

00582



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

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

**REOLOGÍA Y ESTRUCTURA DE MEZCLAS FORMADAS  
POR LOS POLISACÁRIDOS  
ALMIDÓN DE MAIZ CEROSO Y GELANA**

TESIS  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS**

PRESENTA  
ADRIANA INÉS RODRÍGUEZ HERNÁNDEZ



TUTOR:  
DR. ALBERTO TECANTE CORONEL

AÑO: 2004.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

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

## AGRADECIMIENTOS

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

Agradezco a la Dirección General de Asuntos de Personal Académico (DGAPA-UNAM) la beca otorgada para la realización de estudios de doctorado (1997-1999), así como mi participación como estudiante de doctorado en el proyecto IN 112399 "*Reología y estructura de pastas y geles de almidón en presencia de polisacáridos gelificantes*", del cual se financió una estancia de investigación en el Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) en Nantes, Francia (8 de julio al 5 de octubre de 2000) para realizar estudios de microscopía confocal láser y reología de gelana y mezclas almidón-gelana, bajo la dirección del Dr. Jean Louis Doublier y Dra. Catherine Garnier.

Mi más sincero agradecimiento al Dr. Alberto Tecante Coronel por su confianza, disponibilidad y por los conocimientos que logró transmitirme a lo largo de mi formación en la UNAM. Le agradezco también haber adquirido el gusto por la Reología y por el estudio de los polisacáridos.

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

Finalmente, de forma especial agradezco a los miembros del jurado:

Dr. Federico Alfredo García Jiménez, IQ-UNAM  
Dr. Octavio Manero Brito, IIM-UNAM  
Dra. Amelia Farrés González Saravia, FQ-UNAM  
Dr. Juan Alfredo Salazar Montoya, CINVESTAV-IPN  
Dr. Rafael Herrera Nájera, FQ-UNAM  
Dra. Laura Patricia Martínez Padilla, FESC-UNAM  
Dr. Eduardo San Martín Martínez, CICATA-IPN

Sus valiosas sugerencias durante la revisión de este trabajo, ya que todas contribuyeron a su mejoramiento.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Adriana Inés

Rodríguez Hernández

FECHA: 20 de Abril de 2004

FIRMA: 

*Esta Tesis está dedicada a mi hija Daira Adriana, a Norberto y a mi madre, quienes han sido la fuente de mi motivación para concluirla.*

# ÍNDICE

		página
<b>INTRODUCCIÓN</b>	Introducción	1
<b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	1. Gelana	4
	1.1 Introducción	4
	1.2 Estructura química	5
	1.3 Estructura cristalina, conformación en solución y mecanismo de gelificación	6
	1.4 Estudios reológicos	10
	1.5 Microestructura de gelana y mezclas con biopolímeros	17
	2. Almidón	20
	2.1 Introducción	20
	2.2 Morfología del gránulo de almidón	21
	2.3 Macromoléculas componentes del almidón	21
	2.4 Gelatinización de almidones	25
	2.5 Reología de pastas y geles de almidón	35
	2.6 Reología de mezclas almidón-hidrocoloide	45
	2.7 Conclusiones de la revisión bibliográfica	55
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	3.1 Hipótesis	61
	3.2 Objetivos	62
	3.2.1 Objetivo general	62
	3.2.2 Objetivos particulares	62
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	4.1 Materiales	63
	4.1.1 Gelana	63
	4.1.2 Almidón	64
	4.1.3 Amilopectina	65
	4.1.4 Preparación de gelana fluorescente	66
	4.1.5 Preparación de amilopectina fluorescente	69
	4.2 Métodos	70
	4.2.1 Viscosidad intrínseca	70
	4.2.2 Preparación de sistemas monocomponentes	71
	4.2.3 Preparación de sistemas mixtos	73
	4.2.4 Índices de hinchamiento y solubilidad	74

	página
4.2.5 Microscopía óptica	75
4.2.6 Determinaciones reológicas	75
4.2.7 Calorimetría diferencial de barrido	77
4.2.8 Microscopía confocal de barrido láser	77
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	
5.1 Gelana	79
5.1.1 Calorimetría diferencial de barrido	79
5.1.2 Reología dinámica	83
5.1.3 Microestructura	89
5.1.4 Discusión	92
5.2 Almidón	94
5.2.1 Índices de hinchamiento y solubilidad	94
5.2.2 Reología dinámica	100
5.2.3 Discusión	102
5.3 Mezclas almidón-gelana	105
5.3.1 Reología dinámica de mezclas con concentraciones de gelana 0.1% a 0.3% (m/m)	105
5.3.2 Reología dinámica de mezclas con concentraciones de gelana $\leq 0.05\%$ (m/m)	110
5.3.3 Microestructura de mezclas almidón-gelana	120
5.3.4 Discusión	123
5.4 Mezclas amilopectina-gelana	129
5.4.1 Reología dinámica	129
5.4.2 Microestructura	137
5.4.3 Discusión	144
<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES PARA TRABAJOS FUTUROS</b>	
6.1 Conclusiones	151
6.2 Sugerencias para trabajos futuros	153
<b>ANEXO A</b>	
Determinación de solubilidad e índice de hinchamiento de almidón	154
<b>ANEXO B</b>	
Zona de viscoelasticidad lineal de los sistemas estudiados	157
<b>ANEXO C</b>	
Viscosidad intrínseca	159

		página
<b>ANEXO D</b>	Reometría de cizalla oscilatoria de pequeña amplitud	166
<b>ANEXO E</b>	Microscopía confocal de barrido láser	174
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	Referencias bibliográficas	176

## ÍNDICE DE CUADROS

		página
<b>Cuadro 2.2-1</b>	Propiedades fisicoquímicas de almidones comunes.	23
<b>Cuadro 2.3-1</b>	Propiedades generales de las macromoléculas componentes del almidón.	25
<b>Cuadro 2.4-1</b>	Temperaturas de gelatinización de almidones de maíz determinadas por calorimetría diferencial de barrido.	28
<b>Cuadro 2.4-2</b>	Diámetros medianos ( $D [v,0.5]$ ), iniciales y máximos y poder máximo de hinchamiento de partículas de almidón durante la gelatinización.	33
<b>Cuadro 2.5-1</b>	Factores que pueden influir en el comportamiento reológico de suspensiones de almidón.	39
<b>Cuadro 2.6-1</b>	Coefficiente de velocidad de calentamiento ( $J$ ), módulos dinámicos ( $G^*$ , $G'$ , $G''$ ) y diámetro límite del gránulo para diferentes sistemas conteniendo almidón de maíz.	55
<b>Cuadro 4.1.1-1</b>	Contenido iónico de gelana comercial y gelana sometida a intercambio aniónico (gelana sódica).	64
<b>Cuadro 4.1.3-1</b>	Características fisicoquímicas del almidón de maíz ceroso y la amilopectina obtenida a partir de éste.	66
<b>Cuadro 4.2.1-1</b>	Valores de viscosidad intrínseca de gelana y amilopectina.	71
<b>Cuadro 5.1.1-1</b>	Datos experimentales de calorimetría diferencial de barrido de gelana 1% (m/m) en presencia de $\text{CaCl}_2$ 0.01 mol/dm <sup>3</sup> y NaCl 0.01 mol/dm <sup>3</sup> .	81
<b>Cuadro 5.3.1-1</b>	Dependencia de $G'$ con la frecuencia ( $G' \propto \omega^a$ ). Mezclas almidón-gelana preparadas a 90 °C.	106
<b>Cuadro 5.3.1-2</b>	Valores del módulo de almacenamiento ( $G'$ ) y del ángulo de pérdida de gelana (0.1% a 0.3%) y de las diferentes mezclas gelana-almidón. Valores a $\omega = 1$ rad/s.	106
<b>Cuadro 5.3.2-1</b>	Dependencia de $G'$ con la frecuencia ( $G' \propto \omega^a$ ). Mezclas almidón-gelana preparadas a 75 °C y 90 °C, y geles de gelana.	113

	página
<b>Cuadro 5.4.1-1</b> Dependencia de $G'$ y $G''$ con la frecuencia de las mezclas amilopectina-gelana.	132
<b>Cuadro B.1</b> Zona de viscoelasticidad lineal de los sistemas estudiados.	157
<b>Cuadro C.2-1</b> Viscosidades de soluciones de gelana en NaCl 0.01 mol/dm <sup>3</sup> a 25 °C.	161
<b>Cuadro C.2-2</b> Viscosidades de soluciones de gelana-FA en NaCl 0.01 mol/dm <sup>3</sup> a 25 °C.	162
<b>Cuadro C.3-1</b> Viscosidades de soluciones acuosas de amilopectina a 25 °C.	164
<b>Cuadro C.3-2</b> Viscosidades de soluciones acuosas de amilopectina-RITC a 25 °C.	165

## ÍNDICE DE FIGURAS

		página
<b>Figura 1.2-1.</b>	Tetrasacárido estructural de la goma gelana desacilada.	5
<b>Figura 1.3-1</b>	Representación esquemática de los enlaces intermoleculares, intramoleculares y la coordinación del ion potasio (K <sup>+</sup> ) en la doble hélice de gelana nativa (a) y gelana desacilada (b).	7
<b>Figura 1.3-2</b>	Modelo de estructuración de gelana en solución.	9
<b>Figura 1.4-1</b>	Módulo de almacenamiento de gelana 1% en función de la concentración de NaCl.	12
<b>Figura 1.5-1</b>	Microscopía de fuerza atómica de gelana-K <sup>+</sup> (a) 3 µg/mL (0.0003% p/v) y (b) 10 µg/mL (0.001% m/v).	18
<b>Figura 1.5-2</b>	(a) Microscopía de transmisión electrónica de la mezcla 1.4%/12% gelana/maltodextrina, (b) Microscopía confocal de barrido láser de la mezcla 1%/20% gelana/maltodextrina.	19
<b>Figura 2.4-1</b>	Patrones esquemáticos de solubilidad e hinchamiento de varios tipos de almidones nativos.	31
<b>Figura 2.4-2</b>	Hinchamiento (expresado en volumen de gránulos hinchados entre el volumen inicial del almidón) de almidones gelatinizados de maíz.	32
<b>Figura 2.4-3</b>	Imágenes de microscopía óptica de la gelatinización de almidón de maíz ceroso nativo.	34
<b>Figura 2.5-1</b>	Regímenes de concentración en suspensiones de gránulos gelatinizados de almidón.	41
<b>Figura 2.5-2</b>	Dependencia con la frecuencia de G', G'' y η* de almidón de maíz ceroso gelatinizado al 2% (m/m) en suspensión acuosa.	44
<b>Figura 2.6-1</b>	Variación de los módulos dinámicos de pastas de almidón en función de la concentración de hidrocoloide adicionado (guar (G), algarrobo (C), xantana (X)).	47
<b>Figura 2.6-2</b>	Representación esquemática de los posibles arreglos moleculares de los hidrocoloides en la estructura gelificada de las mezclas almidón hidrocoloide.	48
<b>Figura 2.6-3</b>	Variación de G' y tangente de delta con la concentración de almidón en co-gelates de almidón de maíz ceroso nativo con agarosa (0.25% m/m).	51

	página	
<b>Figura 2.6-4</b>	Módulos dinámicos, $G'$ y $G''$ , de almidón de papa (2% m/m), xantana (0.2% m/m) y almidón-xantana (2% - 0.2%) en función de la frecuencia de oscilación. Muestras preparadas en leche a 95 °C a 110 rpm.	54
<b>Figura 4.1.1-1</b>	Intercambio iónico de gelana comercial y recuperación de gelana de los eluatos de la columna de intercambio iónico.	65
<b>Figura 4.1.4-1.</b>	Dependencia del módulo de almacenamiento ( $G'$ ) y módulo de pérdida ( $G''$ ) con la frecuencia, gelana y FA-gelana 0.3% (m/v) en presencia de $\text{CaCl}_2$ 0.01 mol/dm <sup>3</sup> .	68
<b>Figura 4.1.4-2.</b>	Valores de tangente de delta de gelana y FA-gelana 0.3% (m/v) en presencia de $\text{CaCl}_2$ 0.01 mol/dm <sup>3</sup> .	68
<b>Figura 4.1.5-1.</b>	Viscosidad de soluciones de amilopectina a 25 °C.	69
<b>Figura 4.2.2-1</b>	Preparación de pastas de almidón en tanque de acero inoxidable (0.6 L de capacidad).	72
<b>Figura 4.2.6-1</b>	Corte de geles en discos previo al análisis geométrico.	76
<b>Figura 5.1.1-1</b>	Calorimetría diferencial de barrido de gelana 1% en 0.01 mol/dm <sup>3</sup> de NaCl y 0.01 mol/dm <sup>3</sup> de $\text{CaCl}_2$ .	80
<b>Figura 5.1.1-2</b>	Termogramas (enfriamiento, 0.5 °C/min) de dispersiones de gelana 1% en 0.01 mol/dm <sup>3</sup> de $\text{CaCl}_2$ , y evolución de los módulos dinámicos, $G'$ y $G''$ , con la temperatura de gelana 0.05% en 0.01 mol/dm <sup>3</sup> de $\text{CaCl}_2$ , $\omega = 1$ rad/s, $\gamma = 2\%$ .	82
<b>Figura 5.1.2-1</b>	Variación de los módulos dinámicos ( $G'$ y $G''$ ) con la frecuencia de gelana en 0.01 mol/dm <sup>3</sup> de $\text{CaCl}_2$ .	84
<b>Figura 5.1.2-2</b>	Módulo de almacenamiento en función de la concentración de gelana (% m/m), $\omega = 1$ rad/s, $T = 25$ °C.	86
<b>Figura 5.1.2-3</b>	Ángulos de pérdida de gelana en 0.01 mol/dm <sup>3</sup> de $\text{CaCl}_2$ , $T = 25$ °C.	87
<b>Figura 5.1.2-4</b>	Barridos de deformación a 1 rad/s y 25 °C de gelana en 0.01 mol/dm <sup>3</sup> de $\text{CaCl}_2$ .	88
<b>Figura 5.1.3-1</b>	Microfotografías de gelana en 0.01 mol/dm <sup>3</sup> de $\text{CaCl}_2$ .	90
<b>Figura 5.1.3-2</b>	Secciones transversales de gelana 0.005 % en 0.01 mol/dm <sup>3</sup> de $\text{CaCl}_2$ .	91

	página
<b>Figura 5.2.1-1</b>	Microscopía óptica de almidón de maíz ceroso nativo 4 %, a) 65 °C, b) 75 °C y c) 90 °C. <span style="float: right;">95</span>
<b>Figura 5.2.1-2</b>	Índices de solubilidad e hinchamiento, y fracción volumen, de pastas de almidón de maíz ceroso en función de la concentración (% m/m). <span style="float: right;">97</span>
<b>Figura 5.2.1-3</b>	Valores de solubilidad e hinchamiento de almidón de maíz ceroso nativo durante el cocimiento de las pastas. <span style="float: right;">99</span>
<b>Figura 5.2.1-4</b>	Evolución de la fracción volumen de los gránulos hinchados de almidón de maíz ceroso nativo durante el cocimiento de las pastas. <span style="float: right;">100</span>
<b>Figura 5.2.2-1</b>	Módulos dinámicos y ángulos de pérdida de pastas de almidón de maíz ceroso nativo. Concentración de almidón: 3% (m/m), temperatura de cocción de las pastas: 75 y 90 °C. <span style="float: right;">101</span>
<b>Figura 5.2.2-2</b>	Módulos dinámicos y ángulos de pérdida de pastas de almidón de maíz ceroso nativo. Temperatura de cocción de las pastas: 90 °C. Determinaciones realizadas a 25 °C. <span style="float: right;">103</span>
<b>Figura 5.3.1-1</b>	Módulos dinámicos en función de la frecuencia y ángulos de pérdida de mezclas almidón-gelana (0.1 a 0.3%). Efecto de gelana. <span style="float: right;">107</span>
<b>Figura 5.3.1-2</b>	Módulos dinámicos en función de la frecuencia y ángulos de pérdida de mezclas almidón-gelana (0.1 a 0.3%). Efecto de almidón. <span style="float: right;">109</span>
<b>Figura 5.3.2-1</b>	Módulos dinámicos en función de la frecuencia de: (a) mezclas almidón-gelana preparadas a 75 °C y (b) gelana sola. Concentraciones de gelana: 0.005 y 0.01%. <span style="float: right;">111</span>
<b>Figura 5.3.2-2</b>	Módulos dinámicos en función de la frecuencia de: (a) mezclas almidón-gelana preparadas a 75 °C y (b) gelana sola. Concentraciones de gelana: 0.03 y 0.05%. <span style="float: right;">112</span>
<b>Figura 5.3.2-3</b>	Módulos dinámicos en función de la frecuencia de: (a) mezclas almidón-gelana preparadas a 90 °C y (b) gelana sola. Concentraciones de gelana: 0.005 y 0.01%. <span style="float: right;">114</span>
<b>Figura 5.3.2-4</b>	Módulos dinámicos en función de la frecuencia de: (a) mezclas almidón-gelana preparadas a 90 °C y (b) gelana sola. Concentraciones de gelana: 0.02 y 0.03%. <span style="float: right;">115</span>
<b>Figura 5.3.2-5</b>	Módulos dinámicos en función de la frecuencia de: (a) mezclas almidón-gelana preparadas a 90 °C y (b) gelana sola. Concentraciones de gelana: 0.04 y 0.05%. <span style="float: right;">116</span>

	página
<b>Figura 5.3.2-7</b> Ángulos de pérdida de mezclas almidón-gelana preparadas a 75 °C, 90 °C, y geles de gelana sola. La concentración de almidón en todas las mezclas fue 3%.	117
<b>Figura 5.3.2-7</b> Ángulos de pérdida ( $\delta$ ) en función de la concentración de gelana. Mezclas preparadas a 75 °C y 90 °C, y gelana sola.	119
<b>Figura 5.3.2-8</b> Módulo de almacenamiento ( $G'$ ) en función de la concentración de gelana en las mezclas con 3% de almidón. Mezclas preparadas a 90 °C y 75 °C, y gelana sola.	120
<b>Figura 5.3.3-1</b> Microfotografías confocal de barrido láser de mezclas almidón-gelana en 0.01 mol/dm <sup>3</sup> de CaCl <sub>2</sub> ; preparadas a 75 °C.	122
<b>Figura 5.3.3-2</b> Microfotografías confocal de barrido láser de mezclas almidón-gelana en 0.01 mol/dm <sup>3</sup> de CaCl <sub>2</sub> ; preparadas a 90 °C.	124
<b>Figura 5.3.4-1</b> Viscosidad de gelana 0.5% (m/m) en solución acuosa sin adición de iones. Determinaciones realizadas a 25 °C.	127
<b>Figura 5.4.1-1</b> Variación de $G'$ y $G''$ con la frecuencia de soluciones acuosas de amilopectina al 7, 5 y 3%, y pasta de almidón de maíz ceroso nativo al 3% cocido a 90 °C.	130
<b>Figura 5.4.1-2</b> Módulos dinámicos en función de la frecuencia de las mezclas formadas por 3% amilopectina-gelana y de geles de gelana.	133
<b>Figura 5.4.1-3</b> Módulos dinámicos en función de la frecuencia de las mezclas formadas por 7% amilopectina-gelana y de geles de gelana.	134
<b>Figura 5.4.1-4</b> Ángulo de pérdida de las mezclas formadas por 3% amilopectina y gelana.	135
<b>Figura 5.4.1-5</b> Ángulo de pérdida de las mezclas formadas por 7% amilopectina y gelana.	136
<b>Figura 5.4.1-6</b> Comportamiento del ángulo de pérdida en función de la concentración de gelana, a) $\omega = 0.1$ rad/s y b) $\omega = 1$ rad/s. Mezclas amilopectina-gelana.	138
<b>Figura 5.4.1-7.</b> Módulo de almacenamiento de las mezclas amilopectina-gelana y de geles de gelana en función de la concentración de gelana. Determinaciones realizadas a 1 rad/s y 25 °C.	139

	página	
<b>Figura 5.4.2-1</b>	Microfotografías confocal de barrido láser de mezclas amilopectina 3% con gelana (0.005 a 0.05%).	140
<b>Figura 5.4.2-2</b>	Microfotografías confocal de barrido láser de mezclas amilopectina 3% con gelana (0.005 a 0.05%). Técnica de doble localización.	142
<b>Figura 5.4.2-3</b>	Microfotografías confocal de barrido láser de mezclas amilopectina 7% con gelana (0.005 a 0.05%).	143
<b>Figura 5.4.2-4.</b>	Microfotografías confocal de barrido láser de mezclas amilopectina 7% con gelana (0.005 a 0.05%). Técnica de doble localización.	145
<b>Figura 5.4.2-5.</b>	Microfotografías confocal de barrido láser de mezclas amilopectina 3 y 7% con gelana (0.1 a 0.3%).	146
<b>Figura 5.4.3-1.</b>	Evolución del módulo de almacenamiento con el tiempo de algunas mezclas amilopectina/gelana y geles de gelana. Determinaciones realizadas a 1 rad/s durante el enfriamiento gradual de las mezclas desde 65 °C hasta 25 °C.	150
<b>Figura C.2-1.</b>	Determinación de viscosidad intrínseca de gelana.	161
<b>Figura C.2-2.</b>	Determinación de viscosidad intrínseca de gelana-FA.	162
<b>Figura C.3-1</b>	Determinación de viscosidad intrínseca de amilopectina.	163
<b>Figura C.3-2</b>	Determinación de viscosidad intrínseca de amilopectina-RITC.	164
<b>Figura D-1</b>	Geometría y perfil de tiempo de un experimento de cizalla simple oscilatoria.	166
<b>Figura D-2</b>	Resolución vectorial de los componentes del módulo complejo en deformaciones de cizalla oscilatoria.	171
<b>Figura E-1.</b>	Diagrama del principio de operación de MCBL	174

