WAXY).....	42
1.9 HIDROGELES.....	42
1.10 CRIOGELES	47
CAPÍTULO 2 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	50
2.1 OBJETIVO GENERAL	51
2.2 OBJETIVOS PARTICULARES	51
2.3 HIPÓTESIS.....	51
2.4 ACTIVIDADES PRELIMINARES	52
2.4.1 ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA CARNE	52
2.4.2 PREPARACIÓN DE LOS HIDROGELES.....	52
2.4.3 FORMACIÓN DE LOS CRIOGELES	53
2.5 ETAPA 1. CARACTERIZACIÓN DE LOS HIDRO- Y LOS CRIOGELES	53
2.5.1 CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO MODULADA (MDSC)	53

2.5.2 GRADO DE ORDEN ESTRUCTURAL	54
2.5.3 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)	54
2.5.4 REOLOGÍA ROTACIONAL.....	54
2.5.5 ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO CON TRANSFORMADA DE FOURIER CON EL ADITAMENTO REFLECTANCIA DIFUSA (FTIR-RD).....	54
2.6 ETAPA 2. CARACTERIZACIÓN DE LA CARNE DE CERDO CON EL CRIOGEL	55
2.6.1 ACTIVIDAD DE AGUA (A_w).....	56
2.6.2 POTENCIAL DE HIDRÓGENO (PH).....	56
2.6.3 CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO MODULADA (MDSC)	56
2.6.4 PERFIL DE COLOR.....	56
2.6.5 FRACCIÓN DE MIOGLOBINA SUPERFICIAL	57
2.6.6 ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO CON TRANSFORMADA DE FOURIER CON EL ADITAMENTO REFLECTANCIA TOTAL ATENUADA (FTIR-ATR)	57
2.6.7 ANÁLISIS DE FUERZA DE CORTE	58
2.7 DISEÑO EXPERIMENTAL	58
CAPÍTULO 3 ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	62
3.1 ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA CARNE	63
3.2 ETAPA 1. CARACTERIZACIÓN DE LOS HIDRO- Y LOS CRIOGELES DE ALMIDÓN WAXY.....	63
3.2.1 CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO MODULADA (MDSC)	64
3.2.2 GRADO DE ORDEN ESTRUCTURAL	71
3.2.3 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)	72
3.2.4 REOLOGÍA ROTACIONAL.....	77
3.2.5 ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO CON TRANSFORMADA DE FOURIER CON EL ADITAMENTO DE REFLECTANCIA DIFUSA (FTIR-RD).....	78
3.3 ETAPA 2. CARACTERIZACIÓN DE LA CARNE DE CERDO CON EL CRIOGEL	83
3.3.1 CONGELACIÓN DE LA CARNE	83
3.3.2 ACTIVIDAD DE AGUA (A_w) Y POTENCIAL DE HIDRÓGENO (PH)	84
3.3.3 CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO MODULADA (MDSC)	85
3.3.4 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)	89
3.3.5 PARÁMETROS DE PERFIL DE COLOR.....	92
3.3.6 FRACCIÓN DE MIOGLOBINA SUPERFICIAL	94
3.3.7 ESPECTROSCOPIA FTIR-ATR.....	95
3.3.8 ANÁLISIS DE FUERZA DE CORTE	98

CONCLUSIONES	101
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103
ANEXO A. ANÁLISIS DE LOS CRIOGELES DE XANTANA	110
ANEXO B. ANÁLISIS DE CRIOGELES DE KARAYA	120
ANEXO C. REGISTRO DE PATENTE	129
ANEXO D. PUBLICACIÓN	130

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Curvas típicas de congelación y sus diferencias en agua y sistemas biológicos.	18
Figura 2. Diferentes tipos de cristales de hielo.	19
Figura 3. Esquema de la onda de ultrasonido a través del tiempo.	24
Figura 4. Mecanismos de cavitación en el ultrasonido.	26
Figura 5. Arreglo estructural de los polímeros.	30
Figura 6. Transiciones térmicas de los polímeros.	31
Figura 7. Monómero del alcohol polivinílico.	34
Figura 8. Estructura química de la goma xantana.	36
Figura 9. Fragmentos componentes de la goma karaya.	39
Figura 10. Fragmentos del almidón. (a) amilosa, (b) amilopectina.	41
Figura 11. Mecanismos físicos de formación de hidrogeles. (a) Interacciones iónicas, (b) Interacciones hidrofóbicas, (c) Cruzados covalentes primarios, (d) Entrecruzamientos físicos, (e) Afinidad o bioreconocimiento.	43
Figura 12. Mecanismos de formación de criogeles. (a) hidrogel, (b) congelación, (c) criogelificación, (d) descongelación, (e) criogel formado.	47
Figura 13. Fusión del hidrogel y los criogeles de alcohol polivinílico. (a) Flujo de calor total, (b) Derivada del flujo de calor en función de la temperatura, (c) Calor específico.	65
Figura 14. Evaporación del hidrogel y los criogeles de alcohol polivinílico. (a) Flujo de calor total, (b) Derivada del flujo de calor en función de la temperatura, (c) Calor específico.	66
Figura 15. Fusión del hidrogel y criogeles de almidón waxy. (a) Flujo de calor total, (b) Derivada del flujo de calor en función de la temperatura, (c) Calor específico.	68
Figura 16. Evaporación del hidrogel y los criogeles de almidón waxy. (a) Flujo de calor total, (b) Derivada del flujo de calor en función de la temperatura, (c) Calor específico.	69
Figura 17. Micrografías a 900× del alcohol polivinílico a diferentes ciclos de congelación-descongelación. (a) hidrogel, (b) ciclo 1, (c) ciclo 2, (d) ciclo 3, (e) ciclo 4.	73
Figura 18. Tamaños de poros de las dispersiones. (a) alcohol polivinílico, (b) almidón waxy.	74
Figura 19. Estructura a 900× del almidón waxy a diferentes ciclos de congelación-descongelación. (a) hidrogel, (b) ciclo 1, (c) ciclo 2, (d) ciclo 3, (e) ciclo 4.	76
Figura 20. Comportamiento reológico de los hidro- y los criogeles. (a) alcohol polivinílico, (b) almidón waxy.	77

Figura 21. Espectros FTIR-RD del alcohol polivinílico. (a) polvo, (b) hidrogel, (c) 1 ciclo, (d) 2 ciclos, (e) 3 ciclos, (f) 4 ciclos.	80
Figura 22. Espectros FTIR-RD de almidón waxy. (a) polvo, (b) hidrogel, (c) 1 ciclo, (d) 2 ciclos, (e) 3 ciclos, (f) 4 ciclos.	82
Figura 23. Historial térmico durante la congelación de la carne de cerdo fresca y con criogel-ultrasonido.	83
Figura 24. (a) Flujo de calor, (b) Calor específico de las muestras de carne.	85
Figura 25. (a) Flujo de calor, (b) Calor específico, (c) Derivada del flujo de calor de las muestras cárnicas analizadas.	87
Figura 26. Micrografías a 100× de carne de cerdo. (a) fresca, (b) descongelada, (c) criogel-ultrasonido.	90
Figura 27. Tamaños de poro en las muestras de carne analizadas.	91
Figura 28. Espectro de reflectancia de las muestras cárnicas analizadas.	94
Figura 29. Espectros de las muestras de carne (a) 4000 a 450 cm ⁻¹ , (b) 1750 a 1000 cm ⁻¹ .	96
Figura 30. Fuerza de corte (kg _f) en las muestras de carne analizadas.	99
Figura A1. Fusión del hidrogel y los criogel de xantana. (a) Flujo de calor total, (b) Derivada del flujo de calor en función de la temperatura, (c) Calor específico.	110
Figura A2. Evaporación del hidrogel y los criogel de xantana. (a) Flujo de calor total, (b) Derivada del flujo de calor en función de la temperatura, (c) Calor específico.	112
Figura A3. Estructura a 900× de los hidro- y los criogel de xantana a diferentes ciclos de congelación-descongelación. (a) hidrogel, (b) ciclo 1, (c) ciclo 2, (d) ciclo 3, (e) ciclo 4.	115
Figura A4. Tamaños de poros de los hidro- y los criogel de xantana.	116
Figura A5. Comportamiento reológico del hidro- y los criogel de xantana.	117
Figura A6. Espectros FTIR-RD de goma xantana. (a) polvo, (b) hidrogel, (c) 1 ciclo, (d) 2 ciclos, (e) 3 ciclos, (f) 4 ciclos.	118
Figura B1. Fusión del hidro- y criogel de karaya. (a) Flujo de calor total, (b) Derivada del flujo de calor en función de la temperatura, (c) Calor específico.	120
Figura B2. Evaporación del hidro- y los criogel de karaya. (a) Flujo de calor total, (b) Derivada del flujo de calor en función de la temperatura, (c) Calor específico.	121
Figura B3. Estructura a 900× de la goma karaya a diferentes ciclos de congelación-descongelación. (a) hidrogel, (b) ciclo 1, (c) ciclo 2, (d) ciclo 3, (e) ciclo 4.	124
Figura B4. Tamaños de poros del hidro- y los criogel de karaya.	125
Figura B5. Comportamiento reológico del hidro- y los criogel de karaya.	126
Figura B6. Espectros FTIR-RD de goma karaya. (a) polvo, (b) hidrogel, (c) 1 ciclo, (d) 2 ciclos, (e) 3 ciclos, (f) 4 ciclos.	127

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Relación estructura-función de la goma xantana.	37
Tabla 2. Estímulos a los que reaccionan los hidrogeles.	46
Tabla 3. Concentraciones de biopolímeros utilizadas para la formación de los hidrogeles.	52
Tabla 4. Actividades para caracterizar las dispersiones de los hidro- y los criogeles.	59
Tabla 5. Actividades para caracterizar las muestras de carne analizadas.	60
Tabla 6. Composición química de la carne de cerdo fresca.	63
Tabla 7. Transiciones y gastos energéticos del hidro- y los criogeles de alcohol polivinílico.	67
Tabla 8. Transiciones y gastos energéticos del hidro- y los criogeles de almidón waxy.	70
Tabla 9. Porcentaje de orden estructural de las dispersiones de los hidro- y los criogeles.	71
Tabla 10. Parámetros reológicos de fluidos Ostwald de Waele de los hidro- y los criogeles.	78
Tabla 11. Valores obtenidos del historial térmico de la carne fresca y congelada con criogel-ultrasonido.	84
Tabla 12. Algunas Propiedades fisicoquímicas de las muestras de carne analizadas.	84
Tabla 13. Temperaturas de transición y gastos energéticos de las muestras cárnicas.	86
Tabla 14. Principales transiciones térmicas en la carne sometida a diferentes tratamientos.	88
Tabla 15. Color de las muestras de carne de cerdo analizadas.	92
Tabla 16. Fracciones de mioglobina superficial de las muestras cárnicas analizadas.	95
Tabla 17. Principales vibraciones moleculares en la carne de cerdo.	97
Tabla A1. Transiciones y gastos energéticos del hidro- y los criogeles de xantana.	113
Tabla A2. Porcentaje de orden estructural de las dispersiones de los hidro- y los criogeles de xantana.	114
Tabla A3. Parámetros reológicos de fluidos Ostwald de Waele de los hidro- y los criogeles de xantana.	117
Tabla B1. Transiciones y gastos energéticos del hidro- y los criogeles de karaya.	122
Tabla B2. Porcentaje de orden estructural de las dispersiones de los hidro- y los criogeles de karaya.	123
Tabla B3. Parámetros reológicos de fluidos Ostwald de Waele de los hidro- y los criogeles de karaya.	126

CAPÍTULO 1

MARCO

TEÓRICO

“All these accidents that happen follow the dot, coincidence makes sense only with you, you don’t have to speak, I feel emotional landscapes, they puzzle me, then the riddle gets solved, and you push me up to this state of emergency, how beautiful to be, state of emergency is where I want to be...” Joga (Björk).

1.1 MÉTODOS DE CONSERVACIÓN DE CARNE

La carne debido a su composición química es un producto altamente perecedero y, por lo tanto, para preservarla, se deben de adaptar y aplicar una serie de medidas que permitan el retraso o inhibición del crecimiento de la microbiota y la generación de reacciones químicas y físicas que la afecten negativamente. Varios factores que se encuentran interrelacionados influyen en la vida útil y mantienen la calidad, específicamente la temperatura, el oxígeno atmosférico (O₂), las enzimas endógenas, la humedad, la luz y los microorganismos. Todos estos factores, solos o en combinación pueden producir cambios perjudiciales en el color, el olor, la textura y el sabor de la carne.

De todos los posibles tipos de deterioro que sufre la carne, el de origen microbiológico es el más importante, ya que normalmente precede a los otros tipos y puede convertir la carne en perjudicial para la salud debido a la posible presencia de patógenos o compuestos tóxicos derivados de su metabolismo; aunque el deterioro de la carne puede ocurrir en ausencia de microorganismos (por ejemplo, proteólisis, lipólisis y oxidación).

Si bien, existe una variedad de procedimientos físicos, químicos y microbiológicos que se pueden usar para conservar la carne, algunos métodos como el enfriamiento, la irradiación y las altas presiones hidrostáticas sirven para mantener en mayor proporción las características originales del producto. Otros procesos como el curado, la deshidratación y la fermentación, provocan cambios deseables en los atributos de calidad, lo que contribuye a la diversificación de los productos en el mercado (Leygonie *et al.*, 2012).

1.2 CONGELACIÓN DE LA CARNE

La congelación es un método importante de conservación utilizado para extender la vida útil de los alimentos, en especial de la carne y sus subproductos. Comparado con otros métodos, conduce a una pérdida mínima de calidad durante el almacenamiento a largo plazo; desde el punto de vista de la ingeniería, éste proceso es un fenómeno de transferencia de calor en el que los alimentos pierden calor por convección a través de su superficie y, por conducción en su interior. Uno de los factores más importante que afectan el proceso es la composición química del material, donde el contenido de agua, las características propias de las

biomoléculas, los sólidos solubles e insolubles, y otros factores como el calor específico, la entalpía y los fenómenos de transporte acoplados de masa y energía, son importantes.

El proceso de congelación es un método eficaz para prolongar la vida útil de la carne y sus subproductos al inhibir el crecimiento microbiológico y reducir las reacciones bioquímicas y de degradación. Sin embargo, hay un deterioro en la calidad, que incluye pérdida de sabor, decoloración, oxidación de lípidos y desnaturalización de las proteínas. La calidad de la carne congelada está influida por el proceso, el tamaño de los cristales de hielo y su ubicación dentro de las fibras cárnicas (Dalvi-Isfahan *et al.*, 2017).

El proceso de reducción de temperatura puede dividirse en tres fases distintas: (1) el enfriamiento, en que el material reduce su energía, desde su temperatura inicial hasta el punto inicial de congelación (PIC), (2) un período de cambio de fase (propriadamente la congelación), con la cristalización de la mayor parte del agua y (3) una fase de atemperación o subenfriamiento, en la que el producto alcanza la temperatura final establecida.

Cabe destacar que las curvas típicas de enfriamiento (Figura 1) muestran al inicio del proceso, un aumento abrupto de la temperatura debido a la liberación de calor de fusión ($\Delta H_{fusión}$) después de un sobre-enfriamiento inicial. Esta etapa representa el inicio de la cristalización de hielo. Una vez que los embriones de cristal exceden el radio crítico para la nucleación, el sistema libera el calor latente más rápido (Rahman *et al.*, 2008).

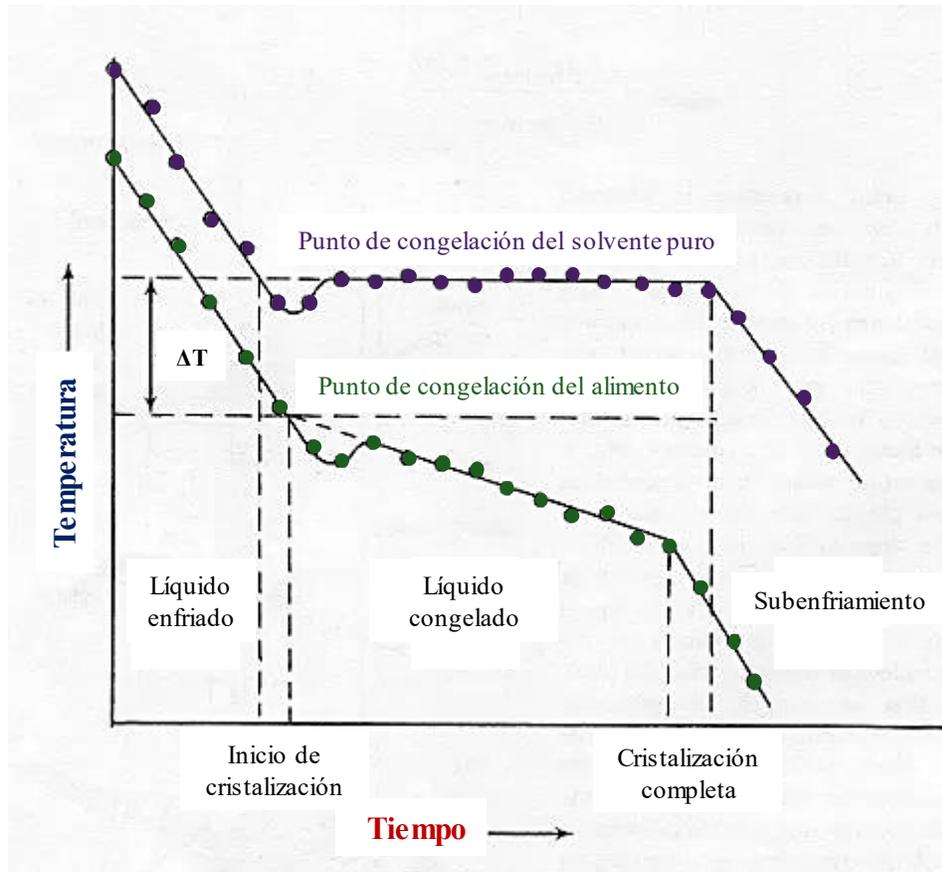


Figura 1. Curvas típicas de congelación y sus diferencias en agua y sistemas biológicos.

Fuente: <http://cwsimons.com/cold-preservation-of-foods-freezing/>

Un factor importante durante el proceso de congelación está definido por dos factores: (1) la velocidad de formación de los núcleos de cristalización y (2) la velocidad de crecimiento de los cristales de hielo. La formación de núcleos aumenta conforme disminuye la temperatura, es decir, la velocidad de congelación es directamente proporcional al número de cristales formados.

Es importante mencionar que, si los cristales de hielo se forman de manera lenta, es decir a baja velocidad, se producirá un número relativamente menor de centros de nucleación y por ende menor cantidad de cristales de hielo, pero de gran tamaño, caso contrario, con la congelación a mayor velocidad, se forma un gran número de núcleos, pero de tamaño pequeño (Rahman *et al.*, 2008).

La congelación rápida forma cristales de hielo intracelulares pequeños y uniformes (Figura 2), lo que lleva a una disminución del daño a las células musculares y su estructura, que se traduce en mejores características en la retención de agua, minimiza la oxidación de los lípidos, controla los procesos de desnaturalización proteica y la modificación en el color y textura, entre otros.

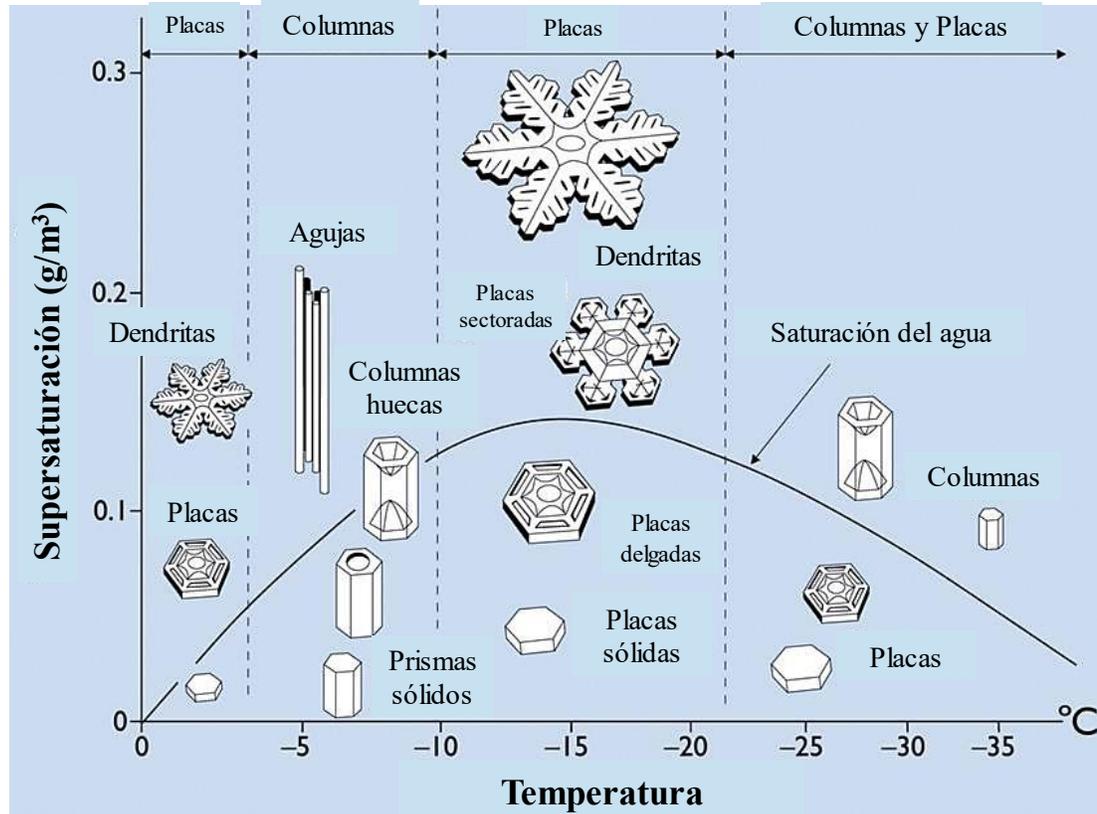


Figura 2. Diferentes tipos de cristales de hielo.

Fuente: <http://francis.naukas.com/2009/05/09/la-fisica-de-los-cristales-de-nieve/>

En general, la congelación rápida da como resultado la formación de cristales de hielo finos y de tamaño menor, que es útil para prevenir el daño al tejido muscular. El uso de líquidos criogénicos por inmersión, donde se utiliza un refrigerante líquido como medio de transferencia de calor, es una de las formas en la que se puede aumentar drásticamente la velocidad de congelación de los materiales, debido al alto coeficiente térmico de los medios líquidos (Zarkadas y Mitrakas, 1999; Ribero *et al.*, 2009).

El número y tamaño de los cristales de hielo formados influyen directamente en la textura de los materiales, en el caso de la congelación lenta, donde éstos son de dimensiones mayores afectan la dinámica fisicoquímica de los sistemas biológicos, ya que el agua dentro de los tejidos se encuentra tanto en el interior como el exterior de las células, en equilibrio osmótico entre ellas, caracterizado por el flujo de agua a través de la membrana. Por lo que, durante la congelación lenta, los primeros núcleos tenderán a formarse en el agua presente en los espacios intercelulares, lo cual se puede explicar por el efecto de barrera a la transferencia de calor que representa la membrana.

Al comenzar a cristalizar el agua extracelular alrededor de los núcleos, la solución líquida remanente concentra las sales naturales, disminuyendo su punto crioscópico y se vuelve más difícil de congelar. A su vez, al ser esta solución extracelular más concentrada que el líquido al interior, inicia un proceso de transferencia de masa para alcanzar nuevamente el equilibrio osmótico. Ello se traduce en la formación de un número pequeño de cristales de hielo de gran volumen y mayormente extracelulares. De esta forma, el líquido intra- y extracelular se va concentrando cada vez más y puede tener un efecto salino sobre las proteínas, las cuales llegan a desnaturalizarse y modifican su funcionalidad, con daño estructural en los tejidos (Ribero *et al.*, 2009).

El grado de deterioro en la calidad de la carne congelada – descongelada, se ve inicialmente influido por la velocidad de congelación. El tamaño, la distribución y la ubicación de los cristales de hielo es afectado por ésta (Leygonie *et al.*, 2012); normalmente a nivel industrial, la carne es conservada en cámaras de congelación por convección forzada de aire, método que es considerado como de “congelación lenta”.

El aire es el método más utilizado para congelar la carne, es económico, higiénico y se cuenta con equipos de fácil acceso. Los sistemas abarcan desde los más básicos en los que un ventilador extrae aire caliente y lo enfría a través de un sistema mecánico para regresarlo dentro de una habitación aislada, hasta túneles o espirales de congelación (Zarkadas y Mitrakas, 1999).

En los sistemas de congelación por aire se obtienen tasas relativamente bajas de transferencia de calor desde la superficie de los productos. La gran ventaja es su versatilidad, especialmente cuando existe la necesidad de congelar una variedad de productos de forma irregular o productos individuales. En un sistema continuo, la carne se transporta a través de un túnel de congelación o sala refrigerada, generalmente en un transportador aéreo o en un cinturón, eliminando el problema de la distribución desigual del aire, ya que cada elemento está sujeto al mismo perfil de velocidad/tiempo, implicando que lo que realmente genera cambios son las variables fisicoquímicas que deben ser consideradas durante el proceso de congelación, como la cantidad de solutos (Rahman *et al.*, 2008).

1.2.1 EFECTO DE LOS SOLUTOS EN EL PROCESO DE CONGELACIÓN

Es importante destacar que la carne, es un sistema multicomponente compuesto por agua, proteínas, lípidos, carbohidratos y minerales y se tiene que considerar que existen fenómenos fisicoquímicos importantes durante el proceso de congelación, los cuales involucran de manera estrecha un conjunto de propiedades que consideran el número de partículas presentes, independientemente de su naturaleza, conocidas como *propiedades coligativas*.

Una característica de las propiedades coligativas es la reducción del potencial químico (μ^*) del disolvente a consecuencia de la presencia del soluto y el equilibrio sólido-líquido produce una temperatura menor, dando origen al descenso del punto de congelación (Giannakourou, 2015).

El fundamento físico de la disminución de μ^* no se debe a la energía de interacción de las partículas del soluto y el disolvente, ya que éste fenómeno se produce incluso en soluciones ideales con entalpía de mezcla igual a cero, es decir, es un efecto directo de la entropía (S).

Para el caso de los alimentos, los cuales al ser sistemas multicomponentes y polidispersos, éstos poseen puntos iniciales de congelación (PIC'S) más bajos en comparación al PIC del agua pura (Figura 1), dando como resultado que cuando la presión de vapor del líquido (agua libre) sea igual a la presión de vapor del sólido (carne) se produzca el inicio de la cristalización.

El PIC de un material se puede describir como "la temperatura a la cual un cristal diminuto de hielo existe en equilibrio con el agua circundante del sistema". Sin embargo, antes de que se pueda formar un cristal de hielo, debe haber un núcleo de moléculas de agua. Por lo tanto, la nucleación precede a la formación de cristales de hielo. Hay dos tipos de nucleación: (1) la homogénea, donde existe una orientación aleatoria y la combinación de moléculas de agua y (2) la heterogénea, que es la formación de un núcleo alrededor de partículas suspendidas o en la membrana celular. Termodinámicamente, es más fácil para las moléculas de agua migrar a los núcleos ya existentes antes que formar nuevos, por lo que la nucleación heterogénea es más probable que ocurra en los alimentos (Giannakourou, 2015).

Todos los alimentos, al ser sistemas biológicos, poseen células, las cuales contienen solutos micro- y macromoléculares que afectan la forma en las que se congelan. En los tejidos animales, el agua es intra- y extracelular, los fluidos extracelulares tienen una menor concentración de solutos, por lo que los núcleos de hielo se forman ahí. A velocidades altas de transferencia de calor se producen un mayor número de núcleos y por consiguiente, la congelación es rápida y produce un gran número de cristales de hielo de menor tamaño (Kiani y Sun, 2011).

Un aumento en la concentración de solutos durante la congelación causa cambios en el pH, la viscosidad, la tensión superficial y el potencial *redox* del líquido no congelado. A medida que desciende la temperatura, los solutos individuales alcanzan el punto de saturación y cristalizan. La temperatura en la que existe un cristal de soluto en equilibrio con el líquido no congelado y el hielo es conocida como temperatura eutéctica. Sin embargo, es difícil identificar las temperaturas eutécticas individuales en la mezcla compleja de solutos en los alimentos y por lo tanto se usa el término "temperatura eutéctica final", que es la temperatura eutéctica más baja de los solutos en un sistema. Por ejemplo, para la carne se encuentra entre -50 y -60 °C (Reid y Fennema, 2007). La formación máxima de cristales de hielo no es posible hasta que se alcance esta temperatura, por lo que comercialmente los alimentos no se congelan a temperaturas tan bajas y por lo tanto, el agua no congelada siempre está presente.

1.3 NUEVAS TECNOLOGÍAS EN LA CONSERVACIÓN DE LA CARNE

Las nuevas tecnologías o tecnologías emergentes, han sido objeto de gran debate en la investigación académica y un tema central en las discusiones de políticas e iniciativas internacionales. La evidencia de la creciente atención que se está prestando al fenómeno de las tecnologías emergentes se puede encontrar en el elevado número de publicaciones que tratan sobre el tema y las noticias sobre éstas.

En general, se puede definir a una tecnología emergente como una tecnología nueva y de crecimiento relativamente rápido, caracterizada por un cierto grado de coherencia persistente a lo largo del tiempo y con la posibilidad de ejercer un considerable impacto; sin embargo, su impacto más prominente yace en el futuro, por lo que en la fase de emergencia sigue siendo algo incierto y ambiguo (Small *et al.*, 2014).

El procesamiento térmico tradicional de los alimentos todavía se considera el método más simple y efectivo para evitar el deterioro por causa microbiológica y reacciones autolíticas. Sin embargo, depende principalmente de la transferencia de calor por conducción y convección y tiende a ser demasiado limitado para garantizar la seguridad microbiana, lo que a menudo compromete la calidad del producto. El tratamiento térmico excesivo en los alimentos con frecuencia conduce a un elevado deterioro en los aspectos de calidad, como la textura, el color, el sabor y la destrucción de los compuestos bioactivos (Choi *et al.*, 2006).

Los productos mínimamente procesados, que conservan sus atributos de calidad sanitaria, sensorial y nutricional han recibido una gran atención por parte de los consumidores en los últimos años. Para satisfacer las crecientes demandas, la exploración de nuevas tecnologías para reemplazar los métodos convencionales se ha convertido en una necesidad. Como alternativas, se introdujeron e implementaron en la investigación e industria nuevas prácticas de procesamiento de alimentos, utilizando tecnologías emergentes (ultrasonido, aditivos, radiación, microondas, calentamiento óhmico y altas presiones). Las tecnologías emergentes en el procesamiento pueden coadyuvar a la obtención de mejores aspectos de calidad en periodos de tiempo más cortos y con menos gasto energético (Nguyen *et al.*, 2013), entre los que destacan el ultrasonido de alta potencia y la adición de agentes crioprotectores.

1.3.1 ULTRASONIDO (US)

El ultrasonido (US) consiste en una serie de ondas sónicas con altas frecuencias que comienzan desde los 16 kHz, cercanas al límite superior del intervalo de audición humana. Cuando una fuente determinada irradia sonido a un fluido que posee una masa determinada (medio de propagación), el sonido se propaga en ondas sinusoidales. El medio responde a la propagación de estas ondas y las sostiene vibrando elásticamente. Las vibraciones elásticas del medio toman dos formas: (1) condensación, donde las partículas del medio se comprimen lo que provoca que se aumente la presión y la densidad del medio y (2) rarefacción, donde las partículas del medio se separan para disminuir la densidad y la presión del fluido.

Es importante destacar que se tiene que explicar a profundidad el comportamiento de las ondas de US desde dos perspectivas, el tiempo y la distancia (Figura 3). En una posición fija en el medio de propagación, la onda de US se comporta sinusoidalmente con respecto al tiempo, el lapso de una amplitud máxima a otra, es el período de tiempo (τ). Físicamente significa que, cada partícula a cierta profundidad en el fluido (a lo largo de una línea equidistante) debe esperar el τ antes de experimentar otra onda de sonido igual a la última. La frecuencia sinusoidal (f) representa con qué periodicidad la senoide completa una oscilación (ciclado de pico a pico) en un segundo de duración y está matemáticamente dada por el inverso de τ (McClements, 1995; Knorr *et al.*, 2004).

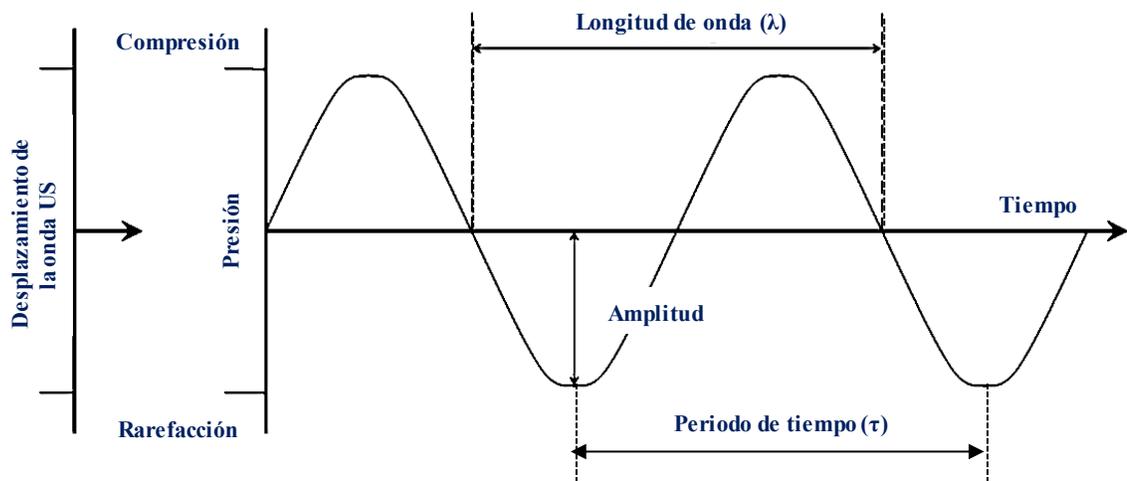


Figura 3. Esquema de la onda de ultrasonido a través del tiempo.

Fuente: McClements, 1995.

La distancia considera el efecto de la onda en cualquier instante fijo en el tiempo, en las partículas que son sucesivamente más profundas en el medio. En cualquier momento, la amplitud de la onda es más intensa en las partículas cerca de la fuente de la onda, pero las partículas más profundas en el medio experimentan la onda con menor fuerza. Esta disminución en la amplitud de la onda de sonido con la distancia se debe a la atenuación del medio. La distancia entre los picos de amplitud sucesivos es la longitud de onda (λ). La longitud de onda se relaciona con la frecuencia a través de la velocidad de la onda (c).

El US utilizado en el área de alimentos puede clasificarse en dos categorías: (1) de baja potencia (frecuencias mayores a 100 kHz), el cual se ha utilizado para evaluar las propiedades fisicoquímicas de los materiales, como la composición y la estructura y otros controles de calidad; y (2) de alta potencia (frecuencias entre 16 y 100 kHz), éste ha sido aplicado a un amplio espectro de condiciones, que incluyen procesos de sonocristalización, emulsificación, secado y congelación, inactivación de enzimas y modificación de propiedades funcionales tales como gelificación, viscosidad y solubilidad e inactivación de microorganismos (Arzeni *et al.*, 2012; Awad *et al.*, 2012).

Uno de los fenómenos durante la aplicación del US de alta potencia es el conocido como cavitación acústica, durante el cual se crean ondas longitudinales que causan áreas de compresión y expansión alternas. En el ciclo de expansión, crecen pequeñas burbujas en el medio de propagación debido a la reducción en la presión local por debajo de la presión de vapor del medio, lo que resulta en intensidades cambiantes. En la fase de compresión, el área de superficie de la burbuja se reduce. Cuando éstas aumentan de tamaño y tienen un área más grande, el medio de propagación no puede absorber todo el gas contenido en éstas y por lo tanto continúan creciendo. Cuando la energía suministrada por el US coincide con la fluidez de la pared de la burbuja, éstas se vuelven inestables e implosionan (Figura 4), generando áreas de alta temperatura (hasta 5000 °C) y alta presión (hasta 1000 atmósferas) (Awad *et al.*, 2012).

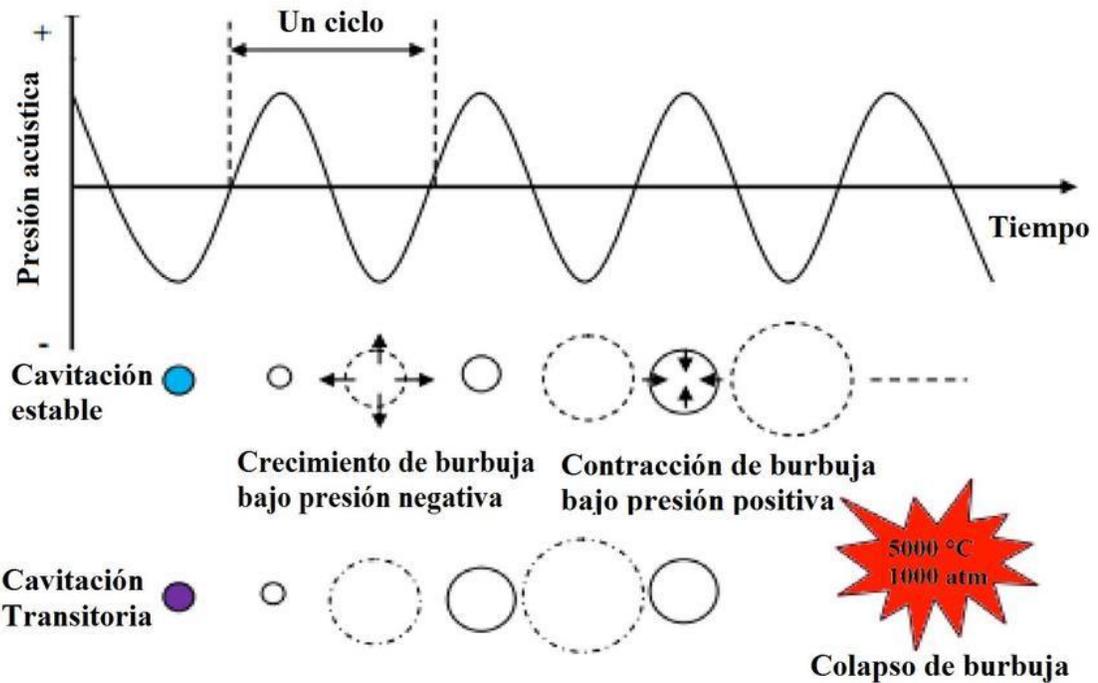


Figura 4. Mecanismos de cavitación en el ultrasonido.

Fuente: https://www.researchgate.net/figure/Cavitacion-inducida-por-ultrasonido-Chen-et-al-2015_fig7_317275062

Teóricamente existen dos fenómenos de cavitación, los cuales dependen de la actividad de las burbujas; ambas producen efectos muy diferentes en el medio de propagación e involucran un campo de sonido que impulsa a las burbujas hacia algún tipo de respuesta. Una respuesta que ocurre en ambos casos es el crecimiento de burbujas; en un proceso llamado difusión rectificadora, éstas aumentan de tamaño extrayendo más gas del líquido circundante a la burbuja. Las burbujas también disminuyen de tamaño al expulsar el gas al líquido. Las variaciones de presión en el medio determinan si el gas entra en la burbuja (cuando la presión del gas dentro de la burbuja es menor que la presión del líquido ambiente) o si se libera de la burbuja al líquido.

La primera, es la *cavitación inercial*, donde la dinámica de la burbuja está detrás de las actividades producidas en el alimento, por ejemplo, si se generan o no los radicales libres y en qué grado ocurre la erosión en los alimentos; sin embargo, no pueden controlarse. Este tipo se caracteriza por un crecimiento rápido, seguido de la alta velocidad de colapso o por

pulsaciones de gran amplitud en las que éstas se expanden y se contraen, colapsándose continuamente. Después de que una burbuja implosiona, ésta puede fragmentarse en partes más pequeñas o volver a crecer para sufrir más pulsaciones y/o colapsos. Debido a que las primeras observaciones de cavitación inercial implicaron sonoluminiscencia de burbujas que se fragmentaron después de algunos ciclos, el fenómeno se denominó cavitación transitoria.

El otro tipo de cavitación es conocida como *no inercial*, donde el campo de sonido hace que las burbujas aumenten de tamaño y luego se disuelvan o que pulsen entre un tamaño más pequeño y más grande durante muchos ciclos acústicos. Debido a que las burbujas nunca colapsan o se rompen en fragmentos, esta forma originalmente se denominó cavitación estable (Li *et al.*, 2004).