## NOTACIÓN

		unidades
$\dot{\gamma}_0$	Amplitud de velocidad de deformación	[s <sup>-1</sup> ]
$\gamma$	Deformación bajo condiciones de cizalla	-
$\gamma_0$	Amplitud de la deformación de cizalla	-
$\dot{\gamma}$	Velocidad de deformación	[s <sup>-1</sup> ]
$\dot{\gamma}^*$	Velocidad de deformación compleja	[s <sup>-1</sup> ]
$\gamma^*$	Deformación compleja	-
$\eta$	Viscosidad no newtoniana	[Pa s]
$\eta_0$	Viscosidad a bajas velocidades de deformación	[Pa s]
$[\eta]$	Viscosidad intrínseca $[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\eta_{sp}}{C}$	[L/g]
$\eta_{rel}$	Viscosidad relativa ( $\eta_{rel} = \frac{\eta}{\eta_s}$ )	-
$\eta_{sp}$	Viscosidad específica ( $\eta_{sp} = \eta_{rel} - 1$ )	-
$\eta_{red}$	Viscosidad reducida ( $\eta_{red} = \frac{\eta_{sp}}{C}$ )	[L/g]
$\eta_s$	Viscosidad del disolvente	[Pa s]
$\eta^*$	Viscosidad compleja	[Pa s]
$\eta'$	Viscosidad dinámica o viscosidad en fase con la rapidez de deformación	[Pa s]
$\eta''$	Viscosidad fuera de fase en 90 ° con la rapidez de deformación	[Pa s]
$\sigma$	Esfuerzo de cizalla	[Pa]
$\sigma_0$	Amplitud del esfuerzo de cizalla	[Pa]
$\sigma^*$	Esfuerzo complejo	[Pa]
$\omega$	Frecuencia de oscilación	[rad/s]
$\delta$	Ángulo de desfase entre el esfuerzo y la deformación en cizalla oscilatoria	[°]
$\tan \delta$	$G''/G'$	-
$\lambda$	Longitud de onda	[nm]
$\Re$	Parte real de un número complejo	-
$i$	Parte imaginaria de un número complejo	-
$\Phi$	Fracción volumen de partículas hinchadas en pastas de almidón	-
CDB	Calorimetría diferencial de barrido	
e	Número de Euler	
FA	Fluoresceinamina	
$G^*$	Módulo complejo	{Pa}
$G'$	Módulo de almacenamiento	[Pa]
$G''$	Módulo de pérdida	[Pa]
H	Hinchamiento del gránulo de almidón	[g/g]
$k'$	Coficiente de Huggins	-
$k''$	Coficiente de Kraemer	-

MCBL	Microscopía confocal de barrido láser	
MFA	Microscopía de Fuerza Atómica	
RITC	Isotiocianato de rodamina	
S	Solubilidad de almidón durante su cocimiento	[% m/m]
T	Temperatura	[°C]
T <sub>0</sub>	Temperatura de inicio de transiciones térmicas en DSC	[°C]
T <sub>m</sub>	Temperatura de transición conformacional de macromoléculas	
T <sub>p</sub>	Temperatura del pico de la transición térmica en DSC	[°C]

## RESUMEN

Se llevaron a cabo determinaciones de viscoelasticidad lineal y estudios de microscopía confocal de barrido láser en mezclas formadas por almidón de maíz ceroso nativo ( $\approx 99\%$  amilopectina) (3%, 5% y 7% (m/m)) y gelana (0.005% a 0.3% (m/m)) en presencia de  $0.01 \text{ mol/dm}^3$  de  $\text{CaCl}_2$ . Las mezclas se prepararon usando dos temperaturas para el cocimiento del almidón,  $75^\circ\text{C}$  y  $90^\circ\text{C}$ . Tanto las determinaciones reológicas como las observaciones al microscopio se realizaron a  $25^\circ\text{C}$ . El objetivo del estudio fue relacionar la microestructura y el comportamiento viscoelástico de sistemas formados por un almidón libre de amilosa y gelana, con el fin de conocer la naturaleza de la organización estructural entre almidón e hidrocoloides gelificantes.

El estudio reológico y microestructural de gelana y de almidón se realizó en paralelo con el propósito de conocer su organización estructural, y explicar la reología de los sistemas que los contienen en términos de dicha organización. Por otra parte, se realizaron estudios de reología y microestructura de las mezclas gelana-amilopectina con el propósito de visualizar posibles eventos de separación de fases entre las macromoléculas que conforman la fase continua de las mezclas almidón-gelana. Todas las determinaciones se realizaron a  $25^\circ\text{C}$ .

Las concentraciones de gelana examinadas en este trabajo permitieron distinguir diferentes niveles de organización estructural, los cuales fueron consistentes con sus comportamientos reológicos. A partir de la relación  $\log G'$  versus concentración de gelana, pudo observarse que las concentraciones bajas de gelana usadas en este trabajo están cercanas a la concentración crítica de gelificación. En este sentido, dichas concentraciones mostraron el inicio de la formación de redes de gelana. La magnitud de las propiedades viscoelásticas de estos sistemas estuvo determinada por la cantidad de redes de gelana en el volumen del gel y su interconexión. La correlación reología-microestructura nos mostró cómo concentraciones progresivamente mayores de gelana, en el intervalo 0.005% a 0.02%, resultaron en sistemas más elásticos en donde sus redes se hayan reforzadas, mientras que concentraciones mayores de gelana tuvieron poco efecto en las propiedades reológicas y en los aspectos microestructurales de sus geles.

Las propiedades viscoelásticas y la microestructura de las mezclas gelana-almidón cocidas a 75 °C y 90 °C fueron significativamente diferentes. A 75 °C se observaron gránulos hinchados y parcialmente fragmentados, mientras que a 90 °C las entidades dominantes fueron los gránulos fragmentados. La adición de gelana produjo mezclas con propiedades elásticas diferentes, las cuales estuvieron en función de la extensión de la desintegración granular y de la concentración de gelana en la mezcla. Las mezclas con concentraciones de gelana menores de 0.02%, estuvieron compuestas de gránulos hinchados rodeados de una red compacta de gelana, lo cual resultó en sistemas con sinergia en sus propiedades viscoelásticas, tanto en las mezclas preparadas a 75 °C como en aquellas preparadas a 90 °C. Concentraciones superiores de gelana en las mezclas no presentaron efectos sinérgicos, gelana dominó el comportamiento viscoelástico debido a la existencia de redes más homogéneas e interconectadas.

En contraste, la gelificación de gelana en presencia de amilopectina (3% y 7%) generó sistemas menos elásticos que los geles respectivos de gelana debido a la creación de redes menos robustas las cuales albergan en sus poros a amilopectina en solución. Los estudios de microestructura no mostraron separación de fases en estas mezclas.

## ABSTRACT

The linear viscoelastic properties and confocal laser scanning microscopy (CLSM) of mixtures formed by unmodified waxy maize starch ( $\approx 99\%$  amylopectin) (3%, 5% and 7% (m/m)) and gellan (0.005% to 0.3% (m/m)) in the presence of  $0.01 \text{ mol/dm}^3 \text{ CaCl}_2$  and pasted at  $75^\circ\text{C}$  and  $90^\circ\text{C}$  were investigated at  $25^\circ\text{C}$ . The objective of this work was to determine the viscoelastic properties of waxy maize starch-gellan blends and correlate that information with their microstructure in order to provide some insights on the nature of the interactions between starch and gelling hydrocolloids.

The rheological and microstructural studies of gellan and starch were also carried out in order to know their structural organization and explain the rheology of the mixed systems in terms of such organization. On the other hand, the rheological properties and microstructure of amylopectin-gellan blends were examined to visualize hypothetical phase separation between the macromolecules present within the continuous phase of starch-gellan systems. All determinations were done at  $25^\circ\text{C}$ .

The gellan concentrations studied in the current work allowed us to distinguish different levels of structure organization well consistent with their rheological behaviors. From the  $\log G'$  versus gellan concentration relationships, it can be seen that the low polysaccharide concentrations used here are close to the critical gel concentration. In this way, such concentrations evidence the onset of network formation. The magnitude of the viscoelastic properties of these systems depends on the extent of connectivity and compactness of the gellan network. The correlation of rheology with CLSM observations allow us to see how the progressively higher gellan concentrations, into the range 0.005% to 0.02%, result in more elastic systems well evidenced by the reinforcement of network structures while at higher gellan concentrations the changes in the rheological and microstructural aspects are not so strongly noticeable as gellan content is increased

The viscoelastic properties and microstructure of mixtures of unmodified waxy maize starch and gellan pasted at  $75^\circ\text{C}$  and  $90^\circ\text{C}$  were significantly different. At  $75^\circ\text{C}$  swollen and partially disrupted granules were observed, while at  $90^\circ\text{C}$  the dominant feature was the presence of

granule remnants. Addition of gellan produced mixtures with different elastic properties depending on the extent of granular disruption and gellan concentration in the mixture. Below 0.02% gellan, swollen granules were surrounded by a compact network making possible the formation of synergistic blends at both pasting temperatures. Above such gellan concentration no synergistic effects were observed and gellan dominated the viscoelastic behavior because of the existence of a more interconnected and homogeneous network.

In contrast, gellan gelation in the presence of amylopectin (3% and 7%) produced less elastic systems than gellan alone due to decreased thickness of the strands of gellan network. The microstructure of gellan-amylopectin mixtures did not reveal phase separation.

# INTRODUCCIÓN

## INTRODUCCIÓN

El almidón es el polisacárido más usado en la manufactura de alimentos. Se utiliza principalmente para espesar alimentos fluidos (sopas, alimentos infantiles) o para dar consistencia tipo gel a productos como rellenos de pastelería, postres y confitería en general, pero las concentraciones recomendadas son relativamente altas en comparación con las usadas con hidrocoloides espesantes y éstas pueden inducir sabores harinosos no deseables en algunos alimentos. Una alternativa para obtener sistemas gelificados o con altas viscosidades a partir de almidón, son las mezclas almidón-hidrocoloide. Por ejemplo, se ha reportado que el reemplazo de ciertas cantidades de almidón por pequeñas concentraciones de hidrocoloide acelera la gelificación de dicha mezcla (Appelqvist *et al.*, 1997), lo cual en procesos industriales podría significar un considerable ahorro en los gastos de energía debido a la disminución en el tiempo de procesamiento. Por otra parte, el uso de mezclas almidón-hidrocoloide genera una gama más amplia de texturas y de propiedades funcionales e incluso, en algunos casos, se han observado fenómenos de sinergia (Appelqvist *et al.*, 1997).

En la literatura científica de biopolímeros, el término sinergismo ha sido usado de forma confusa y existen serias discrepancias en la aplicación de este término en mezclas de biopolímeros cuyas propiedades hayan mostrado cierto perfeccionamiento. En reología de mezclas de biopolímeros, frecuentemente se denomina sinergia a aquella interacción entre biopolímeros que genera que las propiedades reológicas de la mezcla se incrementan más allá de la simple adición de las propiedades reológicas de los biopolímeros individuales (Morris, 1995). El sinergismo observado en algunas mezclas almidón-biopolímero ha propiciado el uso de tales mezclas en productos específicos pero como es usual, la aplicación antecede a su comprensión y por ello el uso de estos sistemas está rodeado de un alto grado de empirismo. Por ejemplo, a pesar de existir mucha información detallada de almidón y gluten, la funcionalidad de las masas de panificación todavía es controlada empíricamente (Tolstoguzov, 2003). Las complejidades del comportamiento reológico que manifiestan los sistemas almidonáceos, los cuales pueden considerarse como sistemas bifásicos en donde la fase dispersa está constituida de gránulos

hinchados de almidón y la fase continua de amilosa y amilopectina parcialmente disuelta, a pesar de estar bien identificadas distan mucho aún de estar completamente estudiadas.

La revisión bibliográfica de este trabajo resume algunos de los numerosos estudios que se han realizado para explicar el por qué de los diferentes comportamientos reológicos en sistemas constituidos por almidón, dentro de los que destaca el incremento de viscosidad que muestran las dispersiones de almidón gelatinizado en presencia de hidrocoloides. De igual forma se ha realizado una revisión bibliográfica de la estructura, propiedades y reología de gelana, un hidrocoloide muy versátil, cuya aplicación en alimentos se ha hecho principalmente a través de mezclas con hidrocoloides espesantes para “diluir” sus propiedades reológicas (Sanderson, 1990). Sin embargo, a pesar de diversas investigaciones, los mecanismos de las interacciones almidón-hidrocoloide no han sido completamente explicados. Una herramienta apropiada para el estudio sistemático de las propiedades funcionales de polisacáridos son las técnicas reológicas. Cada sistema, polisacáridos solos o en mezclas, presentan parámetros reológicos que reflejan su organización macromolecular en el medio. Esto da la posibilidad de discutir los resultados sobre la base de mecanismos moleculares, sobretodo si estas técnicas se auxilian de estudios fisicoquímicos que proporcionen información de su conformación u organización macromolecular en el medio (calorimetría diferencial de barrido, difracción de rayos X, RMN, microscopía, espectroscopía de infrarrojo).

Las técnicas de microscopía, aunque de naturaleza cualitativa, son una herramienta eficaz en el estudio de la estructura de sistemas biológicos. Si éstas se apoyan en el análisis de imágenes o en técnicas fisicoquímicas alternas, se puede obtener información cuantitativa valiosa. Entre las técnicas de microscopía, la microscopía electrónica de barrido y de transmisión electrónica, han sido las técnicas más usadas. Sin embargo, recientemente la microscopía confocal de barrido láser (MCBL) ha empezado a ser usada debido a su carácter no invasivo, lo cual permite obtener representaciones tridimensionales al hacer observaciones a distintos grosores de la muestra sin seccionar ésta. Además como sólo se refleja la luz emitida en el plano focal determinado por el usuario, no existen interferencias por luz fuera de foco y las microfotografías obtenidas son de mejor resolución y claridad. La MCBL ha sido calificada por algunos autores como la técnica de microscopía con mayores ventajas en especímenes biológicos, los cuales frecuentemente se

dañan estructuralmente por las técnicas de preparación comúnmente usadas en microscopía electrónica (Aguilera *et al.*, 2000). A pesar de que los científicos del área de ciencia e ingeniería de alimentos se han beneficiado con las nuevas técnicas de microscopía y éstas han tenido un avance tecnológico importante en los últimos años, aún son pocos los estudios que relacionan las propiedades reológicas con la microestructura del sistema y que explican los mecanismos que conllevan a comportamientos macroscópicos observados. Más aún, el conocimiento de la microestructura no se ha usado para controlar la reología del sistema en términos de condiciones de procesamiento, concentraciones óptimas de polisacáridos, contenido iónico y pH entre otros; al tener un conocimiento preciso de las interacciones imperantes del sistema y los efectos de las variables anteriores en la organización macromolecular y por ende en la reología del sistema.

# REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

## 1. GELANA

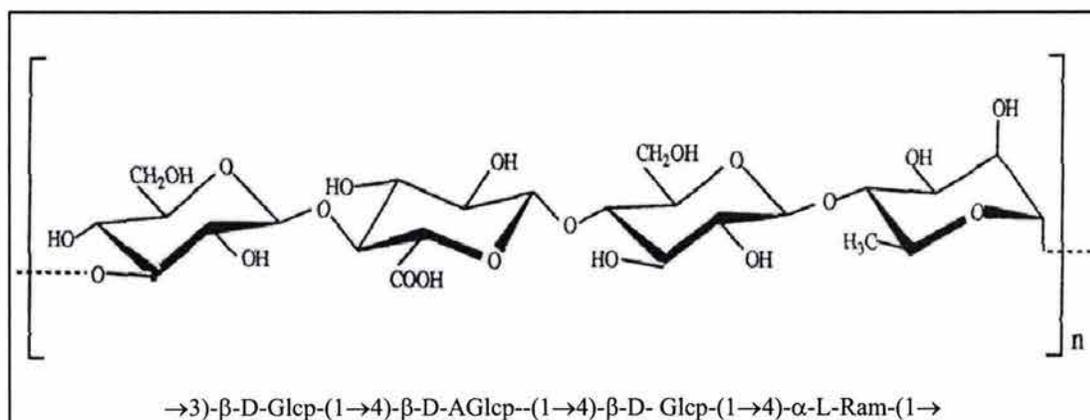
### 1.1 Introducción

En los últimos 30 años, las bacterias han sido una fuente apreciable de hidrocoloides, dextrana, xantana y gelana son quizá los más importantes. La gelana, es un polisacárido funcional a muy bajos niveles de uso y puede generar una gama de texturas manejando adecuadamente su concentración y la fuerza iónica del medio donde se utilice. A pesar de ser un hidrocoloide relativamente recién descubierto (1978), los estudios acerca de su estructura química, propiedades y aplicaciones son cada vez más numerosos y crecen en paralelo con su desarrollo comercial (Sanderson, 1990).

La gelana tiene la capacidad de formar geles a muy bajas concentraciones, los niveles típicos de uso están entre 0.05 y 0.4% (m/m); en contraste con  $\kappa$ -carragenina (0.4 a 0.8% m/m), agar (0.8 a 1.2% m/m) y gelatina (1.5 a 2% m/m). A una concentración dada de gelana, la fuerza requerida para fracturar el gel en pruebas de compresión uniaxial, expresada comúnmente como "fuerza del gel", así como las temperaturas de gelificación y de fundido se pueden cambiar al modificar el contenido iónico del medio (Anónimo, 1996). Actualmente se prefiere el uso de combinaciones de gelana con otros hidrocoloides para mejorar o ampliar la gama de propiedades mecánicas de los sistemas que la contengan. La gelana es un polisacárido con gran potencial en la manufactura de alimentos, cosméticos, fármacos, medios microbiológicos, medios para el cultivo de tejidos, películas fotográficas, entre otros productos (Anónimo, 1996). Esta amplia gama de usos de gelana se debe, entre otros aspectos, a la firmeza y dureza de sus geles, la estabilidad de las propiedades de sus geles en medios ácidos, la termo-resistencia de sus geles cuando se utilizan concentraciones adecuadas de iones, y su capacidad de encapsular compuestos volátiles (Sanderson, 1990). El mercado actual de hidrocoloides comercializa diversos tipos de gelana, desde gelana acilada, comúnmente designada como gelana nativa, gelana con bajo contenido de grupos acilo y gelana desacilada (Anónimo, 1996).

## 1.2 Estructura química

La gelana es un polisacárido aniónico extracelular producido por fermentación aerobia en cultivos de *Sphingomonas elodea*. La estructura primaria consiste de un monómero formado por los azúcares: 1,3 β D-glucosa, 1,4 β D-ácido glucurónico y 1,4 α L-ramnosa. La unidad tetrasacárida repetitiva de gelana fue determinada en 1983 (Jansson y Lindberg 1983) y se muestra en la Figura 1.2-1. Posteriores análisis estructurales en gelana nativa (Sanderson, 1990) sugirieron la presencia de grupos O-acetilo y O-L-glicerilo en cada tercer glucosa enlazada en el polímero, el grupo acetilo fue asignado a la posición 6 de la glucosa y el glicerilo a la posición 2, predominando este último. Estos compuestos se pierden durante el proceso de extracción comercial generando una gelana desacilada designada comúnmente como goma gelana para diferenciarla de la gelana nativa. La presencia de un ácido urónico dentro de la estructura primaria de gelana le confiere un carácter aniónico responsable de muchas de sus propiedades polielectrolíticas. Estudios de dispersión de luz y viscosidad intrínseca han determinado pesos moleculares cercanos a 500,000 g/mol para gelana desacilada (Milas *et al.*, 1990).



**Figura 1.2-1.** Tetrasacárido estructural de la goma gelana desacilada (Milas *et al.*, 1990).

### 1.3 Estructura cristalina, conformación en solución y mecanismo de gelificación

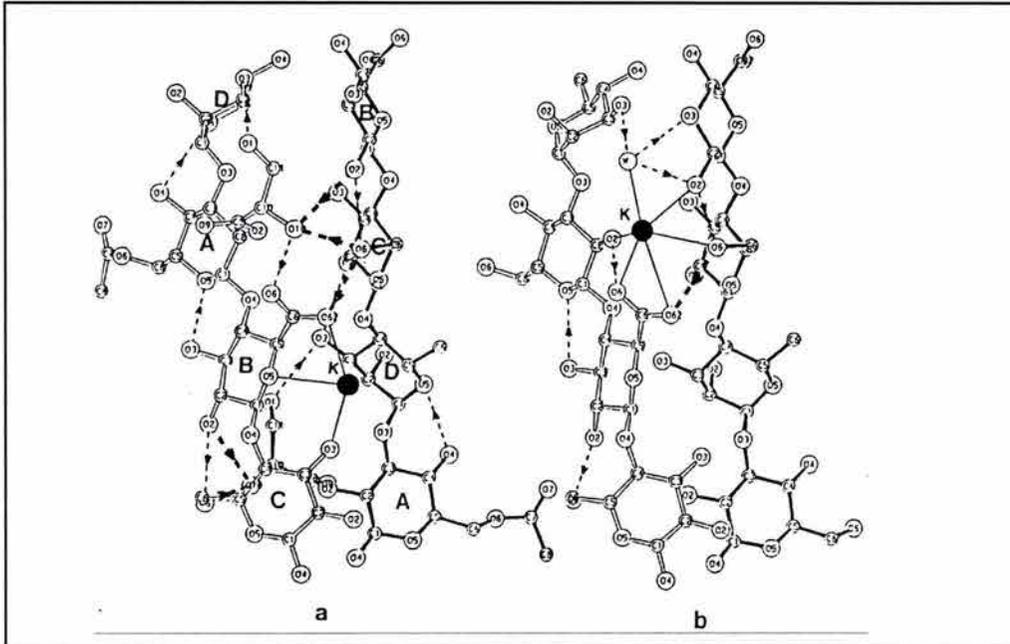
#### *Estructura cristalina*

Con el propósito de evaluar las bases moleculares y el papel que representan los iones en la gelificación de gelana, Upstill *et al.*, (1986) y Chandrasekaran *et al.*, (1988a, 1988b, 1992) han estudiado, a través de difracción de rayos X en fibras de gelana, la arquitectura molecular de las cadenas de gelana y las posiciones que adoptan los iones y el agua en la estructura tridimensional. Esto ha llevado a un mejor entendimiento del mecanismo de gelificación de este polisacárido.

Los primeros estudios de difracción de rayos X en gelana se realizaron a mediados de los años 80's (Upstill *et al.*, 1986) utilizando la sal de litio de gelana. En este estudio se propuso como posible conformación de la gelana, una doble hélice antiparalela. Estudios posteriores confirmaron la estructura helicoidal, mostrando que la doble hélice está compuesta de dos cadenas de polisacárido enrolladas siguiendo la dirección de la mano izquierda (Chandrasekaran, 1988a). Bajo este modelo, la estructura helicoidal es reforzada vía enlaces de hidrógeno intramoleculares entre grupos hidroximetilo y carboxilo.

Investigaciones subsecuentes con la sal de potasio de gelana (Chandrasekaran 1988b) no sólo confirmaron este arreglo estructural, también permitieron conocer cómo los iones potasio y las moléculas de agua se unen a los grupos carboxilos entre las dobles hélices, lo cual es crucial para la gelificación. El arreglo estructural de la sal de potasio de gelana (Chandrasekaran, 1988b) fue el primero en proveer detalles. En la Figura 1.3-1 se muestra el arreglo propuesto para gelana, el cual establece que dos dobles hélices están alineadas en forma antiparalela formando un arreglo triangular (vista superior), en donde los iones  $K^+$  se encuentran en la vecindad del grupo carboxilo en cada unidad tetrasacárida, este ion se encuentra coordinado de forma octaédrica a través de seis uniones (ambos oxígenos del grupo carboxilo y un grupo hidroximetilo pertenecientes a la primera cadena de gelana, dos grupos hidroximetilo de la segunda cadena y una molécula de agua del medio) que proporcionan estabilidad a la doble hélice de gelana. Este modelo de agregación de dobles hélices propone la existencia de interacciones iónicas inter-

dobles hélices: carboxilo-potasio-agua-potasio-carboxilo, las cuales serían responsables del empaquetamiento cristalino de gelana, de la formación de zonas de unión implicadas en la gelificación y de la agregación de moléculas de gelana en solución (Chandrasekaran, 1988b).



**Figura 1.3-1.** Representación esquemática de los enlaces intermoleculares, intramoleculares y la coordinación del ion potasio ( $K^+$ ) en la doble hélice de gelana nativa (a) y gelana desacilada (b). (A, B, C, y D son  $\beta$ -D-glucosa,  $\beta$ -D-glucuronato,  $\beta$ -D-glucosa y  $\alpha$ -L-ramnosa respectivamente) (Chandrasekaran *et al.*, 1992).

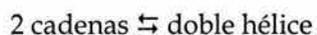
Las diferencias observadas en las propiedades mecánicas de geles de gelana en función del tipo de catión inductor de la gelificación, sugieren diferencias en la forma de agregación de dobles hélices; por ejemplo gelana con  $0.001 \text{ mol/dm}^3$  de calcio puede formar geles similares en “fuerza de gel” que aquéllos formados por gelana en presencia de  $0.040 \text{ mol/dm}^3$  de potasio (Grasdalen y Smidsrod, 1987; Sanderson 1990). Desafortunadamente, no hay estudios de difracción de rayos X en sales de calcio de gelana, ya que esta sal no ha proporcionado buenos patrones de difracción. Sin embargo, trabajos de simulación de la arquitectura estructural de gelana, basados en los estudios de la sal de potasio, revelaron que sólo se necesita un ion de calcio, en lugar de dos iones potasio y una molécula de agua, para llevar a cabo la organización lateral de un par de

dobles hélices de gelana; es decir la unión carboxilo-K<sup>+</sup>-agua-K<sup>+</sup>-carboxilo, en el modelo de la sal de potasio de gelana, es remplazada por carboxilo-Ca<sup>++</sup>-carboxilo, lo cual genera una asociación más fuerte a concentraciones iónicas menores de calcio (Chandrasekaran *et al.*, 1988b).

En relación con los grupos o cadenas laterales presentes en gelana nativa, los estudios de difracción de rayos X han mostrado que los grupos acetilo no interfieren en el arreglo estructural de la doble hélice ya que se hayan acomodados en el exterior de ésta, sin embargo, los grupos glicerilo provocan cambios menores en la conformación de gelana (Chandrasekaran y Radha, 1995). Los dos grupos hidroxilo terminales del grupo glicerilo parecen ocupar los sitios correspondientes al ion potasio y a la molécula de agua en gelana desacilada, lo cual activa nuevos enlaces de hidrógeno en cada unidad tetrasacárida mejorando la estabilidad de la hélice pero la presencia del grupo glicerilo debilita la carga efectiva del grupo carboxilo desplazando la posición del ion K<sup>+</sup> hacia el extremo reductor de la cadena y aumentando la separación intermolecular (9.5 Å en lugar de 9.1 Å en gelana desacilada).

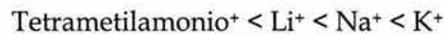
#### *Conformación en solución*

Los estudios fisicoquímicos realizados por Milas *et al.*, (Milas *et al.*, 1990; Milas y Rinaudo 1996) mostraron que gelana en solución experimenta una transición conformacional de un estado desordenado hacia un estado ordenado:

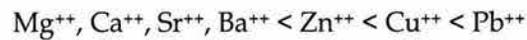


lo cual no discrepa con los resultados de Crescenzi *et al.*, (1987), Grasdalen y Smidsrod (1987), y con la estructura en estado sólido propuesta por Chandrasekaran *et al.*, (1988a, 1988b). Los estudios en relación con las propiedades en solución de gelana, describen a la conformación ordenada de la molécula de gelana como una estructura de rigidez elevada con fuerte dependencia de la densidad de carga de la molécula, de la fuerza iónica, de la naturaleza de los iones y de la temperatura, principalmente. Adicionalmente, dicha conformación está caracterizada por una temperatura de transición, T<sub>m</sub> (Shi, 1990).

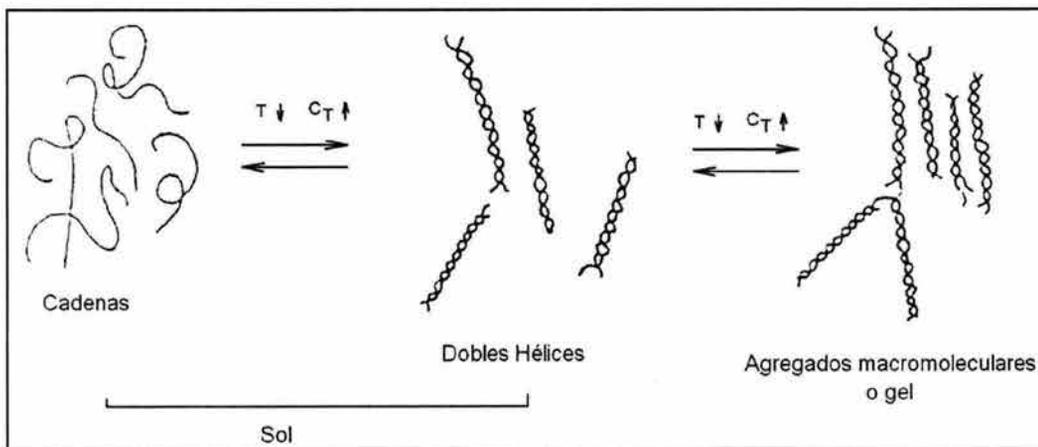
De forma similar a otros polielectrolitos, la conformación de la molécula de gelana puede mostrar selectividad iónica. A temperaturas mayores a la temperatura de transición ( $T_m$ ), donde las cadenas son relativamente flexibles, no hay evidencias de selectividad iónica (Shi, 1990). Sin embargo cuando  $T < T_m$ , la conformación ordenada (doble hélice) tiene una rigidez importante y una selectividad iónica en el siguiente orden de efectividad (Milas *et al.*, 1990, Shi, 1990):



Esta secuencia iónica es similar a la reportada para  $\kappa$ -carragenina (Milas *et al.*, 1990). Para cationes divalentes la selectividad iónica es menos marcada, particularmente en el caso de los elementos alcalino-térreos. La secuencia siguiente fue propuesta por Grasdalen y Smidsrod (1987):



### Mecanismo de gelificación



**Figura 1.3-2.** Modelo de estructuración de gelana en solución. T es la temperatura de la solución y  $C_T$  es la concentración total de contraiones libres (Shi, 1990).

Estudios de viscosidad y conductividad específica (Shi, 1990) dieron lugar a un modelo de asociación en dos etapas para las moléculas de gelana en solución (Figura 1.3-2). El modelo propone que un incremento de la concentración de sal o la disminución de la temperatura promueve la transición de cadena aleatoria a dobles hélices (primera etapa) y la asociación de dobles hélices rígidas para formar agregados o geles (segunda etapa). Este mecanismo es ampliamente aceptado tanto para contraiones monovalentes como divalentes (Grasdalen y Smidsrod, 1987; Milas y Rinaudo, 1996) e involucra la formación de hélices como prerrequisito para la gelificación.

#### **1.4 Estudios reológicos**

##### *Geles y soluciones de gelana*

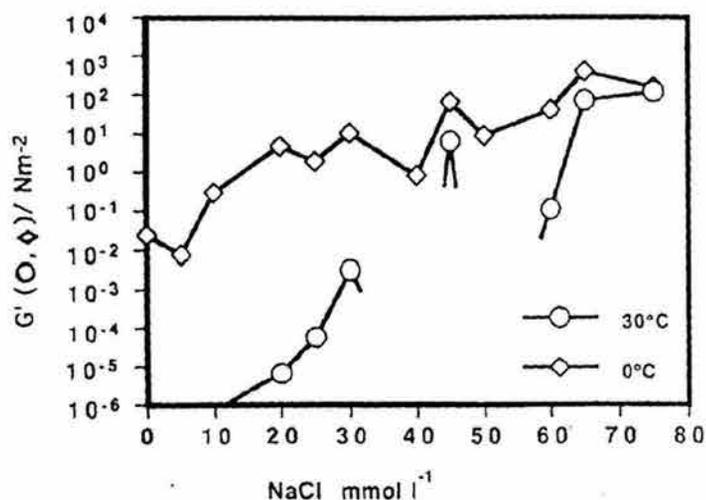
El estudio fisicoquímico de gelana en solución ha propiciado el interés por el aprovechamiento de algunas de sus propiedades en la industria de productos biológicos, concretamente en el caso de la industria de alimentos se ha considerado como aditivo para mejorar o crear atributos de textura. Por consiguiente, existe una inclinación hacia el estudio de las propiedades mecánicas y atributos de textura de geles de gelana sola (Sanderson 1990; Tang *et al.*, 1996; Mao *et al.*, 2000) o en mezclas con otros polisacáridos ampliamente usados en la industria, tales como xantana, algarrobo, agar, carrageninas, alginatos y almidones (Sanderson, 1990).

En contraste con los estudios fisicoquímicos y estructurales de gelana, el número de estudios reológicos de este polisacárido es menor y la mayoría de éstos se enfoca a mezclas gelana-polisacárido. Estudios reológicos que involucran el comportamiento viscoelástico lineal así como las propiedades físicas y fisicoquímicas, se han orientado a estudiar el efecto de las sales en la transición sol-gel y en las propiedades mecánicas de los geles de gelana, tanto desacilada como acilada (Miyoshi *et al.*, 1994a; Miyoshi *et al.*, 1994b; Miyoshi y Nishinari, 1999; Kasapis *et al.*, 1999) verificando la sensibilidad de las propiedades reológicas de gelana a las sales del medio.

El comportamiento de los módulos reológicos dinámicos con la concentración iónica del medio (Miyoshi *et al.*, 1994a; Miyoshi *et al.*, 1994b; Miyoshi y Nishinari, 1999) así como estudios de compresión uniaxial (Sanderson, 1990; Mao *et al.*, 2000) han mostrado un incremento progresivo del módulo de almacenamiento, del módulo de Young y del esfuerzo de fractura de los geles de gelana al incrementarse la concentración de sales, tanto monovalentes como divalentes. Lo anterior ha sido explicado en función de la neutralización de cargas electrostáticas de las cadenas de gelana, favoreciendo la asociación de éstas y por consiguiente la creación de una red tridimensional con propiedades elásticas progresivamente mayores al incrementarse el contenido salino. Sin embargo, este incremento progresivo de las propiedades mecánicas de los geles alcanza un valor máximo y desciende con adiciones subsecuentes de sales (Sanderson, 1990; Miyoshi *et al.*, 1994a; Papageorgiou *et al.*, 1994). En los estudios de compresión uniaxial es más evidente el punto máximo en las propiedades mecánicas, no así en los módulos dinámicos donde el comportamiento es de cierta forma caprichoso, como se muestra en la Figura 1.4-1.

No ha surgido aún una interpretación contundente del efecto de las sales en la reología de geles de gelana, se han sugerido interpretaciones en términos de neutralización de cargas y solvatación de iones que pueden favorecer o desfavorecer la asociación de hélices de gelana (Miyoshi *et al.*, 1994a; Miyoshi *et al.*, 1994b). Robinson *et al.*, (Robinson *et al.*, 1988 citados en Papageorgiou *et al.*, 1994) han propuesto que la gelificación de gelana depende del equilibrio existente entre hélices no agregadas y hélices agregadas a través de cationes; estos autores sugieren la existencia de un intervalo de concentración de cationes que propicia el predominio de hélices agregadas, lo cual explicaría el incremento observado en  $G'$ . Tomando como base la hipótesis anterior, Papageorgiou *et al.*, (1994) propusieron que cuando la concentración de iones está en exceso en los sistemas a base de gelana, se generan interacciones fuertes entre hélices que llevan a una agregación extensa causando la deshidratación del polímero e incluso la formación de precipitados de geles de gelana, lo cual explicaría, de acuerdo con estos autores, la caída de los módulos al incrementarse la concentración de iones del medio. Otros estudios (Tang *et al.*, 1996) reportaron un incremento progresivo del esfuerzo a la fractura ( $\sigma_f$ ) de geles de gelana a medida que la concentración de iones calcio aumentó hasta una relación  $\text{Ca}^{++}/\text{grupos carboxilo}$  de gelana de 0.5, incrementos adicionales de calcio generó una reducción en  $\sigma_f$  debido, de acuerdo con los autores, a la formación de fuerzas repulsivas en las zonas de unión de gelana

por un exceso de iones calcio en los sitios aniónicos (grupos carboxilo de gelana) del polímero. Obviamente las causas de este comportamiento no son claras aún y ameritan investigaciones futuras.



**Figura 1.4-1.** Módulo de almacenamiento de gelana 1% en función de la concentración de NaCl. Determinaciones reológicas dinámicas a 0.1 rad/s (Miyoshi *et al.*, 1994a).

En la mayoría de los estudios reológicos, particularmente reología dinámica, se han utilizado concentraciones relativamente altas de gelana, las cuales van desde 0.2 hasta 5% m/m. Los estudios se han centrado en el comportamiento de las propiedades viscoelásticas en función de la concentración de iones. El efecto de la concentración de polímero en las propiedades citadas al parecer es obvio, mayores concentraciones de gelana manteniendo fija la fuerza iónica del medio, producen sistemas cada vez más rígidos debido al incremento de "zonas de unión" y por consiguiente, los módulos dinámicos de estos sistemas son progresivamente mayores. En un estudio previo (Rodríguez-Hernández, 1997) se evaluaron los módulos dinámicos ( $G'$  y  $G''$ ) y el comportamiento de tangente de delta ( $G''/G'$ ) de geles de gelana (0.2 a 0.5% (m/m)) con 0.01 mol/dm<sup>3</sup> de CaCl<sub>2</sub> como sal promotora de la gelificación. Los resultados mostraron módulos de almacenamiento cercanos a 30 kPa para gelana 0.5% (m/m). Por otra parte, concentraciones menores de gelana generaron la disminución de los módulos de almacenamiento de los geles, los cuales tuvieron valores desde 5 hasta 18 kPa en el intervalo de concentraciones de gelana de

0.2 a 0.4 %. El comportamiento observado en los módulos de almacenamiento es el que se encuentra clásicamente en los sistemas poliméricos, donde menores cantidades de polímero proveen de menor número de cadenas con posibilidades de entrecruzamientos o asociaciones que favorezcan la creación de una red tridimensional.

Contrariamente a lo observado en el módulo de almacenamiento ( $G'$ ), el comportamiento de tangente de delta en geles de gelana (0.2 a 0.5 % (m/m)) con  $0.01 \text{ mol/dm}^3$  de  $\text{CaCl}_2$  reveló un aumento progresivo del carácter elástico a medida que la concentración de gelana disminuye, es decir, los valores de tangente de delta se incrementaron con la concentración de gelana. La interpretación al comportamiento de  $G'$  y de tangente de delta se hizo en términos de la existencia de un equilibrio entre la formación de zonas de unión entre dobles hélices y el rompimiento de tales interacciones, lo cual depende del contenido de iones presentes en el medio. Se propuso que al disminuir la cantidad de polisacárido manteniendo fija la concentración de iones  $\text{Ca}^{++}$ , se promueve un equilibrio más eficiente entre la formación y la destrucción de zonas de unión, es decir, existe menor cantidad de cadenas de gelana (disminución de  $G'$ ) pero el contenido iónico promueve la agregación de dobles hélices de forma efectiva haciendo predominar el carácter elástico ( $G'$ ) sobre el viscoso ( $G''$ ) (disminución de tangente de delta).

#### *Mezclas gelana-biopolímero*

Existe mayor interés científico y tecnológico en las mezclas gelana-biopolímero e incluso en las mezclas gelana desacilada con gelana acilada, que en los sistemas formados por gelana únicamente. Este interés radica en la variedad de propiedades mecánicas que se pueden obtener con las mezclas y la "dilución" de algunas propiedades poco apreciadas que manifiestan los geles de gelana desacilada, los cuales se caracterizan por ser firmes, quebradizos y poco elásticos (Sanderson, 1990).

En la práctica es común el uso de mezclas de hidrocoloides gelificantes con hidrocoloides espesantes para reducir la sinéresis, mejorar la estabilidad al congelamiento-descongelamiento,

disminuir la rigidez proporcionada por el agente gelificante o para incrementar la elasticidad del sistema donde se utilicen tales mezclas. En el caso de gelana se han hecho estudios de análisis de perfil de textura (TPA, por sus siglas en inglés) en mezclas con hidrocoloides espesantes como xantana, guar, algarrobo, carboximetilcelulosa y goma de tamarindo (Sanderson, 1990). Los estudios mostraron que la combinación de gelana con estos hidrocoloides reducía la dureza y los valores del módulo (firmeza del material en términos de textura), la elasticidad tenía un ligero incremento y las mezclas continuaban siendo quebradizas como los geles de gelana desacidada.

Las mezclas gelana-gelatina y gelana-almidón también han sido estudiadas a través de análisis de perfil de textura (Sanderson, 1990). Las combinaciones favorecieron la firmeza y dureza de geles de gelatina y almidón respectivamente, lo cual en términos prácticos se traduce en un reemplazo parcial del contenido de almidón o gelatina por pequeñas concentraciones de gelana. Estudios reológicos dinámicos y de microcalorimetría diferencial de barrido en mezclas gelana-gelatina (Papageorgiou *et al.*, 1994) han confirmado la alta sensibilidad que tienen ambos biopolímeros a las sales. Papageorgiou *et al.*, utilizaron NaCl (0.047 a 1.507 mol/dm<sup>3</sup>) para promover la gelificación de gelana. El comportamiento de los módulos dinámicos con la temperatura durante la gelificación y fundido de geles mixtos gelana-gelatina generó distintos patrones en función del contenido iónico, los cuales fueron comparados con los correspondientes de los componentes solos. Con base únicamente en la similitud de los patrones del sistema mixto con cualquiera de los componentes o con ambos, los autores propusieron la existencia de incompatibilidad termodinámica entre las macromoléculas, donde tanto gelana como gelatina forman fases independientes compitiendo entre sí por el disolvente. Se sugirió que cuando el contenido iónico del medio era moderado la gelana forma la fase continua y la gelatina la fase dispersa, pero al aumentar la fuerza iónica se genera una inversión de fases. Esta inversión se atribuyó al exceso de cationes, el cual posiblemente favorece las interacciones laterales entre hélices de gelana disminuyendo la capacidad de retención de disolvente entre cadenas dando lugar a una posible precipitación de gelana dentro de una fase continua de gelatina. Esta interpretación, desafortunadamente no se respalda en ningún estudio de microscopía ni termodinámico que revele la existencia de incompatibilidad termodinámica o separación de fases.

Otra mezcla de hidrocoloides gelificantes de importancia tecnológica es gelana- $\kappa$ -carragenina, la cual fue estudiada para entender el mecanismo de interacción entre los dos polímeros e interpretar las propiedades de sus mezclas (Nishinari *et al.*, 1996). A partir de determinaciones de viscosidad compleja en soluciones diluidas así como estudios de reología dinámica y calorimetría diferencial de barrido, se propuso que los polisacáridos se encuentran mezclados sin interacciones significativas entre ambos, pero cuando existe sal en exceso, aparece una separación de fases. Los geles de estas mezclas se interpretaron como redes de fases separadas, con una región rica en gelana y otra rica en carragenina. Sin embargo, no se reporta microscopía alguna que evidencie el modelo de asociación propuesto.

A finales de la década pasada, muchos de los estudios reológicos en mezclas de hidrocoloides tenían como objetivo primordial encontrar efectos sinérgicos similares a los hallados en las mezclas de xantana-algarrobo, en donde a partir de dos polisacáridos no gelificantes se genera un gel con importantes características elásticas (Mannion *et al.*, 1992; Zhan *et al.*, 1993). Sin embargo en el caso de gelana, las mezclas estudiadas no han dado evidencia de tales efectos. El grupo de investigación encabezado por Nishinari reportó sinergismo en la mezcla gelana-konjac sólo con konjac de peso molecular medio y una relación gelana:konjac igual a 0.3:0.5 (concentración total de polisacárido igual a 0.8 % m/m) (Miyoshi *et al.*, 1996). Este grupo también reportó un incremento en los módulos dinámicos de las mezclas gelana-konjac, con la adición progresiva de sal, NaCl o CaCl<sub>2</sub>, con esta última los módulos llegaron a un máximo y posteriormente disminuyeron con la progresiva adición de sal.