Entre las aplicaciones del US en la investigación en el área de los alimentos, se encuentra la capacidad de aumentar la difusión de soluciones al interior de las muestras. El fenómeno de la aceleración de la transferencia de masa mediante la aplicación de US en los sistemas alimenticios ha sido reportado y explicado por varios mecanismos. Estos incluyen la cavitación asimétrica cerca de la superficie sólida que genera microbombardeos en dirección de la superficie. Estos afectan la transferencia de masa al alterar la capa límite de las superficies tratadas con ultrasonido, generando un efecto esponja. Hasta ahora, el fenómeno de generación de *microjet* se ha utilizado para la inyección de salmuera en muestras de carne, lo que produce un aumento en las soluciones de humedad y sal (Lamminen *et al.*, 2004).

La carne es rica en proteínas, que son propensas a modificaciones por ultrasonido. Se ha demostrado que el tratamiento con US induce modificaciones estructurales de las proteínas que conducen a mejoras en sus propiedades funcionales, tales como la solubilidad, la emulsificación y la gelificación, la capacidad de retención de agua (CRA), el tamaño de partícula e hidrofobicidad, entre otras (Li *et al.*, 2004).

1.3.2 CRIOPROTECTORES

Los crioprotectores son compuestos que reducen la temperatura de congelación de los alimentos, modifican o suprimen el crecimiento de cristales de hielo e inhiben la recrystalización del agua durante el almacenamiento. Reducen el daño a las membranas

celulares y así protegen la textura de los alimentos y reducen la pérdida de nutrientes en pérdidas por goteo. Algunos ejemplos de crioprotectores incluyen azúcares, aminoácidos, polioles, metilaminas, biopolímeros de alto y bajo peso molecular y sales inorgánicas.

Por lo tanto, estos materiales se definen de manera funcional como compuestos que permiten un mayor grado de supervivencia y menor daño celular durante la congelación. Aunque el conocimiento del modo de acción todavía es incompleto, es probable que sus efectos sean multifactoriales, y los provenientes de diferentes clases puedan actuar por distintos mecanismos. Una de las primeras teorías del mecanismo de acción de los crioprotectores se desarrolló a partir de una serie de experimentos sobre la acción protectora del glicerol en las células; que se interpretaron como la penetración a la célula y a partir de las propiedades coligativas se reducía la cantidad de hielo formado a cualquier temperatura. Es decir, actúa como anticongelante debido a efectos osmóticos (Mazur, 2004).

La teoría de la crioprotección tiene dos atributos esenciales:

1. Los crioprotectores deben poder penetrar a la célula y unirse con electrolitos para aumentar la concentración durante la congelación o con moléculas de agua para retrasar el proceso, de lo contrario, favorecerán la deshidratación osmótica y causarán igual o mayor daño que el mismo proceso.
2. Los crioprotectores no deben ser tóxicos para la célula a las concentraciones requeridas para su eficacia. La toxicidad aparente depende del tipo y la concentración, el tiempo de equilibrio y la temperatura durante la aplicación. Es necesario determinar el punto de equilibrio entre la eficacia crioprotectora y la tolerancia a la toxicidad de las células a crioproteger (Mazur, 2004; Sakai, 2004).

Los crioprotectores se clasifican en dos grandes grupos, según su permeabilidad a través de la membrana. El primer grupo pertenece a las sustancias que poseen bajo peso molecular (penetrantes), los cuales protegen a las células de lesiones causadas por una congelación lenta; los más usados para ello son el glicerol y etilenglicol. Su función es remover el agua intracelular, reemplazándola por el crioprotector durante el enfriamiento, previniendo el

choque osmótico e interviniendo en la rehidratación intracelular con exudados durante la descongelación y estabilización de las membranas (Sakai, 2004).

El segundo grupo son los que se encuentran formados por sustancias de peso molecular alto (no permeables) que actúan extrayendo el agua libre intracelular utilizando el diferencial de presión osmótica, sin la necesidad de penetrar a la célula. Este tipo de materiales son útiles cuando se congela a velocidades rápidas, la sacarosa, la rafinosa y algunos polisacáridos son los más utilizados (Mazur, 2004).

En general, la mayoría de los crioprotectores pueden ser de distinta naturaleza, pero los que destacan para su uso en alimentos, son los de origen polimérico que son moléculas que contienen principalmente carbono.

1.4 POLÍMEROS

La palabra *polímero* se deriva del término griego *πολυς μέρος* para "muchas partes". Son moléculas grandes formadas por muchas unidades repetitivas, llamadas *monómeros* que se han unido químicamente en cadenas largas. Estos monómeros, son pequeñas unidades repetitivas que reaccionan químicamente (polimerización) para formar moléculas grandes. El arreglo estructural de estas moléculas puede ser lineal, ramificada o interconectada para formar redes tridimensionales (Ulery *et al.*, 2011).

Así mismo, se clasifican dependiendo de sus unidades monoméricas en dos grupos, (1) Homopolímeros, que son compuestos con un solo tipo de monómero el cual es repetitivo y (2) Heteropolímeros, compuestos de varios tipos de unidades monoméricas repetidas. Aun así, dentro de esta última categoría existe una variante más común, la cual es conocida como copolímero, que a menudo se forman a partir de una secuencia de dos o más tipos de unidades básicas, las cuales pueden ser agregadas a la cadena de diferentes maneras dependiendo de su reactividad, por lo que es posible producir moléculas con diferentes arquitecturas. Dependiendo de la disposición relativa de los componentes, los copolímeros se clasifican como de bloque, injerto y aleatorios.

Los polímeros pueden ser amorfos, semicristalinos y altamente cristalinos (Figura 5) dependiendo de las disposiciones de las cadenas. Un polímero es amorfo cuando las cadenas

existen como espirales aleatorias y sin un orden estructural definido. Mientras que uno es semicristalino, cuando una parte de las cadenas forma una estructura cristalina, por lo que se organizan de manera ordenada estructuralmente (Ulery *et al.*, 2011).

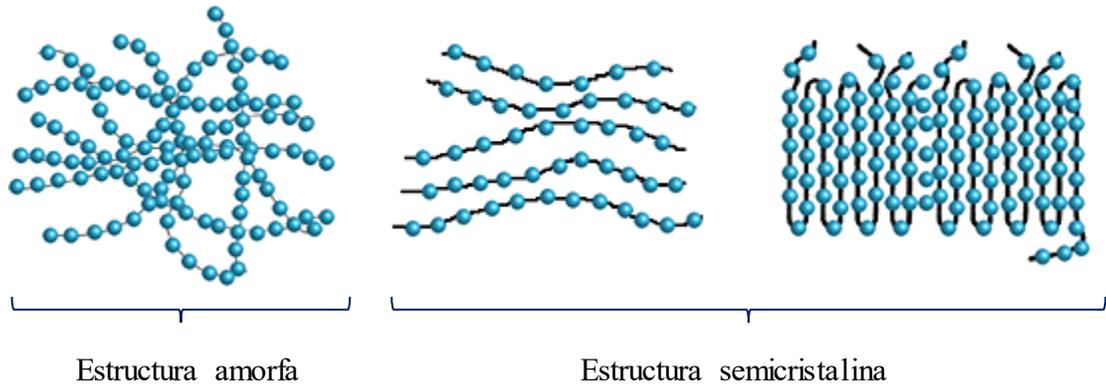


Figura 5. Arreglo estructural de los polímeros.

Fuente: <http://termoplas.blogspot.com/2012/10/termoplasticos.html>

1.4.1 PROPIEDADES DE LOS POLÍMEROS

La naturaleza, estructura y composición de los materiales brinda distintas funcionalidades y propiedades a los polímeros, entre las que destacan:

Propiedades térmicas

La comprensión de éstas es muy importante para el diseño de las condiciones de procesamiento y la selección de un material apropiado para las aplicaciones. Éstas incluyen sus transiciones, estabilidad, conductividad y coeficiente lineal de expansión.

Las transiciones térmicas importantes (Figura 6) son la temperatura de transición vítrea (T_g), la de cristalización (T_c) y la de fusión (T_f). A la T_g los polímeros se transforman de vítreos a un material gomoso y/o viceversa, donde la parte amorfa del polímero es responsable de esta transición. Las cadenas de polímero por debajo de la T_g están en estado congelado. A la temperatura de transición vítrea, los segmentos de la cadena de polímero adquieren movilidad (Drobny, 2012).

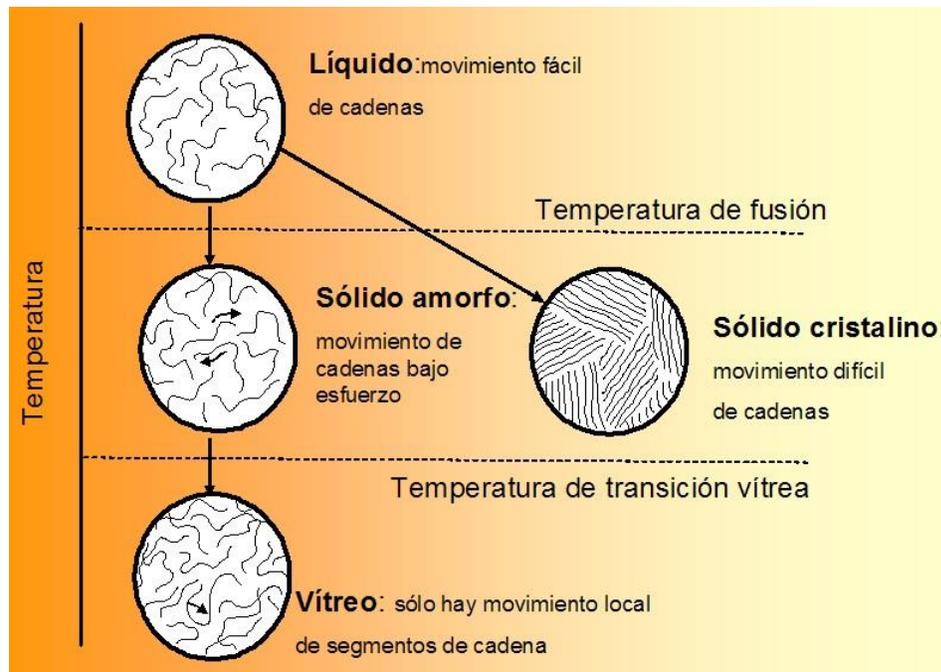


Figura 6. Transiciones térmicas de los polímeros.

Fuente: https://www.upv.es/materiales/Fcm/Fcm15/fcm15_4.html

La fusión es una propiedad de la parte cristalina de los polímeros. En la T_f , los dominios cristalinos en un polímero pierden su orden o colapsan y se transforman en un líquido (Figura 6). Los polímeros pueden ser amorfos, semicristalinos y altamente cristalinos, dependiendo de su estructura.

La cristalinidad de los materiales poliméricos se rige por la estructura, la historia térmica y el tipo de aditivo utilizado. Las características estructurales tales como las ramificaciones, la reticulación, la copolimerización y la estereoregularidad afectan la cristalinidad reduciéndola, mientras que esta última promueve la cristalización de polímeros. Aparte de esto, las secuencias poliméricas también pueden influir en la cristalización.

Los factores que afectan la T_g son los siguientes:

- Cadena principal: la estructura química influye directamente en su flexibilidad. Las cadenas flexibles ofrecen una baja T_g debido a la facilidad de rotación alrededor de sus enlaces. La presencia de grupos rígidos como anillos dificulta la rotación alrededor de la cadena principal y por lo tanto, da como resultado una T_g alta.

- Grupos laterales: las cadenas laterales tienen un efecto prominente sobre la T_g , especialmente en los polímeros de vinilo. Pueden restringir la rotación de macromoléculas y esto da como resultado una T_g alta. Este efecto es prominente en grupos voluminosos e inflexibles, pero los grupos laterales flexibles no tienen un efecto tan notable. No es necesario tener un incremento en T_g con la cantidad de cadenas laterales rígidas, esto se debe a la simetría existente en la molécula.
- Polaridad: esta es directamente proporcional a la T_g del polímero, esto se debe a que aumenta la fuerza de atracción intermolecular, que restringe la movilidad de la cadena.
- Peso molecular: la T_g aumenta con un incremento en el peso molecular hasta cierto punto. Esto se debe a que la movilidad es más alta en los extremos de la cadena en comparación con la de otras partes de la cadena. Las moléculas con un peso molecular más bajo tienen un mayor número de extremos de cadena (ramificaciones), lo que conduce a una T_g menor.
- Reticulación: La T_g aumenta con la reticulación debido a la restricción introducida a la movilidad de los segmentos de la cadena de polímero (Van Krevelen y Te Nijenhuis, 2009).

Propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas se pueden considerar como la respuesta de un material cuando está sujeto a diferentes condiciones de fuerza mecánica. Éstas son funciones de la temperatura para materiales normales, pero para materiales poliméricos, también dependen del tiempo. Esto se debe a que los polímeros son materiales viscoelásticos o muestran una posición intermedia entre líquidos viscosos y sólidos elásticos en su respuesta a cargas mecánicas. Un sólido elástico ideal obedece a la ley de Hooke, es decir, el estrés es proporcional a la tensión.

Los líquidos viscosos obedecen la ley de Newton donde el estrés aplicado o producido, es proporcional a la velocidad de deformación. El comportamiento mecánico de los polímeros se puede clasificar como propiedades mecánicas a corto, largo plazo y dinámicos.

Otra propiedad mecánica importante es la resistencia al impacto, que se puede definir como la capacidad de un material para resistir un golpe o una carga de impacto. Depende de la temperatura ya que a temperaturas inferiores a T_g , los polímeros son frágiles y la resistencia al impacto es baja.

Propiedades eléctricas

Los polímeros son una clase de materiales que exhibe un amplio espectro de propiedades eléctricas, la mayoría de ellos son aislantes, ya que algunos que poseen dobles enlaces conjugados se vuelven eléctricamente conductores por tratamiento con agentes oxidantes o reductores.

La conductividad de los polímeros aislantes se puede mejorar hasta cierto punto mediante la adición de cargas con nanotubos de carbono (Van Krevelen y Te Nijenhuis, 2009). Las respuestas del material a un campo eléctrico son importantes para sus aplicaciones. La polaridad juega un papel vital en la determinación de sus propiedades dieléctricas. Además de esto, la cristalización, la ramificación, la frecuencia del voltaje aplicado y la temperatura también afectan estas propiedades. La constante dieléctrica (capacidad del material para almacenar energía eléctrica) es una propiedad importante (Drobny, 2012).

Los polímeros pueden ser de origen natural o sintético, a continuación, se describen los polímeros utilizados durante este desarrollo experimental.

1.5 ALCOHOL POLIVINÍLICO (PVA)

Polímero sintético dispersable en agua también conocido como polietenol (Figura 7). A diferencia de muchos polímeros vinílicos, el PVA es uno de los polímeros formadores de gel más estudiados y es capaz de generar una gran variedad de geles de gran interés, utilizando varios tipos de disolventes y bajo una gran variedad de condiciones de preparación y/o procesamiento. Es un polímero atáctico (los sustituyentes se encuentran distribuidos

aleatoriamente a lo largo de la macromolécula semicristalina) obtenido por polimerización de radicales libres de acetato de vinilo y una sucesiva hidrólisis. La hidrólisis parcial del poli-acetato de vinilo (PVA_c) al no convertir todos los grupos acetato en grupos hidroxilo, da lugar a polímeros de PVA con un grado de hidrólisis parcial que depende de la duración de la reacción (Dobritroiu y Patachia, 2013).

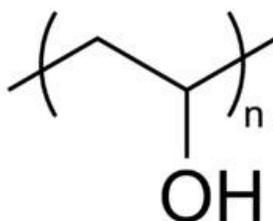


Figura 7. Monómero del alcohol polivinílico.

Fuente: Sigma-Aldrich, 2015

Sus propiedades están fuertemente influidas por el grado de hidrólisis, su solubilidad en agua depende del grado de hidrólisis y peso molecular. Cuanto mayor sea el grado de hidrólisis, menor será la solubilidad. La presencia de grupos acetato residuales en PVA parcialmente hidrolizado mejoran la solubilidad en agua mediante la interrupción de puentes de hidrógeno inter- e intra-catenarios del polímero entre los grupos hidroxilo y, en consecuencia, promueven las interacciones entre el polímero y disolvente. En los grados altamente hidrolizados, la solubilidad en agua disminuye debido a la formación sin obstáculos de cadenas de polímero-polímero y puentes de hidrógeno intra-catenarios entre los grupos hidroxilo, por lo que se impide el establecimiento de interacciones eficaces de cadenas de PVA – disolvente (Plieva *et al.*, 2008).

Su estructura cristalina fue reportada por Bunn (1948). Se caracteriza por las cadenas en una conformación trans-planar, embalado en una celda unidad monoclinica con un $a = 7.81 \text{ \AA}$, $b = 2.52 \text{ \AA}$ (eje de la cadena), $c = 5.51 \text{ \AA}$, y $\beta = 91.7^\circ$. La disposición de las cadenas dentro de los cristales puede ser descrita como un conjunto de capas dobles de cadenas planas paralelas b - c , acomodadas a lo largo del eje a . Estas capas dobles se definen por los puentes de hidrógeno que se establecen entre los grupos hidroxilo, pertenecientes a la primera cadena adyacente. Las capas dobles consecutivas establecen sólo interacciones débiles de Van der

Waals. El grado de estereoregularidad del PVA afecta significativamente la capacidad de cristalización y su arreglo atáctico facilita la cristalización en comparación a las moléculas isotácticas y sindotácticas (Silva *et al.*, 2008).

La temperatura de fusión oscila entre los 220 y 240 °C. La T_g es de 85 °C en los cristales y disminuye con la cantidad de agua adsorbida debido a los efectos de plastificación. Por ejemplo, la T_g de una dispersión que contiene 10% en peso de agua es de aproximadamente 37 °C.

La formación de geles a partir de dispersiones de PVA también puede ocurrir por alterar la calidad termodinámica del disolvente como resultado de la introducción de aditivos. Sin embargo, en todos los casos, los geles termorreversibles poseen bajas temperaturas de fusión ($T_f < 30-40$ °C), baja resistencia mecánica, y no son capaces de mantener su tamaño y dimensiones durante un largo tiempo (Agrawal y Awadhia, 2004).

Si bien, el PVA ha sido el más estudiado como criogel, sin duda existen polímeros de origen natural que funcionan con propiedades muy similares a éste cuando se someten a ciclos repetidos de congelación-descongelación, entre los que se encuentra la goma xantana, la cual ha sido reportada como estable molecularmente a bajas temperaturas.

1.6 GOMA XANTANA

Heteropolisacárido natural ramificado y sintetizado por diferentes especies de bacterias del género *Xanthomona*, principalmente la *campestris*, que produce la goma como una cobertura de protección, está formada por residuos de D-glucosa, D-manosa y ácido D-glucorónico (Figura 8) en una relación molar de 2.8:3.2, también contiene aproximadamente 4.7% de grupos acetilo y 3.5% de ácido pirúvico, su peso molecular es de alrededor de los 3,000 kDa (Dickenson, 2008).

Es una goma pseudoplástica, soluble en agua caliente o fría y forma dispersiones muy viscosas estables en un intervalo de pH de 1 a 9, así como a la presencia de diversas sales en el medio, produce dispersiones translúcidas aún a altas concentraciones, es resistente a la degradación enzimática, funciona como crioprotector, es compatible con otras gomas y presenta sinergia con los galactomananos (Tabla 1) (Dickenson, 2008).

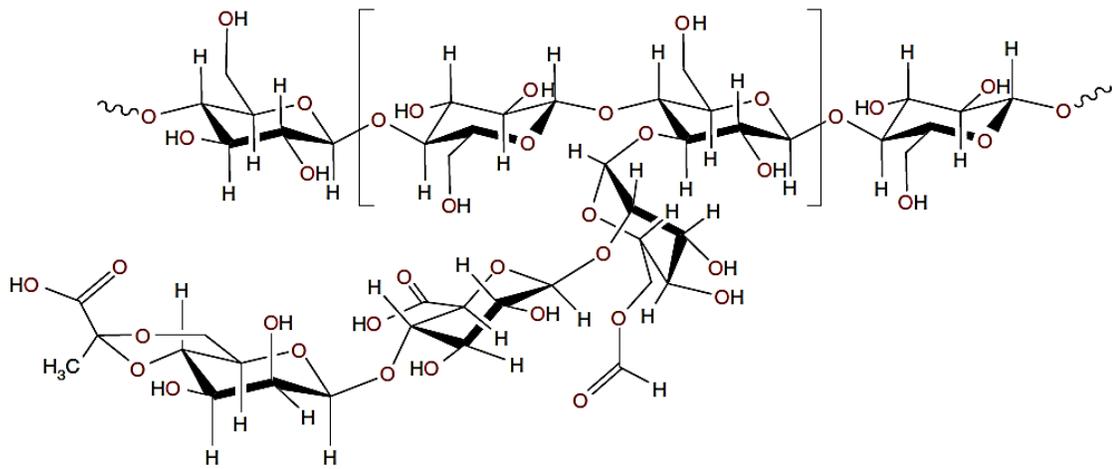


Figura 8. Estructura química de la goma xantana.

Fuente: Giannouli y Morris, 2003.

La funcionalidad de la goma depende de la correcta preparación de la dispersión. La mala preparación puede conducir a una mala funcionalidad en la aplicación final. Para obtener la mejor funcionalidad, la goma debe estar bien hidratada antes de su uso, la hidratación depende de cuatro factores importantes:

- Dispersión
- Velocidad de agitación del disolvente
- Composición química del disolvente
- Tamaño de partícula

Para hidratarla adecuadamente, las partículas de goma deben estar lo suficientemente dispersas. La mala dispersión conduce a la aglutinación de partículas durante la mezcla que resulta en la formación de grumos parcialmente hinchados de goma, su formación impide la completa hidratación y reduce la funcionalidad. Idealmente, se debe dispersar e hidratar bajo condiciones de mezcla de alto cizallamiento (Coviello y Burchard, 1992).

Tabla 1. Relación estructura-función de la goma xantana.

Características estructurales	Propiedades
Complejos agregados con fuerzas intermoleculares débiles	Alta viscosidad a bajas velocidades de cizalla (propiedades estabilizantes de suspensión) Alta viscosidad a bajas concentraciones Alto módulo elástico Reológicamente pseudoplástico
Conformación helicoidal rígida, complejos de hidrógeno unidos, carga aniónica en cadenas laterales	Insensibilidad de temperatura y compatibilidad con sal
Estructura principal protegida por grandes cadenas laterales superpuestas	Estabilidad a los ácidos, álcalis y enzimas

Fuente: Iseki et al., 2001.

El conocimiento actual de la estructura y la conformación de la xantana puede explicar muchas de las propiedades que posee en dispersión. La mayoría de las dispersiones de goma son altamente pseudoplásticas. Cuando se aumenta el esfuerzo de cizallamiento, la viscosidad se reduce progresivamente, pero después de retirar la cizalla, la viscosidad inicial se recupera casi instantáneamente. Este comportamiento resulta de la capacidad de las moléculas en dispersión, para formar agregados intermoleculares a través de entrecruzamientos de puentes de hidrógeno y polímero. Esta red altamente ordenada de moléculas rígidas da como resultado una alta viscosidad a bajas velocidades de cizalla. Estos agregados se rompen progresivamente bajo la influencia de cizallamiento, por lo tanto, las características de flujo muestran el efecto de la velocidad de cizalla más de once órdenes de magnitud en la viscosidad de una dispersión de 0.5% (Fernández *et al.*, 2007).

Las dispersiones de goma xantana son únicas en su capacidad para retener su viscosidad hasta que se alcanza una T_f definida. A esta temperatura, la viscosidad disminuye bruscamente debido al cambio reversible en la conformación molecular. A concentraciones aproximadas de hasta 0.3% en agua desionizada, la transición térmica se produce en torno a los 40 °C; sin embargo, en la presencia de bajos niveles de sal, la transición se produce a temperaturas superiores a 90 °C.

Este polisacárido brinda estabilidad, control de la sinéresis y viscosidad constante durante los ciclos de congelación - descongelación y calentamiento mediante la adición a una variedad de productos congelados tales como crema batida, salsas, batidos y comidas preparadas (Agoub *et al.*, 2007).

1.7 GOMA KARAYA

Es un exudado natural obtenido a partir de incisiones profundas hechas en el duramen de árboles grandes principalmente de la familia *Sterculia*, originarios de la India y Pakistán. La recolección de la goma se lleva a cabo rápidamente después de haber realizado las incisiones. El color es muy variable, desde incoloro a un color rosa oscuro-pardo que entre más pálido sea, la goma será de mejor calidad. Químicamente, es un gluco-ramno-galacturano, con unidades alternadas de la cadena principal de ácido α -D-galacturónico ligado en C₄ a α -L-ramnosa en la posición C₂ con un cambio producido en los grupos hidroxilo de ácido D-galactosa y D-glucurónico. La goma se emplea en las industrias de alimentos y textiles como un estabilizador y adhesivo. Entre las gomas de origen natural, la karaya (*Sterculia spp.*) es una de las más utilizadas en la actualidad y ocupa el segundo lugar en importancia comercial como aditivo alimentario sólo después de la goma acacia.

Se encuentra parcialmente acetilada en aproximadamente un 8%. Tiene aproximadamente el 37% de ácido urónico, un peso equivalente de 511 kDa, y un peso molecular de aproximadamente 9500 kDa. Y requiere para su dispersión iones auxiliares como sales de calcio y magnesio. Su hidrólisis produce D-galactosa, ácido D-glucurónico y L-ramnosa, unidades que pueden ser componentes de la cadena principal y varios fragmentos de oligosacáridos (Figura 9) de la molécula, tales como β -D-glucopiranosil-(1-3)- α -D-galactopiranosil-(1-2)-L-ramnosa (Figura 9a) y 2-O- α -D-glucopiranosil-L-ramnosa, 4-O-D-galactopiranosil-D-galactosa (Figura 9b) (Truesdell, 1974).

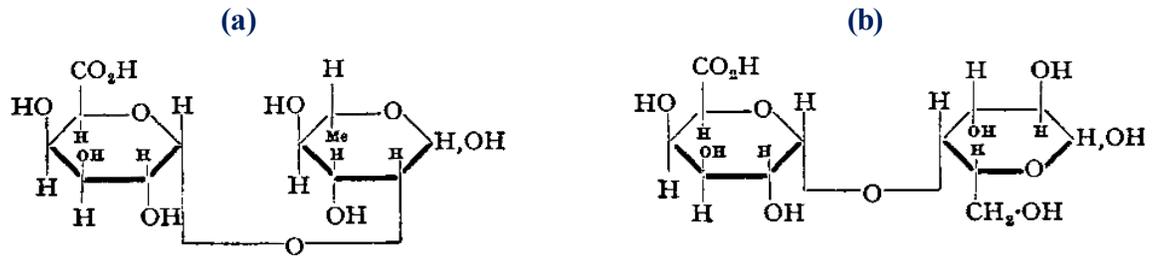


Figura 9. Fragmentos componentes de la goma karaya.

Fuente: Nakagawa y Nishimoto, 2011

Aunque es designada como una goma soluble en agua, es una de las que tiene menor capacidad de solubilidad. Las partículas en el agua no se disuelven, pero se hinchan ampliamente. La textura de la mezcla de goma con agua depende del tamaño de partícula. La goma absorbe el agua rápidamente para formar dispersiones viscosas a bajas concentraciones. Para conseguir dispersiones uniformes se puede realizar:

- Adición de la goma al agua con agitaciones vigorosas.
- Permitir la hidratación por más de dos horas.
- Dispersar la goma en agua mezclada con otro sólido, como la sacarosa.
- Preparación de pre-mezcla con la goma en una proporción de 1 a 5 veces su peso de un líquido miscible en agua, como etanol o glicerol, antes de la adición de agua.

La rapidez con que se hincha se aprecia en el elevado aumento de la viscosidad, las viscosidades normales van desde los 400 cP para una concentración de 0.5% a 10,000 cP para dispersiones de 3%. A valores de pH por encima de 8, las moléculas pierden sus grupos acetilo por saponificación rápida. La viscosidad de las dispersiones puede disminuir con la adición de electrolitos, no es sensible a los electrolitos débiles, pero cuando se añaden ciertas moléculas fuertes, incluso en pequeñas cantidades, se produce la pérdida de viscosidad; por lo tanto, se deben añadir sales sólo después de hidratar totalmente la goma. Cuando se secan las dispersiones, forman películas quebradizas que pueden ser plastificadas con glicerol (Nakagawa y Nishimoto, 2011).

Las dispersiones son tixotrópicas; es decir, las partículas hidratadas no son estables al cizallamiento mecánico y la agitación prolongada provoca disminución de la viscosidad. El

calentamiento en las dispersiones cambia la conformación del polímero y aumenta la solubilidad, pero resulta en una pérdida de viscosidad permanente. Las concentraciones máximas de 4 a 5% se pueden preparar mediante la hidratación en agua fría, pero cuando se calienta bajo presión, se obtienen dispersiones suaves, homogéneas, translúcidas y coloidales en concentraciones de hasta el 20% (Regand y Goff, 2003).

1.8 ALMIDÓN

Polisacárido natural obtenido de las plantas, sus principales componentes son dos polímeros: amilosa y amilopectina (Figura 10). La amilosa es predominantemente lineal, con unidades de D-glucopiranosil incorporadas por enlaces $\alpha,1\rightarrow4$. La amilosa se puede separar en un componente perfectamente lineal y ramificado. Su peso molecular varía con la fuente de obtención, pero es alrededor de 500 kDa. El número de puntos ramificados por molécula, para el componente ramificado, se ha estimado entre 2 y 8. La estructura de este componente ramificado es diferente a la amilopectina y para todos los fines prácticos, es apropiado pensar en la amilosa como un polímero lineal. El contenido de amilosa de la mayoría de los almidones nativos está en el intervalo del 15 al 30%, el polisacárido predominante es la amilopectina (Coria *et al.*, 2018).

La amilopectina es un polímero altamente ramificado compuesto por glucosa, los puntos de ramificación consisten en enlaces ($\alpha,1\rightarrow6$). Existe un debate continuo sobre el tamaño molecular y los valores informados varían entre 10^7 y 10^9 Da. Una de las razones de esta incertidumbre es que para medir el tamaño molecular se requiere la solubilización del gránulo (Tester *et al.*, 2004).

Estas dos macromoléculas están dispuestas en gránulos que tienen un tamaño que varía de 2 a 100 μm dependiendo del origen (maíz, papa) y el genotipo. Estos gránulos tienen un núcleo (hilio) del cual emana una estructura laminar alternativa amorfa y cristalina. Las cubiertas están constituidas por bloques que tienen un tamaño de 20 a 500 nm formados por grupos de amilopectina y amilosa. Los bloques son estructuras laminares alternadas de arreglos de amilopectina amorfa y cristalina (Leloup *et al.*, 1992).

En forma nativa, tanto la amilopectina como la amilosa tienen una estructura de doble hélice con enlaces de hidrógeno entre hélices, ya sea directamente o a través de las moléculas de agua en la celda unitaria.

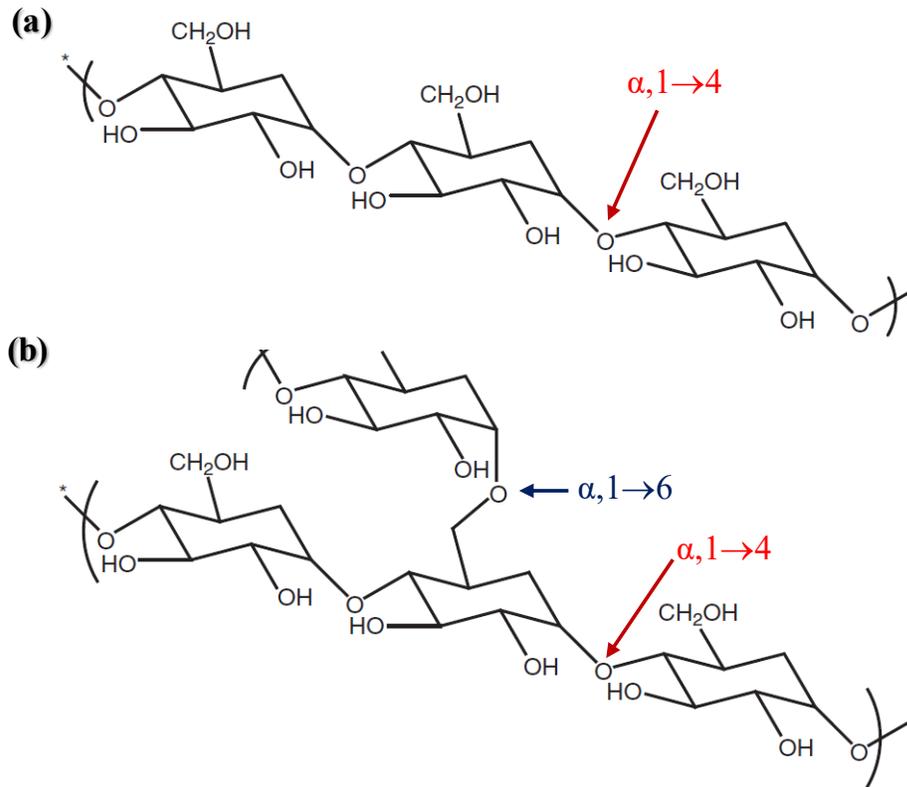


Figura 10. Fragmentos del almidón. (a) amilosa, (b) amilopectina.

Fuente: Tester et al., 2004

El uso principal de los hidrocoloides es como espesantes y agentes gelificantes; una suspensión de gránulos hinchados es estructuralmente diferente de una solución de polisacáridos como carboximetilcelulosa, pectina o guar. (Leloup *et al.*, 1992; Liu *et al.*, 2007).

La amilosa y la amilopectina se agrupan dentro del gránulo semicristalino con una cristalinidad total de aproximadamente 15-45%, dependiendo no solo de su origen sino también de las técnicas utilizadas para determinarlo. Las cadenas laterales cortas de amilopectina adoptan conformaciones de doble hélice y se asocian en grupos que forman

regiones ordenadas o "lamelas cristalinas", mientras que los puntos de ramificación constituyen las "lamelas amorfas" (Leloup *et al.*, 1992; Liu *et al.*, 2007).

1.8.1 ALMIDÓN CEROSO (WAXY)

El almidón ceroso consiste en un 98 a 100% de amilopectina, donde las ramificaciones forman dobles hélices que están dispuestas en una estructura agrupada conocida como región cristalina. Este tipo de almidones provienen de forma natural de semillas como la cebada, maíz, arroz y sorgo. Dentro de sus principales características, se encuentra que comienzan a espesarse a temperaturas bajas y experimentan menos retrogradación que las variedades no cerosas.

El almidón de maíz céreo, por ejemplo, no tiene las mismas propiedades de formación de gel que el almidón de maíz nativo debido a su estructura. La amilopectina, como la única parte del almidón céreo, forma geles muy débiles que también se desintegran aplicando cizallamiento. Los geles provenientes de almidones nativos tienen problemas de retrogradación por efectos de envejecimiento; esto implica un proceso de cristalización. Por lo tanto, la ausencia de amilosa en los almidones céreos previene la retrogradación y esta característica se utiliza para diversificar sus aplicaciones en los alimentos (Wang *et al.*, 2014; Zheng *et al.*, 2016).

En general, la mayoría de los polímeros al entrar en contacto con agua, generan una serie de interacciones físicoquímicas, que dan origen a sistemas conocidos como hidrogeles, los cuales son descritos a continuación.

1.9 HIDROGELES

Los geles hidrófilos llamados *hidrogeles*, son materiales que tienen una estructura tridimensional reticulada que absorbe grandes cantidades de agua sin disolverse; esta capacidad surge de los grupos funcionales afines al agua unidos a la cadena principal del polímero, mientras que su resistencia a la disolución surge de enlaces cruzados entre cadenas. El agua dentro del hidrogel permite la difusión libre de algunas moléculas de soluto, mientras que el polímero sirve como matriz para mantener el agua unida. Los hidrogeles son moléculas

de polímero individual, es decir, las cadenas de la red en el gel están conectadas entre sí para formar una gran molécula a escala macroscópica (Byrne *et al.*, 2002).

Debido a su alto contenido de agua, los hidrogeles poseen una excelente biocompatibilidad. Existe una amplia variedad de opciones de diseño para la preparación de hidrogeles de diferentes estructuras y propiedades. Éstos se mantienen unidos mediante distintos mecanismos físicos (Figura 11), como:

- Enlaces cruzados covalentes primarios.
- Fuerzas iónicas.
- Puentes de hidrógeno.
- Interacciones de afinidad o bioreconocimiento.
- Interacciones hidrofóbicas.
- Entrecruzamientos físicos de cadenas poliméricas individuales.
- Una combinación de dos o más de las interacciones anteriores (Hoffman, 2012).

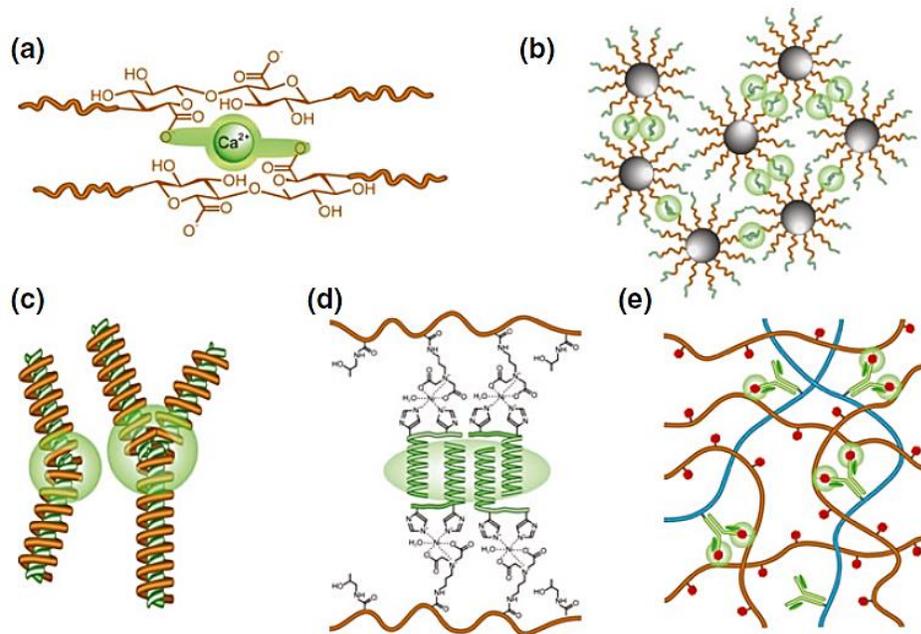


Figura 11. Mecanismos físicos de formación de hidrogeles. (a) Interacciones iónicas, (b) Interacciones hidrofóbicas, (c) Cruzados covalentes primarios, (d) Entrecruzamientos físicos, (e) Afinidad o bioreconocimiento.

Fuente: Hoffman, 2012.

Dentro de las ventajas que poseen los hidrogeles, se encuentran:

- El alto grado de flexibilidad similar a los tejidos naturales.
- Son biocompatibles, biodegradables y es por eso por lo que existen distintos métodos de aplicación, tales como la difusión equimolar, inyección o ultrasonido.
- Sus aplicaciones van desde la farmacia, la química, los alimentos o la industria textil.
- Fácil preparación y manipulación.

Los hidrogeles se clasifican dependiendo su método de preparación, carga iónica o características físicas de la estructura. Con base en el método de preparación, pueden ser de distintos tipos: (Byrne *et al.*, 2002)

- De homopolímeros, son aquellos donde las redes reticuladas son únicamente de un tipo de monómero hidrófilo.
- De copolímero, éstos se producen por entrecruzamiento de cadenas compuestas por dos unidades monoméricas distintas, donde al menos una debe ser hidrófila para hacerlas hinchables en agua.
- Poliméricos, se producen a partir de tres o más monómeros distintos que reaccionan entre sí.
- De red interpenetrante, éstos se producen por dos métodos, uno dentro de una red preformada y el otro en solución; el método más común es polimerizar un monómero dentro de una red de hidrogel reticulada diferente. El monómero se polimeriza para formar un polímero o una segunda red reticulada que está interconectada con la primera red.

Hay varias formas en que los hidrogeles pueden clasificarse. Los iónicos, con cargas en los polímeros de la cadena principal, se pueden clasificar según Navarro *et al.* (2008):

- Neutros.
- Aniónicos, que poseen cargas negativas solamente.
- Catiónicos, que tienen cargas positivas.

- Anfólicos, que tienen cargas positivas y negativas, los cuales pueden terminar con una carga neta negativa, positiva o neutra.