Los estudios de calorimetría diferencial de barrido de este mismo grupo de investigación (Miyoshi *et al.*, 1994b) mostraron picos endotérmicos y exotérmicos a temperaturas cada vez mayores conforme el contenido iónico se incrementó en la mezcla. En presencia de CaCl<sub>2</sub>, los cambios entálpicos mostraron también un máximo a determinada concentración de sal. Por lo tanto este sistema presenta un comportamiento similar al de los geles de gelana estudiados previamente (Miyoshi *et al.*, 1994a) pero en este caso no se observó la formación de geles en presencia de calcio, lo cual contradice la teoría de que los iones divalentes son más eficientes en la gelificación de gelana. El espectro mecánico mostró un comportamiento típico de una solución diluida a pesar de que se usaron concentraciones de gelana suficientemente altas (0.3%

m/m). La interpretación a los efectos observados fue muy aventurada, los autores proponen una separación de fases entre gelana y konjac a elevadas concentraciones iónicas de calcio. Sin embargo, es importante mencionar que gelana se dispersó en conjunto con los iones, previo al calentamiento, por lo que posiblemente las altas concentraciones de sal en solución disminuyeron la solubilidad de gelana y por consiguiente la concentración de polímero en solución disponible para la agregación de cadenas y subsiguiente formación de geles, lo cual podría explicar los valores bajos de los módulos obtenidos en presencia de estos iones ( $\text{CaCl}_2 > 0.0036 \text{ mol/dm}^3$ ).

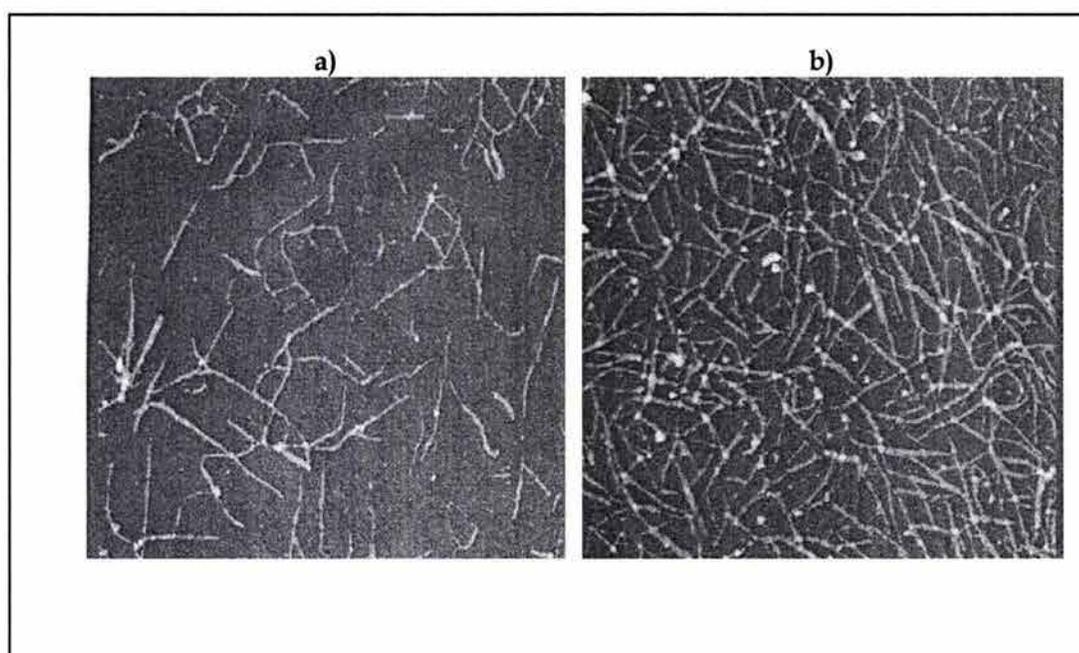
Otras mezclas estudiadas han sido gelana-xantana y gelana-*t*-carragenina (Rodríguez Hernández y Tecante, 1999). El estudio tuvo como objetivo investigar la contribución de cada polisacárido a las propiedades viscoelásticas de las mezclas. Se utilizó como concentración total de polisacárido 0.5% (m/m) variando la relación porcentual gelana:polisacárido (80:20, 60:40, 50:50 y 40:60) y manteniendo fija la concentración de iones en el medio ( $\text{CaCl}_2 0.01 \text{ mol/dm}^3$ ). A excepción de xantana y carragenina, los sistemas mostraron espectros dinámicos típicos de un gel (módulos independientes de la frecuencia,  $G' \gg G''$ ), sin embargo, en ningún caso los sistemas mixtos presentaron módulos dinámicos mayores o iguales a los correspondientes a gelana sola (tanto gelana al 0.5% como gelana a la misma concentración existente en las mezclas respectivas: 0.4, 0.3, 0.25 y 0.2% m/m), los valores fueron intermedios entre los correspondientes a gelana y al polisacárido adicionado (xantana o carragenina). Por otra parte los valores de tangente de delta de los sistemas mixtos fueron mayores que aquéllos de gelana a la misma concentración en la mezcla. Por lo que se propuso que la disminución de los módulos dinámicos en las mezclas no es debida a la simple reducción de gelana, que es el componente dominante en la reología del sistema, sino que la xantana y carragenina tienen un efecto "diluyente" en las propiedades viscoelásticas del sistema, debido posiblemente a un efecto de incompatibilidad termodinámica o bien a la posible interferencia de xantana y carragenina en la formación de la red de gelana, lo cual amerita un estudio más profundo.

## 1.5 Microestructura de gelana y mezclas con biopolímeros

Actualmente existen muchas técnicas microscópicas para obtener información de la morfología y del arreglo microestructural de sistemas biológicos, sin embargo, el principal reto es la preparación de la muestra. Para microscopía electrónica de barrido y microscopía de transmisión electrónica se utilizan métodos químicos y físicos donde la muestra en ocasiones se somete a deshidratación con disolventes orgánicos, congelación o liofilización, así como a la fijación en matrices específicas, corte o teñido. Estos métodos suelen ser muy drásticos para los sistemas biológicos donde el agua predomina en su composición, generando en muchos casos modificaciones sustanciales en su estructura.

En la última década se ha incrementado uso de la microscopía de fuerza atómica (MFA) y de la microscopía confocal de barrido láser (MCBL) para biopolímeros donde el daño mecánico en la muestra se ha minimizado e incluso evitado. Existen pocos estudios de microscopía que involucren la gelificación de polisacáridos, concretamente en el caso de gelana se ha utilizado MFA para visualizar la estructura helicoidal y las zonas de asociación de las cadenas de gelana durante la gelificación (Gunning *et al.*, 1996). Estos estudios mostraron que la estructura de los geles de gelana consiste de una "fibra ramificada" formando una red tridimensional. Por otra parte, mostraron la dependencia que tiene la gelificación de gelana con el contenido total de biopolímero y la concentración de cationes del medio. Las imágenes de microscopía revelaron la formación de "precursores de geles o agregados de gelana" (Figura 1.5-1a) a concentraciones muy bajas de ésta ( $<3 \mu\text{g/mL}$ ) mientras que a concentraciones mayores se observó una estructura tridimensional continua, tipo gel débil, formada por fibras de gelana interconectadas (Figura 1.5-1b); en ambos casos se utilizó la sal de potasio de gelana en ausencia de iones externos. En presencia de iones promotores de la gelificación, se observó una red permanente mientras que iones de tetrametilamonio (TMA) no favorecieron la gelificación debido a su tamaño.

El trabajo de Gunning *et al.*, (1996) analizó el comportamiento viscoelástico de los sistemas gelificados y no gelificados de gelana observados en microscopía (gelana-K<sup>+</sup> y gelana-TMA, respectivamente) en donde se observó el comportamiento típico de un gel para el primer caso, y el de una solución polimérica para gelana-TMA. Sin embargo las concentraciones utilizadas en los estudios reológicos son aproximadamente tres órdenes de magnitud mayores a las utilizadas en microscopía, debido, de acuerdo con los autores, a la baja resolución observada en microscopía cuando se utilizaron concentraciones altas de gelana. Por consiguiente, es aventurado relacionar el comportamiento reológico con la microestructura observada en microscopía.

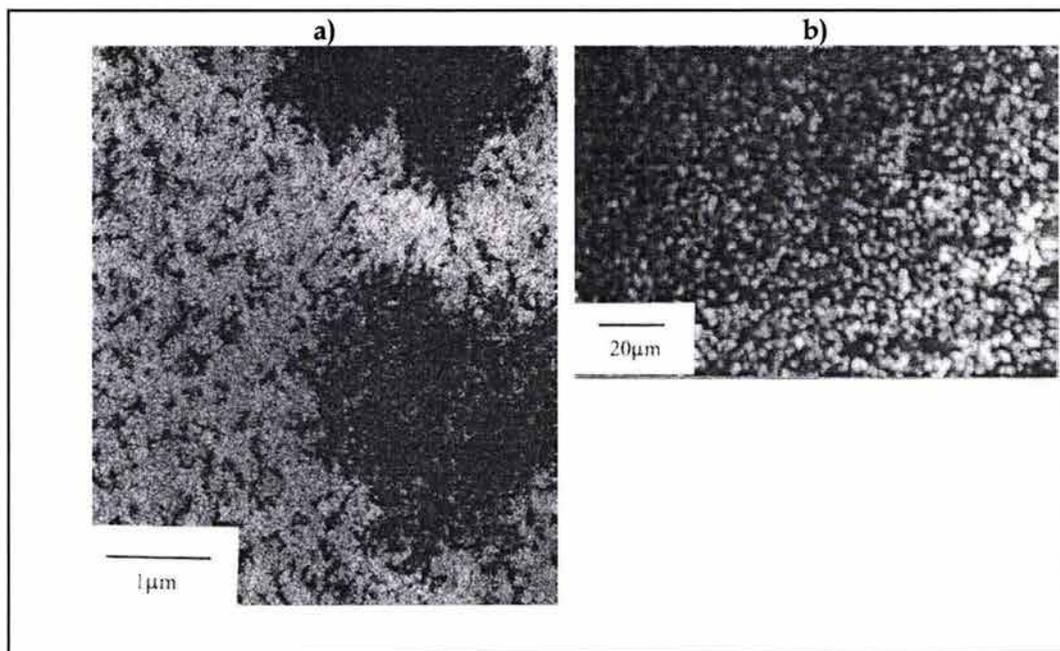


**Figura 1.5-1.** Microfotografías de fuerza atómica de gelana-K<sup>+</sup> (a) 3 µg/mL (0.0003% m/v) y (b) 10 µg/mL (0.001% m/v). En ambos casos el tamaño de la imagen es de 800 x 800 nm (Gunning *et al.*, 1996).

Se reportaron resultados muy similares por McIntire y Brant (1997), quienes utilizaron microscopía de fuerza atómica en soluciones diluidas de gelana (5 a 25 µg/mL). Estos investigadores observaron la formación de redes con filamentos de espesores diferentes. A

medida que la concentración de gelana se incrementó se generó sobreposición de filamentos, dificultando la observación de las cadenas individuales de gelana.

Estudios posteriores de microscopía de transmisión electrónica y confocal de barrido láser en gelana pura y en mezclas con maltodextrinas (Clark *et al.*, 1999) describen a los geles de gelana como una malla fina, uniforme y con poros pequeños. Estas observaciones no hacen alusión a la presencia de contraiones en la muestra ni a la concentración de gelana. Las microfotografías de las mezclas gelana-maltodextrinas (0.4 a 3% gelana y 2 a 20% maltodextrinas) no mostraron evidencias de separación de fases, se observó una red de gelana con grandes agregados de maltodextrina (Figura 1.5-2). De acuerdo con las características polielectrolíticas y el carácter gelificante de gelana, los autores sugieren que la gelificación de gelana se inicia y procede rápidamente mientras la maltodextrina empieza a agregarse dentro de los poros de la red de gelana, lo que en la literatura de biopolímeros se ha denotado como redes interpenetradas.



**Figura 1.5-2.** (a) Microfotografía de transmisión electrónica de la mezcla 14%/12% gelana/maltodextrina, la zonas oscuras corresponden a la presencia de agregados de maltodextrina y las claras a la red de gelana. (b) Microfotografía confocal de barrido láser de la mezcla 1%/20% gelana/maltodextrina, la fase clara corresponde a las zonas ocupadas por maltodextrina. (Clark *et al.*, 1999).

El mismo comportamiento se ha reportado para las mezclas gelana-agar (Amici *et al.*, 2001). Las observaciones de microscopía de transmisión electrónica propusieron la formación de redes interpenetradas. En el trabajo de Amici *et al.*, se utilizó gelana-Na<sup>+</sup> a concentraciones relativamente altas (1 a 5%) y en un ambiente de baja fuerza iónica (no se adicionaron contraiones) en donde se presume no se favorece la separación de fases en las soluciones (gelana+agar) previo a la gelificación. De acuerdo con los resultados de microscopía, los autores sugirieron la formación de una red de gelana y la construcción de redes de agar dentro de los poros de la estructura preformada de gelana. Se observó también que conforme se incrementó la concentración de ambos polisacáridos, la distribución de agar en la red de gelana fue menos uniforme.

## **2. ALMIDÓN**

### **2.1 Introducción**

El almidón es el carbohidrato de reserva de vegetales superiores; se almacena en raíces, tubérculos, semillas, frutos y granos de cereales, y constituye una fuente de energía para muchos organismos superiores, incluyendo al hombre. El término almidón se aplica a la mezcla de dos entidades moleculares: amilosa, una macromolécula básicamente lineal y su contraparte ramificada, amilopectina (Galliard y Bowler, 1987).

El almidón se ha catalogado como el polisacárido más barato y más abundante en la mayoría de los países del mundo, esto lo hace sumamente atractivo como materia prima. Actualmente el mercado de almidones es muy vasto, se comercializan desde almidones nativos de cereales (maíz, trigo, arroz), almidones de tubérculos (papa), de raíces (tapioca) y de leguminosas hasta almidones modificados química o enzimáticamente. Existen varios factores que determinan la elección de almidones, tanto nativos como modificados, los cuales incluyen disponibilidad, costo, eficiencia en el procesamiento y características del producto al cual se adicionará.

## 2.2 Morfología del gránulo de almidón

La biosíntesis de almidón tiene lugar en el amiloplasto, organelo subcelular especializado, en el cual se encuentran las enzimas que catalizan la biosíntesis de las macromoléculas componentes del almidón a partir de glucosa. El ensamblaje de cadenas poliméricas en el almidón tiene lugar en una matriz lipoproteínica, el gránulo de almidón se desarrolla dentro del amiloplasto ocupando una porción que crece progresivamente hasta que ocupa el volumen total de este organelo. En forma general se forma un gránulo en cada amiloplasto, aunque algunas veces, como en el caso del arroz, el amiloplasto puede contener más de un gránulo de almidón (Galliard y Bowler, 1987). De acuerdo con su fuente, los gránulos de almidón poseen características de forma y tamaño que los identifican (Cuadro 2.2-1).

Observaciones del hinchamiento de gránulos de almidón realizadas a través de microscopía óptica y microscopía de barrido electrónico (Galliard y Bowler, 1987), han propuesto que los gránulos de forma lenticular en almidones de trigo, cebada y centeno, tienen una forma única de hinchamiento. Cuando se calientan en exceso de agua bajo cizallamiento ligero, los gránulos se hinchan inicialmente por expansión radial en dirección del diámetro mayor, permaneciendo el plano del diámetro menor sin cambio; al calentar a temperaturas superiores a 60 °C, los gránulos dejan de hincharse radialmente pero continúan haciéndolo tangencialmente al plano original del diámetro mayor, esto genera gránulos hinchados con formas complejas. En contraste, los gránulos de almidón de muchas otras fuentes, como maíz y papa, se hinchan en forma radial tridimensional produciendo una versión de mayor tamaño del gránulo original, aunque susceptible a modificarse por colapso de la estructura.

## 2.3 Macromoléculas componentes del almidón

### *Amilosa*

La amilosa es uno de los polisacáridos componentes del almidón, compuesta por 500 a 5000 unidades de glucosas unidas por enlaces glucosídicos  $\alpha$ -(1-4). El porcentaje en peso de amilosa

presente en almidones depende del origen botánico de éstos (ver Cuadro 2.3-1). Es común definir a la molécula de amilosa como una molécula lineal, sin embargo hay estudios que evidencian cierto grado de ramificación en su estructura (Takeda *et al.*, 1987 y Hizukuri *et al.*, 1997, citados en Buléon *et al.*, 1998). Hizukuri *et al.*, por medio del fraccionamiento de la amilosa encontraron un promedio de dos a ocho puntos de ramificación por molécula de amilosa y las cadenas laterales o ramificaciones contenían de 4 a más de 100 unidades glucosídicas.

En relación con la determinación de los pesos moleculares promedio de la molécula de amilosa, no obstante existen fuertes discrepancias, muchas de éstas debidas a diferencias en el origen botánico y al grado de degradación molecular durante el fraccionamiento y el proceso de extracción (Buléon *et al.*, 1998). Se han reportado pesos moleculares promedio de amilosa entre  $1.6 \times 10^5$  y  $9.0 \times 10^5$  g/mol (Buléon *et al.*, 1998 y Zobel 1988). Una propiedad importante de la amilosa es su poca solubilidad en agua, se requieren temperaturas elevadas ( $> 100$  °C) para solubilizarla. Sin embargo, las soluciones obtenidas son muy inestables, tienden a formar precipitados o geles debido a la formación de zonas de unión entre cadenas de amilosa. Este fenómeno se conoce como retrogradación (Banks y Greenwood, 1975).

Las cadenas de amilosa adoptan una conformación helicoidal cuyo interior es capaz de albergar ciertas moléculas: lípidos monoacilados, fenol, timol, butanol, iones yoduro y yodo molecular (Banks y Greenwood, 1975). Con soluciones de yodo/yoduro (Iugol) se forma un polímero de yodo en el centro de una molécula de amilosa en conformación helicoidal, generando un complejo estable con actividad óptica dentro de la región visible. La cantidad de yodo fijado en almidones está en función de la longitud y linealidad de la cadena. La amilosa puede fijar alrededor de 19.5 g de yodo por 100 gramos de amilosa originando un complejo azul ( $\lambda = 650$  nm), mientras que la amilopectina, con cadenas lineales de menor longitud, sólo puede fijar de 0.3 a 0.5 g por cada 100 gramos de polímero generando un complejo color marrón ( $\lambda = 540$  nm) (Banks y Greenwood, 1975). El Cuadro 2.3-1 muestra las principales propiedades de las macromoléculas componentes de almidón.

**Cuadro 2.2-1.** Propiedades fisicoquímicas de almidones comunes (Pomeranz, 1991).

Almidón	Tamaño de gránulo (µm)		Amilosa (%)	Poder de hinchamiento a 95 °C	Solubilidad a 95°C (%)	Gelatinización (°C)	Fuente	Descripción general de los gránulos
	intervalo	promedio						
Cebada	2 - 35	20	22	-	-	56 - 62	Cereal	Redondo, elipsoidal lenticular
Maíz <sup>1</sup>								
Regular	5 - 25	15	26	24	25	62 - 80	Cereal	Rendondo, poligonal
Ceroso	5 - 25	15	< 1	64	23	63 - 74	Cereal	Redondo, oval
Alto en amilosa	-	15	hasta 80	6	12	85 - 87	Cereal	Redondo
Papa	15 - 100	33	22	1000	82	56 - 69	Tubérculo	Forma de huevo, con rugosidades tipo ostra
Arroz	3 - 8	5	17	19	-	61 - 80	Cereal	Agregados poligonales
Centeno	2 - 35	-	23	-	-	57 - 70	Cereal	Elipsoidal, lenticular
Sorgo	5 - 25	15	26	22	22	68 - 78	Cereal	Redondo, poligonal
Tapioca	5 - 35	20	17	71	48	52 - 64	Raíz	Redondo-oval, truncado
Trigo	2 - 35	15	25	21	41	53 - 72	Cereal	Redondo, elipsoidal lenticular
Avena	2 - 10	-	27	-	-	56 - 62	Cereal	Poligonal

<sup>1</sup>Los datos de composición y propiedades fisicoquímicas están en función de las variedades botánicas, por lo que los datos mostrados en el cuadro sólo son aproximados.

## *Amilopectina*

La amilopectina, el segundo componente del almidón, es un polisacárido altamente ramificado. La amilopectina consiste de monómeros de D-glucopiranososa unidos a través de enlaces  $\alpha$ -(1,4), los cuales forman el esqueleto de la molécula, mientras que la presencia de enlaces  $\alpha$ -(1,6) da lugar a la estructura ramificada de la misma. La amilopectina se ha considerado como una de las moléculas de origen natural de mayor tamaño. Estudios iniciales de dispersión de luz (Witnauer *et al.*, 1955 citados en Banks *et al.*, 1972) indicaron que el peso molecular de la molécula de amilopectina podría estar en el intervalo de  $10^7$ - $10^8$  g/mol, sin embargo, trabajos posteriores reportaron valores de pesos moleculares desde  $10 \times 10^6$  hasta  $500 \times 10^6$  g/mol (Banks *et al.*, 1972). Estas discrepancias se han atribuido a la fuente de amilopectina, al tipo de disolvente empleado, la preparación de la muestra y la técnica usada para la determinación; lo cual hace que algunos de los valores reportados estén subestimados debido a la degradación de la molécula por el cizallamiento empleado durante la solución o bien se reportan valores sobreestimados debido a la tendencia que tiene la molécula de amilopectina a formar agregados macromoleculares aún en disoluciones diluidas.

La forma de la molécula de amilopectina es de interés debido a su carácter altamente ramificado y a su aparente cristalinidad en su estado nativo, la cual parece no alterarse por el contenido de amilosa. Estudios de dispersión de rayos X en muestras de almidón de maíz ceroso (conformado básicamente por amilopectina) y en muestras de almidón de maíz normal presentaron el mismo patrón de difracción (Zobel, 1988). Esta característica única de la amilopectina se ha estudiado sobre la base de la conformación de la molécula, debido a que en polímeros sintéticos, el incremento de ramificaciones en la estructura conlleva a un descenso de cristalinidad.

**Cuadro 2.3-1.** Propiedades generales de las macromoléculas componentes del almidón

Propiedad	Amilosa	Amilopectina	Referencia
Estructura Molecular	Lineal ( $\alpha$ -1,4)	Ramificada ( $\alpha$ -1,4; $\alpha$ -1,6)	Zobel 1988
Soluciones diluidas	Inestable	Estable	Zobel 1988
Geles	Rígidos, irreversibles	Suaves, reversibles	Zobel 1988
Películas	Cohesivas	-	Zobel 1988
Formación de complejos	Favorable	Desfavorable	Zobel 1988
Complejo con Yodo	Azul	Rojo-Púrpura	Zobel 1988
$\lambda_{\text{máx}}$ (nm), reacción con yodo	650 644 <sup>(1)</sup>	540 554 <sup>(1)</sup>	Banks y Greenwood, 1975 Takeda <i>et al.</i> , 1988
Valor Azul <sup>(1)</sup>	1.35	0.11	Takeda <i>et al.</i> , 1988
Afinidad a yodo (g/100 g)	19-19.5 20.1 <sup>(1)</sup>	0.3-0.5 1.10 <sup>(1)</sup>	Banks y Greenwood, 1975 Takeda <i>et al.</i> , 1988
$[\eta]$ (ml/g)	183 <sup>(1)</sup>	147 <sup>(1)</sup> 100 <sup>(2)</sup> 80 <sup>(2)</sup>	Takeda <i>et al.</i> , 1988 Banks <i>et al.</i> , 1972 Ring <i>et al.</i> , 1987
$\bar{M}_w$	200-250 x 10 <sup>3</sup> <sup>(1)</sup>	400 x 10 <sup>6</sup> <sup>(2)</sup>	Zobel, 1988 Banks <i>et al.</i> , 1972
Digestibilidad, $\beta$ -amilasa	100%	60%	Zobel 1988
Grado de polimerización	1500 – 6000	3 x 10 <sup>5</sup> – 3 x 10 <sup>6</sup>	Zobel 1988

<sup>(1)</sup> Amilosa y amilopectina de almidón de maíz<sup>(2)</sup> Amilopectina de almidón de maíz ceroso

## 2.4 Gelatinización de almidones

El entendimiento del mecanismo de gelatinización de almidones es crucial para su uso en la industria. Procesos como la panificación, extrusión, espesamiento y gelificación dependen de la adecuada gelificación del almidón. Cuando una suspensión acuosa de almidón se calienta, el ordenamiento cristalino presente en el gránulo se pierde irreversiblemente en un intervalo de temperatura denominado temperatura de gelatinización (Eliasson, 1986). Durante la gelatinización, los gránulos empiezan a absorber agua del medio incrementando su volumen hasta varias veces su tamaño inicial mientras que una gran parte de la amilosa y una menor proporción de amilopectina,

migran hacia la fase acuosa generando un incremento sustancial en la viscosidad del sistema o la formación de un gel, dependiendo del tipo de almidón y de las condiciones de preparación. Por lo tanto, el fundido de las zonas cristalinas dentro del gránulo de almidón y la solución de su organización estructural son las bases de la gelatinización.

El término gelatinización involucra una serie de eventos irreversibles que ocurren cuando el almidón se calienta en presencia de agua. La temperatura de gelatinización siempre es un intervalo, no es un valor puntual. Cuando los gránulos de almidón se colocan en agua, una pequeña cantidad de ésta es absorbida y si la temperatura se incrementa se producen cambios irreversibles: pérdida de birrefringencia y de cristalinidad, transiciones endotérmicas, cambios en la morfología del gránulo, hinchamiento de éste y solución de material intragranular (Eliasson y Gudmundsson, 1996).

Una característica de los gránulos de almidón no gelatinizados es la birrefringencia mostrada bajo luz polarizada. Cuando la temperatura se aproxima al inicio del intervalo de gelatinización, esta birrefringencia desaparece indicando pérdida de orden en la estructura granular. Un método muy utilizado para determinar la temperatura de gelatinización es el seguimiento de la pérdida de la birrefringencia del almidón en exceso de agua (Moss, 1976 citado en Eliasson y Gudmundsson, 1996). La cristalinidad es otra característica del ordenamiento granular, ésta se modifica e inclusive desaparece durante la gelatinización y es posible determinar los niveles de cristalinidad a través de las modificaciones ocurridas en los patrones de difracción de rayos X (Zobel, 1988). En almidones gelatinizados de cereales se forma un patrón débil de difracción, denominado tipo V, que se relaciona con la formación de complejos amilosa-lípido (Zobel, 1988; Hizukuri, 1996).

#### *Calorimetría diferencial de barrido y gelatinización de almidones*

Durante las últimas dos décadas, la calorimetría diferencial de barrido (CDB) ha sido una herramienta fundamental para estudiar la gelatinización de almidón. Esta técnica detecta el flujo de calor asociado a transiciones de primer orden (procesos de fusión) y a

transiciones de segundo orden (transición vítrea) de materiales poliméricos, por consiguiente, provee información valiosa de los fenómenos que tienen lugar en la estructura granular del almidón durante la gelatinización (Biliaderis *et al.*, 1980). Considerando la estructura semi-cristalina del gránulo de almidón, se ha estudiado la gelatinización como un proceso de fusión donde a niveles intermedios de humedad se manifiestan dos transiciones endotérmicas atribuidas a la hidratación de las zonas amorfas y a la fusión de las zonas cristalinas, y una tercera transición a temperaturas mayores atribuida a la fusión de complejos amilosa-lípido (Biliaderis *et al.*, 1980; 1986).

La interpretación de los termogramas es controversial, se ha sugerido (Biliaderis *et al.*, 1986) que la transición vítrea observada en la primera etapa de la gelatinización de algunos almidones precede al fundido de la zona cristalina y que la temperatura de esta transición ( $T_g$ ) es muy sensible al contenido de agua y por lo tanto al grado de hidratación de las zonas amorfas del almidón. Por lo tanto, la hidratación de las zonas amorfas ocurre durante la etapa inicial de la gelatinización. En exceso de agua (> 60%), este proceso y el fundido de las zonas cristalinas ocurren rápida y cooperativamente, generando solamente un pico endotérmico (Biliaderis *et al.*, 1986; Eliasson y Gudmundsson, 1996). En la literatura existen numerosos estudios de la caracterización térmica de almidones y el papel que representa el agua en la fusión de la zona cristalina de los gránulos de almidón (Biliaderis *et al.*, 1980, 1986; Morrison *et al.*, 1993; Eliasson y Gudmundsson, 1996, Tester *et al.*, 2000).

Algunas de las temperaturas de gelatinización de almidones de maíz obtenidas por CDB se muestran en el Cuadro 2.4-1. El almidón de maíz normal y el ceroso presentan temperaturas de gelatinización parecidas debido a la similitud en la estructura de la amilopectina dentro del gránulo. La diferencia en la entalpía de gelatinización se atribuye a la relación amilopectina/amilosa existente en los dos tipos de almidón (Tester *et al.*, 2000). Por otro lado, el almidón alto en amilosa o amilomaíz, presenta un pico endotérmico de gelatinización más amplio y las temperaturas características son mayores que en los almidones anteriores, lo cual ha sido atribuido a la presencia de complejos

amilosa-lípido que restringen la hidratación de las zonas amorfas del gránulo (Morrison *et al.*, 1993; Tester *et al.*, 2000).

**Cuadro 2.4-1.** Temperaturas de gelatinización de almidones de maíz determinadas por calorimetría diferencial de barrido (Tester *et al.*, 2000).

Almidón*	T <sub>0</sub> (°C)	T <sub>p</sub> (°C)	T <sub>c</sub> (°C)	ΔH (J/g)
Maíz ceroso	62.6 ± 1.2	72.6 ± 0.2	84.4 ± 0.9	15.6 ± 0.5
Maíz normal	62.9 ± 0.5	70.5 ± 0.4	81.1 ± 0.8	12.6 ± 0.2
Maíz alto en amilosa	67.7 ± 1.3	91.0 ± 1.6	104.8 ± 2.2	17.7 ± 0.5 <sup>a</sup> 16.5 ± 0.4 <sup>b</sup>

T<sub>0</sub> temperatura de inicio de la gelatinización

T<sub>p</sub> temperatura del pico endotérmico de la gelatinización

T<sub>c</sub> temperatura de conclusión de la gelatinización.

<sup>a</sup> Incluye la contribución de los complejos amilosa-lípidos

<sup>b</sup> No incluye la contribución de los complejos amilosa-lípidos

\* Las concentraciones de almidón utilizadas en este estudio fueron: 20 a 26%.

#### *Hinchamiento, solubilidad y cambios morfológicos del gránulo durante la gelatinización*

El desordenamiento de la estructura cristalina dentro del gránulo de almidón es la primera etapa que ocurre durante la gelatinización. Sin embargo, los cambios posteriores son trascendentales para el desarrollo de las propiedades funcionales de los almidones. Estos cambios han sido estudiados a través de técnicas de microscopía (da Silva *et al.*, 1997; Atkin *et al.*, 1998a y 1998b), análisis de tamaño de partícula por difracción láser (Ziegler *et al.*, 1993; Rao y Tattiyakul, 1999), métodos de sedimentación (Leach *et al.*, 1959; Doublier 1981) entre otras. Los principales eventos que ocurren durante la gelatinización están relacionados con el hinchamiento del gránulo y la solución en la fase continua del material polimérico del gránulo.

La microscopía, tanto óptica como de barrido electrónico, ha sido útil para describir los cambios morfológicos que tienen lugar durante el hinchamiento (Bowler *et al.*, 1980;

Williams y Bowler, 1982). De acuerdo con su origen los gránulos de almidón siguen un patrón de hinchamiento característico, como se describe en la sección 2.2. La cinética del tratamiento térmico rige el hinchamiento del gránulo pero el cizallamiento también suele ser un factor importante, ya que tratamientos severos pueden causar fragmentación temprana de los gránulos (Loh, 1992).

Durante el calentamiento de suspensiones de almidón, adicionalmente a la absorción de agua por parte del gránulo de almidón, ocurre una migración de material polimérico desde el gránulo hacia el medio. Este material está compuesto básicamente por amilosa, pero también pueden existir cantidades moderadas de amilopectina. La solución de amilosa y/o amilopectina depende del tipo de almidón y de las condiciones de calentamiento-cizallamiento imperantes. Por ejemplo, se ha observado que en el caso de almidón de trigo, la mayor parte de la amilosa se disuelve antes de que la amilopectina empiece a salir del gránulo (Doublier, 1981). En relación con las condiciones de cizallamiento durante la gelatinización, existen evidencias de la fragmentación de los gránulos hinchados por tratamientos térmicos severos, principalmente en el caso de almidones de cereales cerosos, cuyos gránulos son muy propensos a romperse debido a su alta capacidad de hinchamiento y, por ende, baja deformabilidad al disminuir la concentración de sólidos de almidón dentro del gránulo. (Tester y Morrison, 1990; Loh 1992; Ziegler *et al.*, 1993; Atkin *et al.*, 1998a).

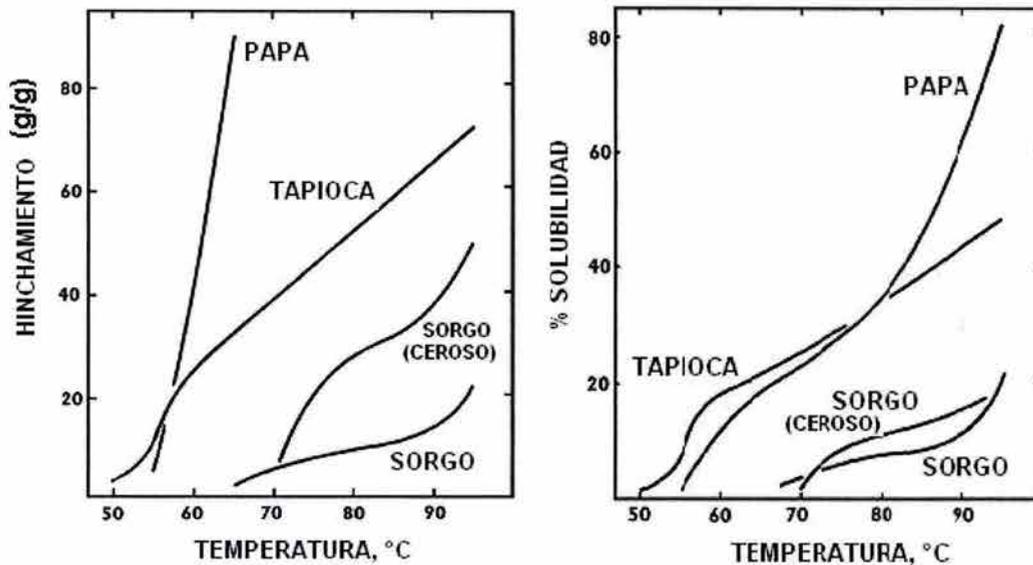
El hinchamiento es una medida de la cantidad de agua absorbida por los gránulos de almidón, la cual está en función de la temperatura. El comportamiento del hinchamiento en función de la temperatura de la suspensión de almidón genera un patrón característico para cada tipo de almidón. Por ejemplo, los almidones de papa y de cereales cerosos muestran valores de hinchamiento mayores que los almidones de cereales normales o de leguminosas. Estas diferencias se han asociado con diferentes tipos de enlaces o interacciones dentro del gránulo que influyen de manera determinante su forma de hinchamiento, de esta forma la curva de hinchamiento generada durante el cocimiento de

un almidón representa la relajación progresiva de los enlaces dentro del gránulo (Leach *et al.*, 1959).

Una descripción bien aceptada en la literatura de una suspensión de almidón gelatinizado, denominada frecuentemente como pasta de almidón, es aquella propuesta por Schoch (Schoch, 1969 citado en Evans y Haisman, 1979): “*Los sistemas de almidón gelatinizados comprenden gránulos de almidón hinchados en una fase continua, la cual contiene material macromolecular en solución*”. Bajo esta descripción, Leach *et al.*, (1959) desarrollaron una metodología para determinar la capacidad de hinchamiento y el porcentaje de sólidos disueltos durante el proceso de gelatinización. La técnica consiste en gelatinizar una cantidad conocida de almidón evitando el cizallamiento excesivo de los gránulos, la pasta formada se centrifuga separando la fase continua, la cual contiene al material en solución, del residuo o sedimento constituido por los gránulos hinchados. El índice de hinchamiento, definido como la cantidad de agua absorbida por el material no soluble, se calcula como la masa de gránulos hinchados (sedimento) dividido por la masa de almidón en base seca, y el porcentaje de material disuelto se calcula a partir de la cuantificación de glúcidos en el sobrenadante. Estas determinaciones realizadas desde el inicio de la gelatinización en intervalos regulares de temperatura generan los correspondientes perfiles de solubilidad-hinchamiento.

En la Figura 2.4-1 se muestran los perfiles esquemáticos de hinchamiento (a) y de solubilidad (b) de varios tipos de almidón. En ella se observa el hinchamiento rápido y libre del almidón de papa aun a temperaturas bajas, mientras que el almidón de tapioca empieza su hinchamiento casi al mismo tiempo que el de papa, pero lo hace lentamente. Otro aspecto que se muestra en la Figura 2.4-1 es el hinchamiento en dos etapas, ejemplificado por almidón de sorgo y característico en algunos almidones de cereales, incluyendo al maíz. De acuerdo con Leach *et al.*, (1959), estos almidones muestran una gelatinización inicial seguida de un periodo de restricción en el hinchamiento y en la solubilidad, y finalmente un segundo hinchamiento más rápido. Adicionalmente a estas

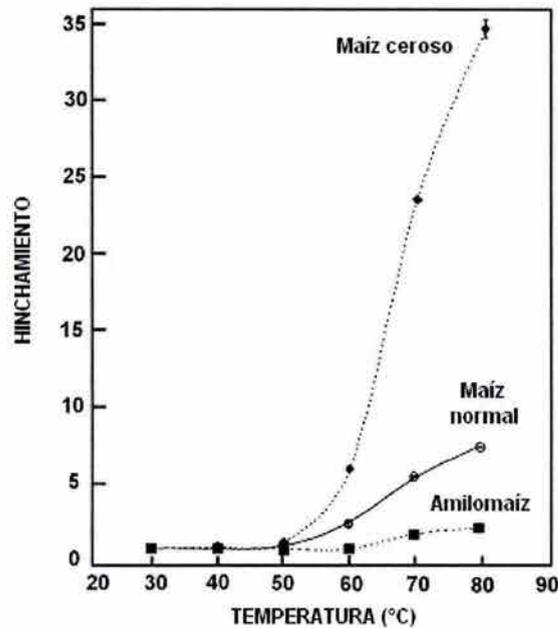
características, los almidones de cereales cerosos muestran mayor capacidad de hinchamiento y mayor porcentaje de material en solución que sus contrapartes no cerosas.



**Figura 2.4-1.** Patrones esquemáticos de solubilidad e hinchamiento de varios tipos de almidones nativos (Leach *et al.*, 1959).

Estudios de hinchamiento y solubilidad en almidones de maíz (Morrison *et al.*, 1993; Tester *et al.*, 2000) mostraron que la amilosa reprime la capacidad de hinchamiento del gránulo de almidón; Tester *et al.*, (2000) encontraron una relación entre los índices de hinchamiento para almidón de maíz ceroso, maíz normal y amilomaíz de: 13.8 : 3.4 : 1.0 a 70 °C y 14.2 : 3.2 : 1.0 a 80 °C. Este efecto de la amilosa en el hinchamiento del gránulo se observa en la Figura 2.4-2, y fue interpretado sobre la base de la formación de complejos amilosa-lípido, que al biosintetizarse en el interior del gránulo se excluyen de las regiones cristalinas de amilopectina formando sus propias regiones, probablemente dentro de las zonas amorfas del arreglo semi-cristalino del gránulo. Este material es difícil de extraerse del gránulo durante el calentamiento, por lo que su presencia en el interior de éste obstaculiza la hidratación de las zonas amorfas y consiguientemente el hinchamiento no es óptimo. Estas observaciones se suman a las realizadas anteriormente por Leach *et al.*, (1959), quienes

mostraron que la presencia de ácidos grasos de cadena larga en el almidón inhibe el hinchamiento del gránulo, probablemente por la formación de complejos insolubles con la amilosa.



**Figura 2.4-2.** Hinchamiento (expresado en volumen de gránulos hinchados entre el volumen inicial del almidón) de almidones gelatinizados de maíz (Tester *et al.*, 2000).

Los estudios de análisis de tamaño de partícula realizados por Ziegler *et al.*, (1993) en almidones de maíz, también revelaron diferentes grados de hinchamiento en función del contenido de amilosa además de diferencias debidas a la rigidez del gránulo (nativo o entrecruzado). Los diámetros iniciales y máximos medidos durante el cocimiento de las pastas de almidón se muestran en el Cuadro 2.4-2. Otros estudios de distribución de tamaño de partícula apoyados en observaciones al microscopio (da Silva *et al.*, 1997) encontraron resultados similares del hinchamiento granular de almidones de maíz en función de la presencia o no de modificaciones químicas en su estructura. Las determinaciones con almidón de maíz nativo no modificado mostraron un hinchamiento gradual y progresivo conforme avanza la gelatinización, mientras que el almidón de maíz

ceroso entrecruzado mostró un hinchamiento súbito llegando a un máximo en su hinchamiento y prosiguió con poco cambio al incrementarse el tiempo de cocimiento.

**Cuadro 2.4-2.** Diámetros medianos ( $D [v,0.5]$ ), iniciales y máximos y poder máximo de hinchamiento de partículas de almidón durante la gelatinización (Ziegler *et al.*, 1993).

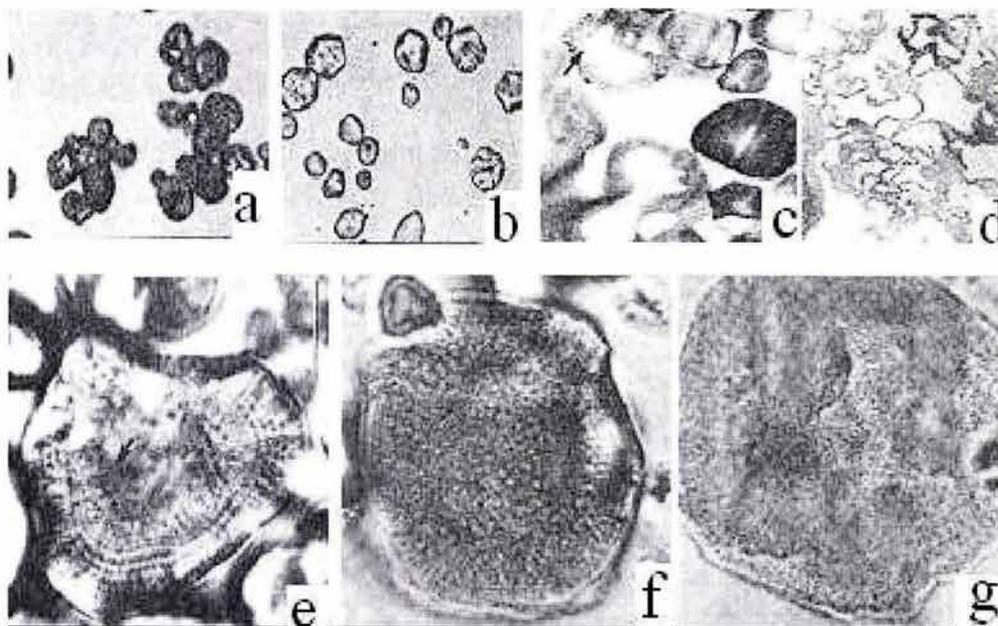
Almidón	Tamaño de partícula		Poder máximo de hinchamiento
	$D_i (\mu m)^a$	$D_{máx} (\mu m)^b$	$(D_{máx})^3/(D_i)^3$
Maíz ceroso	15.61 ± 0.24	39.63 ± 1.62	16.4
Maíz común	14.87 ± 0.38	33.32 ± 1.20	11.2
Maíz ceroso entrecruzado	14.46 ± 0.07	31.49 ± 3.20	10.3

<sup>a</sup> Diámetro inicial.

<sup>b</sup> Diámetro máximo.

Determinaciones realizadas en un analizador de tamaño de partícula por difracción láser (Malvern MasterSizer, Malvern Instruments Ltd., Malvern, England).

Estudios recientes reportaron los cambios que tienen lugar en la organización estructural del gránulo durante la gelatinización. Atkin *et al.*, (1998a, 1998b) utilizando microscopía óptica y de transmisión electrónica, así como técnicas enzimáticas durante la gelatinización de almidones, reportaron una secuencia de eventos que se manifestaron en mayor o menor medida independientemente del contenido de amilosa, de las modificaciones químicas del gránulo y de la fuente del almidón. De acuerdo con estos autores la gelatinización se inicia con la hidratación de las zonas amorfas de la estructura granular interna. Para el caso concreto de almidón de maíz ceroso nativo, el hinchamiento inicial durante la hidratación a temperatura ambiente se lleva a cabo de manera radial incrementando el diámetro del gránulo hasta en un 80% (Figuras 2.4-3a y 2.4-3b). Sin embargo, durante el calentamiento, cuando la temperatura es cercana a 65 °C, el gránulo puede incrementar su diámetro original hasta en un 200%, en esta etapa los autores observaron la destrucción del arreglo estructural interno de los gránulos.