Con base en las características fisicoquímicas y estructurales de la red, los hidrogeles también se pueden clasificar como:

- Amorfos, los cuales tienen enlaces cruzados covalentes, donde las cadenas macromoleculares están dispuestas aleatoriamente.
- Semicristalinos, que pueden tener o no enlaces cruzados covalentes y se caracterizan por regiones autoensambladas de cadenas macromoleculares ordenadas (cristalitos) (Fujiwara *et al.*, 2010).

Los hidrogeles son capaces de responder a cambios drásticos en el comportamiento de hinchamiento (Tabla 2), estructura de la red, permeabilidad, resistencia mecánica, mediante distintos estímulos, los cuales se basan principalmente en las condiciones inherentes de los sistemas.

Los avances recientes en el desarrollo de los hidrogeles para diversas aplicaciones se han concentrado en varios aspectos de su preparación, caracterización y comportamiento. Los principales cuestionamientos rondan en:

- Métodos sintéticos de preparación de polímeros hidrofílicos con grupos funcionales deseables.
- Métodos sintéticos de preparación de estructuras multifuncionales o multimodales, incluidos los copolímeros ramificados o injertados y polímeros en estrella.
- Comprensión de la criticidad y el comportamiento de hinchamiento/sinéresis de nuevos polímeros.
- Desarrollo de polímeros ultrapuros, tales como geles reticulados producidos por congelación-descongelación de soluciones acuosas.
- Síntesis y caracterización de hidrogeles biomiméticos.
- Comprensión del comportamiento de relajación durante la hinchazón dinámica.

- Modelado de cualquier disolución o biodegradación asociada (Byrne *et al.*, 2002; Fujiwara *et al.*, 2010).

Tabla 2. Estímulos a los que reaccionan los hidrogeles.

Estímulo	Respuesta	Mecanismo
pH	Estimula o inhibe las reacciones o los procesos de reconocimiento	Cuando hay un cambio en el pH del medio, ocurren variaciones en el hinchamiento por ionización del polímero. Los ΔT producen cambios en las interacciones polímero-polímero y polímero-agua y a su vez provocan modificaciones estructurales.
Temperatura	Separación de fases, reacomodo de las interacciones	Los compuestos forman complejos de carga de transferencia que producen cambios micro y macroestructurales.
Agentes químicos	Forma (hinchamiento – deshinchamiento)	Las variaciones en la fuerza iónica producen cambios en la concentración de iones dentro del gel en el hinchamiento.
Fuerza iónica	Forma (hidrofobia e hidrofilia)	Cuando se aplica un campo magnético cambia la porosidad, así como el hinchamiento y la liberación
Campo eléctrico y radiaciones electromagnéticas	Permeabilidad (aumento o disminución) y óptica (transparencia u opacidad)	

Los hidrogeles al ser sometidos a una serie de procesos controlados de congelación-descongelación, modifican sus interacciones inter- e intramoleculares dando origen a lo que se conoce como “criogeles”.

1.10 CRIOGELES

La gelificación criotrópica, derivada del griego *kryos* (hielo) y *tropos* (causa), es la formación de geles por tratamientos a bajas temperaturas (congelación-descongelación) de polímeros precursores. La cristalización del disolvente en este proceso actúa como un precedente que permite los fenómenos de gelificación subsecuentes.

Los criogeles son una clase emergente de biomateriales, que recientemente han llamado la atención, ya que poseen muchas aplicaciones en diferentes áreas de la investigación. Actualmente, los criogeles pueden ser definidos en la literatura científica como: (1) sistema coloidal formado durante la crioprecipitación del plasma sanguíneo al enfriarse aproximadamente a 4 °C; (2) sistemas poliméricos e inorgánicos producidos por tecnología sol-gel y posteriormente liofilizados. Así, se han obtenido una serie de polvos de óxidos inorgánicos individuales y mixtos, polímeros y carbonos (por carbonización) y (3) materiales poliméricos sintéticos y naturales producidos en un disolvente congelado, usualmente agua (Figura 12).

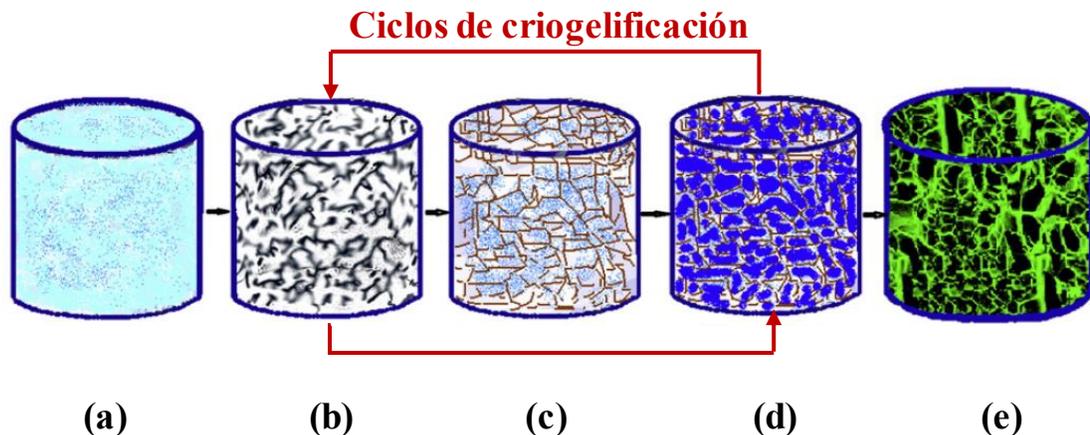


Figura 12. Mecanismos de formación de criogeles. (a) hidrogel, (b) congelación, (c) criogelificación, (d) descongelación, (e) criogel formado.

Fuente: Lozinsky et al., 1997

Los criogeles de interés para este trabajo son los pertenecientes a la tercera categoría, son materiales que se obtienen por la gelificación criotrópica de precursores mono o poliméricos. Este tipo de geles se pueden obtener a través de la formación de redes homogéneas o heterogéneas tanto física como covalentemente reticuladas. A muy bajas temperaturas, la mayor parte del disolvente se congela, mientras se deja descongelar parte de éste (microfase líquida no congelada) las sustancias disueltas se concentran y experimentan reacciones químicas que conducen a la formación del sistema gel y los cristales de disolvente congelado actúan como redes de aberturas interconectadas dentro del sistema, que dan la posibilidad de controlar el tamaño del poro y generar resistencia mecánica (Regand y Goff, 2003; Gun'ko *et al.*, 2013; Ciolacu *et al.*, 2016).

Los criogeles se producen con una amplia variedad de morfologías y propiedades, que pueden adaptarse para una aplicación particular. Son materiales heterofásicos, no transparentes y porosos con macroporos (1 a 150 μm). Sus propiedades dependen de la estructura del poro (tamaño, distribución e interconectividad), el grosor de la pared de los poros y la densidad, expresada como la concentración del polímero en las paredes del poro hinchado. El tamaño define el volumen de poro total y junto con la interconectividad, se controla el transporte de masa en el gel. El grosor y la densidad de la pared porosa determinan las propiedades mecánicas macroscópicas del criogel (Coria *et al.*, 2018).

Los criogeles producidos a partir de polímeros inteligentes cambian significativamente su grado de hinchazón después de modificaciones pequeñas en algunos factores ambientales, como la temperatura, el pH o soluciones con diferentes fuerzas iónicas. El tiempo de respuesta de los criogeles es más rápido que el de los hidrogeles ordinarios de la misma composición química, debido a la rápida transferencia de masa y calor a través de las distancias cortas en las paredes delgadas de la estructura macroporosa en comparación con largas distancias en los polímeros.

Uno de los objetivos principales de los criogeles, son la manipulación de los efectos de las bajas temperaturas sobre los sistemas celulares y la utilización de este conocimiento para el desarrollo de protocolos alternos y mejorados. La concentración intra- y extracelular de solutos, la constitución de solutos permeables e impermeables y la velocidad de congelación-

descongelación, son los tres parámetros que ayudan a controlar las condiciones fisicoquímicas de la aplicación de los criogeles (Morris y Acton, 2013; Ciolacu *et al.*, 2016).

Consecuentemente el presente trabajo de investigación fue estudiar a tres diferentes polímeros con posible acción crioprotectora, eligiendo el que presentó las características más adecuadas para su aplicación con US en carne de cerdo, sometida a congelación-descongelación en cámara y determinar si existió una reducción del tamaño y número de los cristales de hielo, minimizando los daños provocados por la cristalización del agua para que se refleje en características de calidad.

CAPÍTULO 2

METODOLOGÍA

EXPERIMENTAL

“La tarea del ojo derecho es mirar dentro del telescopio, mientras que el ojo izquierdo mira dentro del microscopio”. Leonora Carrington (Memorias de abajo)

2.1 OBJETIVO GENERAL

Desarrollar y caracterizar diversos criogeles aplicados con ultrasonido para controlar el tamaño y el número de cristales de hielo durante la congelación lenta de la carne de cerdo (*Longissimus thoracis*) y así preservar algunos atributos de calidad.

2.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Desarrollar sistemas poliméricos a partir de tres moléculas distintas sometidos a ciclos de congelación-descongelación, con características funcionales, de compatibilidad y capacidad crioprotectora para ser usados como posibles criogeles.
2. Caracterizar los hidro- y los criogeles mediante diversos análisis químicos, estructurales y termodinámicos para determinar los cambios generados por efectos de los ciclos controlados de congelación-descongelación.
3. Seleccionar el criogel que presente las mejores condiciones de arreglo estructural, control de tamaño de poros y compatibilidad para su posterior aplicación en la carne de cerdo empleando ultrasonido.
4. Evaluar los efectos termodinámicos, de fuerza de corte, perfil de color, daño estructural y de formación-ruptura de interacciones, durante la aplicación del criogel en la carne de cerdo sometida a congelación lenta en cámara.

2.3 HIPÓTESIS

Si el polímero aplicado con ultrasonido y utilizado durante la congelación con circulación de aire forzado es compatible, termosensible y favorece la formación de micro- y macroporosidades dentro de la matriz cárnica, se controlará el crecimiento de los cristales de hielo intra- y extracelulares, reduciendo significativamente su tamaño, lo cual se verá reflejado en un menor daño estructural de la carne de cerdo sometida a este proceso de conservación.

2.4 ACTIVIDADES PRELIMINARES

2.4.1 ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA CARNE

Se realizó el análisis químico de la carne fresca para asegurar condiciones homogéneas de la materia prima, para la determinación de *humedad* (AOAC, 2000, Método 986.21) de la muestra se siguió el método de destilación azeotrópica (conocida como Destilación Dean Stark).

Para la determinación de las *cenizas totales*, se utilizó la metodología de incineración directa (AOAC, 2000, Método 990.08) la cual se basa en el residuo inorgánico (minerales) que queda después de incinerar la materia orgánica. Para la cuantificación de los *lípidos* se llevó a cabo la metodología de extracción por solubilización de Werner-Schmidt (AOAC, 2000, Método 960.39). Para la cuantificación de *proteínas* se llevó a cabo el método micro Kjeldahl (AOAC, 2000, Método 977.14) que permite determinar el nitrógeno proteico.

2.4.2 PREPARACIÓN DE LOS HIDROGELES

Las metodologías para la elaboración de los diferentes hidrogeles se llevaron a cabo dependiendo del peso molecular, pureza, naturaleza y propiedades funcionales, en la Tabla 3 se indican las concentraciones utilizadas para cada uno de ellos.

Tabla 3. Concentraciones de biopolímeros utilizadas para la formación de los hidrogeles.

Biopolímero	Concentración (% m/v)
Alcohol polivinílico (testigo)	2.5
Xantana	0.5
Karaya	0.5
Almidón waxy	3.0

Para el Alcohol polivinílico (PVA) (Sigma-Aldrich, CAS 9002-89-5, 146-186 kDa, 99% hidrolizado en cristal) se realizó el protocolo de preparación de Patachia *et al.* (2011), dispersándolo en agua durante 4 h a 80 °C con agitación magnética. La goma xantana (Sigma-Aldrich, CAS 11138-66-2, *Xanthomonas campestris*) y karaya (Sigma-Aldrich, CAS 9000-36-6, *Sterculia tree*) fueron dispersadas con agitación magnética de acuerdo con lo descrito

por Giannouli y Morris (2003) en agua por 2 h a 40 °C. El almidón de maíz waxy (Firm-Tex, Ingredion, México, 100% amilopectina) se dispersó en agua con agitación magnética por 2 h a 70 °C.

2.4.3 FORMACIÓN DE LOS CRIOGELES

La preparación de los criogeles se llevó a cabo por congelación mediante los protocolos descritos por Lozinsky (2002), Giannouli y Morris (2003) y Matejtschuk, (2007). Los hidrogeles se congelaron criogénicamente por inmersión en nitrógeno líquido hasta -150 ± 3 °C durante 10 min y descongelaron por inmersión en agua a 50 ± 5 °C durante 30 min hasta completar 4 ciclos.

2.5 ETAPA 1. CARACTERIZACIÓN DE LOS HIDRO- Y LOS CRIOGELES

2.5.1 CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO MODULADA (MDSC)

Las muestras se analizaron usando un calorímetro diferencial de barrido con modulación de temperatura TA Instruments 2920 (New Castle DE, EUA). El enfriamiento se llevó a cabo usando un sistema RCS (*Refrigerated Cooling System*) utilizando nitrógeno como gas de purga a un flujo constante de 60 mL/min. Las calibraciones de constante de celda, constante de Cp y línea base se realizaron con Indio (temperatura de fusión de 156.6 °C) y zafiro (óxido de aluminio) (TA Instruments, 2012). El software de análisis que se utilizó para registrar y analizar todos los termogramas fue TA Universal Analysis (2000 V 4.5A) (Cassel y Packer, 2010). Las muestras (4.5 ± 0.42 mg) fueron colocadas en charolas de aluminio selladas herméticamente y se analizaron por triplicado de acuerdo con el siguiente método (Coria *et al.*, 2018):

- Equilibrado a -50.0 °C.
- Modulado a ± 0.79 °C cada 60 s.
- Isotherma por 5 min.
- Rampa de 5.0 °C/min hasta 150.0 °C.

2.5.2 GRADO DE ORDEN ESTRUCTURAL

El grado de orden estructural de las dispersiones poliméricas se determinó de acuerdo con la metodología descrita por Patel *et al.* (2014), a partir de los valores de entalpía de fusión de los hidro- y criogeles con la siguiente ecuación:

$$X_c = \frac{\Delta H_f}{\Delta H^0} \quad (1)$$

Donde X_c es la fracción ordenada del polímero; ΔH_f es la entalpía de fusión de la dispersión polimérica (J/g) y ΔH^0 es la entalpía de fusión del polímero 100% cristalino (J/g).

2.5.3 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)

El análisis estructural se realizó con un microscopio Jeol JSM-6010LA (Tokio, Japón). Las muestras fueron liofilizadas para posteriormente ser recubiertas con una capa de oro utilizando un pulverizador iónico Denton Vacuum Desk V (Moorestown, NJ, USA) a 10 mA por 5 min. El análisis se realizó a 900× con un voltaje de aceleración de 7 kV al alto vacío (Aikawa *et al.*, 1998; Aouada *et al.*, 2005; El-Fray *et al.*, 2007; Coria *et al.*, 2018).

2.5.4 REOLOGÍA ROTACIONAL

Las propiedades reológicas de los hidro- y criogeles se determinaron con un viscosímetro rotacional Rheomat RM180, Mapple Instruments (Toronto, Canadá) a 25 ± 1.5 °C, utilizando como geometrías dos cilindros concéntricos de 24 mm de diámetro interno y 26.03 mm de diámetro externo, en un intervalo de velocidades de 99 a 1291 s⁻¹ (Tecante y Doublier, 1999; Coria *et al.*, 2018).

2.5.5 ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO CON TRANSFORMADA DE FOURIER CON EL ADITAMENTO REFLECTANCIA DIFUSA (FTIR-RD)

Los grupos funcionales en las muestras se caracterizaron usando un espectrofotómetro FTIR Frontier SP8000, Perkin Elmer (Waltham, MA, EUA) equipado con un detector de sulfato de triglicina deuterado (DTGS) y controlado con el software Spectrum 10.4.2. Las muestras liofilizadas (<250 μm) se colocaron en el soporte para reflectancia difusa (RD) y los espectros se obtuvieron en un intervalo de número de onda desde 400 hasta 4000 cm⁻¹ a una resolución

de 4 cm⁻¹ utilizando 32 escaneos. Se obtuvo un espectro de fondo contra el aire todos los días durante el experimento. Los espectros de los hidro- y criogeles se adquirieron en modo de transmitancia relativa por cuadruplicado y se utilizó el valor promedio (Coria *et al.*, 2018).

2.6 ETAPA 2. CARACTERIZACIÓN DE LA CARNE DE CERDO CON EL CRIOGEL

Se trabajó con carne de cerdos machos castrados de 6 meses de edad raza Pietrain, con un peso aproximado de 100 ± 5 kg y 24 h *post-mortem*. Los animales fueron sacrificados en condiciones homogéneas en un rastro Tipo Inspección Federal (TIF) del municipio de Cuautitlán Izcalli, Estado de México y, la carne fue mantenida en cámara de refrigeración por 6 h a 4 ± 2 °C. El promedio del peso de los lomos fue de 3.7 ± 0.3 kg. Se utilizó el músculo *Longissimus thoracis*, se llevó a cabo el corte de las unidades experimentales en placas de aproximadamente 5×5×1.5 cm para facilitar la transferencia de materia (difusión del criogel a la carne) y energía (congelación) al interior de las muestras (Meléndez *et al.*, 2011; Coria *et al.*, 2017). La carne fue envasada al vacío (10 ± 2 mBar) en un equipo Inauen Maschinen CH-9100 (Suiza) con películas de nylon *Sealed Air Cryovac*, fabricado de material laminado bajo proceso de co-extrusión como barrera a la transmisión de oxígeno de 3 cm³ (23 °C y 0% HR) y al vapor de agua a 4 g (38 °C y 98% HR).

La difusión del criogel al interior de la matriz cárnica fue llevada a cabo por medio de ultrasonido[‡]. La congelación de las muestras fue llevada a cabo en una cámara de convección forzada Torrey (México). La descongelación se llevó a cabo en una cámara de refrigeración Frigidaire (FL, USA) a 4 ± 1 °C por 6 h.

[‡]Las condiciones de aplicación y congelación de las muestras cárnicas están descritas en la patente con número de registro **MX/a/2017/014304** “Uso de criogeles con difusión asistida por ultrasonido para limitar el crecimiento de cristales de hielo en la congelación de alimentos” (Anexo C).

2.6.1 ACTIVIDAD DE AGUA (A_w)

Se determinó con un higrómetro de punto de rocío Aqualab 4TE (WA, USA), calibrado a dos puntos con LiCl 13.41 M ($A_w = 0.250$) y con KCl 0.5 M ($A_w = 0.984$). Las muestras fueron colocadas en las celdas a 25 ± 1.5 °C siguiendo la metodología descrita por Chirife y Ferro-Fontán, 1982.

2.6.2 POTENCIAL DE HIDRÓGENO (PH)

Se determinó con un potenciómetro para carne HI99163, Hanna Instruments (RI, USA) acoplado a una cuchilla de acero inoxidable y calibrado a tres puntos con soluciones estándar a valores de 4.01, 7.01 y 10.01, de acuerdo con Nair *et al.* (2014).

2.6.3 CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO MODULADA (MDSC)

Se utilizó un calorímetro MDSC TA Instruments 2920 (New Castle DE, EUA) calibrado bajo las mismas condiciones y con los mismos aditamentos que en la etapa 1 de la caracterización de los hidro- y criogeles. Para el caso de las muestras (12.5 ± 0.2 mg), éstas fueron colocadas en charolas de aluminio selladas herméticamente y se analizaron por triplicado de acuerdo con el siguiente método (Coria *et al.*, 2017):

- Equilibrado a -50.0 °C.
- Modulado a ± 0.79 °C cada 60 s.
- Isotherma por 5 min.
- Rampa de 5.0 °C/min hasta 150.0 °C.

2.6.4 PERFIL DE COLOR

Se determinaron los parámetros de perfil de color (L^* , a^* , b^* , croma, ángulo hue y cambios totales de color) en sistema CIELab y la curva de reflectancia-absorbancia de luz de acuerdo con el protocolo descrito por la *American Meat Science Association* (AMSA, 2012), utilizando un espectrofotómetro CM-600d Konica Minolta (Tokio, Japón) con iluminante acoplado tipo “A”, tamaño de apertura de esfera de 8 mm, ángulo de observación de 10°, tiempo de prueba de 1 minuto por muestra después de la apertura de los envases. Los datos obtenidos fueron tratados en el software colector Spectra Magic NX.

2.6.5 FRACCIÓN DE MIOGLOBINA SUPERFICIAL

Para realizar las determinaciones de las fracciones de mioglobina en la superficie de las muestras correspondientes a cada tratamiento se utilizó la metodología descrita por Tang *et al.* (2004), donde se involucran los valores de absorbancia a 503, 525, 557 y 582 nm, los cuales se sustituyen en las siguientes ecuaciones:

$$\text{Desoximioglobina} = -0.543R_1 + 1.594R_2 + 0.552R_3 - 1.329 \quad (2)$$

$$\text{Oximioglobina} = 0.722R_1 - 1.432R_2 - 1.659R_3 + 2.599 \quad (3)$$

$$\text{Metamioglobina} = -0.159R_1 - 0.085R_2 + 1.262R_3 - 0.520 \quad (4)$$

$$R_1 = \frac{A_{582}}{A_{525}} \quad (5)$$

$$R_2 = \frac{A_{557}}{A_{525}} \quad (6)$$

$$R_3 = \frac{A_{503}}{A_{525}} \quad (7)$$

2.6.6 ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO CON TRANSFORMADA DE FOURIER CON EL ADITAMENTO REFLECTANCIA TOTAL ATENUADA (FTIR-ATR)

Los grupos funcionales en las muestras de carne fresca, descongelada y con criogel se caracterizaron usando un espectrofotómetro FTIR Frontier SP8000, Perkin Elmer (Waltham, MA, EUA) equipado con un detector de sulfato de triglicina deuterado (DTGS) y controlado con el software Spectrum 10.4.2. Las muestras liofilizadas (<250 µm) se colocaron en el aditamento de diamante para reflectancia total atenuada (ATR) y los espectros se obtuvieron en un intervalo de número de onda desde 400 hasta 4000 cm⁻¹ a una resolución de 4 cm⁻¹ mediante 32 escaneos. Los espectros se adquirieron en modo de transmitancia relativa por cuadruplicado y se utilizó el valor promedio (Mansur *et al.*, 2004; Prieto *et al.*, 2009).

2.6.7 ANÁLISIS DE FUERZA DE CORTE

Se siguió la metodología descrita por la AMSA (1995), utilizando un texturómetro Brookfield CT3 (USA) acoplado con dispositivo de hojas de cizalla a velocidad de prueba de 1 mm/s por 20 s y con carga de activación de 0.125 gf.

2.7 DISEÑO EXPERIMENTAL

Para el caso de la etapa 1 del proyecto, el diseño experimental que se manejó se encuentra descrito en la Tabla 4.

Tabla 4. Actividades para caracterizar las dispersiones de los hidro- y los criogeles.

Unidad experimental	Dispersiones poliméricas			
Tratamiento	Hidro- y criogel de 1 hasta 4 ciclos			
Niveles de variación	Sin ciclo y hasta 4 ciclos de criogelificación			
Repeticiones	5			
Réplicas	3			
Técnica experimental	Reología	Calorimetría MDSC	Microscopía SEM	Espectroscopia FTIR-RD
Variable independiente	Velocidad de cizalla, Geometría	Masa, Modulación, Intervalo de temperatura, Isotherma, Velocidad de calentamiento y/o enfriamiento	Profundidad de campo, ionización	Número de onda
Variable dependiente	Esfuerzo de cizalla	Cp, Flujo de calor total, reversible, no reversible, Entalpía	Tamaño de poro	% Transmitancia relativa
Variable de respuesta	Viscosidad, Comportamiento reológico, Índice de comportamiento al flujo y de consistencia	Transiciones de fase, grado de ordenamiento estructural	Ordenamiento estructural, Reducción de tamaño	Polimerización, Interacción química de polímero-agua

En la Tabla 5 se describe el diseño de experimentos que se realizó con la carne fresca, congelada-descongelada y con criogel, para así poder determinar los efectos tanto a nivel estructural⁹ como en algunos aspectos de calidad durante la aplicación en el sistema.

Tabla 5. Actividades para caracterizar las muestras de carne analizadas.

Unidad experimental	Placas de carne con y sin criogel				
Tratamiento	Carne fresca, carne congelada-descongelada, carne con criogel congelada-descongelada				
Niveles de variación	3 (carne fresca, carne congelada-descongelada y carne con criogel)				
Repeticiones	5				
Réplicas	3				
Técnica experimental	Parámetros de perfil de color	Calorimetría MDSC	Microscopía SEM	Espectroscopia FTIR-ATR	Análisis de fuerza de corte
Variable independiente	Tiempo de lectura, Masa, Iluminante, Angulo de observación, Diámetro de apertura	Masa, Modulación, Intervalo de temperatura, Isoterma, Velocidad de calentamiento y/o enfriamiento	Profundidad de campo	Número de onda	Precarga, Tamaño de muestra, Velocidad de compresión, Tiempo de compresión
Variable dependiente	L*, a*, b*	Cp, Flujo de calor total, reversible, no reversible, Entalpía	Tamaño de poro	% Transmitancia relativa	Fuerza de corte
Variable de respuesta	C*, Ángulo hue, ΔE^* , % Reflectancia, Fracción de mioglobina superficial	Transiciones térmicas, gastos energéticos	Daño estructural	Polimerización Interacción química de polímero-agua-proteína	Terneza

De acuerdo con el número de variables y respuestas se plantearon como análisis estadísticos, medidas de tendencia central y de dispersión, análisis de varianza (ANOVA) de 1 y 2 vías para los análisis de calorimetría MDSC, Espectroscopía FTIR de los hidro- y criogel, así como de las muestras cárnicas, de los parámetros de perfil de color, mioglobina superficial y

grado de ordenamiento estructural. También se determinaron los intervalos de confianza al 95% para los tamaños de poro; prueba de contrastación de hipótesis por diferencia mínima significativa honesta (DMSH) y regresiones lineales y no lineales para los análisis reológicos, la determinación de velocidades de congelación y análisis de fuerza de corte.

CAPÍTULO 3

ANÁLISIS Y

DISCUSIÓN DE

RESULTADOS

Nuestro principal propósito en esta vida es ayudar a los demás, y si no puedes ayudarles, al menos no les hagas daño. Dalai Lama

3.1 ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA CARNE

Los resultados obtenidos tras realizar el análisis de la composición química de la carne fresca se muestran en la Tabla 6 y los datos obtenidos concuerdan con los reportados por Meléndez *et al.* (2011). El agua y las proteínas son parte importante en el sistema cárnico, por lo que hay que mantener las condiciones favorables de interacción antes, durante y después del proceso de congelación, para evitar alteraciones en las estructuras y que se modifiquen las propiedades funcionales, que son factor importante en la calidad final de la carne.

Tabla 6. Composición química de la carne de cerdo fresca.

Componente	%
Humedad	75.30 ± 1.19
Nitrógeno proteico	21.83 ± 2.54
Lípidos	1.87 ± 0.09
Cenizas	1.00 ± 0.03

3.2 ETAPA 1. CARACTERIZACIÓN DE LOS HIDRO- Y LOS CRIOGELES DE ALMIDÓN WAXY

Se analizan y discuten los resultados de la caracterización de los hidro- y criogeles elaborados a partir del almidón waxy, ya que se demostró que éste es el que posee mejor capacidad tecnológica y sinergia con las proteínas y el agua durante su aplicación en la carne. Este biopolímero es económico y es estable a bajas temperaturas y demostró que existen arreglos estructurales importantes en función al número de ciclos de criocongelación.

Los criogeles de PVA fungieron como sistema de referencia debido a que son los más estudiados y de los que se encontró mayor número de investigaciones en el área farmacéutica, que sirvieron como base para el desarrollo de un material similar con aplicación en el área de los alimentos.

Los criogeles de xantana también fueron analizados y estudiados bajo las mismas condiciones de prueba, encontrando (Anexo A “Análisis de criogeles de xantana”) que es un material que funciona perfectamente como crioprotector y además es biocompatible con los

sistemas biológicos a los 3 ciclos de criogelificación, teniendo una estructura termodinámicamente ordenada ($95.55 \pm 0.92\%$) y tamaños de poro de $13.3170 \leq \mu \leq 23.4830$ μm . Una de las características que permite dicha compatibilidad es que al ser un aditivo GRAS (*Generally Recognized As Safe*, por sus siglas en inglés “Generalmente reconocido como seguro”) no tiene restricción en su uso para el consumo humano; sin embargo, el elevado costo que implica la obtención del polisacárido involucra directamente un incremento en el costo del proceso, lo que implica que se limite su uso.

Para los criogeles de goma karaya (Anexo B “Análisis de criogeles de karaya”), se encontró que pese a ser un polímero de origen natural, aditivo GRAS, compatible con alimentos y tener estabilidad fisicoquímica a bajas temperaturas, fue el menos apto y con baja estabilidad fisicoquímica como criogel. Al realizarse los análisis pertinentes, se encontró que la estructura se desestabiliza con el número de ciclos de criocongelación disminuyendo su grado de orden estructural de $87.16 \pm 0.68\%$ hasta $78.28 \pm 1.91\%$, lo que implica que no existan posibilidades de generar interacciones inter- e intramoleculares, y resultó no viable para su uso en el control del crecimiento de los cristales de hielo en carne.

Por lo tanto, en la etapa 1 se muestran los resultados del hidro- y el criogel de almidón waxy de hasta 4 ciclos, y posteriormente en la etapa 2 la aplicación de criogel de dos ciclos en la carne de cerdo y, cómo influye el criogel en el control del crecimiento de los cristales de hielo durante su congelación en cámara (lenta) reflejándose en algunos atributos de calidad.

3.2.1 CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO MODULADA (MDSC)

El perfil térmico de los hidro- y criogeles se determinó mediante calorimetría MDSC, para evaluar los posibles cambios existentes en el gasto energético y las transiciones, lo que se relaciona directamente con modificaciones estructurales, tras diferentes ciclos de congelación-descongelación.

Para el caso del PVA (Figura 13) se tiene en el flujo de calor el mismo perfil, sin observarse transiciones importantes, desde los -50 hasta los 50 $^{\circ}\text{C}$, diferenciándose únicamente por la magnitud en las entalpías (Sudhamania *et al.*, 2003; El-Sayed *et al.*, 2005; Patel *et al.*, 2014).

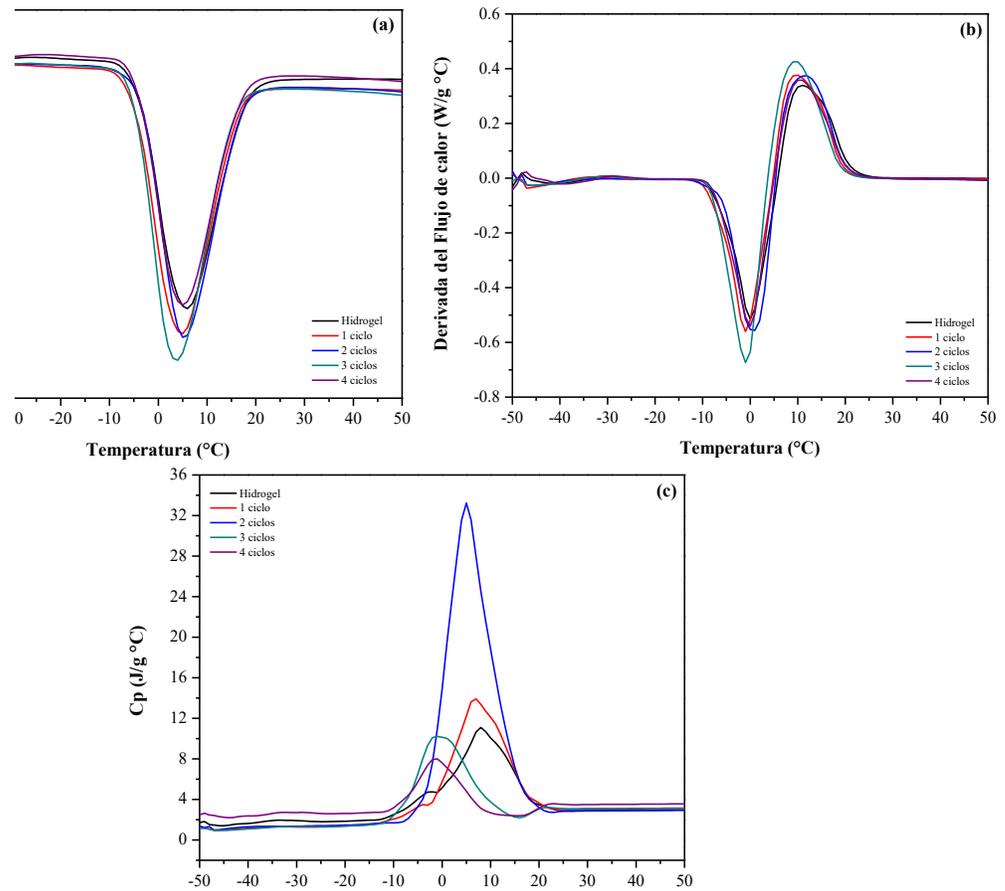


Figura 13. Fusión del hidrogel y los criogel de alcohol polivinílico. (a) Flujo de calor total, (b) Derivada del flujo de calor en función de la temperatura, (c) Calor específico.

Con la derivada del flujo de calor, se corroboró la existencia de la fusión del hielo en las muestras, este evento térmico es muy similar para todos los casos y prácticamente en la misma zona, con respecto a las modificaciones estructurales mostradas en el Cp de la Figura 13c.

Se observa que la fusión genera modificaciones importantes en las dispersiones coloidales, en magnitudes que son estadísticamente iguales, excepto en el criogel del segundo ciclo de congelación-descongelación, donde el cambio es mucho mayor. Esto podría ser posible por los reajustes moleculares tras cada ciclo y de acuerdo con El-Sayed *et al.* (2005) después

de la segunda congelación-descongelación el reacomodo es el de mayor importancia, de tal forma que en ciclos posteriores los movimientos estructurales son de menor magnitud.

En la Figura 14 se muestra la segunda transición de importancia para el PVA, la cual de acuerdo con Sudhamania *et al.* (2003) corresponde a la evaporación del agua libre del hidrogel y de los criogeles.

En el flujo de calor se aprecian diferencias valiosas entre cada una de las muestras, las temperaturas de evaporación son diferentes y van disminuyendo en función al número de ciclos y a partir del ciclo 2 no se modifican.

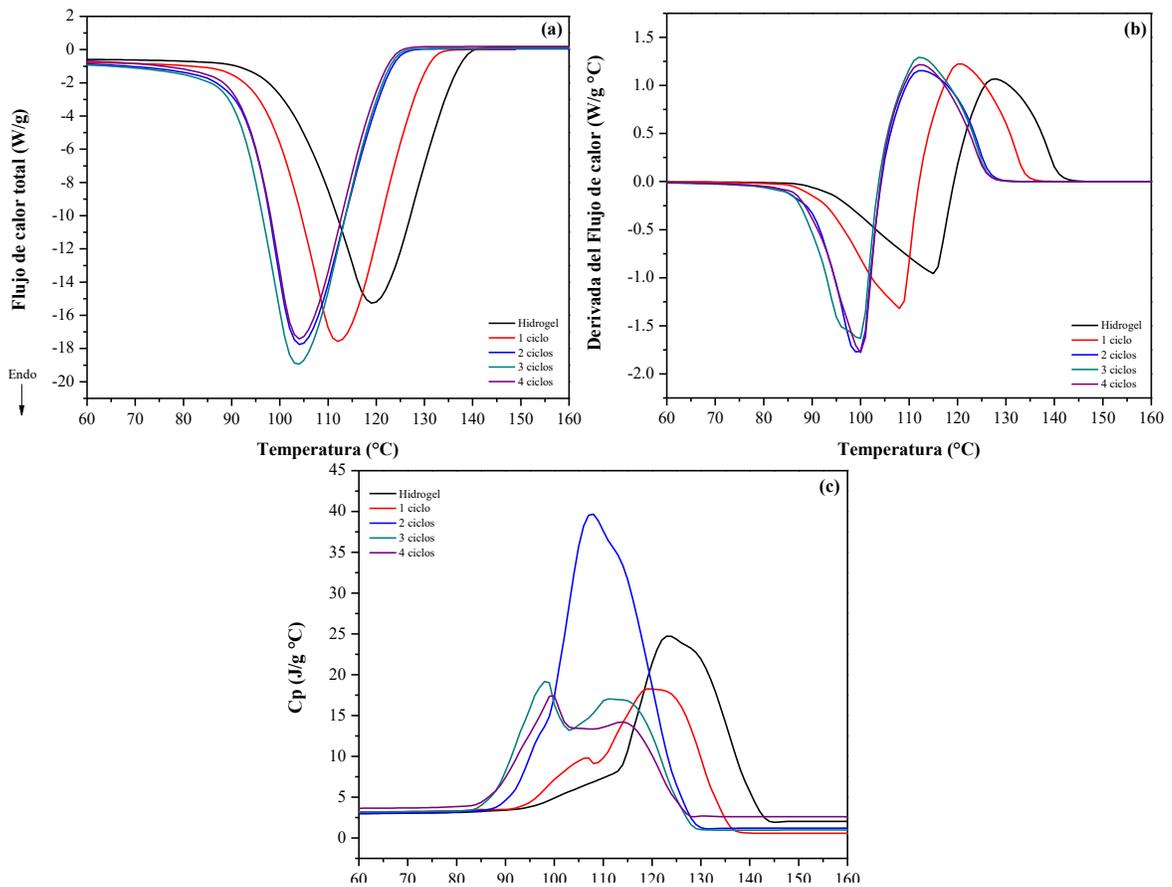


Figura 14. Evaporación del hidrogel y los criogeles de alcohol polivinílico. **(a)** Flujo de calor total, **(b)** Derivada del flujo de calor en función de la temperatura, **(c)** Calor específico.

La derivada del flujo de calor tuvo el mismo comportamiento, mostró que no existían diferencias entre ellos en cuanto al perfil térmico, pero si en función a las temperaturas de transición en los eventos térmicos a partir de ciclo 2. Para el caso del Cp en la Figura 14c, este ciclo también es el más relevante en función a los cambios estructurales, por lo que en la Tabla 7 se muestran los valores de la temperatura inicial y final de las transiciones, así como los gastos energéticos presentes en el PVA como hidro- y criogel, siendo de gran magnitud la fusión de los cristales de hielo y evaporación de agua con elevados gastos energéticos.

Tabla 7. Transiciones y gastos energéticos del hidro- y los criogel de alcohol polivinílico.

	T _i [°C]	T _f [°C]	ΔH [J/g]
Sin ciclo	-43.67	-35.18	4.52
	-3.97	5.78	311.60 [†]
	102.07	119.31	1980.00 [♦]
	218.88	225.45	0.51
Ciclo 1	-47.63	-39.08	5.54
	-4.85	4.77	323.80 [†]
	97.58	112.14	2103.00 [♦]
	212.70	223.55	0.93
Ciclo 2	-41.55	-32.81	6.19
	-4.14	4.93	302.30 [†]
	92.98	104.18	1838.00 [♦]
	211.76	224.65	1.03
Ciclo 3	-3.60	5.27	311.50 [†]
	92.92	104.33	1888.00 [♦]
	211.54	222.14	0.90
Ciclo 4	-4.85	3.62	345.00 [†]
	90.85	103.78	2156.00 [♦]
	211.23	224.34	1.24

[†]: Entalpía de fusión ($\Delta H_{\text{fusión}}$) de los cristales de hielo

[♦]: Entalpía de evaporación ($\Delta H_{\text{evaporación}}$)

En la Figura 15, se muestran los termogramas con los principales cambios ocurridos durante la fusión del almidón waxy sin apreciarse cambios importantes en el flujo de calor y en la derivada, aunque en el Cp se observa que existen modificaciones estructurales para el primer ciclo de criogelificación, donde se pueden observar en la Tabla 8, que las transiciones son en los mismos intervalos de temperatura y de gasto energético.