**Figura 2.4-3.** Imágenes de microscopía óptica de la gelatinización de almidón de maíz ceroso nativo. (a) gránulos secos, no hinchados; (b) gránulos en suspensión acuosa a 40 °C, gránulos hinchados intactos; (c) gránulos gelatinizados a 70 °C; se observan gránulos desintegrados; (d) gránulos gelatinizados a 100 °C, se observan sólo restos de gránulos fragmentados, "ghosts". Las Figuras e-g) muestran el desarreglo interno del gránulo durante la gelatinización de maíz ceroso nativo a 60 °C; la Figura (e) muestra el inicio del rompimiento estructural intergranular; (f) la mayoría de las partículas en el centro del gránulo se encuentran aleatoriamente organizadas mientras que la periferia del gránulo mantiene su integridad; (g) el gránulo es una bolsa turgente con partículas completamente desorganizadas en su interior, hinchamiento máximo del gránulo. (Atkin *et al.*, 1998a, 1998b).

Algunas de las observaciones al microscopio óptico de los trabajos de Atkin *et al.*, (1998a, 1998b) se encuentran en la Figura 2.4-3. De acuerdo con esas microfotografías, el gránulo de almidón inicia su destrucción en el centro (Figura 2.4-3e), tal como se observa con la desaparición de los anillos teñidos en el interior del gránulo y prosigue hacia la superficie (Figura 2.4-3f) hasta que el gránulo puede describirse como una bolsa turgente con partículas de material polimérico en el interior (Figura 2.4-3g). Temperaturas mayores a 70 °C deforman e incluso rompen la superficie del gránulo, liberando el contenido mientras que la superficie granular, conformada básicamente por amilopectina, se colapsa y frecuentemente permanece en suspensión (Figura 2.4-3d). Los almidones no cerosos y los

modificados químicamente siguieron un patrón similar pero con restricción en la extensión del hinchamiento.

## **2.5 Reología de pastas y geles de almidón**

### *Propiedades de flujo*

Durante la gelatinización de suspensiones de almidón se presentan cambios importantes. Los gránulos de almidón absorben agua y se hinchan durante el calentamiento de la suspensión mientras que los componentes de los gránulos, principalmente amilosa, migran hacia el medio formando una matriz con gránulos hinchados en su interior. Como consecuencia de estos eventos, las propiedades reológicas del sistema también presentan modificaciones importantes.

Los primeros estudios reológicos en pastas de almidón constaron, según reportes, de pruebas empíricas y de patrones obtenidos en viscoamilógrafos. Estos equipos someten a la muestra a un tratamiento térmico bien definido (velocidad de calentamiento, intensidad de la agitación, temperatura máxima, tiempo de sostenimiento de la temperatura máxima, velocidad de enfriamiento) y registran el torque ejercido por la muestra durante el cocimiento de la pasta. El torque registrado usualmente se expresa como unidades de viscosidad, la cual está en función de la temperatura de la pasta. Sin embargo, aunque estos métodos todavía son muy útiles en la industria, ya que permiten observar los cambios de "consistencia" de las pastas de almidón durante el cocimiento de manera reproducible y comparar el comportamiento de diferentes almidones; tienen el inconveniente de trabajar con una cinética única de calentamiento-enfriamiento y de no tener definidas las condiciones de cizallamiento, lo que genera que incluso diferentes marcas comerciales de viscoamilógrafos produzcan resultados diferentes aun con el mismo almidón.

Un estudio reológico bien fundamentado es aquél que permite obtener funciones materiales en flujo estacionario y no estacionario a partir de una relación bien definida entre el esfuerzo y la deformación o velocidad de deformación. La mayoría de los estudios reológicos de pastas y geles de almidón versa sobre propiedades de flujo (flujo estacionario) y propiedades viscoelásticas dinámicas (régimen armónico). En cualquier caso, la caracterización reológica de estos sistemas involucra controlar la cinética de calentamiento y las condiciones de agitación.

Fue hasta la década de los años 80's cuando empezaron a surgir estudios reológicos bien fundamentados de suspensiones de almidón. Principalmente se determinaron los cambios en la viscosidad que manifiestan las suspensiones de almidón durante el calentamiento y el efecto de diferentes tratamientos térmicos en la viscosidad de estos sistemas (Evans y Haisman 1979; Doublier 1981, Bagley y Christianson 1982, Doublier *et al.*, 1987).

Para describir el comportamiento de flujo en estado estacionario de las pastas de almidón se han utilizado modelos empíricos como el de Ostwald-de Waele, Herschel-Bulkley, Cross y Casson entre otros (Evans y Haisman, 1979; Doublier 1981; da Silva *et al.*, 1997, Rao y Tattiyakul, 1999). Sin embargo, estas ecuaciones son útiles para describir el comportamiento reológico de soluciones macromoleculares, que a diferencia de las pastas de almidón carecen de partículas en suspensión. Por lo tanto, el uso de los anteriores modelos sólo ha dado información del comportamiento no newtoniano de las pastas de almidón sin considerar el papel de las partículas hinchadas en suspensión (gránulos).

Existen reportes de comportamientos reo-espesantes en las primeras etapas de calentamiento de las dispersiones de almidón cuando los gránulos no han perdido su integridad y son lo suficientemente rígidos para resistir el cizallamiento (Okechukwu y Rao, 1995; Christianson y Bagley, 1983, citados en Rao y Tattiyakul, 1999; Rao y Tattiyakul, 1999). Otros estudios hacen alusión a la existencia de esfuerzos de cedencia (Evans y Haisman, 1979) y al carácter reo-fluidificante con dependencia de la velocidad de cizalla denominado tixotropía (Doublier 1987; Doublier *et al.*, 1987; Tecante y Doublier 1999). Esta

tixotropía o reodestrucción, como ha sido denominada, se ha relacionado con las condiciones de preparación de las pastas de almidón y por consiguiente con el hinchamiento del gránulo, observándose mayores valores de hinchamiento generan gránulos más sensibles al cizallamiento (Doublier *et al.*, 1987).

El uso de técnicas de sedimentación en almidones gelatinizados (Evans y Haisman, 1979) aportó una descripción cualitativa al comportamiento reológico de las pastas de almidón. Estos estudios permitieron sugerir que el comportamiento reológico de suspensiones de almidón gelatinizado está determinado por interacciones intergranulares, tales como uniones débiles de corta duración entre la superficie de moléculas vecinas, y por las características viscoelásticas y de compresibilidad de los gránulos.

Con este antecedente, Doublier (1981) comparó las curvas de flujo de pastas de almidón de trigo con los parámetros de solubilidad e hinchamiento. Evaluando diferentes tratamientos térmicos en las pastas, concluyó que las diferencias observadas en el comportamiento de flujo se debían a la composición de la fase continua (material en solución y partículas finas procedentes de gránulos fragmentados) y al tamaño de las partículas que conforman la fase dispersa (gránulos hinchados y gránulos fragmentados).

El trabajo de Doublier (1981) destaca la importancia de la velocidad de calentamiento y la agitación durante la preparación de pastas de almidón, debido a que pequeñas variaciones en estos parámetros dieron por resultado diferencias importantes en la disolución de la amilosa y consecuentemente en el hinchamiento del gránulo. Cuando las condiciones de agitación y velocidad de calentamiento propiciaron la completa extracción de la amilosa del gránulo, el hinchamiento de éstos fue prominente y su rompimiento puede ocurrir si la agitación es suficiente (por ejemplo 750 rpm en lugar de 200 rpm). Por el contrario, cuando la amilosa no fue completamente extraída, se observó un hinchamiento menor y el gránulo fue menos susceptible a romperse independientemente de las condiciones de agitación usadas. Esto concuerda con observaciones previas del papel de la amilosa en el hinchamiento de los gránulos de almidón (Leach *et al.*, 1959).

Estudios posteriores han avalado la dependencia que tienen las propiedades de flujo y las características de hinchamiento y solubilidad de las pastas de almidón con las condiciones de preparación, específicamente velocidad de calentamiento y la magnitud de la agitación (Doublier 1987; Doublier *et al.*, 1987). El porcentaje de material disuelto al final de la preparación, así como el hinchamiento del gránulo, son mayores cuando se utilizan velocidades de calentamiento altas (Doublier 1987). La agitación es otro parámetro importante principalmente cuando se trabaja con gránulos susceptibles a romperse, como almidones cerosos o almidones de papa, con altos valores de hinchamiento.

Una pasta o gel de almidón frecuentemente se describe como un sistema bifásico con una fase continua constituida por el disolvente y el material extraído del gránulo durante la gelatinización, y una fase dispersa compuesta de gránulos hinchados (Doublier 1981, Bagley y Christianson, 1982; Eliasson 1986; Doublier 1987, Doublier *et al.*, 1987; Da Silva *et al.*, 1997). Esta descripción hace énfasis en la presencia de partículas hinchadas en las suspensiones de almidón, las cuales difieren del grueso de las suspensiones, en que los gránulos hinchados pueden ser deformables. De acuerdo con esto, las suspensiones de almidón permanecen fluidas a concentraciones muy superiores a aquéllas donde el volumen total se encuentra ocupado por gránulos hinchados. Por lo tanto es de esperarse que las propiedades reológicas de las suspensiones de almidón dependan de las características de las fases continua y dispersa. Algunas de las propiedades del almidón que se consideran importantes en la reología de las pastas y geles de almidón se muestran en el Cuadro 2.5-1.

Las características de las fases continua y dispersa son importantes para la caracterización reológica de cualquier material bifásico o tipo *composite* (Ferry 1980). Existen en la literatura ecuaciones que predicen la viscosidad de dichos materiales en función de la viscosidad de la fase continua y de la fracción volumen de la fase dispersa (Quemada, 1975). Muchas de estas ecuaciones se han desarrollado para suspensiones con partículas rígidas no deformables, sin embargo la deformabilidad de las partículas de almidón es tal que en suspensiones de almidón sin material disuelto en la fase continua se pueden

obtener sistemas densamente empacados donde prácticamente el 100% del volumen total sea ocupado por las partículas hinchadas (Bagley y Christianson, 1982). Esta particularidad establece una gran diferencia con respecto a las suspensiones de partículas rígidas no deformables. Las dispersiones de almidón poseen partículas (gránulos) que durante el calentamiento absorben el agua del medio (hinchamiento) y parte de su material polimérico intragranular migra a la fase continua. Estos eventos generan partículas hinchadas y deformables que contribuyen directamente al carácter elástico del sistema.

**Cuadro 2.5-1** Factores que pueden influir en el comportamiento reológico de suspensiones de almidón (Eliasson, 1986).

---

**Fase Dispersa = gránulos de almidón**

Concentración

Tamaño y distribución de gránulos

Forma de los gránulos

Patrones de hinchamiento

Rigidez del gránulo (cristalinidad) y deformabilidad

**Fase continua = matriz amilosa/amilopectina**

Viscoelasticidad de la fase

Cantidad y tipo de amilosa/amilopectina que se ha extraído de los gránulos

Entrecruzamientos débiles de corta duración

**Interacciones entre los componentes**

Contactos gránulo-gránulo

Interacciones gránulo-amilosa/amilopectina

Interacciones gránulo-amilosa/amilopectina-gránulo

Superficie de los gránulos de almidón

---

Se ha propuesto que la fracción volumen ( $\Phi$ ) de la fase dispersa en una suspensión de almidón puede estimarse a partir del producto  $CQ$ , en donde  $C$  es la concentración de almidón en la dispersión y  $Q$  es la capacidad de hinchamiento de los gránulo, expresada en g partículas hinchadas/g almidón (Bagley y Christianson, 1982). Esta estimación contempla que la fase continua es el disolvente sin material polimérico en solución y la fase dispersa está constituida únicamente por las partículas hinchadas. De acuerdo con esto, cuando  $CQ < 1$ , existe disolvente entre las partículas hinchadas; mientras que cuando  $CQ = 1$ , todo el disolvente ha sido absorbido por las partículas de almidón. Bajo un tratamiento similar, considerando que parte del material polimérico del almidón se

disuelve de forma paralela al hinchamiento del gránulo, Doublier *et al.*, (1987) propusieron las siguientes expresiones para estimar la fracción volumen ( $\Phi$ ) de las partículas hinchadas en pastas de almidón y la concentración de sólidos de almidón en la fase continua ( $C_s$ ) en g/g:

$$\Phi = (1 - S/100)CG \quad (2.5-1)$$

$$C_s = \left( \frac{1}{1 - \Phi} \right) CS / 100 \quad (2.5-2)$$

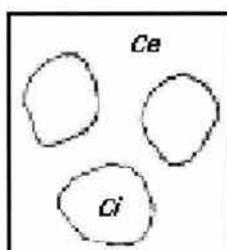
En donde S es el porcentaje de sólidos disueltos, G es el índice de hinchamiento (g/g) y C es la concentración de almidón en la dispersión (g/g). La ecuación 2.5-1 supone que el sedimento o fase dispersa está constituida únicamente por partículas hinchadas y predice un comportamiento lineal de  $\Phi$  con la concentración de almidón, lo cual no se cumple a concentraciones altas de almidón debido a que el hinchamiento y la solubilidad se restringen al haber menor cantidad de agua disponible en la fase continua. La ecuación 2.5-2 es válida en el intervalo de concentraciones de almidón donde se cumpla que  $\Phi \ll 1$  (Doublier *et al.*, 1987).

Se han propuesto tres regímenes de concentración en las suspensiones gelatinizadas de almidón (Taylor y Bagley, 1974 citados en Steeneken, 1989), los cuales se ilustran en la Figura 2.5-1. El régimen diluido abarca las concentraciones de almidón en las cuales los gránulos están completamente hinchados y la concentración de almidón en el interior del gránulo ( $C_i$ ) es mayor que en la fase continua (C). La región de transición es aquella donde los gránulos están completamente hinchados y llenan todo el volumen disponible, finalmente en el régimen concentrado el agua disponible para el hinchamiento de los gránulos puede ser un factor limitante, de tal forma que éstos no llegan a su máximo hinchamiento pero se encuentran densamente empacados en el volumen disponible.

El trabajo de Steeneken (1989) mostró que la viscosidad de suspensiones gelatinizadas de almidón depende fuertemente del producto CQ cuando la concentración de almidón se

ubica en el régimen diluido ( $CQ < 1$ ), mientras que el factor dominante en la viscosidad de estos sistemas es la rigidez de las partículas cuando la concentración del sistema es lo suficientemente alta como para que los gránulos estén densamente empacados ( $CQ > 1$ ). Estas conclusiones coinciden con las de Doublier *et al.*, (1987), quienes consideraron que el comportamiento reológico de suspensiones gelatinizadas de almidón está regido por:

- La concentración de sólidos de almidón en la fase continua
- La deformabilidad de las partículas hinchadas en la fase dispersa.



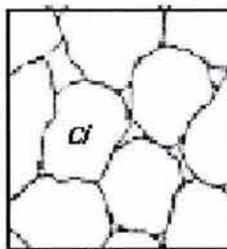
#### Régimen Diluido

Partículas hinchadas en equilibrio

$$C_e < C_i$$

$$C_i = \frac{1}{Q} > C$$

$$CQ < 1$$



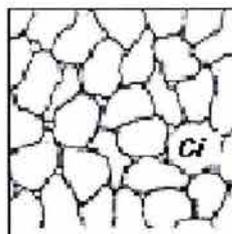
#### Régimen de transición

Partículas hinchadas en equilibrio

$$C_i = C = \frac{1}{Q} = C^*$$

$C^*$  = concentración de transición

$$CQ = 1$$



#### Régimen concentrado

Partículas hinchadas antes del equilibrio

$$C_i = C > C^*$$

$$CQ > 1$$

**Figura 2.5-1.** Regímenes de concentración en suspensiones de gránulos gelatinizados de almidón,  $C$  es la concentración de almidón en la suspensión,  $C_e$  y  $C_i$  son las concentraciones de almidón en el exterior e interior del gránulo respectivamente,  $C^*$  es la concentración de almidón cuando todo el volumen del sistema se encuentra ocupado por los gránulos hinchados, y  $Q$  es el hinchamiento del gránulo expresado en mL/g (Steeneken, 1989).

La deformabilidad de los gránulos hinchados se considera un factor predominante al incrementarse la concentración de las pastas de almidón, esta deformabilidad está inversamente relacionada con el hinchamiento del gránulo, mayores hinchamientos propician una dilución del material polimérico interno propiciando que los gránulos sean más sensibles a deformarse y a fracturarse (Doublier, 1987).

Las diferencias en sensibilidad al cizallamiento mecánico que manifiestan los gránulos de almidón demandan estudios posteriores. Hasta ahora se ha observado que los almidones con grandes capacidades de hinchamiento tienen gránulos más sensibles a romperse durante la preparación de las pastas (Tester y Morrison, 1990; Loh 1992; Ziegler *et al.*, 1993; Atkin *et al.*, 1998a) e incluso la industria del almidón cataloga a los almidones cerosos como almidones útiles donde se requieran bajas viscosidades, debido a que frecuentemente la preparación industrial de las pastas hace uso de esfuerzos cortantes grandes que propician el rompimiento de los gránulos y la disminución de la viscosidad de las pastas de almidón.

Algunos procesos típicos de la industria de alimentos (mezclado, atomización, extrusión, bombeo) utilizan velocidades de deformación entre  $10 \text{ s}^{-1}$  y  $100\,000 \text{ s}^{-1}$  (Loh, 1992), bajo estas condiciones se obtienen pastas de almidón que no se ajustan al modelo bifásico propuesto en la literatura; las dispersiones resultantes son mezclas de gránulos hinchados, gránulos fragmentados y macromoléculas en solución coloidal (Olkku y Rha, 1978), por lo tanto la reología de sistemas tan complejos no es simple.

#### *Propiedades viscoelásticas*

Las propiedades viscoelásticas de las pastas y geles de almidón se han estudiado bajo el modelo de sistemas compuestos, *composites*, sugerido por Ott y Hester (Ott y Hester, 1965 citado en Eliasson, 1986), es decir una red de amilosa reforzada con partículas hinchadas de almidón. En la caracterización viscoelástica de pastas y geles de almidón es frecuente el

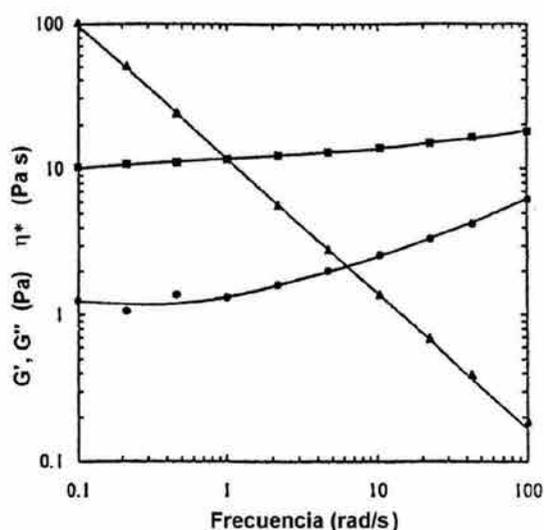
uso de cizalla oscilatoria de baja amplitud. El comportamiento de los módulos dinámicos ( $G'$ ,  $G''$ ,  $G^*$ ), así como el del ángulo de pérdida ( $\tan \delta$ ) han proporcionado información del carácter elástico de estos sistemas (Evans y Haisman, 1979; Alloncle y Doublier, 1991; Evans y Lips, 1992; Eidam y Kulicke, 1995; Abdulmola *et al.*, 1996b; Tecante y Doublier, 1999), lo cual ha sido asociado con la presencia de partículas deformables en suspensión (gránulos hinchados, fragmentos de gránulos hinchados, gránulos no hinchados).

Algunos estudios reológicos de geles y pastas de almidón han dado poca importancia a la fase continua, debido a que ésta, en ausencia de los gránulos, ha presentado viscosidades bajas sugiriendo poca influencia en la reología global del sistema (Evans y Haisman, 1979). La mayoría de los estudios realizados hasta la fecha ha dado mayor énfasis en la contribución que tienen los gránulos o partículas hinchadas en la reología de las pastas y geles de almidón, pero han sugerido que la cantidad de amilosa extraída del gránulo puede perturbar la reología de estos sistemas debido a interacciones con los gránulos (Eliasson, 1986; Steeneken, 1989; Alloncle y Doublier, 1991; Evans y Lips, 1992; Tecante y Doublier, 1999).

Los trabajos realizados con almidón de maíz ceroso nativo y entrecruzado (Abdulmola *et al.*, 1996a; Abdulmola *et al.*, 1996b; Mohammed *et al.*, 1998), donde el efecto de la amilosa en el medio continuo se ha descartado y las condiciones de preparación se controlaron para evitar o minimizar el rompimiento de los gránulos, mostraron espectros dinámicos típicos de un material con predominante carácter elástico ( $G' > G''$ , poca dependencia de los módulos con la frecuencia) aún a bajas concentraciones de almidón (2 y 3% m/m) (Figura 2.5-2).

En el comportamiento reológico dinámico de pastas de almidón también se ha determinado el efecto de las partículas hinchadas. De hecho una diferencia importante entre una solución macromolecular (obtenida bajo condiciones drásticas de calentamiento,  $T > 140$  °C) y una suspensión de almidón versa en el comportamiento viscoelástico. En soluciones de los polisacáridos del almidón, aun a concentraciones del 20%, los valores del

módulo de almacenamiento ( $G'$ ) son muy bajos, apenas perceptibles por los reómetros convencionales (Steeneken, 1989); mientras que los barridos de frecuencia de  $G'$  y  $G''$  de las suspensiones de almidón gelatinizado muestran el característico *plateau* elástico a bajas frecuencias y los valores de tangente de delta indican un predominio del carácter elástico; aun cuando su apariencia sea fluida (Steeneken, 1989; Abdulmola *et al.*, 1996b; Tecante y Doublier 1999).



**Figura 2.5-2.** Dependencia con la frecuencia de  $G'$ ,  $G''$  y  $\eta^*$  de almidón de maíz ceroso gelatinizado al 2% (m/m) en suspensión acuosa (deformación: 0.5%, 20 °C).  $G'$  (cuadrados);  $G''$  (círculos);  $\eta^*$  (triángulos) (Abdulmola *et al.*, 1996).