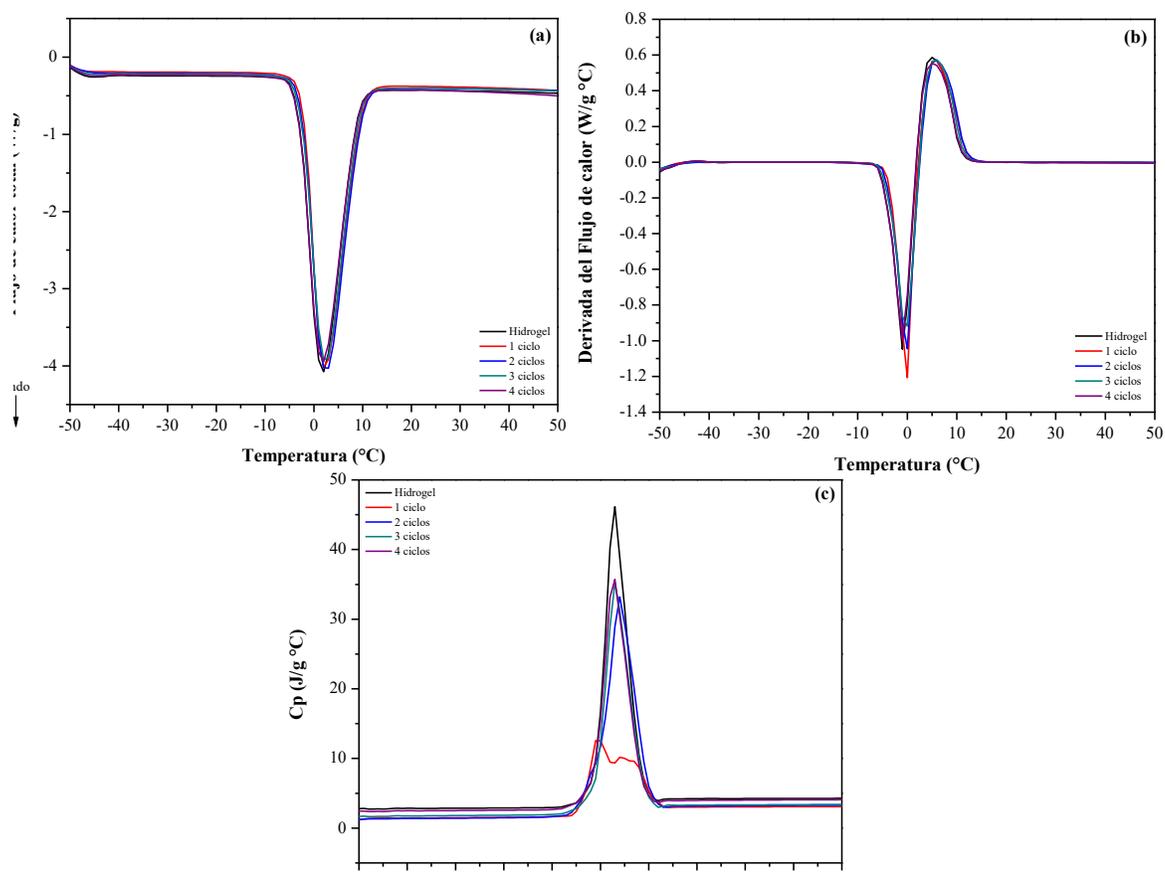


Figura 15. Fusión del hidrogel y criogeles de almidón waxy. **(a)** Flujo de calor total, **(b)** Derivada del flujo de calor en función de la temperatura, **(c)** Calor específico.

El análisis de la evaporación del hidrogel y los criogeles de almidón waxy, demostró (Figura 15) que en la zona donde existen más variaciones en función al flujo de calor, aunque son similares en gastos energéticos, las temperaturas se encuentran modificadas significativamente por efecto del número de ciclos. La amilopectina por sus características

morfológicas y reacomodo en la criogelificación, fue la que sufrió fenómenos de retrogradación a temperaturas más bajas, en comparación con la amilosa de acuerdo con lo reportado por Jenkins y Donald (1995).

El Cp se modifica de manera importante por efectos del arreglo estructural que sufren las cadenas de amilopectina para generar una matriz más ordenada y estable; sin embargo, se observa que con el número de ciclos existen variaciones, indicando de acuerdo con Hulleman *et al.* (1998) que los hidro- y criogel alcanzan un menor estado de energía libre y por lo tanto una estructura metaestable.

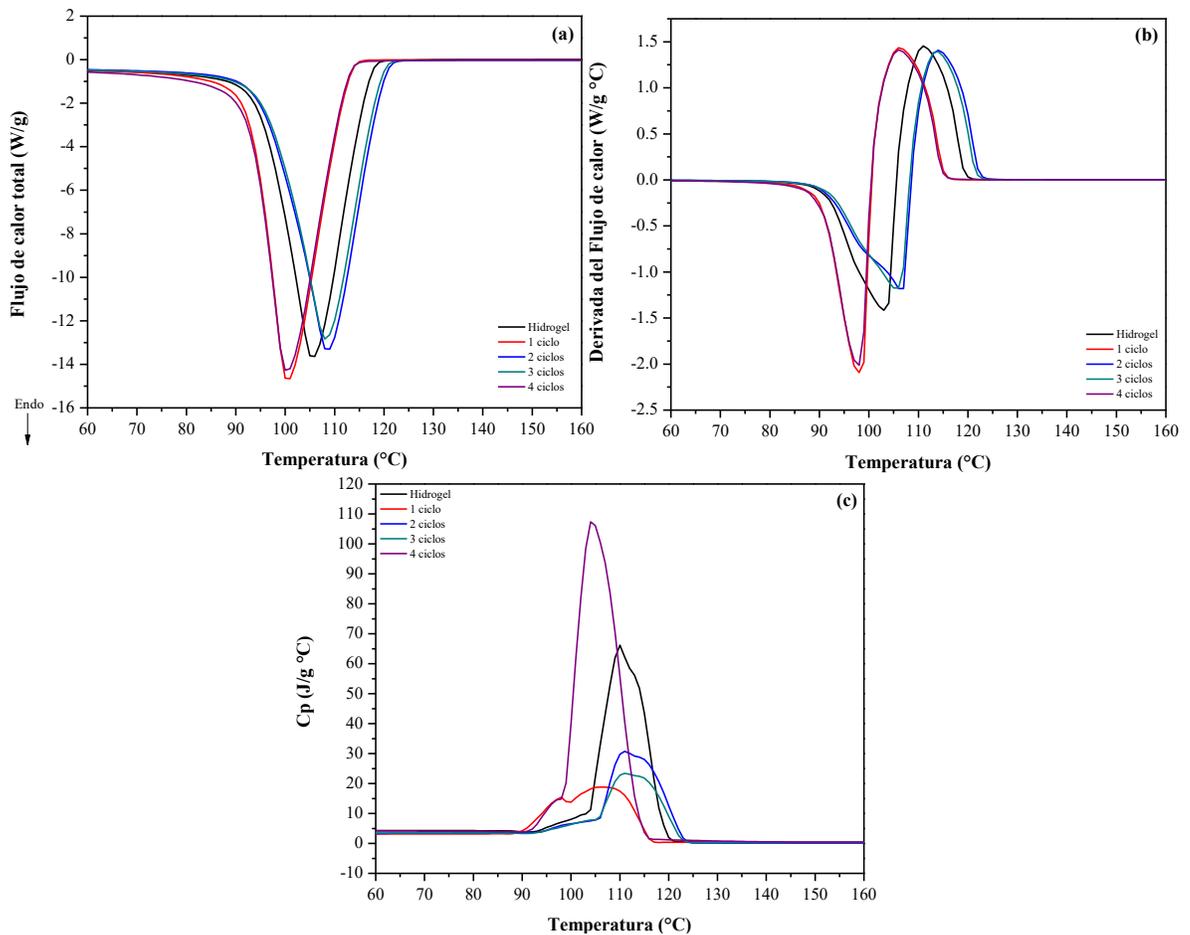


Figura 16. Evaporación del hidrogel y los criogel de almidón waxy. (a) Flujo de calor total, (b) Derivada del flujo de calor en función de la temperatura, (c) Calor específico.

Tabla 8. Transiciones y gastos energéticos del hidro- y los criogeles de almidón waxy.

	T_i [°C]	T_f [°C]	ΔH [J/g]
Sin ciclo	-51.15	-46.07	6.84
	-38.72	-34.86	0.20
	-2.93	1.84	336.90 [†]
	95.37	105.52	2154.00 [♦]
	168.24	177.10	0.09
	195.42	201.48	0.04
Ciclo 1	-50.98	-46.77	3.08
	-41.49	-37.62	0.15
	-1.97	2.17	338.9 [†]
	92.80	100.51	2200.00 [♦]
	161.77	170.96	0.03
	195.39	200.76	0.02
Ciclo 2	-51.01	-45.09	7.00
	-35.38	-28.08	0.02
	-2.29	2.49	351.10 [†]
	96.99	108.40	2279.00 [♦]
	148.98	155.94	0.01
	179.11	190.38	0.09
Ciclo 3	-51.12	-45.56	4.88
	-38.37	-34.02	0.38
	-2.54	2.39	330.70 [†]
	96.93	108.22	2100.00 [♦]
	158.42	165.04	0.03
	178.91	199.24	0.11
Ciclo 4	-51.12	-45.91	5.36
	-31.62	-25.61	0.19
	-3.06	1.79	336.00 [†]
	92.71	100.41	2042.00 [♦]
	146.02	153.65	0.05
	171.83	177.87	0.01

[†]: Entalpía de fusión ($\Delta H_{\text{fusión}}$) de los cristales de hielo

[♦]: Entalpía de evaporación ($\Delta H_{\text{evaporación}}$)

3.2.2 GRADO DE ORDEN ESTRUCTURAL

El concepto de orden estructural se relaciona con la fracción de volumen cristalino en la dispersión, indica el reacomodo de las moléculas en las muestras, existe una relación estrecha con los cambios en morfología, propiedades ópticas y primordialmente en estabilidad, todo ello dependiente de la temperatura (Ball *et al.*, 1996; Kong y Hay, 2002). A partir de los ciclos de congelación y descongelación de los criogeles, entre más cercano se encuentre el valor a 100% tiende a poseer una estructura más ordenada. Para el caso del PVA (Tabla 9), este ordenamiento molecular de su estructura se encuentra en el nivel más alto a los 4 ciclos de criogelificación.

Tabla 9. Porcentaje de orden estructural de las dispersiones de los hidro- y los criogeles.

	PVA	Almidón waxy
Hidrogel	84.47 ± 0.52	84.12 ± 0.33
1 ciclo	85.90 ± 0.97	90.80 ± 0.18
2 ciclos	81.70 ± 0.92	94.72 ± 0.14
3 ciclos	85.53 ± 1.17	89.05 ± 0.87
4 ciclos	93.30 ± 1.11	89.41 ± 0.56

Promedio ± desviación estándar

Para el caso del almidón waxy, el máximo grado de orden estructural se alcanza con 2 ciclos de criogelificación, es decir, este número de ciclos son suficientes para estabilizar fisicoquímicamente al sistema.

Jenkims y Donald (1995); Lourdin *et al.* (1995); Van Soest *et al.* (1996) y Hulleman *et al.* (1998) definen una relación estrecha entre los parámetros reológicos con el grado de ordenamiento que tiene la amilopectina de maíz y su grado de formación de redes tridimensionales que afectan la estabilidad y funcionalidad como crioprotector, dando como resultado mayor rigidez, aunque se tiene que considerar que el hecho de que aumente el orden de las moléculas, no implica que la firmeza del polímero se incremente, evitando cambios en la reología de los criogeles.

3.2.3 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)

Para corroborar los cambios ocurridos por efectos de la criogelificación de los polímeros, se obtuvieron las micrografías que permiten definir con mayor claridad la posible estabilidad de las matrices.

La Figura 17 muestra las micrografías del PVA, en las que se observa que efectivamente el arreglo molecular es afectado por el número de ciclos de congelación del polímero, el tamaño del poro es menor en el hidrogel y éste se va incrementando a partir del primer ciclo.

A partir del tercer ciclo, existe nuevamente un arreglo de la red polimérica para formar un sistema más homogéneo que ayuda a atrapar cantidades pequeñas de agua entre sus poros, logrando así poder controlar el proceso de cristalización, datos que concuerdan con lo reportado por Regand y Goff, (2003) y Ciolacu *et al.* (2016).

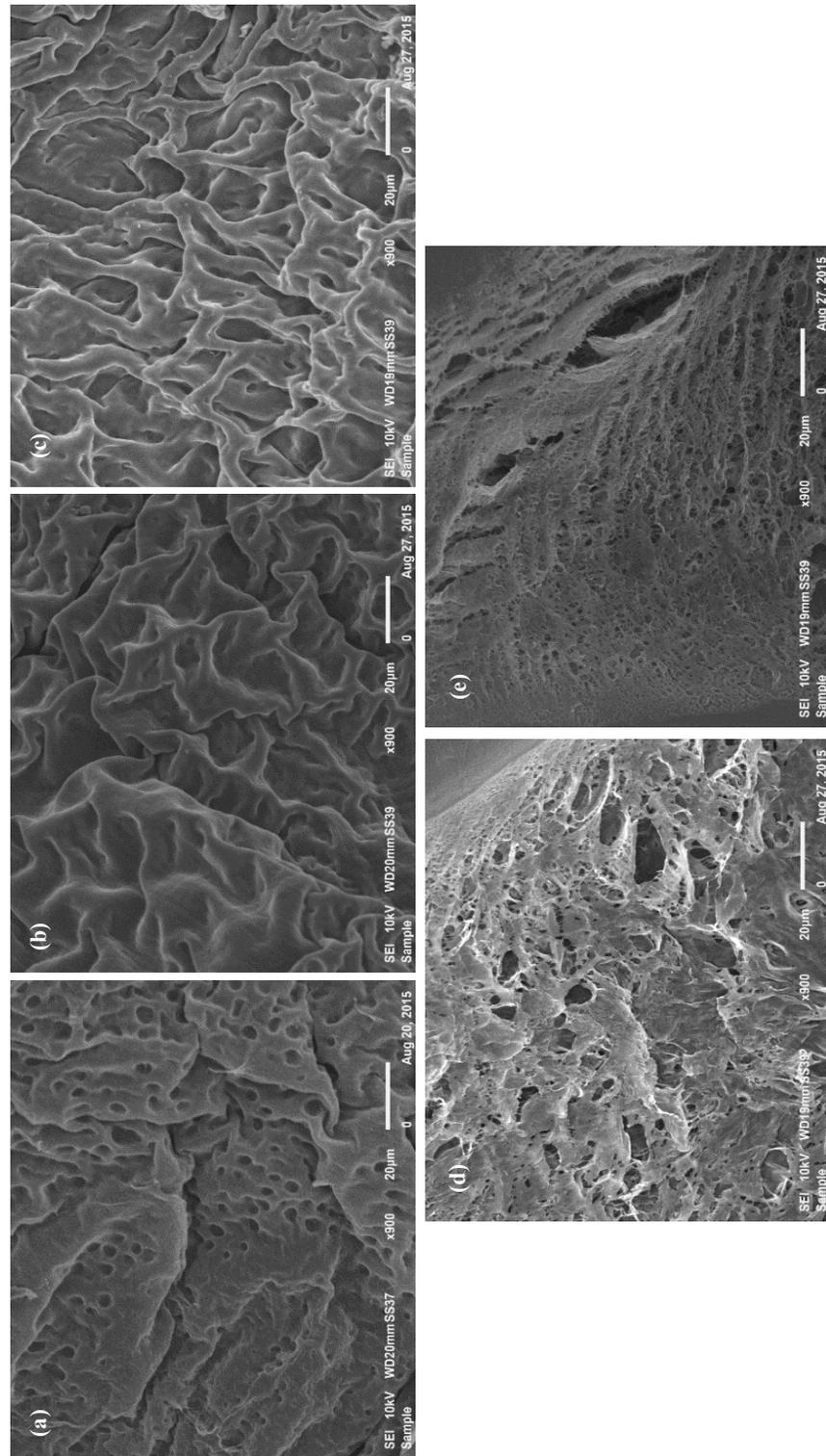


Figura 17. Micrografías a 900× del alcohol polivinílico a diferentes ciclos de congelación-descongelación. (a) hidrogel, (b) ciclo 1, (c) ciclo 2, (d) ciclo 3, (e) ciclo 4.

En la Figura 18a se encuentran los intervalos de confianza a 95% del tamaño de los poros formados y obtenidos en las micrografías, en los que se observa que, para el PVA, conforme van incrementándose los ciclos de criogelificación, la homogeneidad de los poros va disminuyendo, siendo indicativo de que existen arreglos moleculares importantes en este polímero que posiblemente no favorecerían del todo la formación de cristales homogéneos durante la congelación.

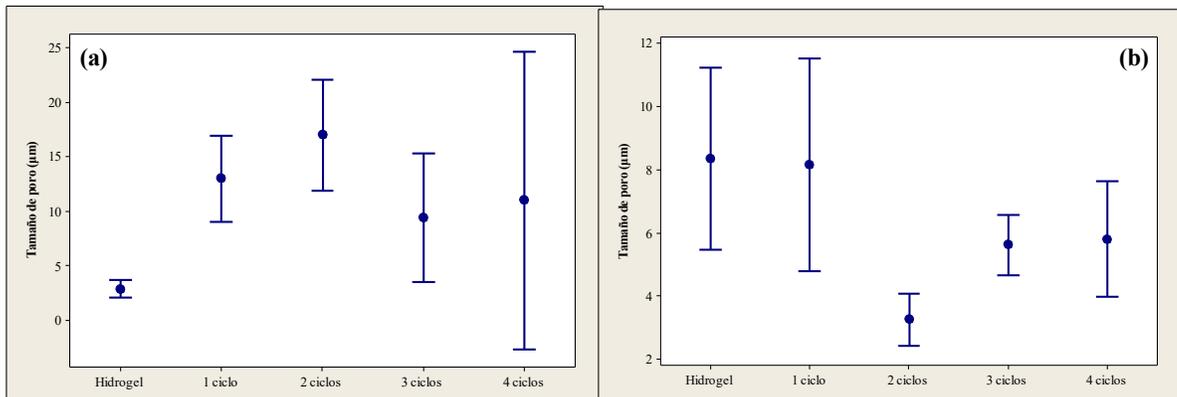


Figura 18. Tamaños de poros de las dispersiones. (a) alcohol polivinílico, (b) almidón waxy.

La Figura 19 muestra las micrografías del almidón con las agrupaciones de amilopectina unidas, que a diferencia de la mayoría de los polímeros, no forma una red de gel tradicional, si no que generan pequeños agregados porosos como lo reportan Huijbrechts *et al.* (2008) y Shi *et al.* (2013). En estos agregados es donde se atrapa el agua de la dispersión y por consiguiente se controla el proceso de cristalización, además, el almidón en la carne es compatible con las proteínas miofibrilares.

La velocidad de congelación de la amilopectina es aproximadamente 0.5 veces más baja en comparación a la amilosa, debido a las cadenas inter- e intramoleculares que la amilopectina forma durante la congelación (Shalviri *et al.*, 2010). Los ciclos repetidos de congelación-descongelación de las dispersiones poliméricas afectan no solo el cambio en la morfología de los gránulos del almidón y su rugosidad media, sino que pueden separar lamelas cristalinas de tamaño nanométrico, que son resistentes a la hidrólisis ácida y enzimática de las regiones amorfas de la molécula (Shi *et al.*, 2013).

Así mismo, el reacomodo de la amilopectina por efecto de la cristalización por congelación, promueve el desarrollo de esferulitas con tamaños entre 5 y 10 μm , lo que ocasiona modificaciones en sus propiedades ópticas, que de acuerdo con Shi *et al.* (2013) afecta directamente promoviendo una mayor interacción con proteínas de alta digestibilidad como las cárnicas.

Los gránulos de almidón son relativamente densos, por efecto de la absorción de agua debido a un gradiente de potencial químico, generando hinchazón, la cual es resistida por la elasticidad de la red de gránulos que se rompe en algún punto, llevando a la lixiviación y desestabilizando las cadenas moleculares, modificando la viscosidad. Estos efectos combinados de la mayor fracción volumétrica de los gránulos (debido al hinchamiento) y la mayor viscosidad de la fase acuosa da como resultado cambios importantes, modificando las interacciones químicas entre la molécula y por consiguiente la termodinámica de sus propiedades (Shalviri *et al.*, 2010).

Shalviri *et al.* (2010) mencionan que el grado de orden estructural que presenten los hidrogeles de almidón waxy, afecta a las propiedades mecánicas del mismo, entre las que destacan el aumento del módulo, la resistencia y la viscosidad y propicia una tendencia quebradiza en materiales altamente cristalinos, influenciadas por la composición, los métodos y las condiciones de transformación y recristalización. El tamaño de poro en el almidón waxy con 2 ciclos de criogelificación es el más pequeño y homogéneo (Figura 18b), por lo que, aunado a lo obtenido a través del resto de las pruebas, lo hace uno de los compuestos con mayor viabilidad para controlar el crecimiento de cristales.

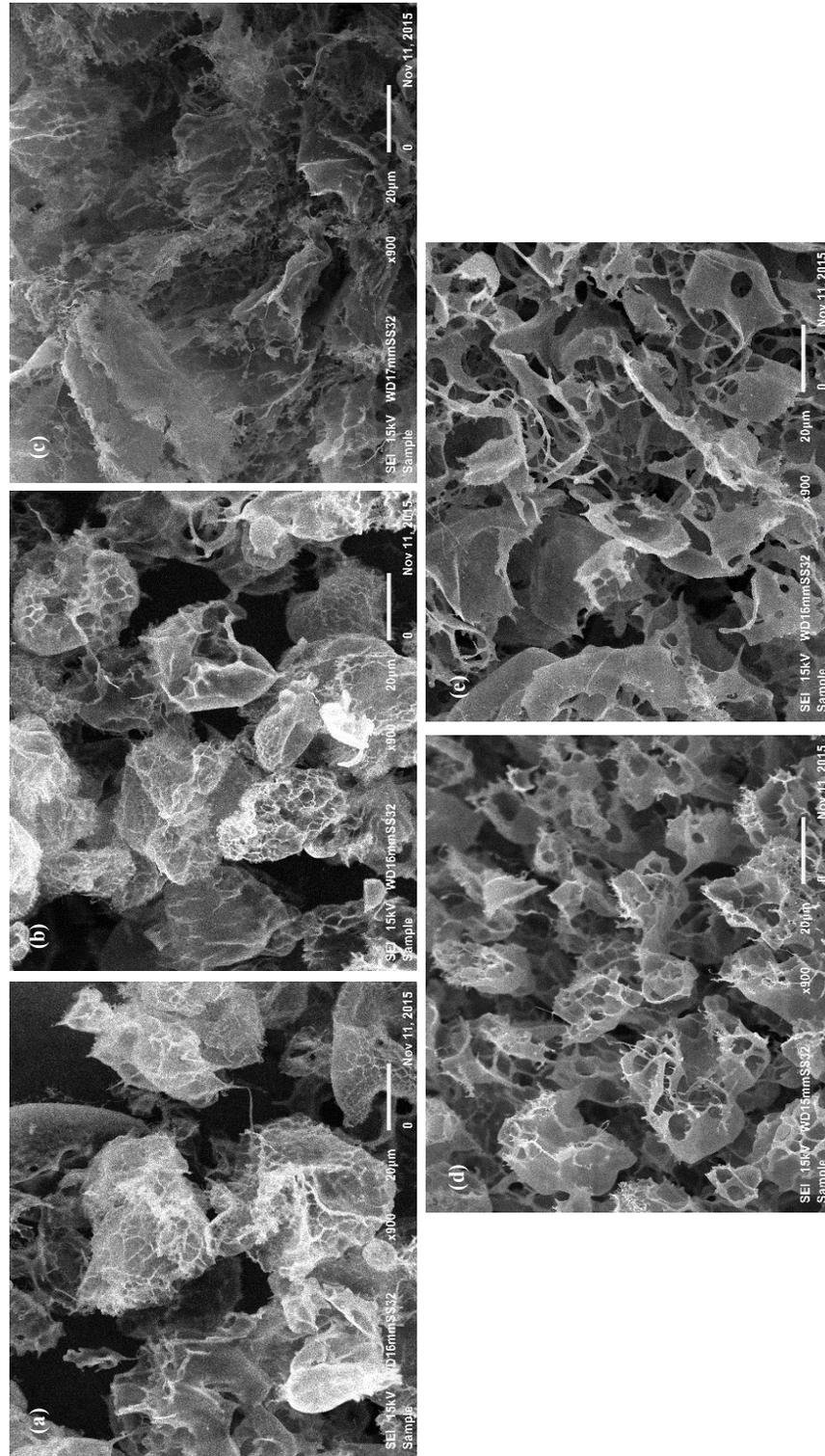


Figura 19. Estructura a 900× del almidón waxy a diferentes ciclos de congelación-descongelación.

(a) hidrogel, (b) ciclo 1, (c) ciclo 2, (d) ciclo 3, (e) ciclo 4.

Por lo tanto, es necesario cuantificar el efecto de la estructura y el tamaño del poro en su comportamiento, para desarrollar directrices que coadyuven en su modificación a través de enlaces entrecruzados, con el fin de obtener las propiedades reológicas deseables para facilitar su difusión al interior de la carne, asegurando un área mayor de contacto.

3.2.4 REOLOGÍA ROTACIONAL

La caracterización reológica con pruebas de flujo bajo cizalla rotacional, indican que el comportamiento del hidro- y criogeles se ve afectado por el tipo de polímero y número de ciclos de congelación-descongelación. Para todos los casos se obtuvieron fluidos no Newtonianos, independientes del tiempo y que siguen la Ley de Ostwald de Waele (Potencia), ya que, las propiedades de flujo dependen únicamente de la velocidad de cizalla y ésta no es constante en relación con el esfuerzo de cizalla.

Para ambos casos, el comportamiento encontrado es característico de materiales espesantes a la cizalla (Figura 20), como lo reportan Tecante y Doublier (1996); Shi *et al.* (2013) y Wang *et al.* (2014), indicando que la viscosidad se incrementa proporcionalmente a la velocidad de cizalla, esto debido a que las altas concentraciones de partículas generan mayor colisión y por consiguiente existe un mayor contacto entre ellas.

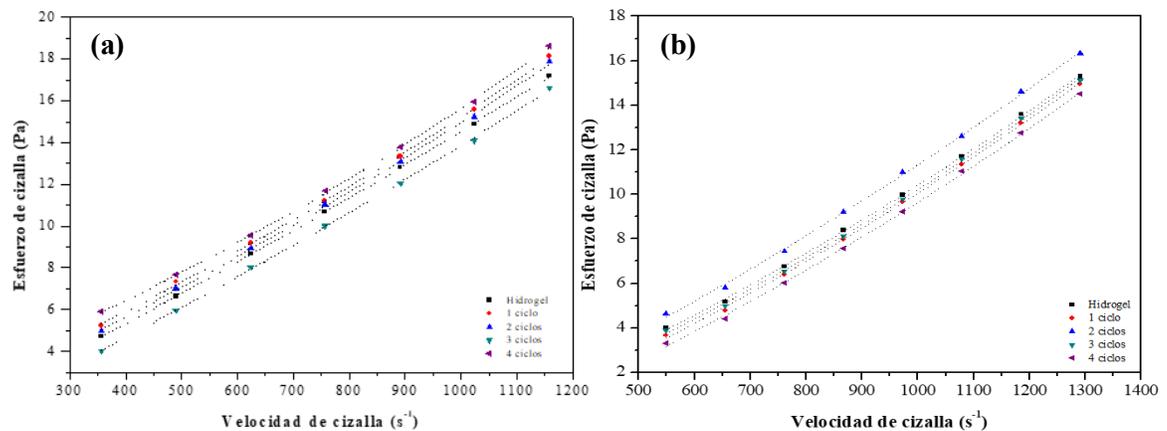


Figura 20. Comportamiento reológico de los hidro- y los criogeles. (a) alcohol polivinílico, (b) almidón waxy.

Esto se puede corroborar ya que al obtener la regresión potencial, se obtienen los parámetros reológicos (Tabla 10), los cuales son k y n en el que el índice de consistencia (k) muestra de

manera indirecta el comportamiento de la viscosidad de los fluidos y el índice de comportamiento al flujo (n) el comportamiento bajo cizalla del material evaluado, para estos criogel el valor es mayor a 1, lo que de acuerdo a la teoría clasifica a estos fluidos como “espesantes a la cizalla”.

Es importante destacar que los criogel de almidón, al sufrir un reacomodo de las cadenas de amilopectina debido a la criogelificación y a los fenómenos de retrogradación, modifican de manera importante la viscosidad, reflejándose directamente en los parámetros reológicos.

Tabla 10. Parámetros reológicos de fluidos Ostwald de Waele de los hidro- y los criogel.

	PVA		Almidón waxy	
	k	n	k	n
Hidrogel	$1.8 \times 10^{-2} \pm 0.0002$	0.9767 ± 0.0008	$4 \times 10^{-4} \pm 0.0002$	1.4999 ± 0.0015
1 ciclo	$1.1 \times 10^{-2} \pm 0.0010$	1.0425 ± 0.0011	$2 \times 10^{-4} \pm 0.0001$	1.5855 ± 0.0009
2 ciclos	$9.1 \times 10^{-3} \pm 0.0003$	1.0723 ± 0.0002	$1 \times 10^{-4} \pm 0.0001$	1.6198 ± 0.0006
3 ciclos	$7.4 \times 10^{-3} \pm 0.0004$	1.0973 ± 0.0010	$1 \times 10^{-4} \pm 0.0001$	1.6696 ± 0.0012
4 ciclos	$3.6 \times 10^{-3} \pm 0.0002$	1.1940 ± 0.0009	$1 \times 10^{-5} \pm 0.0000$	1.7510 ± 0.0018

Promedio \pm desviación estándar

3.2.5 ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO CON TRANSFORMADA DE FOURIER CON EL ADITAMENTO DE REFLECTANCIA DIFUSA (FTIR-RD)

El espectro de absorción IR resultante representa una huella digital de la muestra evaluada. Esta técnica es ampliamente utilizada para investigar la disposición estructural en hidrogel en comparación con los materiales nativos (Mansur *et al.*, 2004).

La espectroscopía vibracional se utiliza a menudo de preferencia a los métodos de análisis químico exhaustivo, especialmente en entornos industriales donde el tiempo es la esencia. Además, las muestras se pueden examinar *in situ*, evitando la pérdida de información estructural. El principio básico es la interacción de las muestras con la luz que puede excitar transiciones vibracionales de las moléculas (Papadopoulou *et al.*, 2011).

En la Figura 21 se observan los espectros FTIR del PVA, para todos los casos se encontraron bandas a los 3455-3450 cm^{-1} las cuales presentan vibraciones de estiramiento de grupos OH del PVA sin puentes de hidrógeno y que pertenecen a los grupos alcoholes y de agua estructural, principalmente en forma de dímeros (Shi *et al.*, 2013).

Aproximadamente a los 2948 cm^{-1} se presentaron estiramientos de la cadena principal alifática de alcanos y grupos alquilo (C-H) con intensidades medianamente fuertes. A los 1651 cm^{-1} existen estiramientos asimétricos de los grupos carbonilo (C=O) del acetato de PVA. También esta banda se asocia a estiramientos C=C de los grupos vinilo terminal de las cadenas (Papadopoulou *et al.*, 2011; Shi *et al.*, 2013).

A los 1460 cm^{-1} existe una combinación de frecuencias entre grupos CH₃-OH (interacciones) que tienen vibraciones asimétricas de flexión de tijera, en el plano en los grupos metilo terminales. A los 1155 cm^{-1} hay estiramientos de los enlaces entre C-O de los alcoholes terciarios, así como estiramientos asimétricos de los puentes de C-O-C de los éteres alifáticos. Finalmente, a los 850 cm^{-1} existen flexiones de los grupos CH₂ terminales de las cadenas principales (Rhoman *et al.*, 2011; Shi *et al.*, 2013).

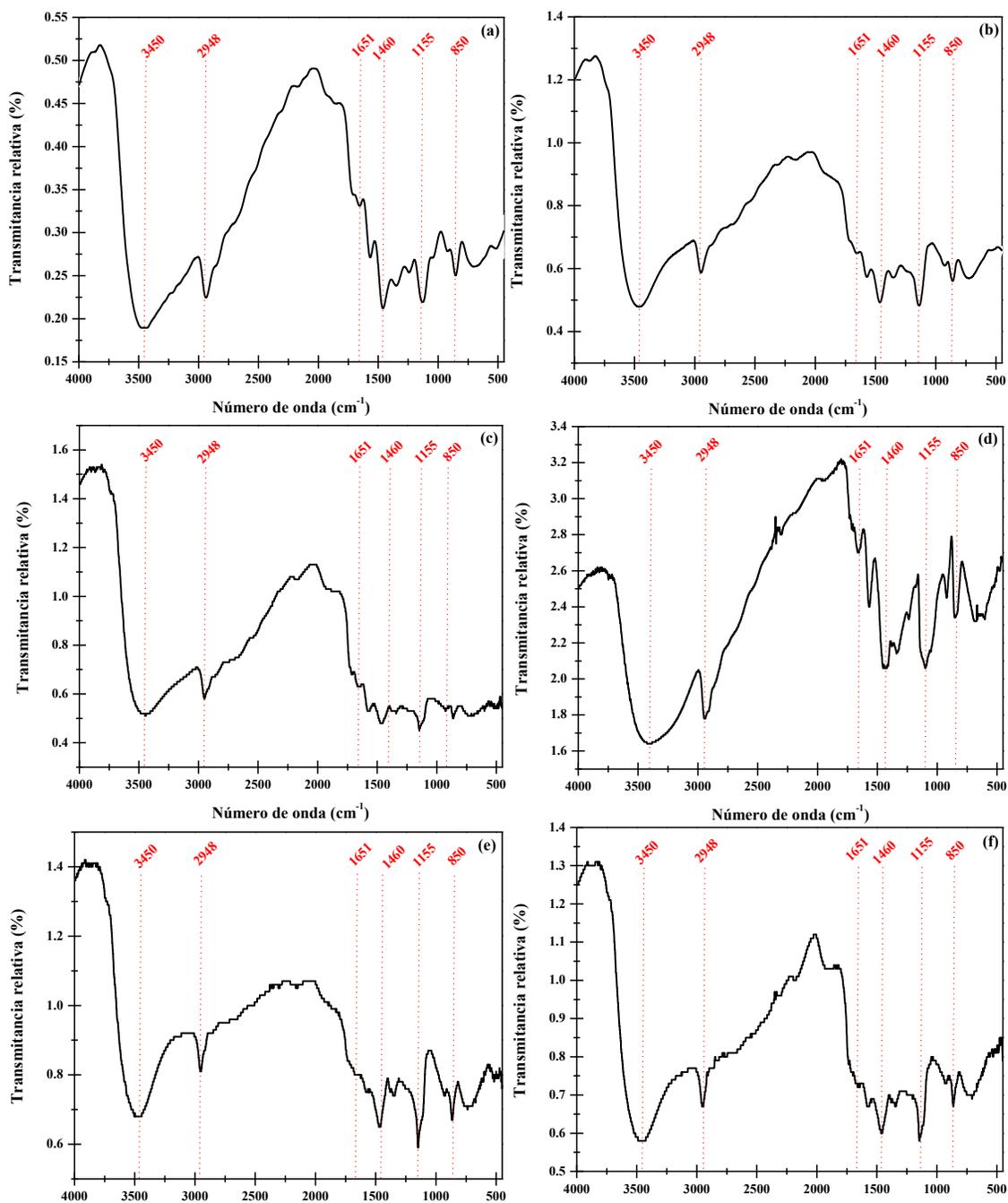


Figura 21. Espectros FTIR-RD del alcohol polivinílico. (a) polvo, (b) hidrogel, (c) 1 ciclo, (d) 2 ciclos, (e) 3 ciclos, (f) 4 ciclos.

Los espectros FTIR del almidón de maíz waxy se muestran en la Figura 22, presenta dos bandas a los 3450 y 2948 cm^{-1} , que al igual que en el PVA se tienen vibraciones de estiramiento de los grupos OH⁻ asociadas a los grupos inter- e intramoleculares libres en forma de dímeros y estiramientos de la cadena principal alifática de alcanos y grupos alquilo (C-H) con intensidades de absorción medianamente fuertes (Lu *et al.*, 2011).

A los 2100 cm^{-1} se tiene presencia de una banda que indica vibraciones de estiramiento entre grupos C=C=O (cetenos) característico de los polisacáridos naturales. A los 1650 cm^{-1} se tienen vibraciones de estiramientos asimétricos entre grupos C=C de dienos no conjugados de los metilenos terminales de las cadenas de almidón. A los 1170 cm^{-1} existen estiramientos asimétricos de los grupos C-O-R de los metil éster (Shalviri *et al.*, 2010; Lu *et al.*, 2011).

En general, en la zona de huella dactilar existen modificaciones importantes en función del número de ciclos entre el hidro- y los criogeles de almidón, reflejando que la forma de vibrar entre las moléculas modifica su intensidad debido al cambio que sufren por la criocongelación repetida, que a su vez genera cambios en el perfil de potencial químico y por lo tanto en la termodinámica y propiedades. Por lo tanto, estas bandas aparecen desde el primer ciclo de congelación, lo que indica que existen importantes arreglos estructurales afectados por el proceso de congelación-descongelación que hacen que el sistema de polímero sea más estable de acuerdo con los cambios observados en la Cp en los estudios MDSC (Lu *et al.*, 2011; Coria *et al.*, 2018).

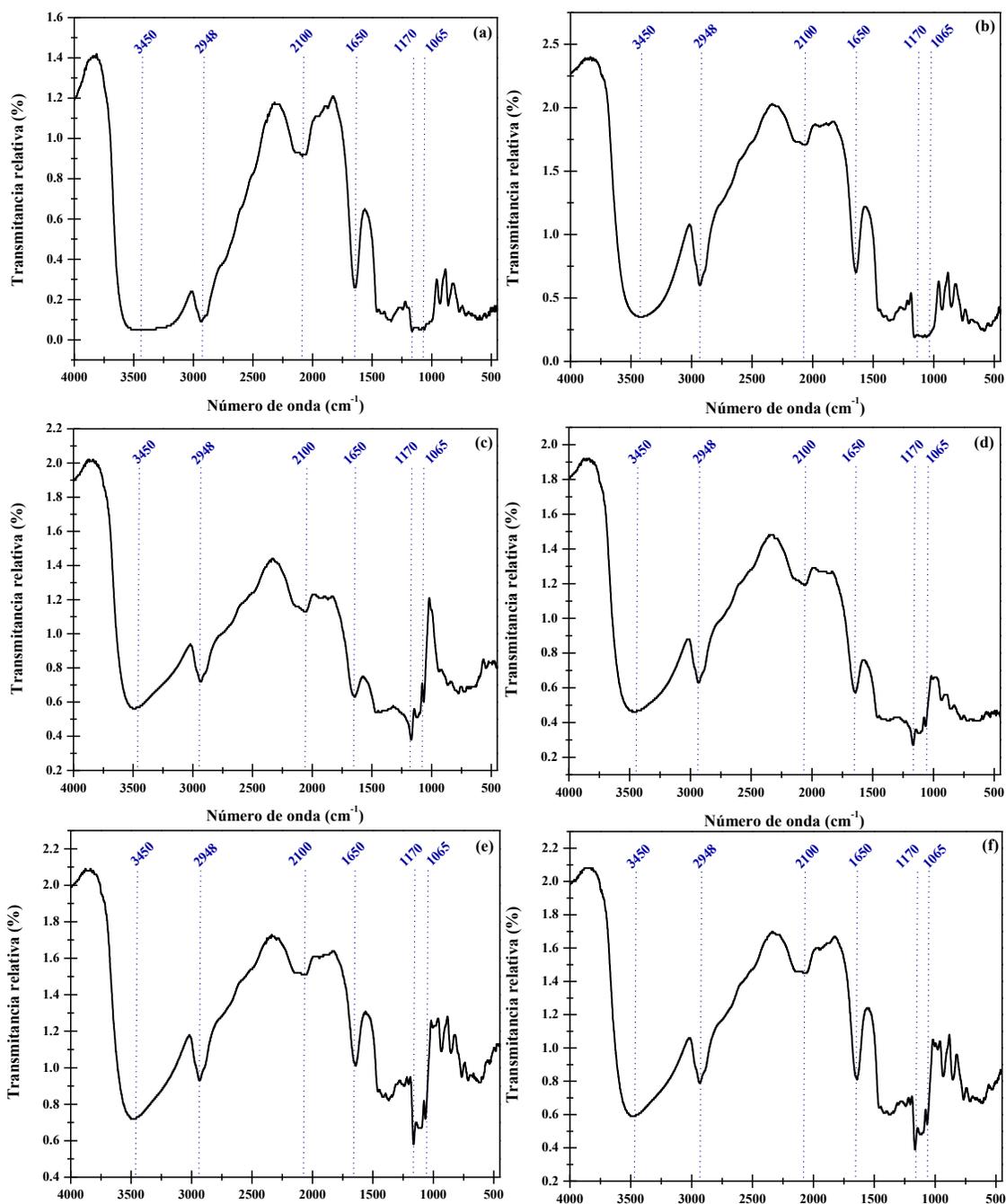


Figura 22. Espectros FTIR-RD de almidón waxy. (a) polvo, (b) hidrogel, (c) 1 ciclo, (d) 2 ciclos, (e) 3 ciclos, (f) 4 ciclos.

3.3 ETAPA 2. CARACTERIZACIÓN DE LA CARNE DE CERDO CON EL CRIOGEL

3.3.1 CONGELACIÓN DE LA CARNE

Se realizó el historial térmico (Figura 23) durante la congelación de la carne fresca y la adicionada con criogel de almidón waxy 2 ciclos y ultrasonido (criogel-US), se observa que la aplicación del polímero a la carne impacta mínimamente el perfil de congelación. En la Tabla 11 se muestran los valores obtenidos, como el punto inicial de congelación (PIC), el cual para la carne con criogel es menor ($P < 0.05$) al de la carne sin criogel, al adicionar un polímero se respetan los principios básicos de las propiedades coligativas, generando el descenso de la temperatura de congelación.

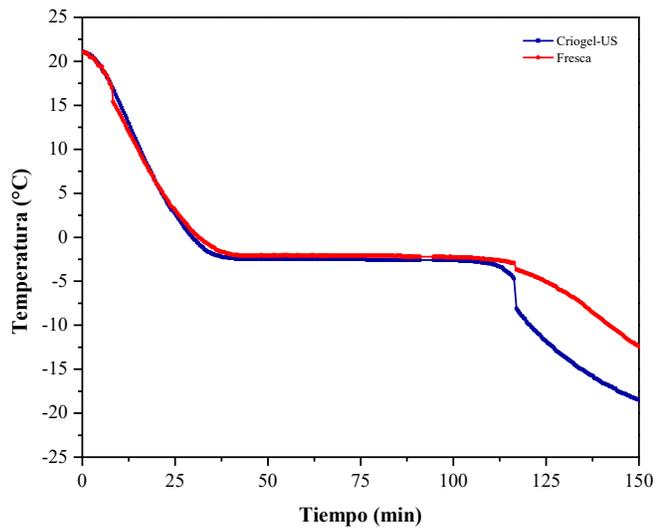


Figura 23. Historial térmico durante la congelación de la carne de cerdo fresca y con criogel-ultrasonido.

Así mismo, la temperatura final de congelación en las muestras que poseen criogel es menor a las muestras frescas. En relación con las velocidades de congelación, la carne con criogel-US es mayor en comparación a las muestras que no tienen biopolímero, reflejando una interacción entre el criogel y el agua libre de la carne que incrementó ligeramente la velocidad (Zhou *et al.*, 2010).

Tabla 11. Valores obtenidos del historial térmico de la carne fresca y congelada con criogel-ultrasonido.

	Fresca	Criogel-US
Punto inicial de congelación (°C)	-1.26 ± 0.0020	-2.08 ± 0.0020
Punto final de congelación (°C)	-2.76 ± 0.0007	-3.57 ± 0.0010
Velocidad de congelación (°C/min)	4×10 ⁻³ ± 0.0003	6×10 ⁻³ ± 0.0002

Promedio ± desviación estándar

3.3.2 ACTIVIDAD DE AGUA (A_w) Y POTENCIAL DE HIDRÓGENO (pH)

De los análisis fisicoquímicos realizados a las muestras, en la Tabla 12 se indican los valores obtenidos para la actividad acuosa y el potencial de hidrógeno, los cuales concuerdan con los obtenidos por Chirife y Ferro-Fontán, (1982) y Nair *et al.* (2014). Estos parámetros definen el sistema en función a su estabilidad frente a los microorganismos y que también se relacionan a la mioglobina, la principal proteína responsable del color de la carne y del estado químico en el que se encuentra.

Tabla 12. Algunas Propiedades fisicoquímicas de las muestras de carne analizadas.

	Fresca	Congelada-descongelada	Criogel-US
A _w	0.98 ± 0.002	0.98 ± 0.005	0.98 ± 0.002
pH	5.49 ± 0.020	5.69 ± 0.080	5.52 ± 0.010

Promedio ± desviación estándar

El pH se modificó debido al proceso de congelación-descongelación, esto por la desnaturalización parcial de las proteínas (principalmente miofibrilares y sarcoplásmicas) por efectos de la crioconcentración de solutos y la formación no controlada de cristales intra- y extracelulares. Al adicionar el criogel a las muestras de carne y posteriormente someterla al proceso de congelación-descongelación, esta propiedad se mantuvo más cercana a la de la carne fresca, debido a las características del criogel de almidón, ya que al ser una molécula anfófila no modifica las cargas y por lo tanto mantiene el equilibrio de H⁺ presentes (Seetapan *et al.*, 2016).

La actividad acuosa, se modificó en el proceso de congelación-descongelación sin la adición del crioprotector ($P < 0.05$), la desnaturalización fría altera la estructura de las proteínas responsables de la captación de agua, por lo que se cambia su funcionalidad y ocurre una liberación de exudados, reflejándose en el aumento de esta propiedad (Nair *et al.*, 2014).

Por otro lado, cuando se adiciona el criogel la A_w se mantiene más cercana a su valor inicial, indicando la existencia de ligeras modificaciones en las proteínas cárnicas, que favorecen la interacción entre criogel-agua-proteínas.

3.3.3 CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO MODULADA (MDSC)

La carne fue sometida al análisis térmico, para determinar su comportamiento frente al calentamiento, en función a sus componentes mayoritarios (agua-proteínas-criogel). La Figura 24 muestra las transiciones relacionadas a la fusión y la evaporación del agua.

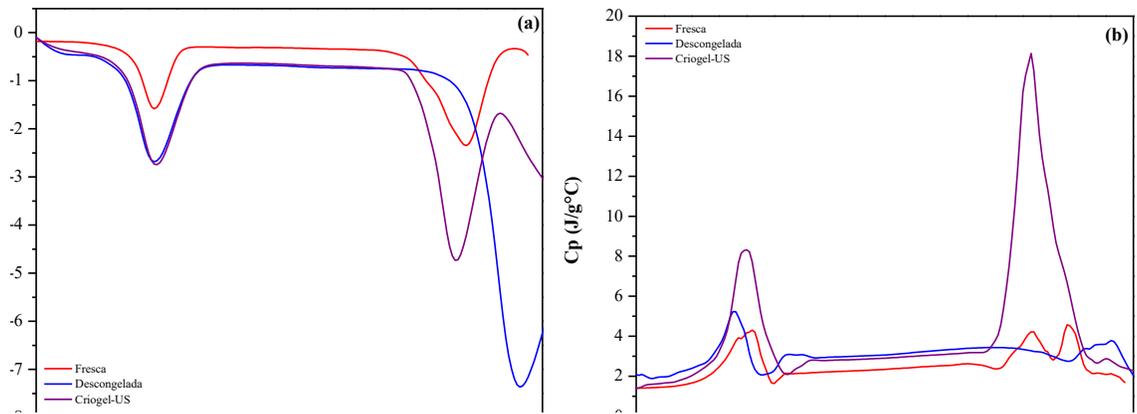


Figura 24. (a) Flujo de calor, (b) Calor específico de las muestras de carne.

En el caso de la fusión, existen cambios que no se reflejan en el flujo de calor total, ya que aparentemente las transiciones son en los mismos intervalos y con los mismos gastos energéticos, aunque en la señal de C_p , se aprecia que los mayores cambios a nivel estructural son dados para la muestra de carne congelada con criogel, esto atribuido a las interacciones que se forman entre el agua, las proteínas y el criogel. En la Tabla 13 se enlistan los valores de transición y su respectiva entalpía para cada muestra en fusión y evaporación.

Tabla 13. Temperaturas de transición y gastos energéticos de las muestras cárnicas.

Muestra	Fusión		Evaporación	
	T_f (°C)	ΔH_f (J/g)	T_e (°C)	ΔH_e (J/g)
Fresca	2.02	182.5	112.83	432.4
Descongelada	1.98	204.3	131.36	549.9
Criogel-US	2.59	208.3	109.10	315.5

Promedio ± desviación estándar

Para el caso de la zona de evaporación de agua, se observa que existen diferencias en las transiciones y en los gastos energéticos, en el caso de la carne que contiene el criogel posee la menor entalpía, indicando que posiblemente existe un equilibrio entre el criogel-agua-proteínas que se refleja en la cantidad de energía requerida para evaporar el agua.

Para el caso de la zona donde se encuentran las principales proteínas cárnicas, se analizó desde los 40 a los 80 °C y en la Figura 25 se presentan los termogramas del flujo de calor total, Cp y la derivada del flujo de calor total, en función de la temperatura.

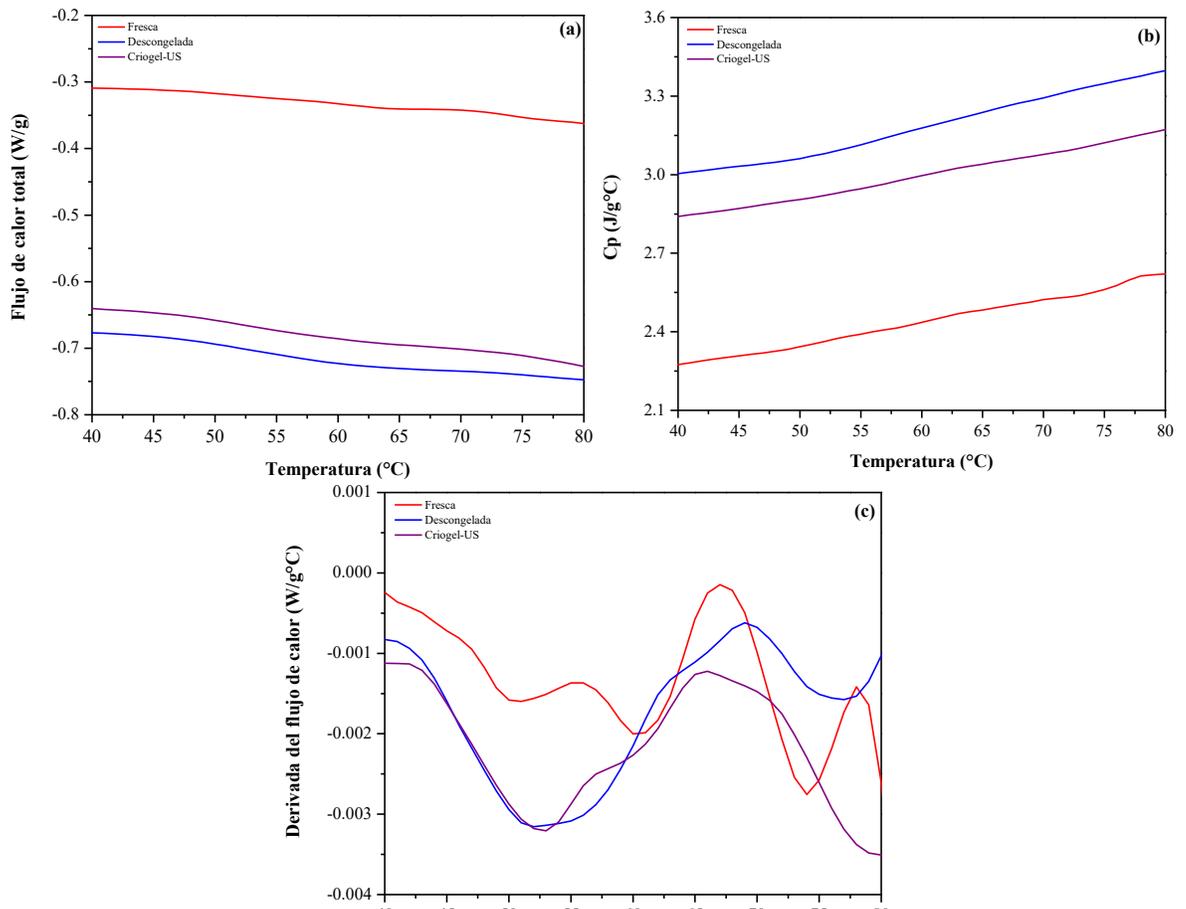


Figura 25. (a) Flujo de calor, (b) Calor específico, (c) Derivada del flujo de calor de las muestras cárnicas analizadas.

En la figura 25a, se tiene el termograma del flujo de calor y se muestran los cambios cinéticos y estructurales en conjunto, así mismo al separar las señales, se aprecia en la Figura 25b el componente del Cp, en el cual existen variaciones importantes en las zonas de proteínas cárnicas como lo reportan Kazemi *et al.* (2009) y Coria *et al.* (2017).

Para determinar con mayor precisión las zonas de transición, se derivó el flujo de calor en función de la temperatura (Figura 25c), por lo que se definieron los eventos térmicos para cada una de las proteínas analizadas.

El cambio en el flujo de calor indica que existen modificaciones ya sea en el componente cinético o en el estructural, esto es indicativo que el proceso de congelación en la cámara a -

25°C y descongelación, así como la aplicación del criogel con US, por sí mismos generan alteraciones importantes. Los cambios generados son por el posible efecto protector en las proteínas cárnicas, posterior a la congelación en cámara, diferenciando de cierta manera la funcionalidad que desempeña cada una de estas biomoléculas y se refleja en aspectos que podrían alterar la calidad de la carne y su aspecto para los consumidores.

En la Tabla 14 se presentan los datos de las temperaturas de desnaturalización (T_D) para cada una de las proteínas y sus respectivos gastos energéticos (ΔH_D), todos ellos concordando con los obtenidos por Kazemi *et al.*, 2009; Meléndez *et al.*, 2011; Lesiów y Xiong, 2013 y Coria *et al.*, 2017.

Tabla 14. Principales transiciones térmicas en la carne sometida a diferentes tratamientos.

T_D [°C]	ΔH_D [J/g]	
47.71	0.4091 [♦]	Fresca
63.96	0.3194 [†]	
76.47	0.0092 [‡]	
42.26	0.0040 [♦]	Descongelada
60.24	0.7259 [†]	
79.48	0.0065 [‡]	
43.69	0.2090 [♦]	Criogel-US
60.61	0.5250 [†]	
75.95	0.2721 [‡]	

♦ miosina; † sarcoplásmicas y colágeno; ‡ actina

Para la miosina, la congelación sin la adición de crioprotector, generó que se desnaturalizara en mayor proporción, dando como resultado valores de ΔH_D menores, comparado con la carne que se sometió al mismo proceso, pero con la adición del criogel-US.

Para el colágeno y las proteínas sarcoplásmicas, se tiene un efecto donde el tratamiento con criogel-US genera que el colágeno pueda ser modificado estructuralmente hasta cierto punto donde no tenga efectos ($P < 0.05$) en la textura.

En la actina el tratamiento con criogel-US permitió que se favoreciera el recubrimiento de esta proteína y aumentara la energía requerida para desnaturalizarla, lo cual se refleja en atributos de calidad de la carne.

En la Figura 25b se muestra el componente estructural del análisis térmico (Cp) realizado a la carne sometida a diferentes tratamientos, esto para corroborar los posibles cambios que pudiesen existir por efectos del procesamiento y analizar si el criogel aplicado podría favorecer dichos cambios para controlar los efectos del proceso de congelación de la carne o la aplicación del criogel. Se observan cambios significativos del Cp entre las muestras, lo que indica que el procesamiento térmico a bajas temperaturas genera modificaciones en las estructuras de las proteínas cárnicas (Prabhu, 2005).

El desplegamiento de proteínas globulares generalmente tiene un Cp positivo. De hecho, muchas proteínas, incluyendo las cárnicas, tienen su máxima estabilidad a menudo cerca de la temperatura ambiente (20-25 °C). Además de la esperada disminución de la estabilidad con el aumento de la temperatura (transición de fusión), la estabilidad de la curva mostrada por el Cp implica que las proteínas se vuelven menos estables a baja temperatura e incluso pueden desnaturalizarse a temperaturas suficientemente bajas, como la congelación.

El perfil de estabilidad a la temperatura y el despliegue de la capacidad térmica también tiene implicaciones para el mecanismo de estabilización de proteínas con estructuras suficientemente compactas y termoestables, como la actina y el colágeno, que se modifican en intervalo de 60 a 120 °C (Prabhu, 2005). Estos cambios estructurales pueden llegar a reflejar modificaciones que se pueden determinar a partir del análisis por microscopía SEM en función al tamaño de los poros en la carne.

3.3.4 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)

En el análisis estructural, de las micrografías SEM (Figura 26) se aprecian las diferencias ($P < 0.05$) en las muestras por efectos de la congelación-descongelación y de la aplicación del criogel con US.

Se observan cambios en las miofibrillas, presentan colapso y modifican la porosidad de la carne, por lo que, se reafirma que la congelación en cámara y la formación no regular de los

cristales de hielo, modifican la presión por efectos del crecimiento no controlado de los mismos. Esta formación no controlada de cristales de hielo afecta a las proteínas, principalmente a la actina y la miosina, con cambios en la funcionalidad de acuerdo con el análisis de resistencia al corte menor en la carne congelada, debido a que no existe un acomodo normal de las miofibrillas y con cambios en la calidad (terneza y color), que no siempre son positivos para el consumidor.

En la carne que se congeló con criogel-US, ocurrió una aparente modificación de la estructura original de la muestra, aunque cabe destacar que también se generaron espacios más homogéneos, en donde pudo almacenarse agua libre, que sirvió para la formación de hielo.

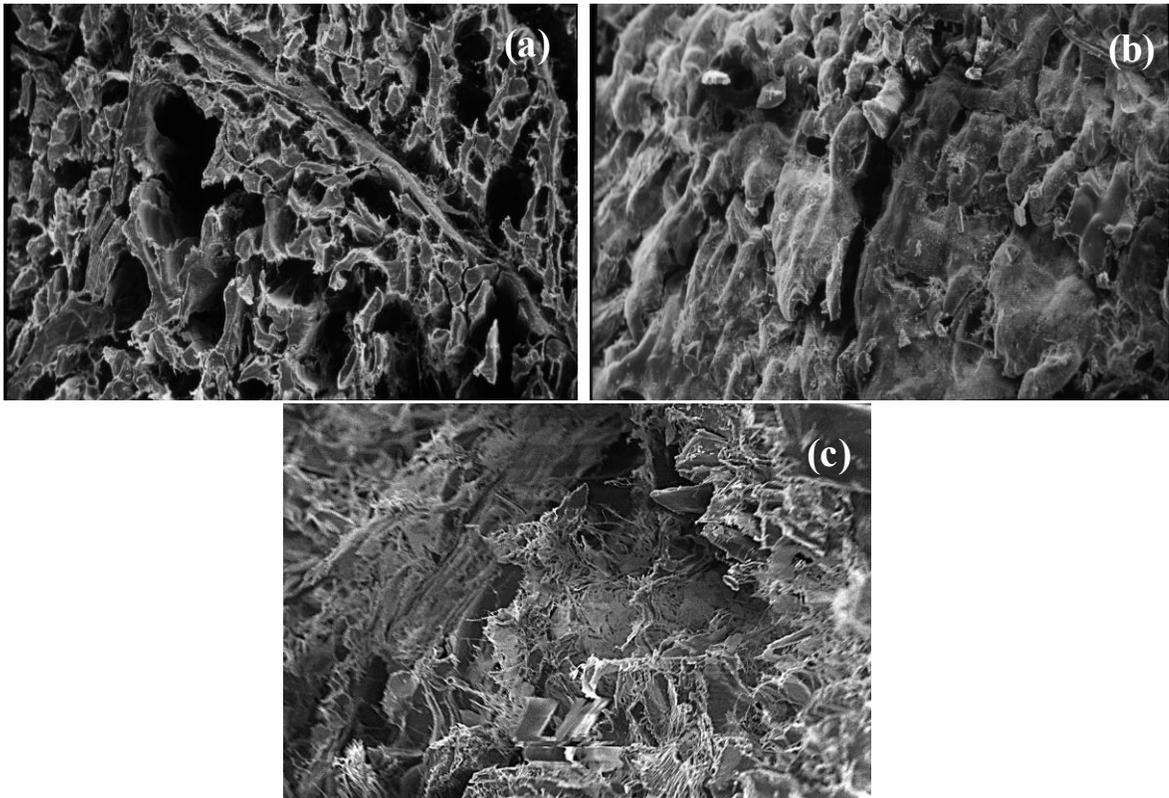


Figura 26. Micrografías a 100× de carne de cerdo. (a) fresca, (b) descongelada, (c) criogel-ultrasonido.

La a Figura 27 muestra el análisis estadístico de los intervalos, con 95% de confianza, los cuales indican el margen de error de una población determinada, para la carne fresca los

poros son 19.64% más pequeños en comparación a la carne congelada-descongelada, debido a que las fibras no han sufrido modificaciones por efectos de ningún proceso.

Para el caso de la carne congelada-descongelada, se encontró que la cristalización del agua intra- y extracelular, generó ruptura en las miofibrillas, dañando considerablemente las proteínas cárnicas, lo que se traduce en cambios estructurales y en las propiedades funcionales de éstas (miosina, actina, mioglobina y colágeno) y a su vez en alteraciones en la calidad de la carne.

En la carne que fue sometida a congelación con criogel-US, se encontró que la disminución del tamaño de poro es del 80.84%, indicando que existe un efecto de competencia entre el agua-criogel-proteína y que se forman espacios más pequeños para los núcleos de hielo, dañando en menor proporción la estructura de la carne que refleja en atributos de calidad sensorial; así mismo, se corroboró que en las condiciones en que fue aplicado el US no se afectaron las fibras a causa de los *microjets* acústicos.

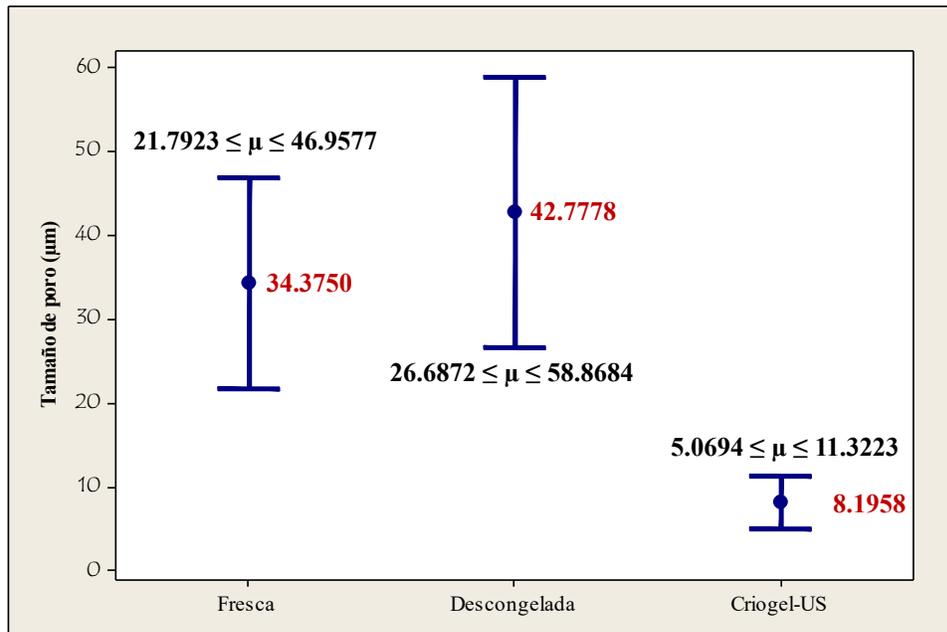


Figura 27. Tamaños de poro en las muestras de carne analizadas.

3.3.5 PARÁMETROS DE PERFIL DE COLOR

Para la carne fresca se obtuvieron los valores promedio de los parámetros de perfil de color en el sistema CIE (L^* , a^* y b^*) (Tabla 14), que coincidieron con los obtenidos por Brewer *et al.* (2001); Skrlep y Candek-Potokar, (2006); AMSA, (2012) y Lesiow y Xiong, (2013).

Para el caso de las coordenadas complementarias, la saturación (C^*) y el tono ($^{\circ}\text{hue}$) se encontraron dentro de los parámetros característicos para la concentración de mioglobina que tiene este tipo de sistema y en específico este tipo de músculo (*Longissimus thoracis*) y sirven de referencia para las alteraciones por efecto del criogel-US después de la congelación.

En el caso de la carne descongelada, el valor L^* disminuye, indicando que pudo existir una pérdida de líquidos por exudación, generando menos reflexión de la luz y por consiguiente afectando la luminosidad del sistema. Así mismo, con el criogel-US se encontraron valores más altos en comparación con la carne fresca, sugiriendo que los fenómenos de cavitación y bombardeo con las ondas acústicas, modifica considerablemente la superficie de la muestra, generando más espacios por los que incide la luz generando mayor reflexión de ésta entre proteínas-criogel-agua.

Para la coordenada a^* (+rojos/-verdes), la carne fresca y la de criogel-US mostraron valores iguales ($P>0.05$), a diferencia de la muestra descongelada (Tabla 15), indicando que esta coordenada aparentemente no se ve afectada por efectos del crioprotector, igual que para el caso de la coordenada b^* , obteniendo valores iguales entre la muestra fresca y la de criogel-US.

Tabla 15. Color de las muestras de carne de cerdo analizadas.

Muestra	L^*	a^*	b^*	$^{\circ}\text{hue}$	C^*
Fresca	38.85±0.88	5.65±0.37	5.19±0.38	42.54±0.76	7.67±0.52
Descongelada	38.57±0.41	6.27±0.05	5.54±0.56	41.36±2.97	8.38±0.35
Criogel-US	40.52±0.14	5.64±0.55	5.19±0.73	42.54±5.99	7.69±0.47

Promedio ± desviación estándar

Para el caso del ángulo hue, la AMSA (2012) reporta que los valores de la carne de cerdo deben de encontrarse entre 0 y 90°, este intervalo es para tonos rojizos, las diferencias entre la muestra fresca y la que contiene criogel-US no fueron significativas ($P < 0.05$) por lo que, el matiz no se afecta debido al agente crioprotector.

En lo que respecta a C^* , no existió diferencia significativa ($P < 0.05$) entre carne fresca y la que contiene criogel, indicando que en el ángulo hue, la saturación no se ve afectada por la adición del polímero por medio del US.

Para conocer la diferencia total en el color (ΔE^*) se utilizaron los parámetros tri-estímulo del sistema CIELab, se tomó como referencia a la carne fresca, la carne descongelada tuvo un valor de 0.8318, indicando que las diferencias de color no fueron estadísticamente significativas ($P > 0.05$) y por lo tanto, no son perceptibles por el ojo humano.

Para la carne adicionada con criogel-US el valor fue de 1.8332, superior al de la carne congelada-descongelada, pero aun así la diferencia es insuficiente para que el consumidor pueda percibirla a la hora de la compra (Irie y Swatland, 1992).

El comportamiento espectral de las muestras se presenta en la Figura 28, es la curva espectrofotométrica por reflectancia, coincide con las obtenidas por la AMSA, (2012), indicando que el comportamiento de la reflexión de la luz entre los 500 y 600 nm no muestra presencia de mioglobina en estado oxidado. La posible causa es que la desoximioglobina se encuentra en mayor proporción para todos los casos, aunque, las tres formas químicas de esta hemoproteína se encuentran en un estado de *pseudoequilibrio* y solo con la cuantificación a partir de la absorbancia a los 503, 525, 557 y 582 nm se pueden conocer las concentraciones de éstas.

Para la carne con criogel-US, el porcentaje de reflectancia aumentó, debido a que las muestras fueron inmersas en el polímero y sometidas a contradifusión equimolar por US, lo que provoca que exista más líquido en la superficie y se reflejó en estos valores.

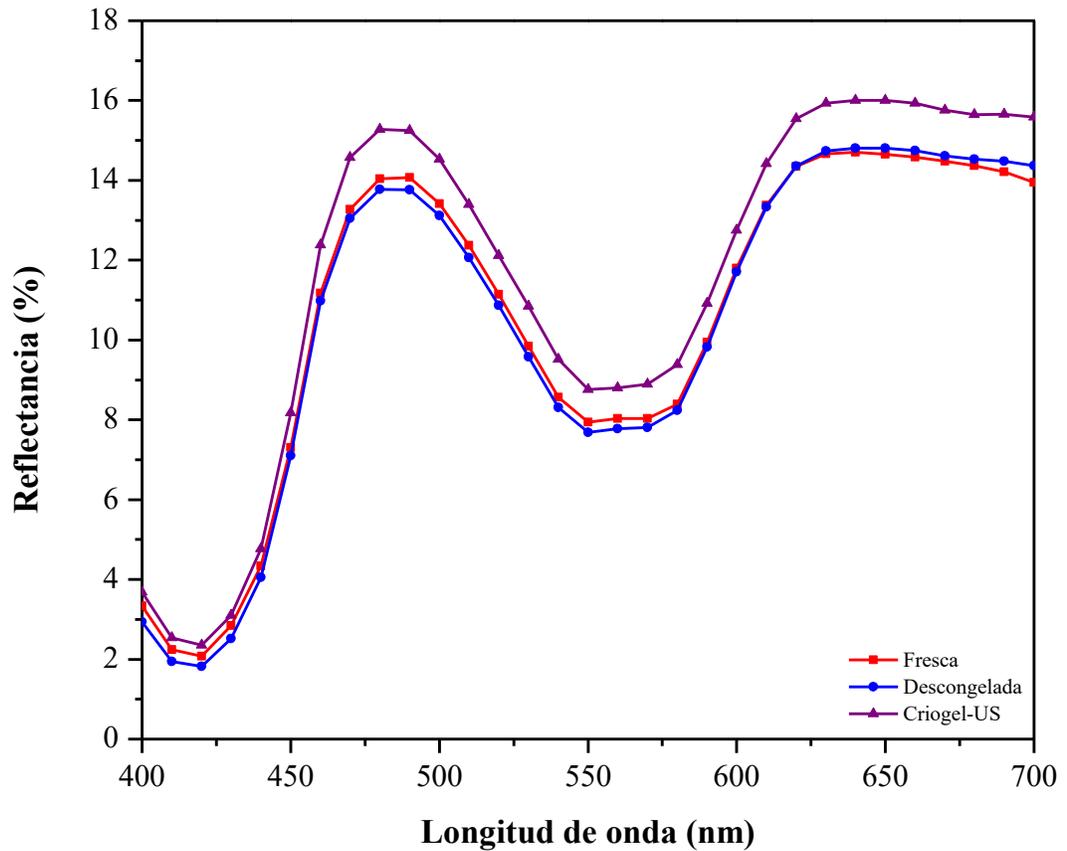


Figura 28. Espectro de reflectancia de las muestras cárnicas analizadas.

3.3.6 FRACCIÓN DE MIOGLOBINA SUPERFICIAL

Los valores de la fracción de mioglobina superficial obtenidos para la carne de cerdo se muestran en la Tabla 16; en la carne sin tratamiento, la desoximioglobina se encuentra en mayor concentración, seguida de la oximioglobina, indicando que el proceso de almacenamiento de la carne fue adecuado previo a la congelación, lo que conlleva a que la percepción del color se encuentre dentro de los estándares de calidad (AMSA, 2012).

El proceso de congelación-descongelación en cámara, generó las condiciones apropiadas para que la estructura nativa de la mioglobina se modifique por efectos de la oxigenación, incrementando la concentración de metamioglobina.

Tabla 16. Fracciones de mioglobina superficial de las muestras cárnicas analizadas.

	Fresca	Descongelada	Criogel-US
Desoximioglobina	0.3652 ± 0.0008	0.3598 ± 0.0012	0.3209 ± 0.0005
Oximioglobina	0.3490 ± 0.0012	0.2745 ± 0.0016	0.3339 ± 0.0008
Metamioglobina	0.2830 ± 0.0017	0.3640 ± 0.0009	0.3325 ± 0.0003
Promedio ± desviación estándar			

Por otra parte, la muestra con criogel-US propició por sí misma, un efecto que coadyuvó a la existencia de mayor concentración de oximioglobina, seguida por metamioglobina, demostrando que son condiciones adecuadas para tener un balance en la pigmentación acorde a lo que un consumidor esperaría, reflejándose en los valores obtenidos de pH, A_w y Luminosidad (L^*) de la superficie (Irie y Swatland, 1992; AMSA, 2012).

3.3.7 ESPECTROSCOPIA FTIR-ATR

En la Figura 29 se muestran los espectros para la carne fresca, carne sometida a congelación en cámara a $-25\text{ }^\circ\text{C}$ y descongelación controlada y carne con aplicación de criogel con US. A los 3270 cm^{-1} se tienen vibraciones de los grupos OH^- del agua presente en las muestras, indicando que aparentemente no existen cambios en función de la muestra.

Los datos en el intervalo de $1750\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ proporcionan información sobre los cambios bioquímicos que se producen por efecto de los procesos de congelación-descongelación y la aplicación de criogel con US. La banda que se encontró a los 1640 cm^{-1} fue debida a la cantidad de humedad (OH^-) y parte de las bandas de amidas primarias de las proteínas, indicando una interacción entre el agua contenida en las muestras y las principales proteínas cárnicas.

Se observó una segunda banda a los 1550 cm^{-1} , la cual es atribuida a la absorción de amidas secundarias (estiramiento entre C-N), seguida de otra banda a los 1745 cm^{-1} que corresponde a las grasas existentes (C=O éster carbonilo que estira la vibración de los triacilglicéridos).

Figura 29. Espectros de las muestras de carne (a) 4000 a 450 cm^{-1} , (b) 1750 a 1000 cm^{-1} .

Se observaron otras bandas de intensidad menor a 1458 cm^{-1} (grasas, tijereteo de CH_2), 1398 cm^{-1} (amidas, estiramiento de C-N), 1311 y 1246 cm^{-1} (aminas, estiramiento de C-N), 1166 y 1090 cm^{-1} (aminas, aminoácidos, estiramiento de C-N). También se observaron bandas a los 1016-1041 cm^{-1} (correspondiente a grupos C-O-C, de enlaces glucosídicos); 1292–1371 cm^{-1} (perteneciente a aminas y amidas terciarias); 1388–1486 cm^{-1} (C-H de grasas), 1529-1540 cm^{-1} de amidas secundarias y proteínas; y 1697-1726 cm^{-1} de grasas, amidas primarias y torsión de H-O-H del agua. Sin embargo, hubo ausencia de bandas que demostraran características específicas que reflejaran diferencias entre las muestras (Pedersen *et al.*, 2003).

En la Tabla 17 se tienen las principales vibraciones existentes en la carne de cerdo, comparadas con las reportadas por Pedersen *et al.* (2003); Papadopoulou *et al.* (2011) y Rohman *et al.* (2011).

Tabla 17. Principales vibraciones moleculares en la carne de cerdo.

Numero de onda (cm ⁻¹)	Grupo funcional	Compuesto
3270	-OH y -NH ₂	Agua, polímeros, proteínas.
2920 - 2850	-CH	Lípidos saturados
1740	-C=O	Lípidos insaturados
1640	-OH y -NH ₂ hidratados	Agua, polímeros, proteínas.
1540 - 1550	-NH	Prolina
1460 - 1310	-NH, -OH y -C=O	Mioglobina y proteínas miofibrilares

Las muestras con criogel revelaron la presencia de grupos OH⁻ relacionados con el contenido de agua, ubicadas en la onda de 3270 cm⁻¹, indicando que las muestras que tienen criogel propician que la señal transmitida por los enlaces sea mayor, debido a que el agua asociada no logra reflejar la luz IR con la misma intensidad, a diferencia de las muestras donde la cantidad de agua agrupada al polímero es menor.

Después de un proceso de congelación-descongelación, el espectro IR no evidencia diferencias estadísticamente significativas ($P > 0.05$) en comparación con las de la carne fresca, lo cual sugiere que cierta cantidad de almidón se pierde por exudado después de la descongelación.

En la zona de la huella digital, una banda a los 1670 cm⁻¹ mostró las señales de grupos hidroxilo, carbonilo y aminas primarias, las cuales estarían relacionadas con el contenido de aminoácidos de las proteínas de la carne. Papadopoulou *et al.* (2011) reportan que los aminoácidos con mayor presencia en las proteínas de la carne son lisina, arginina y ácido glutámico, cuyas cadenas laterales están relacionadas con interacciones fuertes con el agua y por lo tanto, con sus propiedades funcionales, en específico con la CRA.

3.3.8 ANÁLISIS DE FUERZA DE CORTE

La terneza de la carne se describe como uno de los factores más importantes en la satisfacción del consumidor, lo que ha llevado a una gran cantidad de investigación para comprender y evaluar esta propiedad. Sin embargo, existen distintos métodos para realizar el corte de las fibras musculares y tener un dato objetivo de la fuerza necesaria para la medición. En este caso se utilizó un instrumento que aplica una fuerza en dirección perpendicular a las fibras cárnicas para determinar el punto máximo de corte y poder relacionarse con la terneza.

Se obtuvieron los resultados de fuerza de corte (Figura 30) de las muestras analizadas, porque el proceso de congelación-descongelación genera un efecto relevante sobre esta variable. Para la carne fresca se obtuvo un valor promedio de 8.81 ± 0.60 kg_f, para la carne descongelada de 5.05 ± 0.95 kg_f y para la carne con criogel-US de 12.30 ± 0.11 kg_f. De acuerdo con la comparación de medias se encontró que existen diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) en relación con el proceso.

La congelación afecta primordialmente a las proteínas miofibrilares y el colágeno, generando menor resistencia al corte en comparación con la carne fresca. Este fenómeno propicia la desestabilización estructural y fisicoquímica de las miofibrillas, el crecimiento de cristales en forma no controlada modifica la funcionalidad de dichas proteínas, mejorando este atributo de calidad.

En la carne congelada-descongelada, el proceso generó importantes afectaciones a nivel estructural, al estar colapsada por el crecimiento sin control de los cristales de hielo, la fuerza mínima de la precarga incrementa el tiempo hasta 8.32 segundos en detectar una resistencia, a diferencia de la muestra fresca y criogel-US.

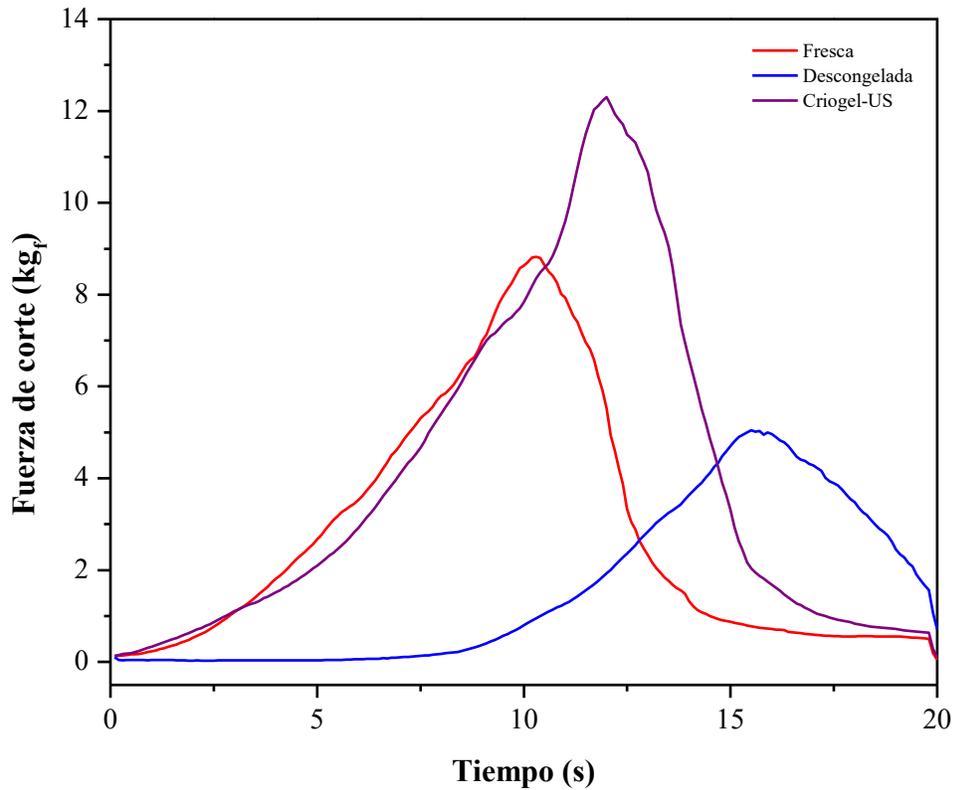


Figura 30. Fuerza de corte (kg_f) en las muestras de carne analizadas.