Otro aspecto que se ha discutido en la literatura (Steeneken, 1989; Evans y Lips, 1992) es la relación lineal entre  $G'$  y la concentración de almidón, dicha relación se observa dentro del régimen diluido (Figura 2.5-1). En esta región también se ha observado la disminución progresiva del ángulo de pérdida ( $\delta$ ) con la concentración de almidón. Por otra parte, en la región de concentraciones de almidón donde  $CQ > 1$ , los módulos divergen del comportamiento lineal y los valores de  $\delta$  llegan a un mínimo y se mantienen prácticamente constantes al incrementarse la concentración. Por lo tanto se ha considerado

que la concentración donde los gránulos hinchados de almidón ocupan todo el volumen de la dispersión en suspensiones gelatinizadas de almidón, denota una transición también en el comportamiento reológico dinámico (Doublier *et al.*, 1987; Steeneken, 1989; Evans y Lips, 1992). Aspectos relacionados con la composición de la fase continua y su efecto en las propiedades reológicas dinámicas y propiedades de flujo también han sido discutidos; principalmente en el caso de mezclas de almidón con hidrocoloides (Alloncle *et al.*, 1989; Alloncle y Doublier, 1991, Eidam y Kulicke, 1995, Abdulmola *et al.*, 1996b; Mohammed *et al.*, 1998; Tecante y Doublier, 1999).

## 2.6 Reología de mezclas almidón-hidrocoloide

Los sistemas almidón-hidrocoloide incorporan importantes atributos de textura en muchos productos alimenticios. Se ha observado que la combinación de almidón con hidrocoloides (galactomananos, xantana, carboximetilcelulosa, carrageninas) puede generar viscosidades mayores a las obtenidas con almidón únicamente (Christianson *et al.*, 1981; Alloncle *et al.*; 1989, Alloncle y Doublier, 1991) e inclusive una aceleración de la gelificación en el sistema (Eidam y Kulicke, 1995). Este incremento en la viscosidad, frecuentemente denominado como sinergismo, ha sido motivo de un gran número de estudios.

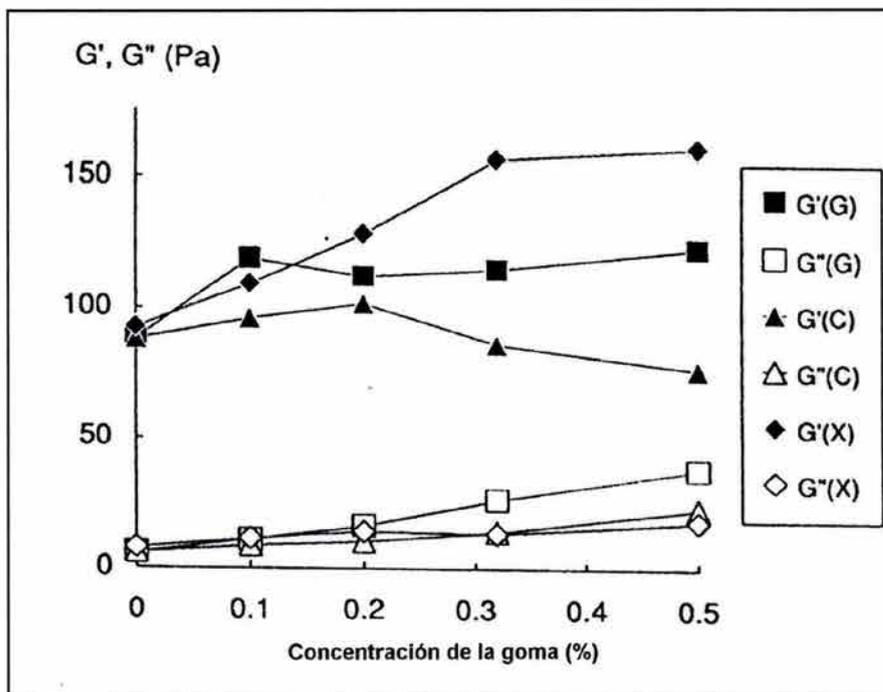
Miller *et al.*, (Miller *et al.*, 1973 citado en Christianson *et al.*, 1981) propusieron que el incremento en la viscosidad de pastas de almidón de trigo en presencia de hidrocoloides (carboximetilcelulosa, alginato) se debía a la formación de una red de amilosa en donde el hidrocoloide podría contribuir a su formación e incrementar la viscosidad de la pasta. Posteriores estudios explicaron el mismo efecto sobre la base de la formación de complejos entre la amilosa, o almidón disuelto, y el hidrocoloide adicionado durante la gelatinización (Christianson *et al.*, 1981).

La caracterización reológica de mezclas de almidón de maíz y almidón de trigo con galactomananos (Alloncle *et al.*, 1989) sugirió que la adición de un hidrocoloide a pastas de almidón resulta en la modificación de la fase continua donde se ubica el polisacárido adicionado. Según este estudio, conforme la gelatinización procede, los gránulos de almidón se hinchan disminuyendo el volumen disponible para la fase continua y por lo tanto elevando la concentración del hidrocoloide dentro de esta fase. Los autores han atribuido este efecto al incremento de viscosidad que presentan las mezclas de almidón con hidrocoloide, el cual puede ser más o menos intenso dependiendo de las propiedades viscoelásticas propias del hidrocoloide adicionado. En este trabajo también se presume que la presencia de hidrocoloide en la fase continua no afecta el hinchamiento del gránulo ni la solución del material extraído de éste durante la gelatinización.

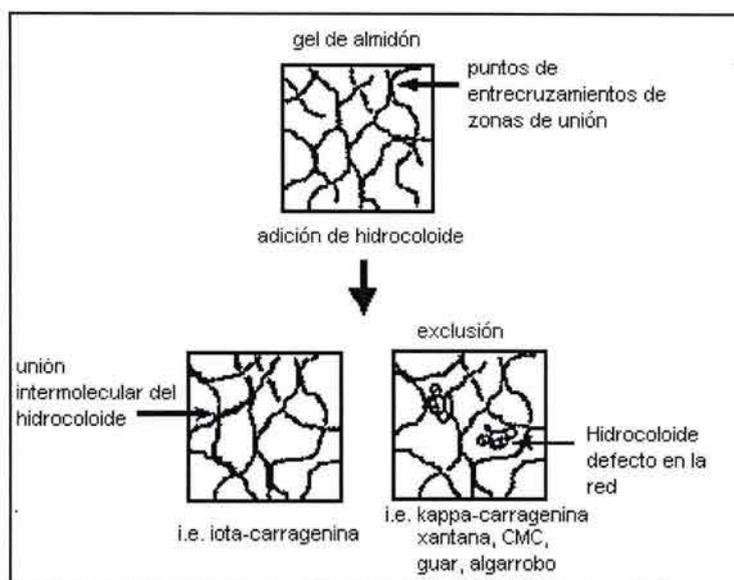
En cuanto a las propiedades viscoelásticas, el trabajo de Alloncle *et al.*, (Alloncle 1990; Alloncle y Doublier, 1991), con almidón de maíz y sistemas mixtos con hidrocoloides no gelificantes: guar o algarrobo y débilmente gelificantes: xantana, mostró diferentes comportamientos viscoelásticos (Figura 2.6-1). Los espectros mecánicos de las mezclas almidón-guar y almidón-algarrobo no exhibieron cambios sustanciales en los módulos ni en tangente de delta en relación con almidón solo, además de que los módulos de almacenamiento de las mezclas fueron más dependientes de la frecuencia. Por otra parte, la adición de xantana a almidón de maíz generó un comportamiento diferente, los módulos se incrementaron en una relación casi lineal con la concentración de xantana en la mezcla, es decir a diferencia de las mezclas con hidrocoloides no gelificantes donde el carácter elástico de la pasta de almidón fue atenuado, las mezclas almidón-xantana mostraron un “reforzamiento” de las propiedades elásticas globales. Para explicar estos efectos, los autores sugirieron un efecto de incompatibilidad entre los polisacáridos de la fase continua que podría inhibir la gelificación de amilosa y generar el comportamiento observado.

La posibilidad de incompatibilidad termodinámica entre el hidrocoloide adicionado y las macromoléculas del almidón también ha sido sugerida en otros trabajos (Eidam y Kulicke,

1995), en donde se estudiaron las propiedades reológicas dinámicas de las mezclas formadas por almidón de maíz e hidrocoloides tanto espesantes (carboximetilcelulosa, guar, goma de algarrobo), como gelificantes (xantana,  $\iota$ -carragenina,  $\kappa$ -carragenina). Las propiedades viscoelásticas dinámicas de estos sistemas, a excepción de las mezclas con  $\iota$ -carragenina, evidenciaron una disminución en la elasticidad global del sistema (incremento de los valores de tangente de delta) en comparación con almidón solo. Con base en estas observaciones los autores especularon en la forma de interacción entre los polisacáridos adicionados y el almidón. Ellos propusieron que las cadenas del hidrocoloide adicionado actúan como sitios de discontinuidad de la red de amilosa, que se traducen en una reducción en las propiedades elásticas de las mezclas almidón-hidrocoloide. Contrariamente, en presencia de iota-carragenina se presume ocurre un "reforzamiento" de la red de amilosa (Figura 2.6-2).



**Figura 2.6-1.** Variación de los módulos dinámicos de pastas de almidón en función de la concentración de hidrocoloide adicionado (guar (G), algarrobo (C), xantana (X)). Determinaciones a 1 Hz de frecuencia y 25 °C después de 15 h de envejecimiento de los geles (Alloncle 1990).



**Figura 2.6-2.** Representación esquemática de los posibles arreglos moleculares de los hidocoloides en la estructura gelificada de las mezclas almidón hidocoloide (Eidam y Kulicke, 1995).

Los resultados de Eidam y Kulicke (1995) contrastan con los obtenidos previamente (Alloncle y Doublier, 1991). Aunque en ambos trabajos se menciona un posible efecto de incompatibilidad termodinámica, el comportamiento reológico de las pastas de almidón fue completamente diferente. Las diferencias observadas se pueden atribuir a las condiciones experimentales empleadas. Eidam y Kulicke (1995) prepararon sus mezclas utilizando temperaturas muy elevadas durante un lapso de tiempo relativamente grande (130 °C, 30 minutos), dichas condiciones fueron suficientes para eliminar la estructura granular del almidón, lo cual fue comprobado por los autores a través de observaciones al microscopio bajo luz polarizada. Por lo tanto el efecto de los gránulos de almidón fue eliminado en el trabajo en cuestión y las mezclas estudiadas constaron de tres polisacáridos en suspensión (amilosa, amilopectina e hidocoloide adicionado) donde efectos de exclusión de amilosa bien pueden llevarse a cabo, considerando la incompatibilidad termodinámica que existe entre amilosa y amilopectina (Kalichevsky y Ring, 1987).

Una interpretación alterna y completamente diferente al comportamiento viscoelástico observado en mezclas almidón-hidrocoloide, se propuso por Abdulmola *et al.*, (1996b). Su estudio comprendió la viscoelasticidad de mezclas formadas por xantana y dos tipos de almidón de maíz ceroso: nativo y entrecruzado. Ellos observaron comportamientos reológicos típicos de geles en almidones a concentraciones tan bajas como 2% m/m, donde el volumen ocupado por los gránulos fue menor a 20%, de acuerdo con sus determinaciones. Adicionalmente observaron que la adición de almidón (1 a 5% m/m) a soluciones de xantana (0.25 y 0.5% m/m) produjo un incremento importante en los módulos dinámicos, el cual aparentemente no puede ser explicado a través del esquema propuesto por Alloncle *et al.*, (1989) quienes proponen el aumento de la concentración del hidrocoloide en la fase continua debida al hinchamiento de los gránulos.

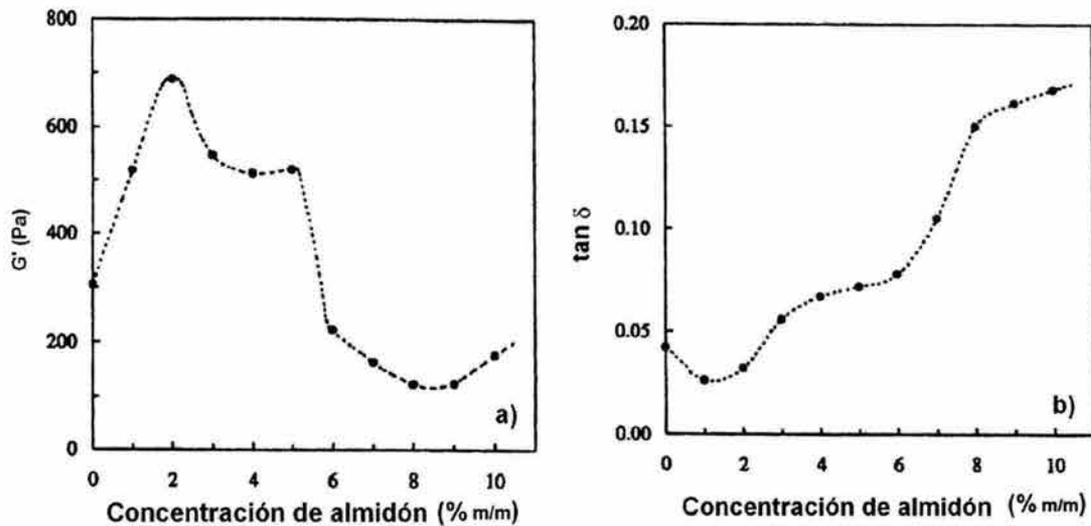
A diferencia de otros sistemas, en donde la reología de la mezcla es dominada por el hidrocoloide adicionado, en el trabajo de Abdulmola *et al.*, se concluye que la reología de las mezclas almidón-xantana está determinada por el almidón y se especula que la xantana promueve la adhesión entre gránulos gelatinizados. Los autores proponen la formación de una estructura tipo red en estas mezclas, aún a concentraciones lejanas a aquellas donde existe un empacamiento de gránulos, e inclusive esto explicaría los valores de  $G'$  mayores para almidón ceroso no modificado en comparación con el modificado a bajas concentraciones, presumiendo diferencias en la superficie del gránulo que condicionan su capacidad para adherirse a gránulos vecinos.

Dentro del mismo grupo de trabajo que Abdulmola *et al.*, (1996a, 1996b); se estudió el comportamiento viscoelástico de mezclas de almidón de maíz ceroso no modificado (1 a 10% m/m), con agarosa (0.25% m/m) (Mohammed *et al.*, 1998). Los espectros dinámicos mostraron que dependiendo de la concentración de almidón en la mezcla, la reología podría estar dominada por: a) el hidrocoloide adicionado, b) ambos componentes, c) el almidón. Sin descartar el esquema de los gránulos dispersos en una matriz de biopolímero, Mohammed *et al.*, suponen que los tres comportamientos mencionados se deben al efecto del volumen ocupado por los gránulos de almidón.

Mohammed *et al.*, (1998) proponen la formación de una matriz gelificada de agarosa que atrapa a los gránulos dispersos cuando la concentración de almidón es baja en la mezcla (1 % a 2%). A estas concentraciones de almidón, sus estudios mostraron que la reología global de las mezclas está determinada por el hidrocoloide, y una hipótesis similar a la propuesta anteriormente por Alloncle *et al.*, (1991) emergió para explicar este efecto. Es decir, el incremento en  $G'$  y el descenso en tangente de delta se atribuyó al incremento de concentración de agarosa en el medio continuo debido a la absorción de agua por los gránulos de almidón durante su hinchamiento. La variación de  $G'$  y tangente de delta en los sistemas estudiados por Mohammed *et al.*, (1998) se muestran en la Figura 2.6-3a y 2.6-3b respectivamente.

A concentraciones intermedias de almidón (3 a 5%),  $G'$  y tangente de delta denotan un descenso notable en las propiedades elásticas de las mezclas almidón-agarosa (Figura 2.6-3). Este intervalo de concentraciones de almidón coincide de acuerdo con los datos reportados por los autores, con el punto en el cual los gránulos hinchados empiezan a ocupar todo el volumen disponible,  $\Phi > 0.72$ . De los resultados reológicos, Mohammed *et al.*, (1998) especulan que en este intervalo de concentraciones de almidón, las zonas intersticiales se ocuparían por el biopolímero formando una segunda red dentro de la red original de almidón, a este sistema lo denominaron redes bicontinuas o redes interpenetradas haciendo alusión al tipo de asociación que se presume existe en algunas mezclas de biopolímeros (Morris, 1991; Piculell *et al.*, 1992).

Finalmente Mohammed *et al.*, (1998) observaron que a concentraciones entre 6 y 10% de almidón, éste domina la reología de las mezclas debido supuestamente a la mutua inhibición en la formación de redes por ambos componentes, atribuible a la poca disponibilidad de agua para el hinchamiento del gránulo y a restricciones de tipo topológico en la formación de la red de hidrocoloide.



**Figura 2.6-3.** Variación de  $G'$  (a) y tangente de delta (b) con la concentración de almidón en co-geles de almidón de maíz ceroso nativo con agarosa (0.25% m/m). Determinaciones realizadas a  $\omega = 10$  rad/s;  $\gamma = 0.05\%$ ,  $T = 5$  °C (Mohammed *et al.*, 1998).

El trabajo de Mohammed *et al.*, (1998) ofrece interpretaciones especulativas a comportamientos reológicos observados. Aunque se mostraron datos de las fracciones volumen de los gránulos de almidón en los sistemas estudiados, no se constató la integridad de los gránulos ni se hicieron estudios de microestructura. No obstante, en este trabajo se muestran resultados en un intervalo amplio de concentraciones de almidón logrando detectar cambios en la reología de los co-geles en función de la concentración de este componente y emerge la descripción de redes interpenetradas para los sistemas mezclados almidón-hidrocoloide.

La literatura de reología de mezclas formadas por almidones e hidrocoloides ha sido particularmente prolífica con hidrocoloides espesantes, los aspectos mayormente estudiados han sido las propiedades de flujo y el comportamiento viscoelástico dinámico. Una mezcla interesante desde el punto de vista práctico es aquella que involucra almidón y carragenina. Tecante y Doublier (1999) realizaron un estudio reológico estacionario y dinámico de mezclas de almidón de maíz ceroso entrecruzado con  $\kappa$ -carragenina

concluyendo que el modelo bifásico propuesto para dispersiones y geles de almidón se puede aplicar en este tipo de mezclas. Este estudio utilizó almidón de maíz ceroso entrecruzado para proveer un sistema exento de amilosa así como de gránulos de almidón lo suficientemente rígidos para generar una suspensión de partículas hinchadas en un medio continuo.

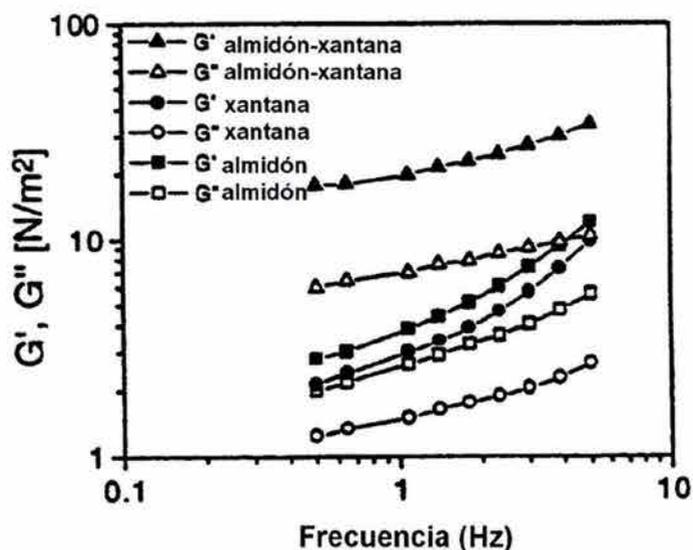
Las propiedades de flujo de las mezclas no presentaron ningún efecto sinérgico presumiblemente debido a la baja capacidad espesante que tiene la carragenina y a la ausencia de amilosa en el medio continuo. De igual forma la presencia de carragenina, sin iones en el medio, en las dispersiones gelatinizadas de almidón generó una disminución de los módulos dinámicos en comparación con almidón solo a la misma concentración, lo cual se atribuyó a la no-gelificación de la carragenina. No obstante, se observó un comportamiento diferente cuando se adicionó KCl a las mezclas, los módulos dinámicos de los sistemas almidón-carragenina fueron mayores a almidón solo y el comportamiento viscoelástico fue el característico de un gel, cuyos módulos dinámicos se incrementaron con la concentración de almidón.

Un aspecto importante que se señala en el trabajo de Tecante y Doublier (1999), es la falta de aplicación del esquema propuesto por Alloncle *et al.*, (1989) a las mezclas estudiadas. De acuerdo con ese esquema, la concentración de carragenina se incrementaría en la fase continua como resultado de la reducción de volumen disponible al hincharse el gránulo de almidón. Sin embargo de acuerdo con los datos de hinchamiento, de fracción volumen de gránulos hinchados y la estimación de la concentración de hidrocoloide en el medio continuo (ecuación 2.5-2), el incremento de carragenina en la fase continua sería tal que no requeriría iones para inducir su gelificación, lo cual no se detectó en las propiedades de flujo ni en los espectros mecánicos de esos sistemas.

Si bien existen muchos trabajos donde se han caracterizado reológicamente los sistemas almidón-hidrocoloide, existen muchos aspectos por esclarecer, uno de estos es el papel que tiene el hidrocoloide en el hinchamiento del gránulo de almidón. Como se ha mencionado

anteriormente, los trabajos de algunos investigadores (Alloncle y Doublier 1991; Tecante y Doublier 1999) han supuesto que el hidrocoloide no influye en el proceso de hinchamiento del gránulo durante el cocimiento de las pastas de almidón, sin embargo, se han reportado estudios que afirman lo contrario.