Otros factores que afectan la fuerza de corte de la carne son la pérdida por goteo, la temperatura, la molienda, el prensado y, en particular, la congelación-descongelación. Autores como Gap-Don *et al.* (2013) indican que hasta 18.27% de la pérdida por goteo se observa congelando-descongelando la carne de cerdo y es importante en la textura. Los exudados están estrechamente relacionados con la oxidación y desnaturalización de las proteínas musculares, que son responsables del deterioro del pH muscular, cambios en la A_w , modificaciones en el perfil de color y la fuerza de corte.

Para la muestra con criogel-US, existió un aumento en la fuerza de corte y en la fuerza requerida para destruir la muestra, indicando que al ser recubiertas las fibras cárnicas y controlar el tamaño de los poros donde se forman cristales de hielo, existe un efecto amortiguador, brindando mayor estabilidad a la estructura celular, evitando el colapso y no afectando los parámetros de calidad evaluados.

Al obtener las áreas bajo la curva de la Figura 30, se puede encontrar que es la fuerza requerida para realizar el corte, para la carne fresca se requiere de 56.57 ± 1.23 , para la carne congelada-descongelada de 31.91 ± 1.85 y para la muestra con criogel-US de 79.79 ± 0.98 , corroborando el efecto que tiene el proceso térmico y la crioprotección brindada con el polímero en la carne de cerdo comparado con los valores de fuerza de corte.

CONCLUSIONES

You'll be given love, you'll be taken care of, you'll be given love, you have to trust it. Maybe not from the sources, you have poured yours, maybe not from the directions, you are staring at. Twist your head around, it's all around you, all is full of love, all around you. All is full of love, you just ain't receiving, all is full of love, your phone... Björk

La caracterización de los hidro- y criogel, indicó que en las particularidades observadas de los sistemas analizados por calorimetría MDSC, reología, SEM y espectroscopia FTIR, el almidón con 2 ciclos de criogelificación es el que posee características similares a las obtenidas por el PVA y por consiguiente el más apto para su uso como crioprotector en la carne de cerdo.

En general para todos los polímeros analizados, los ciclos de criogelificación tienen cambios relevantes a nivel estructural que se ven reflejados en la superficie, con un ordenamiento más homogéneo en la matriz polimérica, aumento de la viscosidad y consistencia (parámetros reológicos) y todo relacionado directamente con cambios en las interacciones químicas propias de cada material.

Los cambios ocurridos propician repercusiones en las propiedades termodinámicas de cada polímero, favoreciendo modificaciones en la funcionalidad, siendo el almidón con dos ciclos de criogelificación, el que tiene las características más adecuadas y afines como crioprotector para la congelación de la carne, reduciendo hasta en un 75% el tamaño de los poros celulares.

El método y tiempo de aplicación del criogel tiene importantes efectos en la difusión de la superficie al centro de la muestra; esto es trascendental debido a que se tiene que asegurar que la matriz cárnica esté totalmente cubierta de almidón para así asegurar las interacciones agua-proteína-criogel y poder tener el control de los cristales intra- y extracelulares.

Los atributos de calidad evaluados (perfil de color, textura y mioglobina superficial) de las muestras de carne con criogel, difieren mínimamente con la carne fresca, indicando que el polímero no genera cambios perceptibles para los consumidores, llevando a cabo las modificaciones a nivel molecular y reflejándose directamente en la aceptación por el consumidor.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Agoub, A.A., Smith, A.M., Giannouli, P., Richardson, R.K., y Morris E.R. (2007). "Melt-in-the-mouth" gels from mixtures of xanthan and konjac glucomannan under acidic conditions: A rheological and calorimetric study of the mechanism of synergistic gelation. *Carbohydrated Polymers*, **69**, 713-724.
2. Agrawal, S.L., y Awadhia, A. (2004). DSC and conductivity studies on PVA based proton conducting gel electrolytes. *Bulletin of Material Science*, **27**(6), 523-527.
3. Aikawa, K., Matsumoto, K., Uda, H., Tanaka, S., Shimamura, H., Aramaki, Y., y Tsuchiya, S. (1998). Hydrogel formation of the pH response polymer polyvinylacetal diethylaminoacetate (AEA). *International Journal of Pharmaceutics*, **167**, 97-104.
4. American Meat Science Association [AMSA] (1995). Research Guidelines for cookery, sensory evaluation and instrumental tenderness measurements of fresh meat. Illinois, USA.
5. American Meat Science Association [AMSA] (2012). Meat color measurement guidelines. Illinois, USA.
6. AOAC. (2000). Official methods of analysis (17th. Ed.) In: Washington, D.C. IL: Association of Analytical Chemists.
7. Aouada, F.A., De-Moura, M.R., Fernandes, P.R.G., Rubira, A.F., y Muniz E.C. (2005). Optical and morphological characterization of polyacrylamide hydrogel and liquid crystal systems. *European Polymer Journal*, **41**, 2134-2141.
8. Arzeni, C., Martínez, K., Zema, P., Arias, A., Perez, O., y Pilosof, A. (2012). Comparative study of high intensity ultrasound effects on food proteins functionality. *Journal Food Engineering*, **108**, 463-472.
9. Awad, T., Moharram, H., Shaltout, O., Asker, D., y Youssef, M. (2012). Applications of ultrasound in analysis, processing and quality control of food: a review. *Food Research International*, **48**, 410-427.
10. Ball, S., Guan, H.P., James, M., Myers, A., Keeling, P., y Mouille, G. (1996). From glycogen to amylopectin: A model for the biogenesis of the plant starch granule. *Cell*, **86**, 349-352.
11. Bilanovic, D., Starosvetsky, J., y Armon, R.H. (2015). Cross-linking xanthan and other compounds with glicerol. *Food Hydrocolloids*, **44**, 129-135.
12. Brewer, M.S., Zhu, L.G., Bidner, B., Meisinger, D.J., y McKeith, F.K. (2001). Measuring pork color: effects of bloom time, muscle, pH and relationship to instrumental parameters. *Meat Science*, **57**, 169-176.
13. Bunn, C.W. (1948). Crystal structure of Polyvinyl alcohol. *Nature*, **161**, 929-930.
14. Byrne, M.E., Park, K., y Peppas, N.A. (2002). Molecular imprinting within hydrogels. *Advance Drug Delivery Reviews*, **54**, 149-161.

15. Cassel, B., y Packer, R. (2010). Modulated temperature DSC and the DSC 8500: A step up in performance. U.S.A.: PerkinElmer Inc.
16. Chirife, J., y Ferro-Fontan, C. (1982). Water activity of fresh foods. *Journal of Food Science*, **47**, 661-663.
17. Choi, Y., Lee, S.M., Chun, J., Lee, H.B., y Lee, J. (2006). Influence of heat treatment on the antioxidant activities and polyphenolic compounds of Shiitake (*Lentinus edodes*) mushroom. *Food Chemistry*, **99** (2), 381–387.
18. Ciolacu, D., Rudaz, C., Vasilescu, M., y Budtova, T. (2016). Physically and Chemically cross-linked cellulose cryogels: Structure, properties and application for controlled release. *Carbohydrate Polymers*, **151**, 392-400.
19. Coria, H.J., Méndez, A.A., Meléndez, P.R., Rosas M.M.E., y Arjona, R.J.L. (2018). Thermal, Structural, and Rheological Characterization of Waxy Starch as a Cryogel for Its Application in Food Processing. *Polymers*, **10** (359), 1-13.
20. Coria, H.J., Meléndez, P.R., Rosas, M.M.E., Llorente, B.A., y Arjona, R.J.L. (2017). Activation Energy for Protein Denaturation in Frozen and Freeze-Dried Pork Meat (*Longissimus thoracis*) by MDSC. *Arctic Journal*, **70** (7), 16-30.
21. Coviello, T., y Burchard, W. (1992). Criteria for the point of gelation in reversibly gelling systems according to dynamic light-scattering and oscillatory rheology. *Macromolecules*, **25**, 1011–1012.
22. Dalvi-Isfahan, M., Hamdami, N., Xanthakis, E., y Le-Bail, A. (2017). Review on the control of ice nucleation by ultrasound waves, electric and magnetic fields. *Journal of Food Engineering*, **195**, 222–234.
23. Dickenson, E. (2008). Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers. *Food Hydrocolloids*, **23**, 1473–1482.
24. Dobritoiu, R., y Patachia, S. (2013). A study of dyes sorption on biobased cryogels. *Applied Surface Science*, **285P**, 56-64.
25. Drobny, J.G. (2012). Polymers for electricity and electronics: Materials, properties, and applications. John Wiley & Sons.
26. El-Fray, M., Pilaszkievics, A., Swieszkowski, W., y Kurzydowski, K.J. (2007). Morphology assessment of chemically modified and cryostructures poly (vinyl alcohol) hydrogel. *European Polymer Journal*, **43**, 2035-2040.
27. El-Sayed, M.E.H., Hoffman, A.S., y Stayton, P.S. (2005). Rational design of composition and activity correlations for pH-sensitive and glutathione-reactive polymer therapeutics. *Journal of Controlled Release*, **101**, 47–58.
28. Fernández, P.P., Martino, M.N., Zaritzky, N.E., Guignon, B., y Sanz, P.D. (2007). Effects of locust bean, xanthan and guar gums on the ice crystals of sucrose solution frozen at high pressure. *Food Hydrocolloids*, **21**, 507–515.
29. Fujiwara, T., Yamaoka, T., y Kimura, Y. (2010). Thermo-responsive Biodegradable Hydrogels from Stereocomplexed Polylactides. In R. M. Ottenbrite, K. Park, & T.

- Okano (Eds.), *Biomedical Applications of Hydrogels Handbook*. New York, NY: Springer. pp. 157–178.
30. Gap-Don, K., Eun-Young, J., Hyun-Jung, L., Han-Sul, Y., Seon-Tea, J., y Jin-Yeong, J. (2013). Influence of meat exudates on the quality characteristics of fresh and freeze-thawed pork. *Meat Science*, **95**, 323-329.
 31. Giannakourou, M., (2015). Freezing. In: Varzakas, T., Tzia, C. (Eds.), *Handbook of Food Processing: Food Preservation*. CRC Press, Boca Raton, FL. pp. 259-296
 32. Giannouli, P., y Morris, E.R. (2003). Cryogelation of xanthan. *Food Hydrocolloids*, **17**, 495-501.
 33. Grinberg, V.Y., Burova, T.V., Haertlé, T., y Tolstoguzov V.B. (2000). Interpretation of DSC data on protein denaturation complicated by kinetic and irreversible effects. *Journal of Biotechnology*, **79**, 269-280.
 34. Gun'ko, V.M., Savina, I.N., y Mikhalovsky, S.V. (2013). Cryogels: Morphological, structural and adsorption characterization. *Advances in Colloid and Interface Science*, **187-188**, 1-46.
 35. Hoffman, A.S. (2012). Hydrogels for biomedical applications. *Advances Drug Delivery Reviews*, **64**, 18–23.
 36. Huijbrechts, A.M.L., Desse, M., Budtova, T., Franssen, M.C.R., Visser, G.M., Boeriu, C.G., y Sudhölter, E.J.R. (2008). Physicochemical properties of etherified maize starches. *Carbohydrates Polymers*, **74**, 170-184.
 37. Hulleman, S.H.D., Janssen, F.H.P., y Feil, H. (1998). The role of water during plasticization of native starches. *Polymer*, **39**, 2043-2048.
 38. Irie, M., y Swatland, H.J. (1992). Relationships between Japanese pork color standards and optical properties of pork before and after frozen storage. *Food Research International*, **25**, 21-30.
 39. Iseki, T., Takahashi, M., Hattori, H., Hatakeyama, T., y Hatakeyama, H. (2001). Viscoelastic properties of xanthan gum hydrogels annealed in the sol state. *Food Hydrocolloids*, **15**, 503-506.
 40. Jenkins, P.J., y Donald, A.M. (1995). The influence of amylose on starch granule structure. *International Journal of Biological Macromolecules*, **17**, 315-321.
 41. Kazemi, S., Ngadi, O.M., y Gariépy, C. (2009). Protein Denaturation in pork *Longissimus* muscle of a different quality groups. *Food Bioprocess Technology*, **4** (1), 102-106.
 42. Kiani, H., y Sun, D.W. (2011). Water crystallization and its importance to freezing of foods: a review. *Trends in Food Science and Technology*, **22** (8), 407-426.
 43. Knorr, D., Zenker, M., Heinz, V., y Lee, D. (2004). Applications and potential of ultrasonics in food processing. *Trends in Food Science and Technology*, **15**, 261–266.
 44. Kong, Y., y Hay, J.N. (2002). The measurement of the crystallinity of polymers by DSC. *Polymer*, **43** (14), 3873-3878.

45. Lamminen, M.O., Walker, H.W., y Weavers, L.K. (2004). Mechanisms and factors influencing the ultrasonic cleaning of particle-fouled ceramic membranes. *Journal of Membrane Science*, **237**, 213–223.
46. Le Cerf, D., Irinei, F., y Muller, G. (1990). Solution Properties of Gum Exudates from *Sterculia urens* (Karaya Gum). *Carbohydrate Polymers*, **13**, 375-386.
47. Leloup, V.M., Colonna, P., y Ring, S.G. (1992). Physico-chemical aspects of resistant starch. *Journal of Cereal Science*, **16**, 253–266.
48. Lesiów, T., y Xiong, Y.L. (2013). A simple, reliable and reproductive method to obtain experimental pale, soft and exudative (PSE) pork. *Meat Science*, **93**, 489-494.
49. Leygonie, C., Britz, T. J., y Hoffman, L. C. (2012). Impact of freezing and thawing on the quality of meat: Review. *Meat Science*, **91**, 93–98.
50. Li, H., Pordesimo, L., y Weiss, J. (2004). High intensity ultrasound-assisted extraction of oil from soybeans. *Food Research International*, **37**, 731–738.
51. Liu, H., Yu, L., Chen, L., y Li, L. (2007). Retrogradation of waxy corn starch after thermal treatment at different temperatures. *Carbohydrate Polymers*, **69**, 756–762.
52. Lourdin, D., Dellavalle, G., y Colonna, P. (1995). Influence of amylose content on starch films and foams. *Carbohydrate Polymers*, **27**, 261-270.
53. Lozinsky, V.I. (2002). Cryogels on the basis of natural and synthetic polymers: preparation, properties and application. *Uspekhi Khimii*, **71**, 559-585.
54. Lozinsky, V.I., Zubov, A.L., y Titova, E.F. (1997). Poly (vinyl alcohol) cryogels employed as matrices for cell immobilization. Entrapped cells resemble porous fillers in their effects on the properties of PVA-cryogel carrier. *Enzyme and Microbial Technology*, **20**, 182-190.
55. Lu, H.W., Zhang, L.M., Wang, C., y Chen, R.F. (2011). Preparation and properties of new micellar drug carriers based on hydrophobically modified amylopectin. *Carbohydrate Polymers*, **83**, 1499-1506.
56. Mansur, H.S., Oréfice, R.L., y Mansur, A.A.P. (2004). Characterization of poly (vinyl alcohol)/poly (ethylene glycol) hydrogels and PVA-derived hybrids by small-angle X-ray scattering and FTIR spectroscopy. *Polymer*, **45**, 7193-7202.
57. Matejtschuk, P. (2007). Cryopreservation and freeze-drying protocols. *Methods in molecular biology*, **368**, 59-72.
58. Mazur, P. (2004). Principles of cryobiology, In: Fuller B, Lane N, Benson EE (eds) *Life in the Frozen State*. CRC Press, London, pp. 3–66.
59. McClements, J.D. (1995). Advances in the application of ultrasound in food analysis and processing. *Trends in Food Science and Technology*, **6**, 293–299.
60. Meléndez, P.R., Arjona, R.J.L., Velázquez, C.R.R., Méndez, A.A., y Vázquez, D.A. (2011). On the thermal properties of frozen, refrozen and freeze drying porcine *Longissimus dorsi*. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, **10** (22), 2956-2960.

61. Mittal, H., Maity, A., y Ray, S.S. (2015). Synthesis of co-polymer-grafted gum karaya and silica hybrid organic–inorganic hydrogel nanocomposite for the highly effective removal of methylene blue. *Chemical Engineering Journal*, **279**, 166-179.
62. Morris, G.J., y Acton, E. (2013). Controlled ice nucleation in cryopreservation – A review. *Cryobiology*, **66** (2), 85-92.
63. Nair, M.N., Suman, S.P., Li, S., Ramanathan, R., y Mancini, R.A. (2014). Temperature-and pH-dependent effect of lactate on in vitro redox stability of red meat myoglobins. *Meat Science*, **96**, 408-412.
64. Nakagawa, K., y Nishimoto, N. (2011). Cryotopic gel formation for food nutrients encapsulation – A controllable processing of hydrogel by freezing. *Procedia Food Science*, **1**, 1968-1972.
65. Navarro, M., Michiradi, A., Castano, O., y Planell, J.A. (2008). Biomaterials in Orthopedic. *Journal of the Royal Society Interface*, **5**, 1137–1158.
66. Nguyen, L.T., Choi, W., Lee, S.H., y Jun, S. (2013). Exploring the heating patterns of multiphase foods in a continuous flow, simultaneous microwave and ohmic combination heater. *Journal Food Engineering*, **116** (1), 65–71.
67. Nur Hazirah, M.A.S.P., Isa, M.I.N., y Sarbon, N.M. (2016). Effect of xanthan gum on the physical and mechanical properties of gelatin-carboxymethyl cellulose film blends. *Food Packaging and Shelf Life*, **9**, 55-63.
68. Papadopoulou, O., Panagou, E.Z., Tassou, C.C., y Nychas, G.J.E. (2011). Contribution of Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy data on the quantitative determination of minced pork meat spoilage. *Food Research International*, **44**, 3264-3271.
69. Patachia, S., Dobritoiu, R., y Coviello, T. (2011). Determination of the sorption efficiency of Poly (Vinyl Alcohol)/Scleroglucan cryogels, against Cu²⁺ ions. *Environmental Engineering and Management Journal*, **10** (2), 193-198.
70. Patel, A.K., Bajpai, R., y Keller, J.M. (2014). On the crystallinity of PVA/palm leaf biocomposite using DSC and XDR techniques. *Microsystem Technologies*, **20**, 41-49.
71. Pedersen, D.K., Morel, S., Andersen, H.J., y Engelsen, S.B. (2003). Early prediction of water-holding capacity in meat by multivariate vibrational spectroscopy. *Meat Science*, **65**, 581-592.
72. Plieva, F.M., Galaev, I.Y., Noppe, W., y Mattiasson, B. (2008). Cryogel applications in microbiology. *Trends in Microbiology*, **16**, 543-551.
73. Prabhu, V.N. (2005). Heat Capacity in proteins. *Physical Chemistry*, **56**, 521-548.
74. Prieto, N., Roehle, R., Lavín, P., Batten, G., y Andrés, S. (2009). Application of near infrared reflectance spectroscopy to predict meat and meat products quality: A review. *Meat Science*, **83**, 175-186.

75. Rahman, M.S., Machado-Velasco, K.M., Sosa-Morales, M.E., y Velez-Ruiz, J.F. (2008). Freezing point: Measurement, data and prediction. In M. S. Rahman (Ed.), *Food Properties Handbook*. Boca Ratón: Taylor & Francis Group, LLC., CRC Press. pp. 153–192.
76. Regand, A., y Goff, H.D. (2003). Structure and ice recrystallization in frozen stabilized ice cream model systems. *Food Hydrocolloids*, **17**, 95-102.
77. Reid, D.S., y Fennema, O.R. (2007). Water and ice. In: Damodaran, S., Parkin, K.L., Fennema, O.R. (Eds.), *Fennema's Food Chemistry*, 4th ed CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 1782.
78. Ribero, G.G., Rubiolo, A.C., y Zorrilla, S.E. (2009). Microstructure of Mozzarella cheese as affected by the immersion freezing in NaCl solutions and by the frozen storage. *Journal of Food Engineering*, **91** (4), 516–520.
79. Rohman, A., Siswindari, Erwanto, Y., y Che Man, Y.B. (2011). Analysis of pork adulteration in beef meatball using Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. *Meat Science*, **88**, 91-95.
80. Sakai, A. (2004). Plant cryopreservation. In: Fuller B, Lane N, Benson EE (eds) *Life in the Frozen State*. CRC Press, London, New York, pp. 329–345.
81. Seetapan, N., Limparyoon, N., Fuongfuchat, A., Gamonpilas, C., y Methacanon, P. (2016). Effect of freezing rate and starch granular morphology on ice formation and non-freezable water content of flour and starch gels. *International Journal of Food Properties*, **19**, 1616-1630.
82. Shalviri, A., Liu, Q., Abdekhodaie, M.J., y Wu, X.Y. (2010). Novel modified starch-xanthan gum hydrogels for controlled drug delivery: Synthesis and characterization. *Carbohydrate Polymers*, **79**, 898-907.
83. Shi, M., Chen, Y., Yu, S., y Gao, Q. (2013). Preparation and properties of RS III from waxy maize starch with pullulanase. *Food Hydrocolloids*, **33**, 19-25.
84. Silva, G.G.D., Sobral, P.J.A., Carvalho, R.A., Bergo, P.V.A., Mendieta-Taboada, O., y Habitante, A.M.Q.B. (2008). Biodegradable films based on blends of gelatin and poly (vinyl alcohol): Effect of PVA type or concentration on some physical properties of films. *Journal Polymer Environmental*, **16**, 276-285.
85. Skrlep, M., y Candek-Potokar, M. (2006). Pork color measurement as affected by bloom time and measurement location. *Journal of Muscle Foods*, **18**, 78-87.
86. Small, H., Boyack, K.W., y Klavans, R. (2014). Identifying emerging topics in science and technology. *Research Policy*, **48** (8), 1450–1467.
87. Sudhamania, S.R., Prasad, M.S., y Udaya-Sankar, K. (2003). DSC and FTIR studies on gellan and polyvinyl alcohol (PVA) blend films. *Food Hydrocolloids*, **17**, 245-250.
88. TA Instruments. (2012). Thermal analysis review, Modulated DSC™ theory. Germany: Thermal Analysis and Rheology

89. Tang, J., Faustman, C., y Hoagland, T.A. (2004). Krzywicki revisited: Equations for spectrophotometric determination of myoglobin redox forms in aqueous meat extracts. *Journal of Food Science*, **69** (9), 717-720.
90. Tao, Y., Zhang, R., Xu, W., Bai, Z., Zhou, Y., Zhao, S., Xu, Y., y Yu, D. (2016). Rheological behavior and microstructure of release-controlled hydrogels based on xanthan gum crosslinked with sodium trimetaphosphate. *Food Hydrocolloids*, **52**, 923-933.
91. Tecante, A., y Doublier, J.L. (1999). Steady flow and viscoelastic behavior of crosslinked waxy corn starch-k-carrageenan pastes and gels. *Carbohydrate Polymers*, **40**, 221-231.
92. Tester, R.F., Karkalas, J., y Qi, X. (2004). Starch-composition, fine structure and architecture. *Journal of Cereal Science*, **39** (2), 151-165.
93. Truesdell, C. (1974). The meaning of viscometry in fluid dynamics. *Annual Review of Fluid Mechanics*, **6**, 111-146.
94. Ulery, B.D., Nair, L.S., y Laurencin, C.T. (2011). Biomedical applications of biodegradable polymers. *Journal of Polymer Science Part B. Polymer Physics*. **49**, 832-886.
95. Van Krevelen, D.W., y Te Nijenhuis, K. (2009). Properties of polymers: Their correlation with chemical structure; their numerical estimation and prediction from additive group contributions. Elsevier.
96. Van Soest, J.J.G., Hulleman, S.H.D., de Wit, D., y Vliegthart, J.F.G. (1996). Crystallinity in starch bioplastics. *Industrial Crops and Products*, **5**, 11-22.
97. Wang, S., Wang, J., Yu, J., y Wang, S. (2014). A comparative study of annealing of waxy, normal and high-amylose maize starches: The role of amylose molecules. *Food Chemistry*, **164**, 332-338.
98. Zarkadas, D., y Mitrakas, M. (1999). On the applicability of a plug flow immersion freezer: Theoretical considerations. *LWT-Food Science and Technology*, **32** (8), 548-552.
99. Zheng, F., Gao, Q.Y., Han, Z., Zeng, X.A., y Yu, S.J. (2016). Structural properties and digestibility of pulsed electric field treated waxy rice starch. *Food Chemistry*, **194**, 1313-1319.
100. Zhou, G.H., Xu, X.L., y Liu, Y. (2010). Preservation technologies for fresh meat – A review. *Meat Science*, **86**, 119–128.

ANEXO A. ANÁLISIS DE LOS CRIOGELES DE XANTANA

Calorimetría MDSC

Para el caso de las muestras elaboradas con xantana se encontró que en la primera transición importante (fusión), se aprecia en la Figura A1a que no existen diferencias importantes en el flujo de calor, encontrándose que la temperatura oscila entre los 4 y 6 °C para todas las muestras sin importar el número de ciclos de criocongelación. Así mismo corroborado con la derivada del flujo de calor de la Figura A1b, en función de la temperatura, se muestra que no existen diferencias estadísticamente significativas ($P>0.05$) en este evento térmico, y por consiguiente no se diferencia la existencia de cambios cinéticos y/o estructurales.

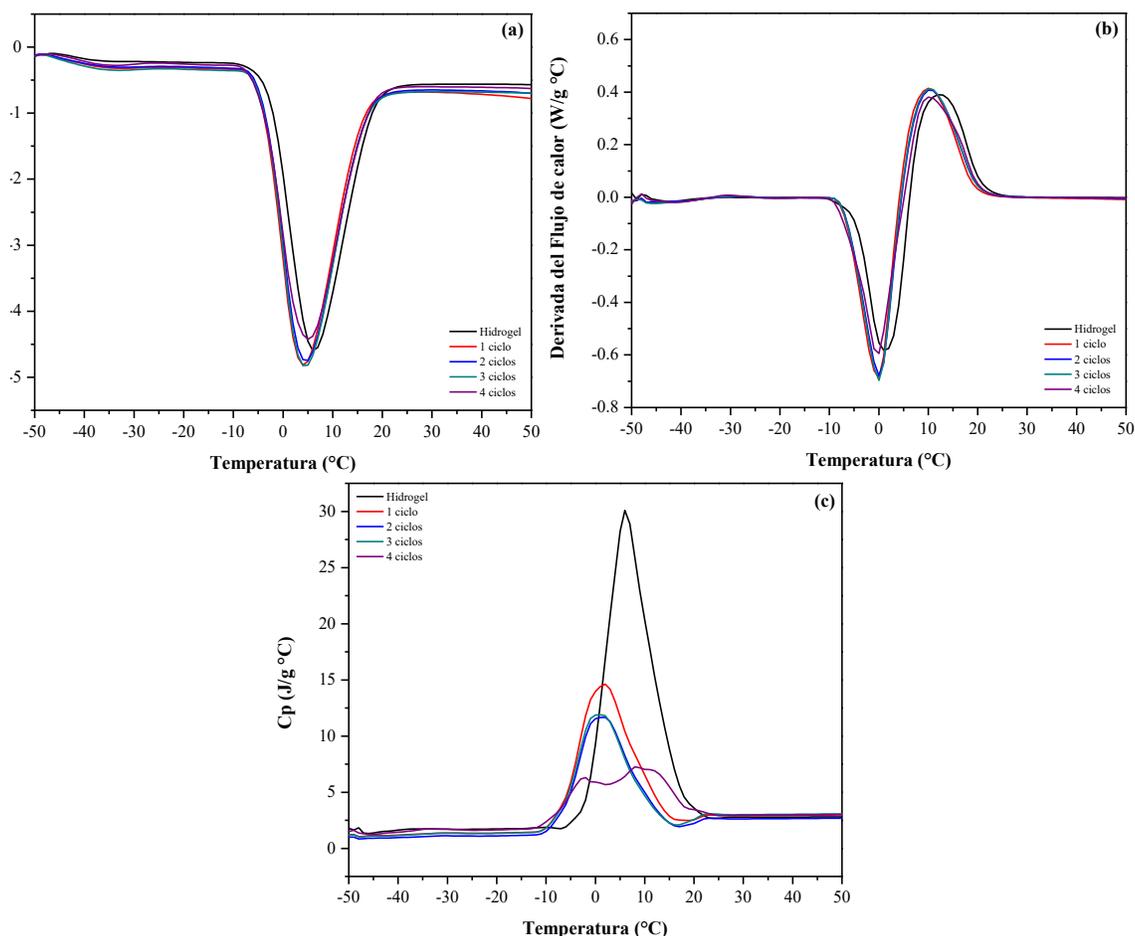


Figura A1. Fusión del hidrogel y los criogeles de xantana. (a) Flujo de calor total, (b) Derivada del flujo de calor en función de la temperatura, (c) Calor específico.

Para determinar si existen cambios, se determinaron los cambios en el C_p , la Figura A1c muestra que existen importantes modificaciones en la estructura conformacional de la xantana en función al número de ciclos de congelación-descongelación para su formación como criogel y reacomodo de la matriz.

Se encontró que los mayores cambios estructurales se encuentran en el hidrogel, y que de acuerdo con el número de ciclos de congelación-descongelación para su formación como sistema criogelificado, el valor del C_p disminuye considerablemente durante la fusión, esto es indicativo del reacomodo de la estructura del gel a una conformación más estable, lo que es característico de un polímero criocongelado.

A diferencia de los cambios durante la fusión de la xantana, los presentados durante la evaporación, son diferentes en función al número de ciclos para la formación del sistema criogelificado; se muestra en la Figura A2a en el flujo de calor hay modificaciones importantes no solo en el valor de la entalpía, sino principalmente en la temperatura de evaporación del agua en cada sistema.

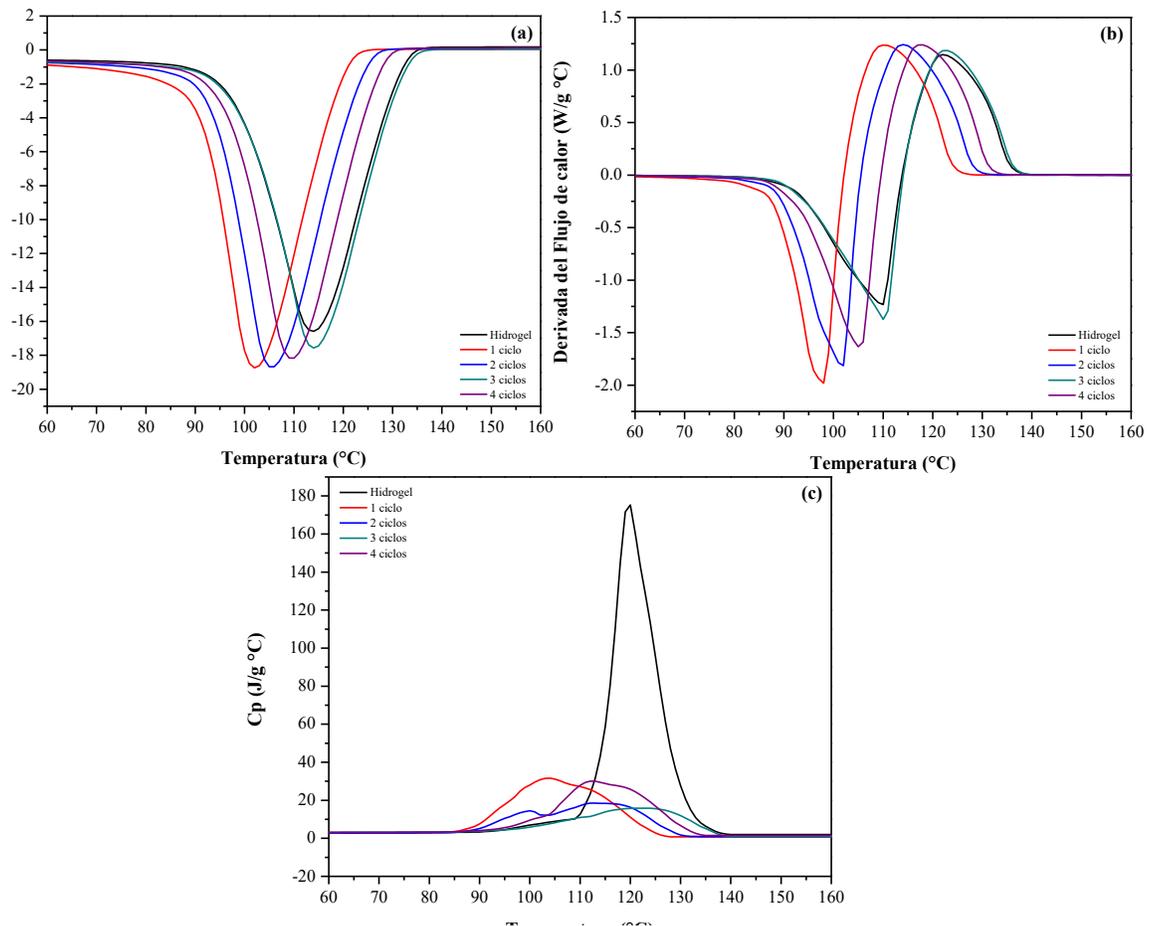


Figura A2. Evaporación del hidrogel y los criogeles de xantana. **(a)** Flujo de calor total, **(b)** Derivada del flujo de calor en función de la temperatura, **(c)** Calor específico.

El flujo de calor existente en las muestras de criogel fue mayor a diferencia que el del hidrogel. Con la derivada del flujo de calor presentado en la Figura A2b, se determinó que efectivamente existen diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) en la temperatura inicial y máxima de evaporación.

Las alteraciones en la estructura de los polímeros fueron analizadas con el Cp, la Figura A2c presenta que el mayor cambio ocurrido es en el hidrogel, indicando que después del primer ciclo de criogelificación, la estructura está de cierta manera más estable a la evaporación, sin existir posibles reacomodos en la estructura que propicien afectaciones al Cp.

En la Tabla A1 se muestran las temperaturas de las diferentes transiciones, así como los gastos energéticos, encontrándose dos eventos térmicos importantes que no se aprecian con facilidad en el flujo de calor, ni en el Cp, pero que de igual forma se encuentran estrechamente relacionados con los cambios tanto estructurales como cinéticos durante la formación del criogel, siendo uno de ellos a temperaturas de congelación y el otro superiores a las temperaturas de evaporación.

Tabla A1. Transiciones y gastos energéticos del hidro- y los criogeles de xantana.

	T_i [°C]	T_f [°C]	ΔH [J/g]
Sin ciclo	-24.84	-19.02	0.09
	-2.76	6.18	329.80 [†]
	98.70	113.86	2114.00 [♦]
	147.29	149.87	0.02
Ciclo 1	-47.89	-35.18	3.90
	-4.10	4.06	339.30 [†]
	91.01	102.13	2076.00 [♦]
	132.96	137.11	0.05
Ciclo 2	-47.95	-35.25	4.04
	-3.79	4.49	334.80 [†]
	93.80	105.57	2104.00 [♦]
	152.22	155.81	0.04
Ciclo 3	-47.89	-35.55	6.90
	-3.82	4.37	341.30 [†]
	100.03	114.10	2130.00 [♦]
	143.66	172.05	0.03
Ciclo 4	-44.92	-35.40	5.89
	-4.18	5.04	331.60 [†]
	96.87	109.59	2103.00 [♦]
	140.35	143.95	0.05

[†]: Entalpía de fusión ($\Delta H_{\text{fusión}}$) de los cristales de hielo

[♦]: Entalpía de evaporación ($\Delta H_{\text{evaporación}}$)

Grado de Orden Estructural

Para el caso de la goma xantana el máximo nivel de orden estructural (Tabla A2) se alcanza con 3 ciclos, ya que después de este número de eventos ocurre una desestabilización de las cadenas poliméricas para la formación de una red tridimensional (Giannouli y Morris, 2003). La desestabilización propicia el incremento de la parte amorfa, ya sea porque las ramificaciones se doblan hacia atrás, o sobresalen en ángulos rectos de la cadena principal (parte lineal), pero, la conformación que no está cerca de las ramificaciones de la cadena celulósica explicaría mejor su extraordinaria estabilidad.

Tabla A2. Porcentaje de orden estructural de las dispersiones de los hidro- y los criogeles de xantana.

Hidrogel	93.43 ± 0.48
1 ciclo	92.34 ± 0.55
2 ciclos	94.36 ± 0.71
3 ciclos	95.55 ± 0.92
4 ciclos	92.17 ± 0.34
Promedio ± desviación estándar	

Análisis SEM

Para la xantana (Figura A3) se tiene un comportamiento de red de gel característico de este polímero, en el que se observa que el proceso de criogelificación tiene implicaciones importantes acorde a lo reportado por Giannouli y Morris, (2003). A partir del tercer ciclo la estructura ya no se modifica, esto debido a que la cristalinidad alcanza su mayor grado, generando poros homogéneos en tamaño donde se atrapa agua, misma que sirve para el proceso de cristalización, ayudando así a controlar el número y tamaño de cristales.

Posiblemente al tercer ciclo de criogelificación exista una formación por asociación de conjuntos moleculares mayores, aunque podrían ser interacciones de unión o dimerización entrelazada (formación de dobles hélices coaxiales) que se llevan a cabo durante el ordenamiento conformacional y se encuentran estrechamente relacionados con el grado de orden estructural que presenta el polímero.

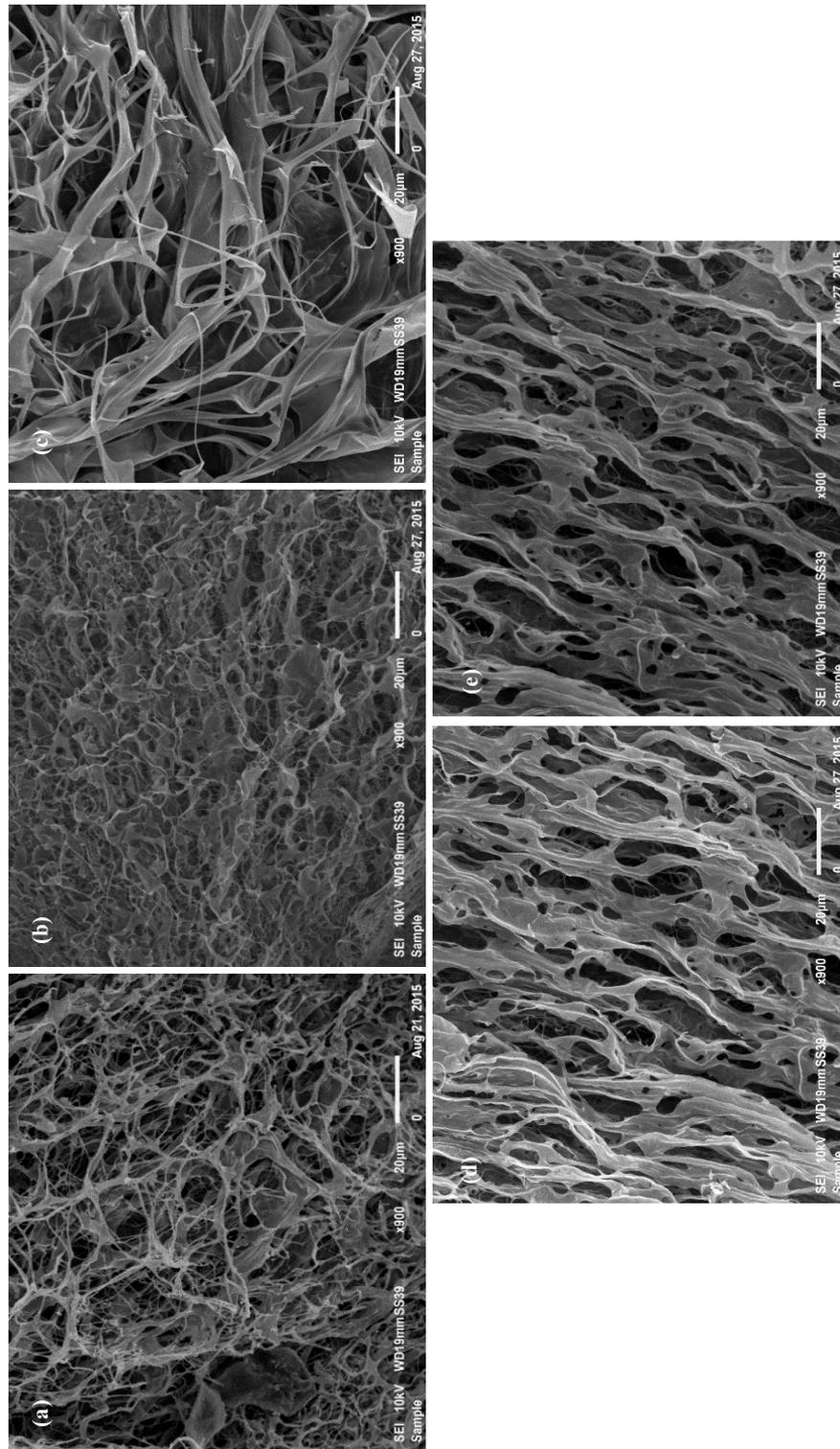


Figura A3. Estructura a 900× de los hidro- y los criogel de xantana a diferentes ciclos de congelación-descongelación. (a) hidrogel, (b) ciclo 1, (c) ciclo 2, (d) ciclo 3, (e) ciclo 4.

En la Figura A4 se observa que en el tercer y cuarto ciclo de criogelificación no presentan diferencias estadísticamente significativas ($P>0.05$) para el tamaño de los poros, siendo el ciclo 3 el que posee mayor grado de ordenamiento estructural generando poros más homogéneos en todo el sistema polimérico.

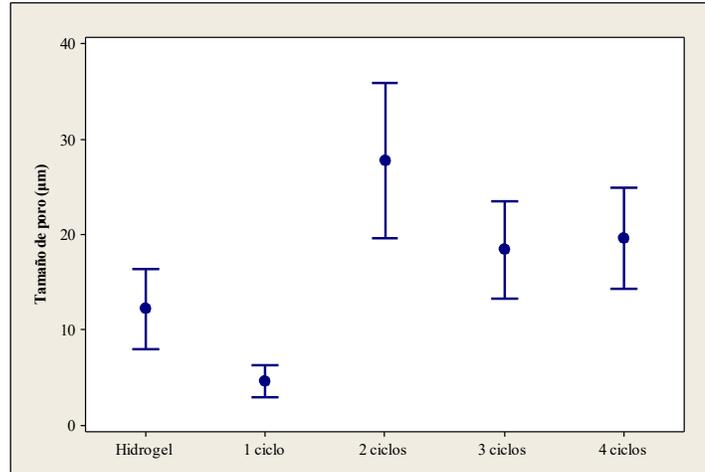


Figura A4. Tamaños de poros de los hidro- y los criogeles de xantana.

Reología rotacional

Para el caso de los hidro- y los criogeles de xantana, el comportamiento observado en la Figura A5, es de materiales fluidificantes a la cizalla (Iseki *et al.*, 2001; Tao *et al.*, 2016), indicando que son fluidos menos espesos cuando se someten a altas velocidades de corte y que su viscosidad solo depende de la velocidad y no de otros factores.

Aparentemente esta característica de la xantana en dispersión favorece la aplicación en un sistema debido a estas propiedades reológicas, ya que, a viscosidades bajas la difusión que puede existir al interior de una matriz alimenticia sería mejor y, se aseguraría la protección de forma homogénea.

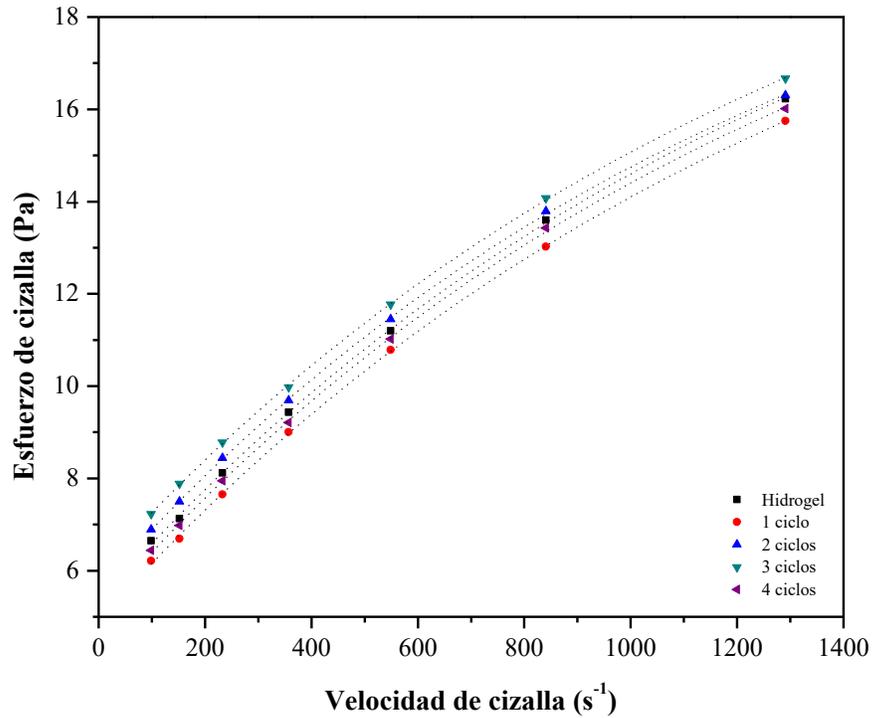


Figura A5. Comportamiento reológico del hidro- y los criogeles de xantana.

Esto se corrobora con la determinación de los parámetros reológicos n y k de la Tabla A3 donde se tienen valores menores a 1, clasificándolo dentro de la categoría de fluidos fluidificantes a la cizalla.

Tabla A3. Parámetros reológicos de fluidos Ostwald de Waele de los hidro- y los criogeles de xantana.

	k	n
Hidrogel	$1.20 \pm 1 \times 10^{-3}$	$0.36 \pm 2 \times 10^{-4}$
1 ciclo	$1.05 \pm 9 \times 10^{-4}$	$0.37 \pm 2 \times 10^{-3}$
2 ciclos	$1.35 \pm 1 \times 10^{-3}$	$0.34 \pm 1 \times 10^{-3}$
3 ciclos	$1.50 \pm 2 \times 10^{-3}$	$0.33 \pm 2 \times 10^{-3}$
4 ciclos	$1.13 \pm 8 \times 10^{-4}$	$0.36 \pm 2 \times 10^{-3}$

Promedio \pm desviación estándar

Espectroscopía FTIR-RD

En la Figura A6 se tienen los espectros FTIR de las muestras de xantana en polvo, hidrogel y criogeles con diversos ciclos de congelación, por lo que se tiene que a los 3450 cm^{-1} existen vibraciones de estiramiento de los OH^- asociadas a los grupos inter- e intramoleculares libres en forma de dímeros de las glucosas (Tao *et al.*, 2016).

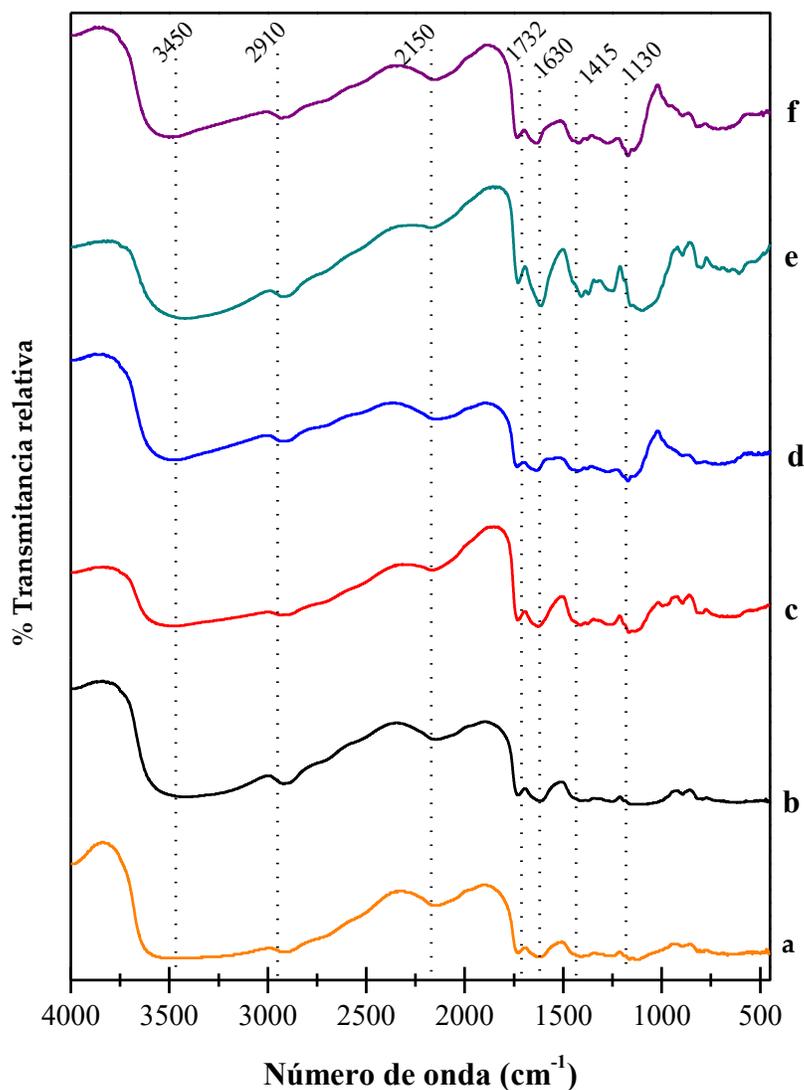


Figura A6. Espectros FTIR-RD de goma xantana. (a) polvo, (b) hidrogel, (c) 1 ciclo, (d) 2 ciclos, (e) 3 ciclos, (f) 4 ciclos.

A los 2910 cm^{-1} se presenta una banda que indica los estiramientos axiales de los grupos CHO y C-H, así como, vibraciones asimétricas de los grupos metilenos CH_2 . Se presenta una banda a los 2150 cm^{-1} que indica las vibraciones de estiramiento entre los grupos $\text{C}=\text{C}=\text{O}$ (cetenos) característico de los polisacáridos naturales. A los 1732 cm^{-1} se presentan movimientos de los grupos carbonilo indicando la sal (COO^-) y el ácido (COOH) que coexisten en las cadenas de manosa internas de la xantana. También a los 1630 cm^{-1} se tienen flexiones axiales de los enoles $\text{C}=\text{O}$ (dicetonas), así como un estiramiento de los ésteres de ácido galacturónico metilado del polímero.

Otra banda aparece a los 1415 cm^{-1} que indica flexión de los aniones carboxilato $\text{C}=\text{O}$ y de hidroxilo (OH^-), así como torsión de tijera en los metilenos terminales (CH_2) de la cadena de xantana. Por último, a los 1130 cm^{-1} se tienen estiramientos asimétricos de grupos éter alifático C-O-C, indicando también la presencia de grupos libres de C-OH terciarios (Shalviri *et al.*, 2010; Bilanovic *et al.*, 2015; Nur Hazirah *et al.*, 2016).

ANEXO B. ANÁLISIS DE CRIOGELES DE KARAYA
Calorimetría MDSC

Para el caso de la goma karaya, la Figura B1a muestra que el flujo de calor y la temperatura durante la fusión entre el hidro- y los criogeles no se ve modificado en función al número de ciclos de congelación-descongelación, siendo indicativo que la suma tanto de los eventos cinéticos como estructurales no se ve alterado por el proceso de re-arreglo de la matriz polimérica.

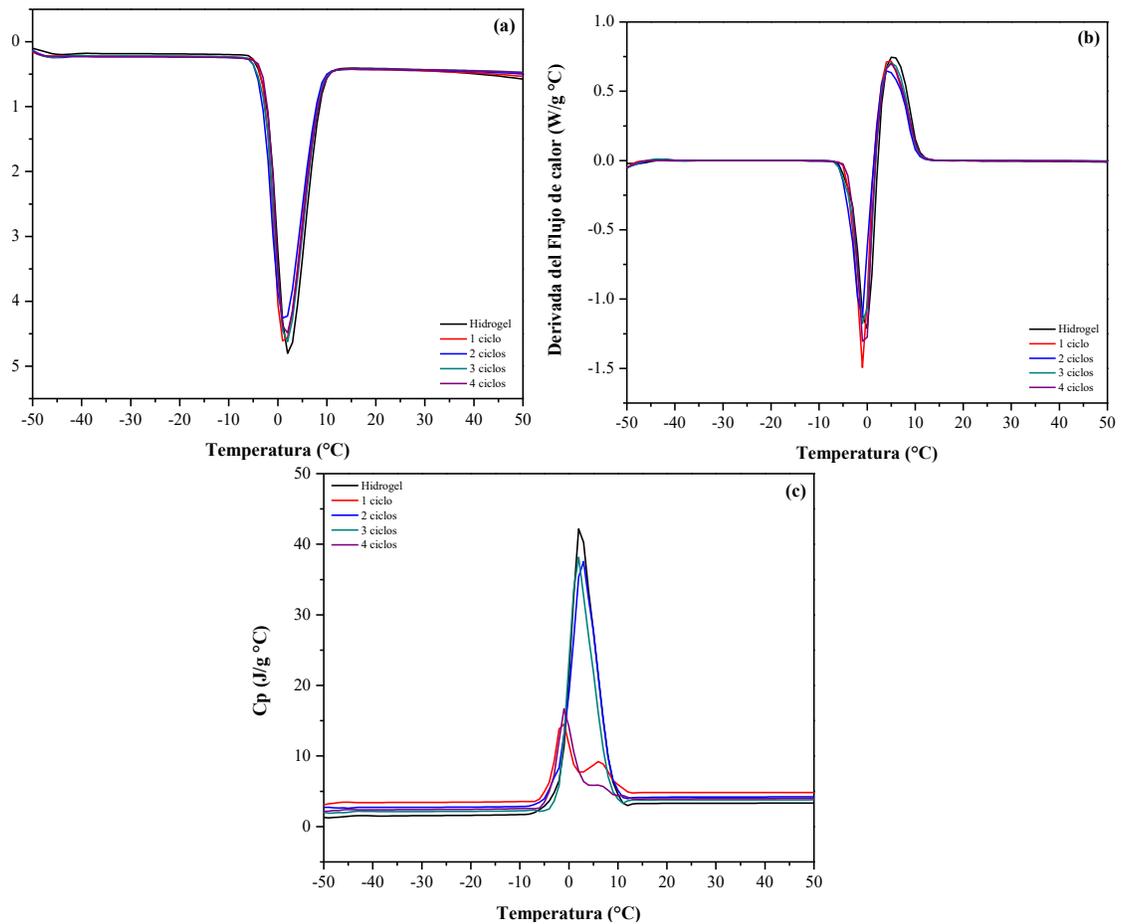


Figura B1. Fusión del hidro- y criogeles de karaya. (a) Flujo de calor total, (b) Derivada del flujo de calor en función de la temperatura, (c) Calor específico.

En la fusión, aparentemente no existen cambios relevantes, tanto en el flujo de calor, como en la derivada, aunque el calor específico (Figura B1c) muestra las variaciones estructurales

durante el primer y cuarto ciclo de congelación-descongelación, indicando que existe la posibilidad de modificaciones importantes por efectos de la criogelificación.

Para el caso de la evaporación, se observan modificaciones más notorias en el flujo de calor desplazándose en función al número de ciclos, por lo que se deduce la existencia tanto de cambios estructurales como cinéticos, siendo los primeros los de mayor importancia. La Figura B2a presenta que a partir del ciclo 1 de congelación-descongelación existe la variación molecular más relevante, interpretándose como un reacomodo para formar una red de gel más homogénea y estable.

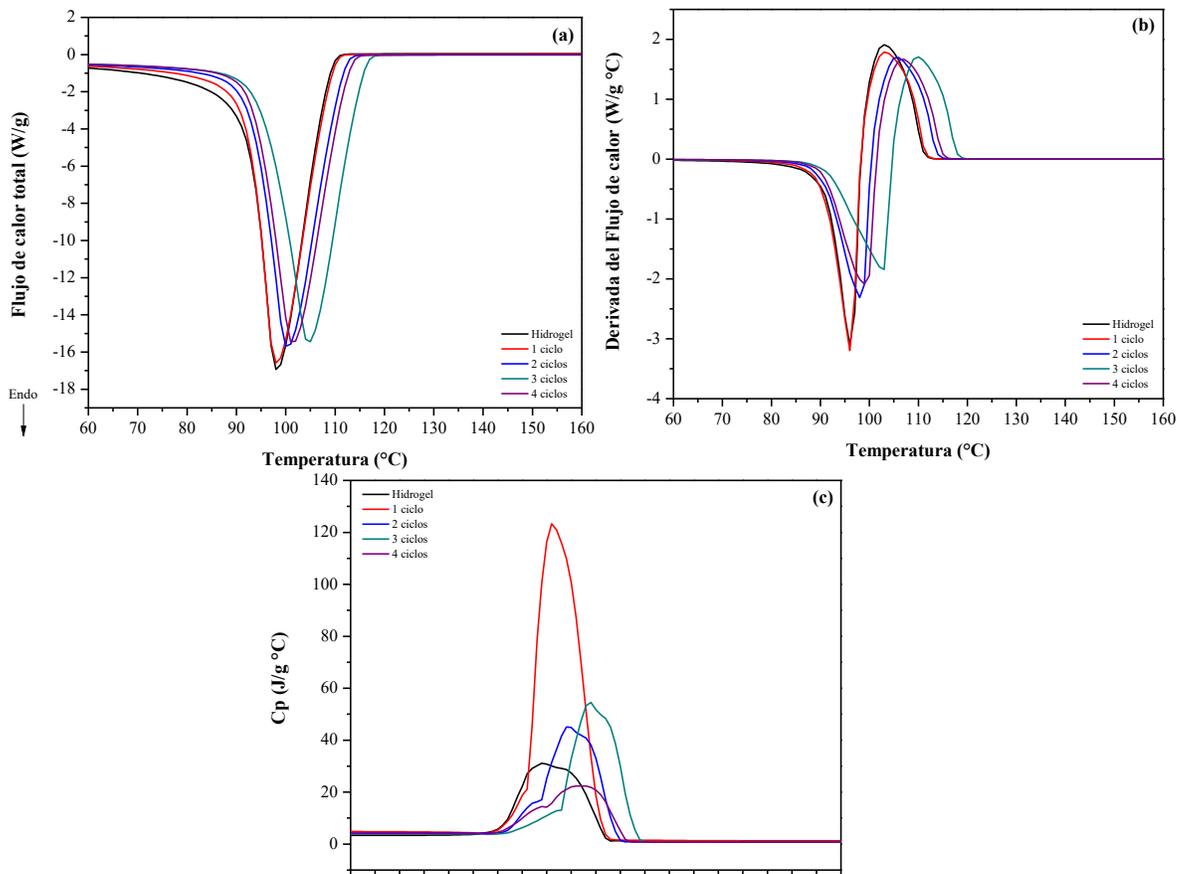


Figura B2. Evaporación del hidro- y los criogeles de karaya. **(a)** Flujo de calor total, **(b)** Derivada del flujo de calor en función de la temperatura, **(c)** Calor específico.

Los principales cambios energéticos existentes para la criogelificación de la goma karaya se muestran en la Tabla B1 la cual muestra que existe concordancia con los valores en las transiciones de fusión y evaporación.

Tabla B1. Transiciones y gastos energéticos del hidro- y los criogeles de karaya.

	T_i [°C]	T_f [°C]	ΔH [J/g]
Sin ciclo	-50.44	-44.91	3.14
	-2.39	2.18	385.00 [†]
	92.19	98.23	2628.00 [♦]
	141.26	151.00	0.02
Ciclo 1	-2.52	1.34	359.50 [†]
	92.29	98.21	2191.00 [♦]
	165.53	169.48	0.03
Ciclo 2	-51.11	-46.14	4.90
	-38.94	-35.45	0.16
	-3.21	1.40	353.00 [†]
	93.11	100.39	2104.00 [♦]
	158.23	164.54	0.06
Ciclo 3	-51.02	-46.76	4.61
	-39.97	-36.52	0.47
	-2.79	1.75	373.70 [†]
	95.78	104.62	2301.00 [♦]
	160.80	167.72	0.04
Ciclo 4	-51.02	-47.68	3.85
	-41.77	-37.93	0.26
	-2.17	1.65	348.70 [†]
	93.34	101.44	2298.00 [♦]
	159.58	166.03	0.03

[†]: Entalpía de fusión ($\Delta H_{\text{fusión}}$) de los cristales de hielo

[♦]: Entalpía de evaporación ($\Delta H_{\text{evaporación}}$)

Grado de Orden Estructural

La goma karaya como hidrogel tiene en mayor proporción su fracción cristalina (Tabla B2) y en caso contrario ocurre que, al momento de la criogelificación del sistema, esta porción va disminuyendo y por consiguiente su fracción amorfa se incrementa.

La disminución de las zonas ordenadas en la matriz polimérica ocasiona que no exista un posible equilibrio fisicoquímico del sistema lo que conlleva a afectaciones estructurales, que puede traducirse también en su morfología por SEM, donde no hay un arreglo homogéneo en la formación de redes tridimensionales de gel.

Tabla B2. Porcentaje de orden estructural de las dispersiones de los hidro- y los criogeles de karaya.

Hidrogel	87.16 ± 0.68
1 ciclo	79.89 ± 1.21
2 ciclos	80.40 ± 1.38
3 ciclos	84.48 ± 1.74
4 ciclos	78.28 ± 1.91
Promedio ± desviación estándar	

Análisis SEM

En la Figura B3 se observa el comportamiento de la goma karaya, mostrando que efectivamente el polímero tiene cambios notables en su estructura (Mittal *et al.*, 2015), y a diferencia de la xantana, se encuentra al sistema en un arreglo heterogéneo en número y forma de poros, lo que impide que exista un control de la cristalización del agua y, por consiguiente, generando una mayor variabilidad en el tamaño y número de cristales de hielo.

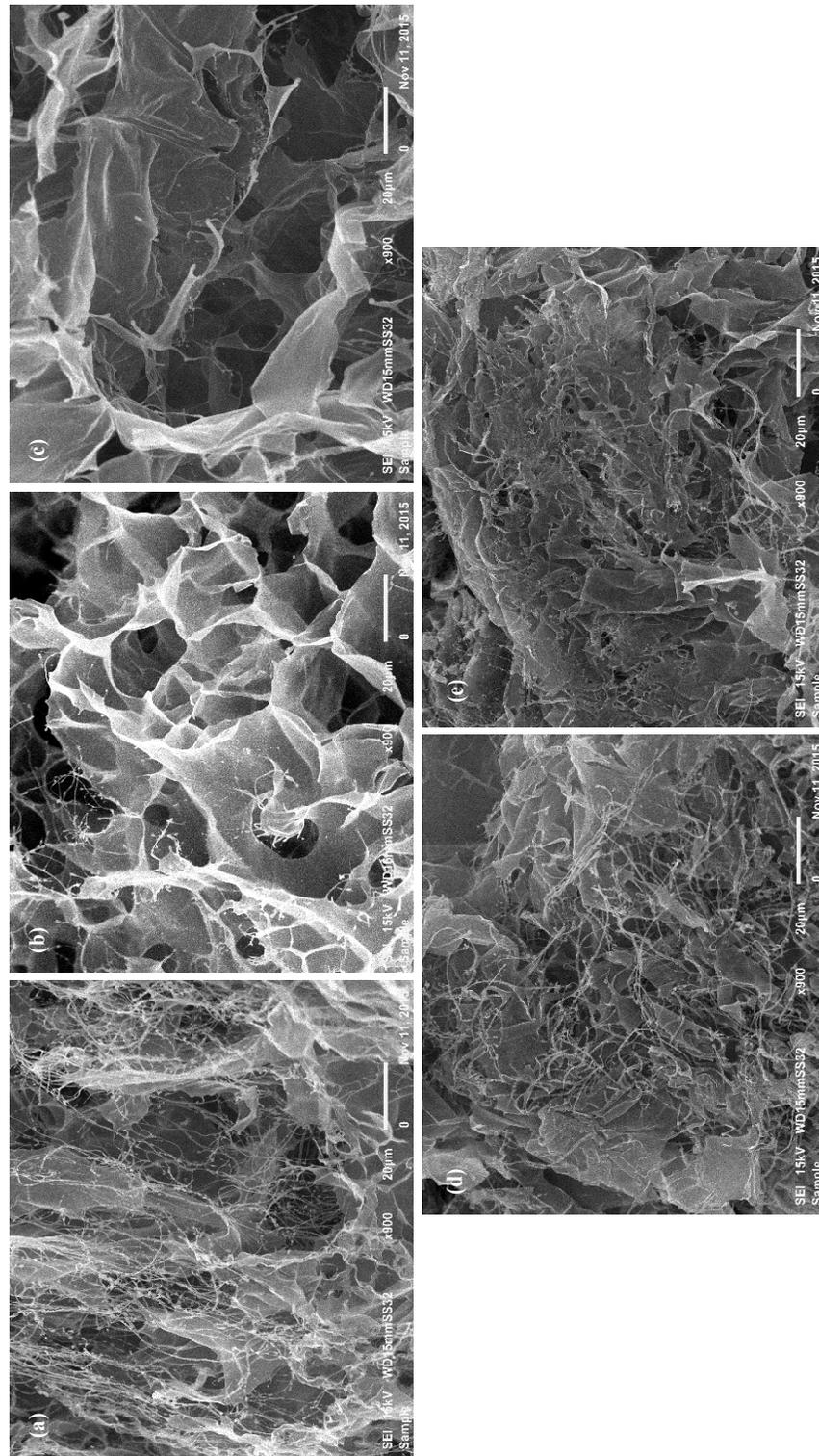


Figura B3. Estructura a 900× de la goma karaya a diferentes ciclos de congelación-descongelación.

(a) hidrogel, (b) ciclo 1, (c) ciclo 2, (d) ciclo 3, (e) ciclo 4.

Esta estructura también tiene relación directa con el grado de orden estructural de los geles, ya que al ser el hidrogel el que aparentemente tiene mayor arreglo y conforme se incrementan los ciclos de criogelificación, la parte amorfa de los criogeles se incrementa, dando menos estabilidad fisicoquímica al polímero e impidiendo las condiciones adecuadas para su aplicación en carne, modificando así el tamaño y distribución de poros (Figura B4).

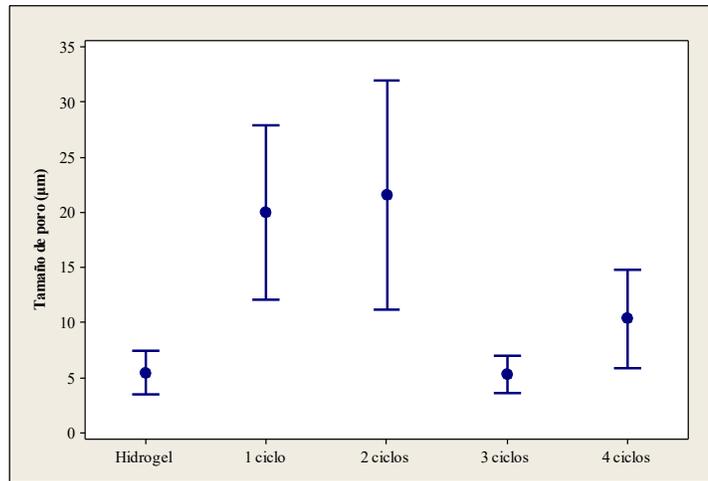


Figura B4. Tamaños de poros del hidro- y los criogeles de karaya.

Reología rotacional

Las dispersiones de karaya de acuerdo con el perfil reológico, tuvieron un comportamiento de materiales espesantes a la cizalla (Tecante y Doublier, 1996; Shi *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2014), es decir, la viscosidad se incrementa al aumentar la velocidad de corte, esto debido a que las altas concentraciones de partículas generan mayor colisión y por consiguiente existe un mayor contacto entre ellas (Figura B5). Esto se puede corroborar, ya que, al obtener la regresión potencial, se obtienen los parámetros reológicos (Tabla B3), los cuales son k y n , siendo para todas las muestras mayor a 1, lo que de acuerdo con la teoría clasifica a estos fluidos como “espesantes a la cizalla”.

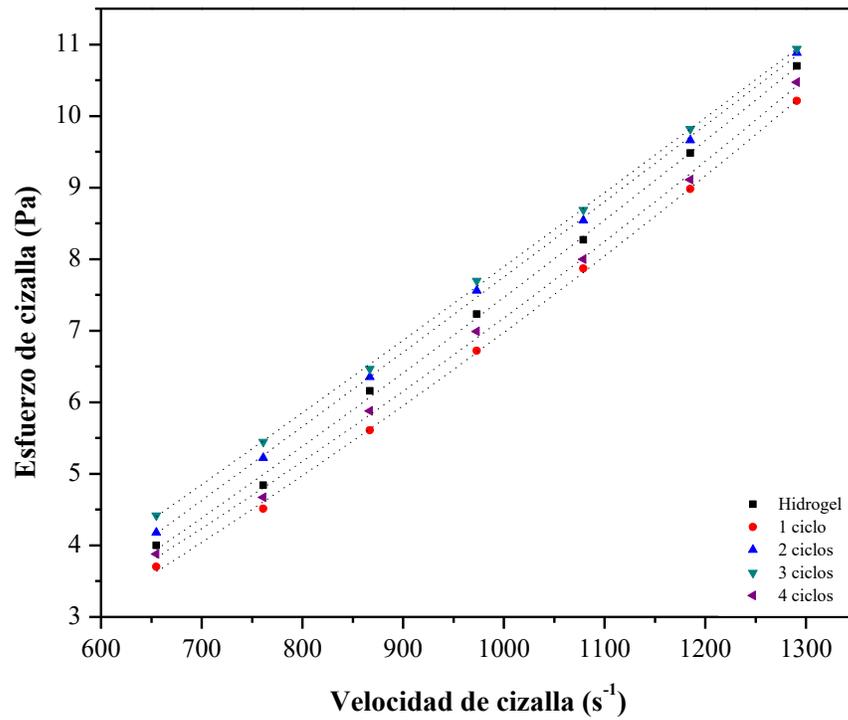


Figura B5. Comportamiento reológico del hidrogel y los criogeles de karaya.

Tabla B3. Parámetros reológicos de fluidos Ostwald de Waele de los hidrogel y los criogeles de karaya.

	k	n
Hidrogel	$8 \times 10^{-4} \pm 1 \times 10^{-3}$	$1.34 \pm 3 \times 10^{-3}$
1 ciclo	$5 \times 10^{-4} \pm 7 \times 10^{-4}$	$1.41 \pm 5 \times 10^{-3}$
2 ciclos	$3 \times 10^{-4} \pm 1 \times 10^{-3}$	$1.47 \pm 3 \times 10^{-3}$
3 ciclos	$3 \times 10^{-4} \pm 2 \times 10^{-3}$	$1.47 \pm 4 \times 10^{-3}$
4 ciclos	$2 \times 10^{-4} \pm 2 \times 10^{-4}$	$1.52 \pm 4 \times 10^{-3}$

Promedio \pm desviación estándar

Espectroscopía FTIR-RD

En la Figura B6 se encuentran los espectros FTIR de la goma karaya, en el cual se aprecian diversas bandas, entre las que destacan las de 3450, 2930 y 2150 cm^{-1} indicando al igual que en los polímeros anteriores, vibraciones de estiramiento de los OH^- asociadas a los grupos inter- e intramoleculares libres en forma de dímeros, estiramientos axiales de grupos CHO y

CH, así como, vibraciones asimétricas de grupos metilenos y vibraciones de estiramiento entre grupos C=C=O (cetenos) característico de los polisacáridos naturales, respectivamente.

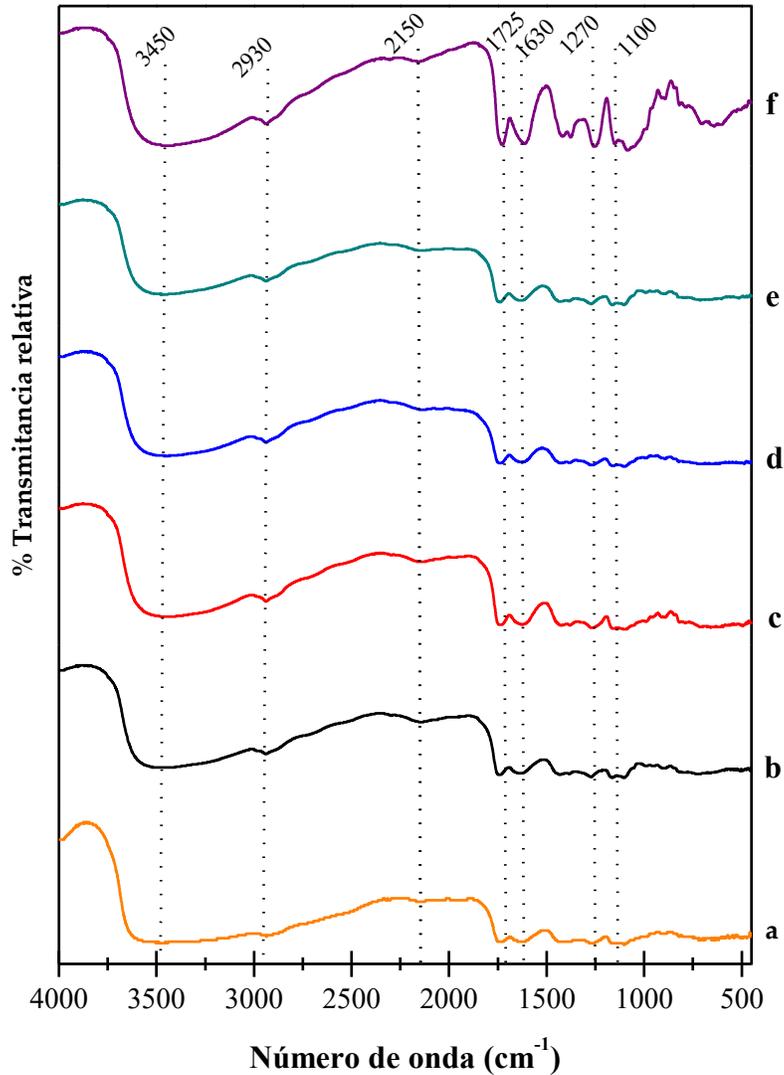


Figura B6. Espectros FTIR-RD de goma karaya. (a) polvo, (b) hidrogel, (c) 1 ciclo, (d) 2 ciclos, (e) 3 ciclos, (f) 4 ciclos.

A los 1725 cm^{-1} existen vibraciones de estiramiento de los grupos C=O de los aldehídos y grupos acetyl libres. La banda que se encuentra a los 1630 cm^{-1} indica estiramientos de los C=O de grupos éster metilados de ácido galacturónico, siendo éstas últimas dos bandas (1725 y 1630 cm^{-1}) características de la goma karaya. A los 1270 cm^{-1} existen estiramientos asimétricos de C-O-C de los éteres aromáticos, característico de los polisacáridos naturales.

Por último, a los 1100 cm^{-1} hay estiramientos de los grupos OH⁻ de los alcoholes secundarios y estiramiento asimétrico de los anillos de piranosa (Le Cerf *et al.*, 1990; Mittal *et al.*, 2015).

ANEXO C. REGISTRO DE PATENTE



Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial



Solicitud de Patente
 Solicitud de Registro de Modelo de Utilidad

Solicitud de Registro de Diseño Industrial, especifique cuál:
 Modelo Industrial Dibujo Industrial

Antes de llenar la forma lea las consideraciones generales al reverso

Uso exclusivo Delegaciones y Subdelegaciones de la Secretaría de Economía y Oficinas Regionales del IMPI

Sello

Folio de entrada

Fecha y hora de recepción

INSTITUTO MEXICANO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL
Dirección Divisiva de Patentes

Solicitud: **MX/a/2017/014304**
Expediente: **MX/NOV/2017** Hora: **11:03:36**
Fecha: **MX/E/2017/083199** 887131



I DATOS DEL (DE LOS) SOLICITANTE(S)

El solicitante es el inventor El solicitante es el causahabiente

1) Nombre (s): **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.**

2) Nacionalidad (es): **MEXICANA**

3) Domicilio; calle, número, colonia y código postal: **9° PISO DE LA TORRE DE RECTORÍA S/N, CIUDAD UNIVERSITARIA, C.P. 04510**

Población, Estado y País: **COYOACÁN, CIUDAD DE MÉXICO, MÉXICO.**

4) Teléfono (clave): **(55) 56 22 63 29 AL 31** 5) Fax (clave): **(55) 56 65 46 44**

II DATOS DEL (DE LOS) INVENTOR(ES)

6) Nombre (s): **JOSÉ LUIS ARJONA ROMÁN, ROSALÍA MELÉNDEZ PÉREZ, MARTA ELVIA ROSAS MENDOZA, JONATHAN CORIA HERNÁNDEZ Y JESÚS ABRAHAM MÉNDEZ ALBORES.**

7) Nacionalidad (es): **MEXICANAS.**

8) Domicilio; calle, número, colonia y código postal: XXXXXXXXXX

Población, Estado y País: **CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO.**

9) Teléfono (clave): _____ 10) Fax (clave): _____

III DATOS DEL (DE LOS) APODERADO(S)

11) Nombre (s): **MARTHA FIGUEROA PÉREZ** 12) RGP-DDAJ-14782

13) Domicilio; calle, número, colonia y código postal: **3er PISO DEL EDIFICIO "B" DE LAS OFICINAS ADMINISTRATIVAS EXTERIORES DE LA ZONA CULTURAL DE CIUDAD UNIVERSITARIA, C.P. 04510.**

Población, Estado y País: **COYOACÁN, CIUDAD DE MÉXICO, MÉXICO.** 14) Teléfono (clave): **(55) 56 22 63 29 AL 31** 15) Fax (clave): **(55) 56 65 46 44**

16) Personas Autorizadas para oír y recibir notificaciones:
DANIEL OJESTO MARTÍNEZ PORCAYO, ROCIO JUÁREZ VÁZQUEZ Y ANACLARA ALVARADO DE LA CUESTA.

17) Denominación o Título de la Invención:
"USO DE CRIOGELES CON DIFUSIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDO PARA LIMITAR EL CRECIMIENTO DE CRISTALES DE HIELO EN LA CONGELACIÓN DE ALIMENTOS"

18) Fecha de divulgación previa

09 | 11 | 2016

Día Mes Año

19) Clasificación Internacional uso exclusivo del IMPI

20) Divisiva de la solicitud

Número

22) Prioridad Reclamada:

País

21) Fecha de presentación

Figura jurídica

Fecha de presentación

No. de serie

Lista de verificación (uso interno)

No. Hojas	No. Hojas
<input checked="" type="checkbox"/> 1 Comprobante de pago de la tarifa	<input checked="" type="checkbox"/> 5 Documento de cesión de derechos
<input checked="" type="checkbox"/> 35 Descripción y reivindicación (es) de la invención	<input type="checkbox"/> Constancia de depósito de material biológico
<input checked="" type="checkbox"/> 13 Dibujo (s) en su caso	<input checked="" type="checkbox"/> 1 Documento (s) comprobatorio(s) de divulgación previa
<input checked="" type="checkbox"/> 1 Resumen de la descripción de la invención	<input type="checkbox"/> Documento (s) de prioridad
<input checked="" type="checkbox"/> 1 Documento que acredita la personalidad del apoderado	<input type="checkbox"/> Traducción
	57 TOTAL DE HOJAS

Observaciones:
Se anexa hoja de descuento.

Bajo protesta de decir verdad, manifiesto que los datos asentados en esta solicitud son ciertos.

LIC. MARTHA FIGUEROA PÉREZ CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., A 6 DE NOVIEMBRE DE 2017

Nombre y firma del solicitante o su apoderado Lugar y fecha

Página 1 de 2 IMPI-00-009

ANEXO D. PUBLICACIÓN



Article

Thermal, Structural, and Rheological Characterization of Waxy Starch as a Cryogel for Its Application in Food Processing

Jonathan Coria-Hernández ¹, Abraham Méndez-Albores ^{2,*} , Rosalía Meléndez-Pérez ³,
Marta Elvia Rosas-Mendoza ³ and José Luis Arjona-Román ^{3,*}

¹ National Autonomous University of Mexico-Superior Studies Faculty at Cuautitlan (UNAM-FESC), Doctorate Program in Animal Production and Health Sciences, Cuautitlan Izcalli 54714, Mexico; jonathancoria@outlook.com

² National Autonomous University of Mexico-Superior Studies Faculty at Cuautitlan (UNAM-FESC), Campus 4. Multidisciplinary Research Unit L14 (Food, Mycotoxins and Mycotoxicosis), Cuautitlan Izcalli 54714, Mexico

³ National Autonomous University of Mexico-Superior Studies Faculty at Cuautitlan (UNAM-FESC), Campus 4. Multidisciplinary Research Unit L13 (Thermal and Structural Analysis of Materials and Foods), Cuautitlan Izcalli 54714, Mexico; melendez@unam.mx (R.M.-P.); merosas@unam.mx (M.E.R.-M.)

* Correspondence: albores@unam.mx (A.M.-A.); arjona@unam.mx (J.L.A.-R.);
Tel.: +52-55-5623-1999 (ext. 39433) (J.L.A.-R.)

Received: 27 February 2018; Accepted: 21 March 2018; Published: 23 March 2018



Abstract: Starch is the major component of cereal, pulses, and root crops. Starch consists of two kinds of glucose polymers, amylose and amylopectin. Waxy starch—with 99–100% amylopectin—has distinctive properties, which define its functionality in many food applications. In this research, a novel material was prepared through the cryogelification of waxy starch (WS) using four cycles of freezing and thawing in indirect contact with liquid nitrogen at $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$. Polyvinyl alcohol (PVA) was used as a reference. The cryogels were characterized using several validation methodologies: modulated differential scanning calorimetry (MDSC), scanning electron microscopy (SEM), rheology, and Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy with diffuse reflectance (DR). Based on the number of freeze–thaw cycles, significant changes were found ($P < 0.05$) showing important structural modifications as well as reorganization of the polymeric matrix. Two cryogelification cycles of the WS were enough to obtain the best structural and functional characteristics, similar to those of PVA, which has already been tested as a cryogel. From these results, it is concluded that WS has potential as a cryogel for application in food processing.

Keywords: waxy starch; cryogel; heat capacity; pore size; rheology

1. Introduction

Cryogels are an emerging class of biomaterial that have recently drawn attention because of the diverse applications they have in different research areas. Cryogels can be defined as: (1) colloidal systems formed during the cryoprecipitation of the blood plasma when it is cooled down to approximately $4\text{ }^{\circ}\text{C}$; (2) polymers or inorganic systems first produced by the sol–gel technology and then by lyophilization; and (3) synthetic and natural polymeric materials produced in a frozen solvent, usually water [1,2].

In this research, the produced cryogels belong to the third definition. This material is obtained by cryotropic gelation of polymeric precursors through homogeneous or heterogeneous network formation with physical stability and covalent cross-linking. At very low temperatures, most of the

solvent freezes, while a portion is left to unfreeze (non-frozen liquid micro-phase). The dissolved substances are concentrated and undergo polymerization and structural rearrangement, which leads to the cryogel formation. Moreover, crystals act as an interconnected opening network which controls the pore size and generates mechanical resistance [1–3].

Cryogels are produced with a wide range of morphologies and properties, which can be adapted for particular applications. They are heterophasic non-transparent materials showing macropores (1 to 150 μm). Their properties depend on the pore structure (size, distribution and inter-connectivity), and on the thickness of the pore wall and density expressed as the concentration of the polymer in swollen pore walls. Mass transport inside the matrix is controlled by pore size and inter-connectivity. On the other hand, the thickness and density of the cryogel wall determine its mechanical properties.

The cryogels produced from bio-polymers significantly change their expansion degree after small modifications in the environmental factors, such as temperature, pH or ionic forces. The time response to mass and heat transfer is shorter with cryogels than with hydrogels [3].

One of the purposes of cryogels is the analysis of their application at low temperatures to biological systems and the use of this knowledge for the development of improved conservation protocols. The intra- and extracellular solute concentration, the constitution of permeable and impermeable solutes and the freeze–unfreeze rate are the three parameters that control the physicochemical conditions for the application of cryogels [1–4].

Polyvinyl alcohol (PVA) is a synthetic, non-toxic, water-soluble, biocompatible and biodegradable polymer that has been systematically studied due to its multiple characteristics, especially for several industrial and pharmaceutical applications such as films, emulsions and adhesives. Despite its synthetic composition, it is a semi-crystalline, hydrophilic polymer produced by the polymerization of vinyl acetate (PVAc) and its subsequent hydrolysis [5–7]. PVA applications are related to processes that involve energy changes; therefore, advanced research and analysis of the microstructure of the polymer as a function of temperature are very important for its use with cellular systems. However, its use in food processing is totally restricted, and the information could be used as a reference for the behavior of cryogels produced from other polymers [8].

Starch is a mixture of two glucose polymers, amylose and amylopectin [9]. Amylose is essentially a linear molecule consisting of α -(1,4)-linked *d*-glucopyranosyl units, while amylopectin, is a highly branched macromolecule consisting of α -(1,6)-linked *d*-glucopyranosyl units attached to α -(1,4)-bonds [10]. The amylose–amylopectin ratio differs among starches, but typical levels are 25–75% [11]. Some starches contain either higher amylose content (up to 70%) or higher amylopectin content (99–100%), such as waxy starch (WS). Compared to traditional starch, WS provides unique functions for diverse applications. It confers different properties such as the formation of more viscous and thermostable structures after freezing, with smooth texture, cohesivity, low opacity and thermo-reversibility in gels [12,13]. WS is preferably used in foods and the textile industry.

The objective of this work is the characterization of a WS cryogel to evaluate its structural, rheological and thermodynamic properties and to determine if there are important differences caused by the freeze–thaw process using PVA as a reference, as it has already been studied as a cryogel.

2. Materials and Methods

2.1. Sample Preparation

PVA ($-\text{CH}_2\text{CHOH}-\text{n}$; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, 146–186 kDa, 99% hydrolyzed in crystal) was dispersed in water (2.5% *w/w*) for 4 h at 80 °C with magnetic stirring [7]. WS ($-\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5-\text{n}$; Firm-Tex, Ingredient, Mexico) was dispersed by magnetic stirring in water (3% *w/w*) at 40 °C for 2 h [14]. Freezing was carried out using the protocols described by Giannouli and Morris [14] and Lozinsky [15]. Briefly, the hydrogels were placed in cryogenic tubes, and then immersed in liquid nitrogen up to -150 ± 1 °C for 10 min; subsequently, tubes were thawed by immersion in water at 50 ± 2 °C for 30 min using four repeated cycles.

2.2. Thermal Analysis by Modulated Differential Scanning Calorimetry (MDSC)

Samples were analyzed using a differential scanning calorimeter with temperature modulation (DSC 2920, TA Instruments, New Castle, DE, USA). Cooling was carried out using a refrigerated cooling system (RCS). The temperature and heat capacity calibrations were performed using TA Instruments software with indium (melting point value of 156.6 °C) and sapphire (aluminum oxide), respectively. The TA Instruments universal analysis software (2000 V 4.5 A) was used to record and analyze all thermograms. Samples (4.5 ± 0.42 mg) were packed down in hermetic aluminum pans and were analyzed in triplicate by heating in the modulated DSC furnace at a rate of 5 °C/min with temperature modulation of 0.8 °C every 60 s. Nitrogen was used as a purge gas at a constant flow rate of 60 mL/min. Thermal decomposition data were collected over the temperature range of -50 to 150 °C [16,17].

2.3. Structural Ordering Degree

The structural ordering degree can be calculated by estimating the enthalpy of fusion from the area under the curve in MDSC endotherms by drawing a baseline from the first onset of the melting to the last trace of crystallinity using:

$$X_c = \frac{\Delta H_f}{\Delta H_f^0} \quad (1)$$

where: X_c is the weight fraction of crystallinity, ΔH_f is the enthalpy of fusion measured at the melting point T_m , and ΔH_f^0 is the enthalpy of fusion of the totally crystalline polymer dispersion measured at the equilibrium melting point T_m^0 [18].

2.4. Scanning Electron Microscopy (SEM)

The surface morphology and the microstructure of the cryogels were examined using an in-touch scope SEM (JEOL, JSM-6012LA, Tokyo, Japan). Samples were coated with a thin gold layer with a vacuum electric sputter coater (Denton Vacuum Inc., Desk V HP, Moorestown, NJ, USA) operated at 7 mA for 5 min to enhance the electron conductivity and image quality. Microscopy analysis was performed at 900× with an accelerating voltage of 7 kV under high vacuum.

2.5. Rheological Analysis

The rheological properties of the cryogels were measured by using a rotational viscosimeter (Rheomat RM180, Mapple Instruments, Toronto, ON, Canada) with attached computer software (RSI Orchestrator, Rheometrics Scientific, Piscataway, NJ, USA) at a programmed temperature of 25 ± 1.5 °C. A total of 25 mL of each sample were kept in a thermostatically controlled water bath for 10 min before being measured in order to attain a desirable temperature of 25 °C. First measurements were taken 2 min after the spindle was immersed in each sample, in order to allow thermal equilibrium in the sample. Each measurement was duplicated on the same sample. The shear rate versus shear stress data were interpreted using the power law expression ($\tau = k \cdot \gamma^n$); where τ is the shear stress (N/m²), γ is the shear rate (s⁻¹), n is the flow behavior index, and k is the consistency index (Nsⁿ/m²). The values for the flow behavior index n , and the consistency index k were obtained from plots of log shear stress versus log shear rate, according to the power law equation ($\log \tau = \log k + n \cdot \log \gamma$).

2.6. Fourier Transform Infrared-Diffuse Reflectance (FTIR-DR) Spectroscopy

The functional groups in the cryogels were characterized using a FTIR-DR Frontier SP8000 spectrophotometer (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) equipped with a deuterated triglycine sulfate (DTGS) detector and controlled with the Spectrum 10.4.2 software (Perkin Elmer Ltd, Bucks, UK). The ground samples (<250 μm) were placed in a diffuse reflectance (DR) sample holder and DR spectra were collected in a range of 400–4000 cm⁻¹ at a resolution of 4 cm⁻¹ by co-adding 32 scans. A

background spectrum was obtained against air every day during the experiment. The spectra of both PVA and WS cryogels were collected in transmittance mode in quadruplicate and the average value was used.

2.7. Statistical Analysis

The experiment was conducted as a completely randomized design with three replicates. Data were assessed by one- and two-way analysis of variance (ANOVA) and means comparisons were performed according to the Tukey's test using Minitab 16.0.1 software (Penn State University, Pennsylvania, PA, USA). A significance value of $P < 0.05$ was used to distinguish significant differences between treatments.

3. Results and Discussion

3.1. MDSC Analysis

The thermal behavior of the polymers was evaluated in order to determine changes in the enthalpy and transitions, indicating kinetic and structural changes after different freeze–thaw cycles with liquid nitrogen. For the PVA case (Figure 1a), the heat flow shows the same behavior, at an interval of -50 to 75 °C, presenting the same transitions with different magnitudes in enthalpy. The four-cycle cryogel has 345.0 J/g with a melting temperature (T_m) of 3.62 °C showing higher enthalpy. This phenomenon is due to the existence of more crystallized water and therefore the need for more energy to carry out the fusion of the crystals [18–21].

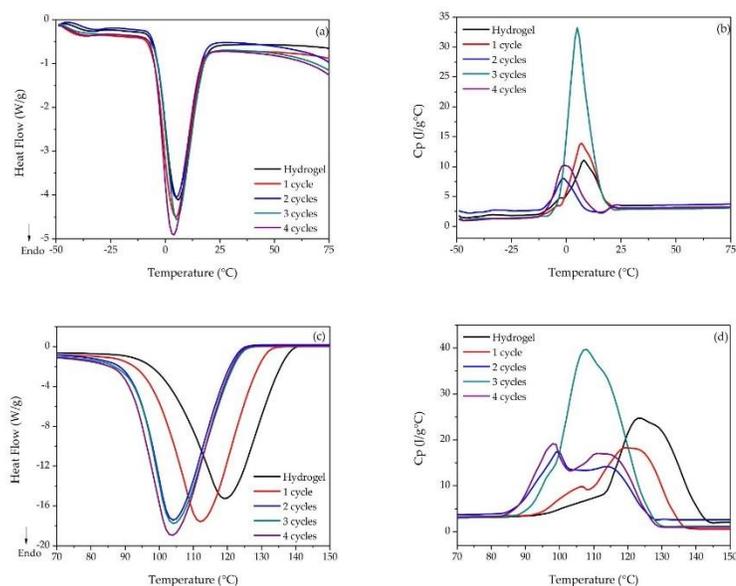


Figure 1. Thermal analysis of the hydro- and cryogels of PVA with different freeze–thaw cycles: (a) heat flow during melting; (b) fusion Cp; (c) heat flow during evaporation; (d) evaporation Cp.

Regarding the structural changes shown in the Cp of Figure 1b, the fusion of PVA crystals generates important changes, showing that the cryogel at three cycles has major structural

modifications due to molecular rearrangements after each cycle. As for the four-cycle cryogel case, important changes occurred in the same temperature range. According to El-Sayed et al. [19], the structural reorientation of the polymer molecules is higher after the second cycle of cryogelification. On the other hand, Figure 1c shows the second important thermal transition for the PVA. According to Sudhamani et al. [21] it corresponds to the water evaporation contained in the polymer dispersions. For heat flow, important differences between the samples were observed. Evaporation temperatures (T_e) are different because they decrease depending on the increase in the number of cycles. The second cycle changes were minimal, indicating that more cryogelification cycles make difficult the evaporation of the water contained in the polymeric matrices. For the C_p (Figure 1d), the third cycle was also the most relevant according to changes in the structure, as the number of cryogelification cycles increasing the three-dimensional conformation of the network was significantly modified [22].

Figure 2a shows the total heat flow with the major changes occurring during the WS fusion. There were no significant changes since the T_m and the enthalpy were within the same range (Table S1). C_p (Figure 2b) was modified by the effects of the structural arrangement of the amylopectin chain in order to generate a more ordered and stable three-dimensional network, except for the first cryogelification cycle. Figure 2c shows differences in the T_e in the evaporation zone of the WS polymer dispersions, which indicates that there are interactions of water with the polymers, reflected in the specific heat (Figure 2d), whereas the number of freeze–thaw cycles increases the changes in the structure. Lozinsky [15] reported that polymers spontaneously form gel networks at a certain rate and temperature below zero, and the kinetics of this process is strongly related to the condition of sub-cooling, as well as to the number of cryogelification cycles. Therefore, the formation of the gel network is controlled directly by kinetics, which can be described by its cryogelification cycles. In the case of WS, it presents a thermal phenomenon similar to PVA.

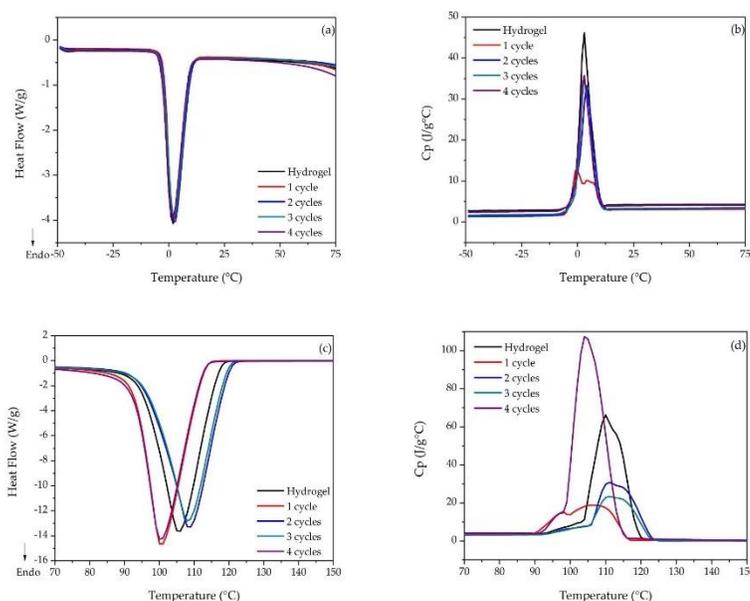


Figure 2. Thermal analysis of the hydro- and cryogels of WS with different freezing-thawing cycles: (a) heat flow during melting; (b) structural changes during fusion; (c) heat flow during evaporation; (d) structural changes during evaporation.

3.2. Structural Ordering Degree

The concept of order is related to the crystalline volume fraction in the dispersion, which indicates the structural order in the samples; consequently, there is a close relationship between physicochemical stability, changes in morphology and optical properties, and all of these are temperature dependent [23]. Table 1 shows that for the freeze–thaw cycles of polymers, values closer to 100% tend to possess a largely ordered structure. For the PVA case, the molecular arrangement of its structure occurred at four cycles, before a destabilization of the polymer chains occurred to form a three-dimensional network [24]. This phenomenon is closely related to the enthalpy values obtained by MDSC, since the four-cycle PVA has higher energy consumption, necessary to rearrange and stabilize the structure.

Table 1. Structural order percentage of the hydro- and cryogel dispersions.

Sample	PVA	WS
Hydrogel	84.47 ± 0.52	84.12 ± 0.33
1 cycle	85.90 ± 0.97	90.80 ± 0.18
2 cycle	81.70 ± 0.92	94.72 ± 0.14
3 cycles	85.53 ± 1.17	89.05 ± 0.87
4 cycles	93.30 ± 1.11	89.41 ± 0.56

Mean ± standard deviation.

For the WS, the highest degree of order was achieved through two cryogelification cycles, corresponding to the greater enthalpy obtained by MDSC. This number of cycles was enough to rearrange the molecular structure to stabilize the system [23,25]. At the same time, Hulleman et al. [26], Jenkins and Donald [27], Lourdin et al. [28], and Van Soest et al. [29] define a close relationship between the rheological parameters and the structural ordering degree of the WS and its three-dimensional network formation. These properties affect its stability and functionality as a cryoprotectant material, resulting in enhanced rigidity.

3.3. SEM Analysis

Figure 3 shows that the polymer was affected by the number of cryogelification cycles. The pore size was smaller in the hydrogel and it increased from the first cryogelification cycle. At the third cycle, it presented a new alteration in the arrangement of the polymer network and formed a more homogeneous system that allowed it to capture small quantities of water between pores [30,31].

Figure 4a shows the distribution of the PVA pore sizes, showing that as the cryogelification cycles increase, they also enhance the heterogeneity of the pore sizes, which indicates that there are important structural arrangements corresponding with the MDSC analysis in this polymer. According to the structural ordering degree, cryogelification at four cycles did not present the smallest pore size, showing a greater dispersion of the data, which does not allow a control of the network spaces.

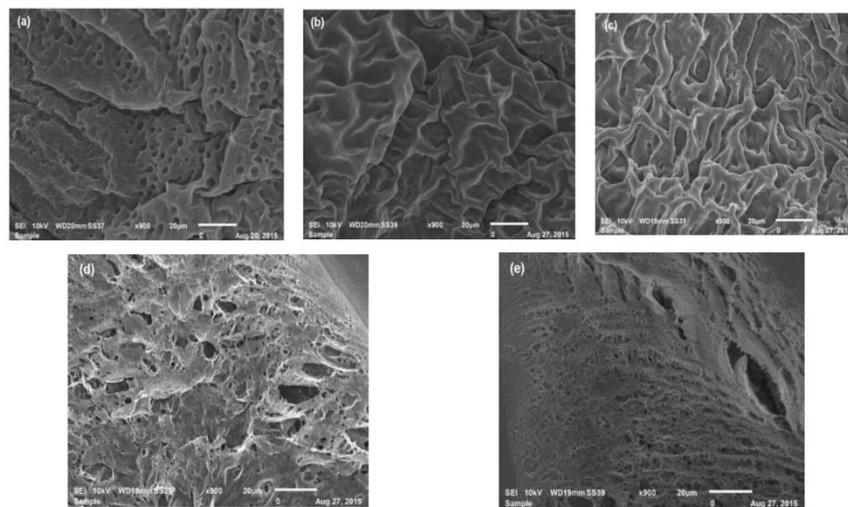


Figure 3. SEM micrographs (900×) of the PVA polymers: (a) hydrogel; (b) one-cycle cryogel; (c) two cycles; (d) three cycles; (e) four cycles.

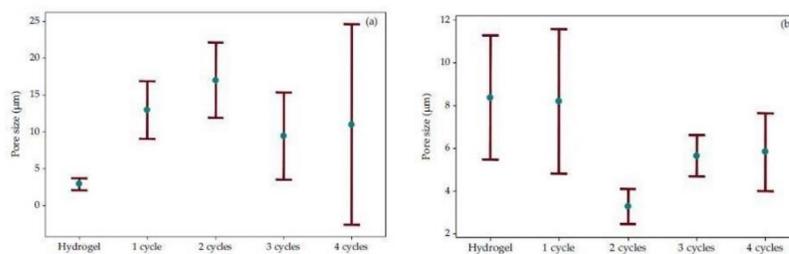


Figure 4. Confidence intervals at 95% of the polymer pore size: (a) PVA; (b) WS.

The WS micrographs (Figure 5) show aggregates of amylopectin different to the PVA. It does not form a traditional gel network, but small porous aggregates were reported by Huijbrechts et al. [32], Shi et al. [33], and Yoon et al. [34] where water is trapped. The amylopectin crystallization rate was approximately 0.5 times lower than for amylose, due to the inter- and intramolecular amylopectin chains formed during freezing [29].

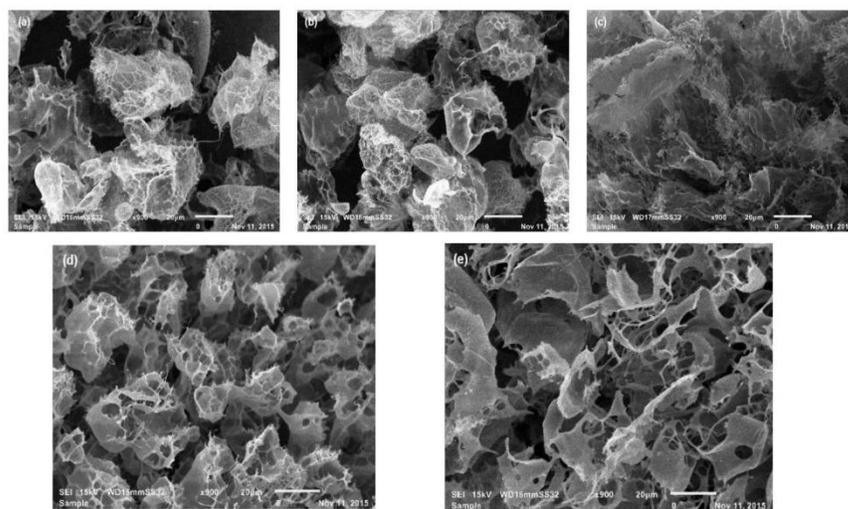


Figure 5. SEM micrographs (900 \times) of the WS polymers: (a) hydrogel; (b) one-cycle cryogel; (c) two cycles; (d) three cycles; (e) four cycles.

Van Soest et al. [29] also reported that the ordering degree of the WS hydrogels will affect their mechanical properties, as well as the module, the resistance and the viscosity with a more ordered structure. The WS pore sizes are shown in Figure 4b, where the two-cycle cryogel presented a smaller value ($2.44 \leq \mu \leq 4.08$), and at the same time, is more homogeneous with a lower data dispersion. This shows that this material has a viable structure for application in food processes.

3.4. Rheological Analysis

The rheological characterization of PVA and WS at different cryogelification cycles indicates that the behavior of the dispersions was affected by the number of freeze–thaw cycles, fitting a Newtonian not-time-independent fluid behavior, following the Ostwald de Waele law, since the flow properties depend only on shear rate and are not constant in relation to the shear stress (Figure 6). In general, for the PVA case, minimal variations of the stress–shear curves depending on the number of freeze–thaw cycles were observed. However, for WS, the two-cycle cryogel showed a notable increase in the shear stress due to an increment in the shear rate (Figure 6b).

In both cases, the behavior was a shear thickening material, where the viscosity increases with the rise of the shear rate, due to a high concentration of particles that generate more collision and consequently more contact between them, as reported by Yang et al. [35] and Wang et al. [36]. This can be also observed for the rheological parameters (n and k), showing that for both polymers the n value was very close to 1 (Table 2), classifying these fluids as shear thickening.

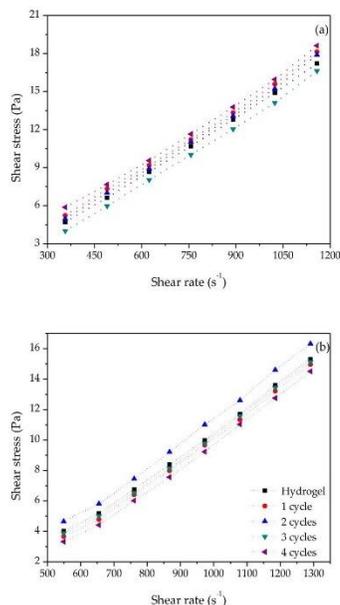


Figure 6. Rheological behavior of the polymers: (a) PVA; (b) WS.

Table 2. Rheological parameters according to the Ostwald de Waele’s law.

Sample	PVA		WS	
	<i>n</i>	<i>k</i>	<i>n</i>	<i>k</i>
Hydrogel	0.9767 ± 0.0008	0.0183 ± 0.0007	1.4999 ± 0.0015	4 × 10 ⁻⁴ ± 0.0002
1 cycle	1.0425 ± 0.0011	0.0113 ± 0.0014	1.5855 ± 0.0009	2 × 10 ⁻⁴ ± 0.0001
2 cycles	1.0723 ± 0.0002	0.0091 ± 0.0003	1.6198 ± 0.0006	1 × 10 ⁻⁴ ± 0.0001
3 cycles	1.0973 ± 0.0010	0.0074 ± 0.0004	1.6696 ± 0.0012	1 × 10 ⁻⁴ ± 0.0001
4 cycles	1.1940 ± 0.0009	0.0036 ± 0.0002	1.7510 ± 0.0018	1 × 10 ⁻⁵ ± 0.00001

Mean ± standard deviation

3.5. FTIR Spectroscopy Analysis

Figure 7 shows the PVA FTIR-DR spectra; all the cases present bands at 3455–3450 cm⁻¹ belonging to the stretching vibrations of OH⁻ groups, which correspond to the alcohol groups and water mainly in the structural form of dimers. The intensity of the band was not modified in any case, indicating that the association between water molecules was not affected by the cycles of cryogelification.

At 2948 cm⁻¹, one can see stretches on the main aliphatic chain of the alkanes and alkyl groups (C–H) with moderately strong absorption intensities, which show no change in the function of the number of cryogelification cycles. At 1651 cm⁻¹ an asymmetric stretching of the carbonyl groups (C=O) of the PVA acetate was observed. This band is also associated with C=C stretching of the terminal vinyl groups, decreasing its intensity in the hydrogel in the first, third and fourth freeze–thaw cycles, since they reduce the interactions between the vinyl groups and increase with water [33,37].

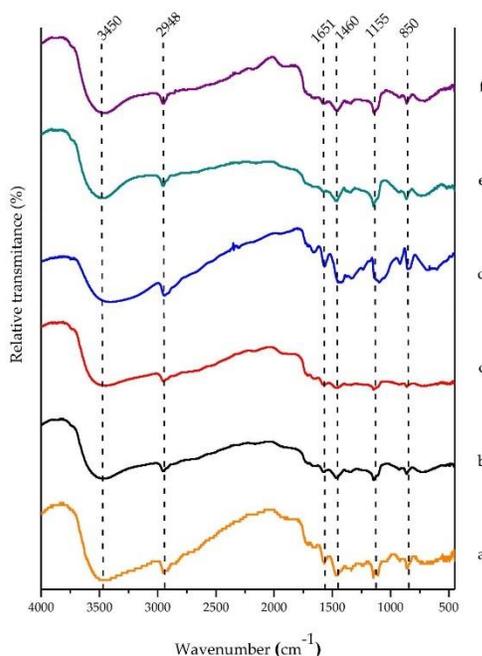


Figure 7. FTIR spectra of PVA hydro- and cryogels: (a) powder; (b) hydrogel; (c) one cycle; (d) two cycles; (e) three cycles; (f) four cycles.

At 1460 cm^{-1} there was a combination of frequencies between the $\text{CH}_3\text{-OH}$ groups (interactions), showing asymmetric vibrations in the terminal methyl groups. These interactions were minor for one- and two-cycle cryogels in comparison to the other samples, indicating a close relationship with the increase in the pore size observed by SEM microscopy. At 1155 cm^{-1} stretches of the links between the C-O of tertiary alcohols were observed, as well as an asymmetric stretching of the C-O-C bonds of the aliphatic ethers. Finally, at 850 cm^{-1} there were bands of the CH_2 terminal groups of the main chains, which are mostly emphasized with the two-cycle cryogel, closely related to the increase in the pore sizes observed by SEM studies [33,37,38].

Besides, Figure 8 shows a band at 2100 cm^{-1} indicating stretching vibrations between $\text{C}=\text{C}=\text{O}$ groups (ketenes) characteristic of natural polysaccharides. At 1650 cm^{-1} , bending vibrations between O-H groups of the absorbed water in the amorphous regions of the starch were observed. This means that the band intensity decreases according to the increase of the cryogel's order degree. For the two cryogelification cycles, this band was less intense. At 1170 cm^{-1} , stretching vibrations of anhydroglucose rings were registered, which were modified from the first cryogelification cycle. At 1065 cm^{-1} , the greater order degree in the cryogel bands intensity increased. Therefore, these bands appear from the first cycle of freezing, indicating that there are important structural arrangements affected by the freeze-thaw process that make the polymer system more stable according to the observed changes in the C_p in the MDSC studies [39–41].

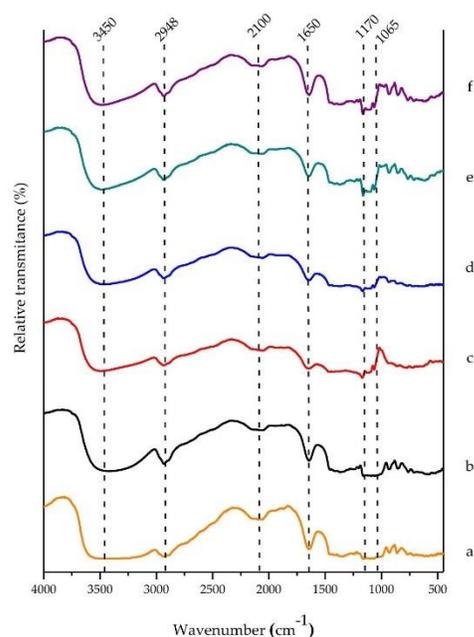


Figure 8. FTIR spectra of WS hydro- and cryogels: (a) powder; (b) hydrogel; (c) one cycle; (d) two cycles; (e) three cycles; (f) four cycles.

4. Conclusions

It was demonstrated that significant changes were produced by the freeze–thaw cycles of the WS hydrogel. Two cryogelification cycles were sufficient to obtain a cryogel with physicochemical, thermodynamic and structural properties similar to those of PVA.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2073-4360/10/4/359/s1>, Table S1: Enthalpies of melting and evaporation of the hydro- and cryogels.

Acknowledgments: The authors are grateful to Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) as well as to Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) for the financial support for this research through the Grants CB-220710 and IT-201417, respectively. Jonathan Coria-Hernández also acknowledges CONACYT for the PhD scholarship (447128).

Author Contributions: Jonathan Coria-Hernández carried out the experiments, analyzed the data, drafted and revised the first version of the manuscript. Rosalía Meléndez-Pérez and Marta Elvia Rosas-Mendoza performed the statistical analysis and took part in discussion. José Luis Arjona-Román and Abraham Méndez-Albores drafted the article and revised it critically for important intellectual content. All authors read and approved the final version of the document.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Ciolacu, D.; Rudaz, C.; Vasilescu, M.; Budtova, T. Physically and Chemically cross-linked cellulose cryogels: Structure, properties and application for controlled release. *Carbohydr. Polym.* **2016**, *151*, 392–400. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Gun'ko, V.M.; Savina, I.N.; Mikhalovsky, S.V. Cryogels: Morphological, structural and adsorption characterization. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2013**, *187–188*, 1–46. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

3. Regand, A.; Goff, H.D. Structure and ice recrystallization in frozen stabilized ice cream model systems. *Food Hydrocoll.* **2003**, *17*, 95–102. [[CrossRef](#)]
4. Morris, G.J.; Acton, E. Controlled ice nucleation in cryopreservation—A review. *Cryobiology* **2013**, *66*, 85–92. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Kamoun, E.A.; Chen, X.; Eldin, M.S.M.; Kenawy, E.R.S. Crosslinked poly (vinyl alcohol) hydrogels for wound dressing applications: A review of remarkably blended polymers. *Arabian J. Chem.* **2015**, *8*, 1–14. [[CrossRef](#)]
6. Mansur, H.S.; Oréfice, R.L.; Mansur, A.A.P. Characterization of poly (vinyl alcohol)/poly(ethylene glycol) hydrogels and PVA-derived hybrids by small-angle X-ray scattering and FTIR spectroscopy. *Polymer* **2004**, *45*, 7193–7202. [[CrossRef](#)]
7. Patachia, S.; Dobritoiu, R.; Coviello, T. Determination of the sorption efficiency of poly (vinyl alcohol)/scleroglucan cryogels, against Cu⁺² ions. *Env. Eng. Manag. J.* **2011**, *10*, 193–195.
8. Smith, T.J.; Kennedy, J.E.; Higginbotham, C.L. The rheological and thermal characteristics of freeze-thawed hydrogels containing hydrogen peroxide for potential wound healing applications. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **2009**, *2*, 264–271. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Lionetto, F.; Maffezzoli, A.; Ottenhof, M.-A.; Farhat, I.A.; Mitchell, J.R. Ultrasonic investigation of wheat starch retrogradation. *J. Food Eng.* **2006**, *75*, 258–266. [[CrossRef](#)]
10. Zobel, H. Starch crystal transformations and their industrial importance. *Starch-Stärke* **1988**, *40*, 1–7. [[CrossRef](#)]
11. Van Hung, P.; Maeda, T.; Morita, N. Waxy and high-amylose wheat starches and flours—characteristics, functionality and application. *Trends Food Sci. Technol.* **2006**, *17*, 448–456. [[CrossRef](#)]
12. Seetapan, N.; Limpanyoon, N.; Fuongfuchat, A.; Gamonpilas, C.; Methacanon, P. Effect of freezing rate and starch granular morphology on ice formation and non-freezable water content of flour and starch gels. *Int. J. Food Prop.* **2016**, *19*, 1616–1630. [[CrossRef](#)]
13. Yu, X.; Yu, H.; Zhang, J.; Shao, S.; Xiong, F.; Wang, Z. Endosperm structure and physicochemical properties of starches from normal, waxy, and super-sweet maize. *Int. J. Food Prop.* **2015**, *18*, 2825–2839. [[CrossRef](#)]
14. Giannouli, P.; Morris, E.R. Cryogelation of xanthan. *Food Hydrocoll.* **2003**, *17*, 495–501. [[CrossRef](#)]
15. Lozinsky, V.I. Cryogels on the basis of natural and synthetic polymers: preparation, properties and application. *Russ. Chem. Rev.* **2002**, *71*, 489. [[CrossRef](#)]
16. Meléndez, P.R.; Arjona, R.J.L.; Velázquez, C.R.R.; Méndez, A.A.; Vázquez, D.A. On the thermal properties of frozen, refrozen and freeze drying porcine *Longissimus dorsi*. *J. Anim. Vet. Adv.* **2011**, *10*, 2956–2960.
17. Arjona, R.J.L.; Hernández, G.R.P.; Navarro, L.L.; Coria, H.J.; Rosas, M.M.E.; Meléndez, P.R. Heat capacity prediction during pork meat thawing: Application of artificial neural network. *J. Food Process Eng.* **2016**, *40*, 1–8.
18. Patel, A.K.; Bajpai, R.; Keller, J.M. On the crystallinity of PVA/palm leaf biocomposite using DSC and XDR techniques. *Microsyst. Technol.* **2014**, *20*, 41–49. [[CrossRef](#)]
19. El-Sayed, S.; Mahmoud, K.H.; Fatah, A.A.; Hassen, A. DSC, TGA and dielectric properties of carboxymethyl cellulose/polyvinyl alcohol blends. *Physica B* **2011**, *406*, 4068–4076. [[CrossRef](#)]
20. Qi, X.; Hu, X.; Wei, W.; Yu, H.; Li, J.; Zhang, J.; Dong, W. Investigation of salecan/poly(vinyl alcohol) hydrogels prepared by freeze/thaw method. *Carbohydr. Polym.* **2015**, *118*, 60–69. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Sudhamani, S.R.; Prasad, M.S.; Udaya-Sankar, K. DSC and FTIR studies on gellan and polyvinyl alcohol (PVA) blend films. *Food Hydrocoll.* **2003**, *17*, 245–250. [[CrossRef](#)]
22. Gómez, I.; Otazo, E.M.; Hernández, H.; Rubio, E.; Varela, J.; Ramírez, M.; Barajas, I.; Gordillo, A.J. Thermal degradation study of PVA derivative with pendant phenylthionecarbamate groups by DSC/TGA and GC/MS. *Polym. Degrad. Stab.* **2015**, *112*, 132–136. [[CrossRef](#)]
23. Kong, Y.; Hay, J.N. The measurement of the crystallinity of polymers by DSC. *Polymer* **2002**, *43*, 3873–3878. [[CrossRef](#)]
24. Elliot, S.R. *Physics of Amorphous Materials*, 2nd ed.; Longman Scientific & Technical: New York, NY, USA, 1993.
25. Ball, S.; Guan, H.P.; James, M.; Myers, A.; Keeling, P.; Mouille, G. From glycogen to amylopectin: A model for the biogenesis of the plant starch granule. *Cell* **1996**, *86*, 349–352. [[CrossRef](#)]
26. Hulleman, S.H.D.; Janssen, F.H.P.; Feil, H. The role of water during plasticization of native starches. *Polymer* **1998**, *39*, 2043–2048. [[CrossRef](#)]
27. Jenkins, P.J.; Donald, A.M. The influence of amylose on starch granule structure. *Int. J. Biol. Macromol.* **1995**, *17*, 315–321. [[CrossRef](#)]

28. Lourdin, D.; Dellavalle, G.; Colonna, P. Influence of amylose content on starch films and foams. *Carbohydr. Polym.* **1995**, *27*, 261–270. [[CrossRef](#)]
29. Van Soest, J.J.G.; Hulleman, S.H.D.; De Wit, D.; Vliegthart, J.F.G. Crystallinity in starch bioplastics. *Ind. Crop. Prod.* **1996**, *5*, 11–22. [[CrossRef](#)]
30. Chaturvedi, A.; Bajpai, A.K.; Bajpai, J.; Singh, S.K. Evaluation of poly (vinyl alcohol) based cryogel-zinc oxide nanocomposites for possible applications as wound dressing materials. *Mater. Sci. Eng.* **2016**, *65*, 408–418. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Aouada, F.A.; De-Moura, M.R.; Fernandes, P.R.G.; Rubira, A.F.; Muniz, E.C. Optical and morphological characterization of polyacrylamide hydrogel and liquid crystal systems. *Eur. Polym. J.* **2005**, *41*, 2134–2141. [[CrossRef](#)]
32. Huijbrechts, A.M.L.; Desse, M.; Budtova, T.; Franssen, M.C.R.; Visser, G.M.; Boeriu, C.G.; Sudhölter, E.J.R. Physicochemical properties of etherified maize starches. *Carbohydr. Polym.* **2008**, *74*, 170–184. [[CrossRef](#)]
33. Shi, M.; Chen, Y.; Yu, S.; Gao, Q. Preparation and properties of RS III from waxy maize starch with pullulanase. *Food Hydrocoll.* **2013**, *33*, 19–25. [[CrossRef](#)]
34. Yoon, H.S.; Lee, J.H.; Lim, S.T. Utilization for retrograded waxy maize starch gels as tablet matrix for controlled release of theophylline. *Carbohydr. Polym.* **2009**, *76*, 449–453. [[CrossRef](#)]
35. Yang, X.; Liu, Q.; Chen, X.; Yu, F.; Zhu, Z. Investigation of PVA/WS-chitosan hydrogels prepared by combined γ -irradiation and freeze-thawing. *Carbohydr. Polym.* **2008**, *73*, 401–408. [[CrossRef](#)]
36. Wang, Y.; Lue, A.; Zhang, L. Rheological behavior of waterborne polyurethane/starch aqueous dispersions during cure. *Polymer* **2009**, *50*, 5474–5481. [[CrossRef](#)]
37. Bhunia, T.; Giri, A.; Nasim, T.; Chattopadhyay, D.; Bandyopadhyay, A. Uniquely different PVA-xanthan gum irradiated membranes as transdermal diltiazem delivery device. *Carbohydr. Polym.* **2013**, *95*, 252–261. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Fan, L.; Yang, H.; Yang, J.; Peng, M.; Hu, J. Preparation and characterization of chitosan/gelatin/PVA hydrogel for wound dressings. *Carbohydr. Polym.* **2016**, *146*, 427–434. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Lu, H.W.; Zhang, L.M.; Wang, C.; Chen, R.F. Preparation and properties of new micellar drug carriers based on hydrophobically modified amylopectin. *Carbohydr. Polym.* **2011**, *83*, 1499–1506. [[CrossRef](#)]
40. Shalviri, A.; Liu, Q.; Abdekhodaie, M.J.; Wu, X.Y. Novel modified starch-xanthan gum hydrogels for controlled drug delivery: Synthesis and characterization. *Carbohydr. Polym.* **2010**, *79*, 898–907. [[CrossRef](#)]
41. Zou, W.; Yu, L.; Liu, X.; Chen, L.; Zhang, X.; Qiao, D.; Zhang, R. Effects of amylose/amylopectin ratio on starch-based superabsorbent polymers. *Carbohydr. Polym.* **2012**, *87*, 1583–1588. [[CrossRef](#)]



© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).