Conde-Petit *et al.*, (1997) estudiaron las propiedades reológicas dinámicas y estacionarias de las mezclas de almidón de papa (2% m/m) con xantana (0.2% m/m). Los estudios reológicos se contrastaron con las determinaciones de capacidad de fijación de yodo (IBC, por sus siglas en inglés) para estimar la cantidad de amilosa extraída del gránulo en cada caso. La viscosidad de las mezclas fue del mismo orden de magnitud que la viscosidad de las soluciones de xantana y menor que la viscosidad de las suspensiones de almidón de papa, por lo que no se reportó sinergismo en estas mezclas. Las propiedades viscoelásticas de los sistemas monocomponentes, xantana y almidón, y la mezcla almidón-xantana usando leche como medio de dispersión se muestra en la Figura 2.6-4. Como se puede observar en la figura anterior, los módulos dinámicos de la mezcla almidón-xantana fueron mayores y menos dependientes de la frecuencia que aquellos de los componentes por separado. Por otra parte, la IBC de la pasta de almidón fue 3.5% y ésta se redujo a 1.7% cuando el almidón se gelatinizó en presencia de xantana. Los autores concluyen que las propiedades viscoelásticas de almidón de papa gelatinizado en presencia de xantana, se incrementan debido a la acumulación de xantana en el espacio intergranular y dicho efecto es más pronunciado cuando los gránulos de almidón no están completamente desintegrados. Por otra parte de acuerdo con sus determinaciones de IBC, los autores afirman la existencia de un efecto de protección que ejerce xantana en los gránulos, esto conlleva a un bajo grado de hinchamiento del gránulo y por consiguiente a poca amilosa disuelta en el medio continuo.



**Figura 2.6-4.** Módulos dinámicos,  $G'$  y  $G''$ , de almidón de papa (2% m/m), xantana (0.2% m/m) y almidón-xantana (2% - 0.2%) en función de la frecuencia de oscilación. Muestras preparadas en leche a 95 °C a 110 rpm (Conde-Petit *et al.*, 1997).

Un estudio reciente (Krüger *et al.*, 2003) ha mostrado que la gelatinización de almidón de maíz (10%) en presencia de hidrocoloide (1% de xantana, guar o alginato) y 15% de sacarosa, resultó en menores coeficientes de velocidad de calentamiento ( $J$ ), en comparación con almidón solo y con las pastas almidón-sacarosa; mientras que los módulos dinámicos mostraron el efecto contrario. El Cuadro 2.6-1 muestra los valores de  $J$ ,  $G'$ ,  $G''$ ,  $G^*$  y el diámetro límite del gránulo hinchado, este último dato fue obtenido por análisis de imágenes de microfotografías digitalizadas (Image Pro Plus software, media Cybernetics, USA). Krüger *et al.*, reportaron que el hinchamiento del gránulo de almidón en presencia de hidrocoloides y sacarosa se restringe debido a la disminución en la penetración de calor y a la baja movilidad de las moléculas de agua al incrementarse la viscosidad del medio continuo (sacarosa + hidrocoloide). Sin embargo estos autores no reportan valores de viscosidad del medio continuo, ni tampoco muestran el efecto del hidrocoloide en el hinchamiento del gránulo en ausencia de sacarosa. Por lo tanto, el efecto separado del hidrocoloide sobre el hinchamiento del gránulo de almidón no puede determinarse de manera clara.

**Cuadro 2.6-1.** Coeficiente de velocidad de calentamiento (J), módulos dinámicos ( $G^*$ ,  $G'$ ,  $G''$ ) y diámetro límite del gránulo para diferentes sistemas conteniendo almidón de maíz (Krüger *et al.*, 2003).

Sistema	J ( $\text{min}^{-1}$ )	$G^*$ (Pa)	$G'$ (Pa)	$G''$ (Pa)	$D_L$ ( $\mu\text{m}$ )
Almidón	0.51 (0.06)	690 (6)	662 (10)	170 (8)	31.7 (1.0)
Almidón-sacarosa	0.44 (0.05)	986 (11)	945 (15)	279 (13)	25.7 (0.5)
Almidón- sacarosa -alginato	0.27 (0.02)	1905 (10)	1861 (9)	410 (10)	26.0 (0.7)
Almidón- sacarosa -xantana	0.23 (0.03)	2242 (31)	2159 (41)	592 (35)	23.9 (1.0)
Almidón- sacarosa -guar	0.15 (0.01)	2837 (21)	2795 (29)	473 (47)	17.4 (0.6)

J=UA/ $\rho$ CpV (U: Coeficiente global de transferencia de calor, A: área de transferencia de calor,

$\rho$ : densidad, Cp: calor específico, V: volumen de la pasta)

Errores estándar entre paréntesis.

$G^*$ ,  $G'$ ,  $G''$  a 84.5 °C,  $\omega = 1\text{Hz}$

$D_L$  después de 20 minutos a 90 °C.

## 2.7 Conclusiones de la revisión bibliográfica

### *Gelana*

El carácter polielectrolito del polisacárido gelana le concede propiedades de interés que es preciso conocer previo a su utilización. Los estudios fisicoquímicos han mostrado que la gelana es una molécula que presenta en solución dos conformaciones: desordenada (cadena aleatoria) y ordenada (doble hélice), las cuales dependen de la concentración de polímero, de la temperatura y fuerza iónica del medio, y de la naturaleza química de los cationes. Por otra parte se ha sugerido un mecanismo de gelificación en dos etapas, el cual hasta la fecha es bien aceptado:

- a) Transición conformacional: 2 cadenas  $\rightleftharpoons$  doble hélice
- b) Asociación de hélices rígidas

Los estudios realizados en el estado sólido y en solución permitieron diferenciar la efectividad que tienen los cationes divalentes en relación con los monovalentes para neutralizar la carga del polianión (gelana) y permitir la asociación lateral. Por lo que actualmente se acepta que los cationes divalentes son más efectivos para inducir la

gelificación de gelana debido a que promueven una interacción catión-polianión más fuerte e incluso termoestable.

En relación con las propiedades reológicas, los estudios han mostrado que la combinación de gelana con polisacáridos o proteínas ofrece ventajas que pueden ser aprovechadas en la manufactura de alimentos, generando una gama más amplia de texturas. Sin embargo es necesario contar con estudios reológicos fundamentales que contribuyan al conocimiento de las propiedades mecánicas de los geles de gelana, sola o en mezclas, y de los factores que influyen dicho comportamiento, lo cual tendría como ventaja el optimizar el uso de hidrocoloides en la industria de alimentos, ya que frecuentemente los utiliza indiscriminadamente. Actualmente se dispone de las herramientas necesarias para realizar estudios básicos y fundamentales que describan las propiedades reológicas, tanto de los geles de gelana como de las mezclas con biopolímeros, en términos de funciones materiales. Sin embargo, es lamentable que todavía se utilicen parámetros pobremente definidos para caracterizar “la consistencia”, “la fuerza de gel”, “la resistencia al corte”, “la firmeza”, entre otros, a través de pruebas empíricas y semiempíricas. Si bien estas determinaciones resultan útiles en control de calidad de rutina, no contribuyen al conocimiento de las propiedades reológicas de las soluciones o geles de gelana.

A pesar del número reducido de estudios de microscopía en sistemas de gelana, se han hecho esfuerzos importantes para observar el tipo de asociación en los geles y en las mezclas con biopolímeros, pero en la mayoría de los casos las imágenes presentan poca resolución. Los estudios realizados por Gunning *et al.*, (1996) mostraron redes tridimensionales homogéneas de gelana a muy bajas concentraciones de ésta (3 a 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), lo cual denota la capacidad estructurante de gelana. Por otra parte, las microfotografías de transmisión electrónica de gelana sola (Clark *et al.*, 1999; Amici *et al.*, 2001) mostraron una estructura fibrosa muy compacta, lo cual puede ser indicativo de que las concentraciones usadas fueron elevadas. En relación con el tipo de asociación presumiblemente existente en las mezclas a base de gelana, la literatura parece coincidir en la formación de redes interpenetradas, paradójicamente a lo reportado por algunos autores

en relación con la dificultad para la formación de este tipo de sistemas (Picullel *et al.*, 1995; Amici *et al.*, 2001), y a la incompatibilidad termodinámica especulada en algunos sistemas mixtos a base de gelana (Papageorgiou *et al.*, 1994; Nishinari *et al.*, 1996; Rodríguez-Hernández, 1999).

### *Almidón*

La literatura científica del almidón es bastante amplia, es quizá el polisacárido estudiado con mayor profundidad, sobre todo en aspectos relacionados con su estructura y propiedades fisicoquímicas. El proceso de gelatinización y las propiedades de las pastas de almidón han sido motivo de estudio desde épocas remotas debido a que dichas propiedades inciden directamente en la funcionalidad de los almidones. Sin embargo, la naturaleza de los cambios generados durante la gelatinización y cocción de almidones así como el efecto de factores intrínsecos (peso molecular, estructura) y extrínsecos (condiciones de preparación, naturaleza del medio, temperatura, concentración) requieren de mayores estudios que conlleven al entendimiento del efecto de los distintos factores en el proceso de gelatinización y en las propiedades resultantes en las pastas de almidón.

La bibliografía referente a pastas de almidón ha mostrado evidencias concretas de que los patrones de hinchamiento y solubilidad están fuertemente influenciadas por la composición del gránulo (almidones cerosos, normales y altos en amilosa) y por sus características de rigidez (almidones modificados y nativos). Para el caso concreto de almidones de maíz, los estudios han mostrado que la presencia de amilosa en el interior del gránulo le proporciona a éste rigidez y restringe su hinchamiento, esto explica los valores menores de hinchamiento y solubilidad de los almidones nativos normales comparados con las variedades cerosas (básicamente compuestos por amilopectina). Por otra parte, la alta capacidad de hinchamiento que tienen los almidones cerosos nativos le confiere mayor fragilidad durante el cocimiento de la pasta, promoviendo el rompimiento del gránulo a temperaturas relativamente bajas (< 80 °C). Esta fragilidad limita su aplicación en procesos industriales en donde se utilizan condiciones más drásticas de

calentamiento-cizallamiento, y en el aspecto científico dificulta el estudio de sus propiedades debido a la complejidad de la estructura de la pasta, entre otros aspectos, el modelo bifásico propuesto para describir una pasta de almidón carece de validez cuando se trabaja con almidones cerosos nativos debido a las poblaciones no definidas de gránulos en diferentes extensiones de hinchamiento, la presencia de remanentes de éstos y mayor cantidad de amilopectina en solución.

Los almidones, solos o en mezclas almidón-hidrocoloide, han sido ampliamente utilizados en la industria de alimentos debido a su capacidad para impartir una gama más amplia de texturas así como mejoras en el procesamiento y almacenamiento. Como es obvio, el uso de tales sistemas se ha realizado de manera empírica y el efecto de los factores que intervienen en sus propiedades físicas, principalmente lo referente a sus propiedades reológicas, no ha sido esclarecido. Parece evidente que las condiciones de preparación de las pastas y geles de almidón son las variables que inciden directamente en su comportamiento reológico, los trabajos reportados hasta ahora muestran que dependiendo del tratamiento térmico y del esfuerzo mecánico en el sistema, se generan diferentes tipos de sistemas que van desde el bifásico, innumerablemente citado en la literatura donde la fracción volumen de los gránulos es el factor clave, hasta soluciones macromoleculares donde las condiciones de preparación han sido lo suficientemente drásticas para eliminar la estructura granular. Entre estos extremos se ubican una infinidad de sistemas donde existen poblaciones más o menos numerosas de gránulos hinchados, gránulos fragmentados y material polimérico disuelto.

Por otra parte, existen fuertes discrepancias en la literatura en relación con la influencia de hidrocoloides en el hinchamiento y solución del almidón durante su gelatinización. Se ha reiterado que el factor determinante en las propiedades reológicas de sistemas a base de almidón es la estructura granular, por lo que el tamaño de los gránulos, la desintegración de éstos, el grado de hinchamiento, su rigidez y la fracción volumen que ocupen dentro de la mezcla son los principales factores estudiados hasta ahora. Sin embargo a pesar de que la literatura es vasta en relación con la reología de almidón, es indispensable profundizar

en su estudio de manera sistemática donde la reología se auxilie de otras técnicas para lograr dilucidar el efecto de cada una de las principales variables que inciden en la reología de geles y pastas de almidón, así como sus mezclas con hidrocoloides. La revisión bibliográfica ha permitido detectar que los principales aspectos que influyen de manera directa en la reología de sistemas a base de almidón son los siguientes:

#### FASE DISPERSA (Gránulos de almidón)

- ✓ Fracción volumen de gránulos hinchados o regímenes de concentración de almidón
- ✓ Grado de desintegración de los gránulos
- ✓ Rigidez del gránulo y deformabilidad

#### FASE CONTINUA

- ✓ Cantidad de amilosa/amilopectina liberada del gránulo durante la preparación de las pastas o geles a base de almidón.
- ✓ Regímenes de concentración y propiedades viscoelásticas de los hidrocoloides de la fase continua

Sin embargo existen aspectos controversiales por esclarecer como:

- ✓ Papel del hidrocoloide en el hinchamiento del gránulo durante la gelatinización del almidón
- ✓ Incompatibilidad de las macromoléculas del medio continuo
- ✓ Existencia o no de efectos de adhesión entre gránulos
- ✓ Forma de asociación de las macromoléculas del medio continuo, y
- ✓ Relaciones estructura-propiedades de las mezclas almidón-hidrocoloide.

Asimismo, es posible establecer que la mayoría de las investigaciones en sistemas almidón-hidrocoloide se han centrado en mezclas con hidrocoloides espesantes (goma guar, goma de algarrobo, carboximetilcelulosa) o débilmente gelificantes (xantana, iota-carragenina), existen pocos estudios que involucren hidrocoloides gelificantes, más aún, el efecto de estos agentes gelificantes no ha tomado la importancia requerida, ya que los pocos trabajos reportados hasta ahora han considerado una sola concentración de hidrocoloide o un intervalo muy pequeño de éstas, pudiendo no ser las adecuadas para

observar la contribución de los dos componentes, almidón e hidrocoloide, en la reología global de la mezcla. Otro aspecto poco atendido es la microestructura de estos sistemas, a pesar de que la microscopía óptica de pastas de almidón generó un gran número de trabajos en décadas pasadas, no ha sucedido lo mismo con las nuevas técnicas de microscopía (fuerza atómica y confocal láser).

# HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

## 3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### 3.1 HIPÓTESIS

La revisión bibliográfica ha mostrado la complejidad reológica que manifiestan las pastas y geles de almidón, así como la capacidad que tiene la gelana para formar geles con importantes propiedades elásticas. Por lo tanto la hipótesis planteada en el presente trabajo fue:

“La reología de las mezclas formadas por almidón de maíz ceroso nativo (99% amilopectina) y gelana estará fuertemente influenciada por la fracción volumen de gránulos hinchados de almidón y por la concentración de gelana en la fase continua”.

En este sentido, los gránulos hinchados dispersos incrementaran las propiedades viscoelásticas del sistema global en virtud de su grado de hinchamiento y de la fracción volumen que ocupen. Por otra parte, gelana dominará la reología global del sistema a medida que la concentración de este polisacárido se incremente, generando incluso una separación de fases originada por la incompatibilidad entre gelana y amilopectina parcialmente disuelta durante la cocción del almidón. Este efecto se verá reflejado en la disminución de las propiedades elásticas de las mezclas en comparación con gelana sola a la misma concentración.

En este estudio se usó un almidón nativo de maíz (no modificado), denominado ceroso ( $\approx$  99% amilopectina), para simplificar el sistema al excluir a la amilosa de las mezclas. Por otra parte, el uso de almidón nativo provee de gránulos con mayor capacidad de hinchamiento lo cual podría generar sistemas compuestos en donde se refleje el efecto de dicho hinchamiento en la reología global de las mezclas.

En relación con gelana, sobre la base de estudios previos (Rodríguez-Hernández, 1997) se utilizaron concentraciones menores de este hidrocóide para detectar la contribución de ambos componentes, gelana y almidón, en la reología de sus mezclas.

## 3.2 OBJETIVOS

### 3.2.1 Objetivo General

Relacionar la microestructura y el comportamiento viscoelástico de sistemas formados por un almidón libre de amilosa (almidón de maíz ceroso no modificado) y gelana, con el fin conocer la naturaleza de la organización estructural entre almidón e hidrocoloides gelificantes y explicar la respuesta macroscópica de viscoelasticidad lineal de las mezclas.

### 3.2.2 Objetivos particulares

1. Determinar las propiedades viscoelásticas lineales de sistemas acuosos de gelana y relacionarlas con la microestructura observada en microscopía confocal de barrido láser con el propósito de conocer la organización estructural de las redes de gelana y explicar la reología de estos sistemas en términos de su microestructura.
2. Determinar el comportamiento viscoelástico lineal de pastas de almidón de maíz ceroso nativo ( $\approx 99\%$  amilopectina) cocidas a dos diferentes temperaturas, e interpretar la reología de las pastas en función del hinchamiento y la fracción volumen del gránulo.
3. Determinar las propiedades viscoelásticas lineales de mezclas formadas por almidón de maíz ceroso nativo y gelana, y relacionar esa información con la microestructura observada en microscopía confocal láser con el fin de conocer la naturaleza de las posibles interacciones entre los componentes.
4. Verificar la posible separación de fases entre las macromoléculas componentes de las mezclas, amilopectina y gelana, a través de microscopía confocal de barrido láser y relacionar la microestructura observada con sus propiedades viscoelásticas lineales.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 MATERIALES

#### 4.1.1 Gelana

La gelana comercial es un polisacárido aniónico que tiene en su estructura varios cationes como sodio, magnesio, calcio y potasio, predominando este último en la gelana comercial. Esta mezcla de iones en gelana disminuye su solubilidad en agua fría, debido a que el contenido de iones divalentes es suficiente para propiciar la agregación de cadenas y evitar su hidratación. Para este estudio se preparó la sal de sodio de gelana a partir de gelana desacidada comercial (Kelcogel, lote 07254A; Kelco, San Diego, USA), adaptando la técnica de intercambio iónico de Papageorgiou *et al.*, (1994). Se utilizó una columna de vidrio (longitud = 0.73 m, diámetro externo = 0.028 m) empacada con resina de intercambio catiónico, Amberlite IR 120 PLUS (Lote 123H1073, Sigma). Previo al tratamiento de la muestra, se realizaron las siguientes operaciones para preparar la resina:

- a) Conversión de la resina a la forma ácida: elución con HCl 0.1 N hasta obtener eluatos con valores de pH cercanos a 1.
- b) Enjuague: la resina fue enjuagada con agua desionizada hasta obtener eluatos neutros
- c) Conversión hacia la forma sódica: elución de la columna con NaCl 0.1 M hasta obtener nuevamente eluatos neutros.
- d) Enjuague de la resina con agua desionizada hasta eliminar el exceso de sal (eluatos libres de cloruros). La presencia de cloruros en los eluatos fue confirmada a través de la precipitación de AgCl al verter parte de éstos en una solución de AgNO<sub>3</sub> 0.1 M acidificada con HNO<sub>3</sub> hasta un pH final de 1.6 (Ayres, 1970). La formación de una solución coloidal blanca lechosa fue indicativa de la precipitación de AgCl.

Para el intercambio iónico, se suspendió gelana en agua desionizada (0.8% m/v) y las suspensiones se calentaron a 90 °C bajo agitación magnética. Las soluciones calientes de gelana

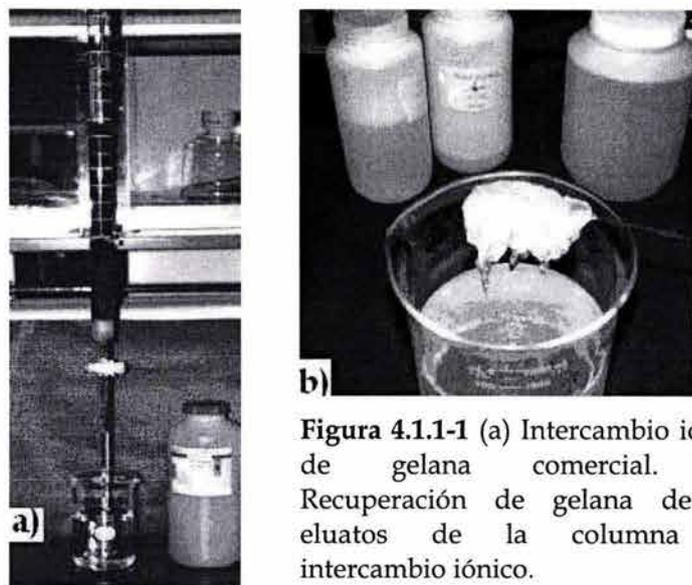
se pasaron por la columna (Figura 4.1.1-1a) utilizando flujos volumétricos de 10 mL/min a 12 mL/min. Al finalizar la elución, la columna se enjuagó con agua desionizada caliente recolectando los lavados junto con los eluatos de la muestra. La gelana se recuperó precipitándola de la solución acuosa con 2-propanol, utilizando una relación alcohol: solución de gelana de 2:1. Se obtuvo un precipitado blanco fibroso (Figura 4.1.1-1b), el cual se lavó varias veces con 2-propanol para deshidratar el polímero y posteriormente se secó bajo presión de vacío a  $27 \pm 3$  °C. La gelana seca se trituró en un homogenizador de aspas, se tamizó y se determinó la humedad en el polvo obtenido. El Cuadro 4.1.1-1 muestra el contenido iónico (absorción atómica NOM-051/1981) de la gelana obtenida.

**Cuadro 4.1.1-1.** Contenido iónico de gelana comercial y gelana sometida a intercambio iónico (gelana sódica).

	Gelana comercial (Kelcogel) meq/kg (b.s)	Gelana sódica meq/kg (b.s)
Potasio	401.49	73.86
Sodio	187.70	207.76
Magnesio	12.46	4.79
Calcio	44.77	2.70

#### 4.1.2 Almidón

En este trabajo se utilizó almidón de maíz ceroso no modificado (Waxy No. 1, Staley 7350 lote SB1N1302A; A. E. Staley USA) compuesto prácticamente por amilopectina (99%). Se escogió este tipo de almidón para simplificar la composición del sistema al eliminar la participación de la amilosa. Las características fisicoquímicas del almidón usado se muestran en el Cuadro 4.1.3-1



**Figura 4.1.1-1** (a) Intercambio iónico de gelatina comercial. (b) Recuperación de gelatina de los eluatos de la columna de intercambio iónico.

### 4.1.3 Amilopectina

La amilopectina utilizada en este estudio se obtuvo por desnaturalización de almidón de maíz ceroso nativo (Waxy No. 1, Staley 7350 lot SB1N1302A; A. E. Staley USA) en dimetilsulfóxido. Se siguió la técnica propuesta por Kalichevsky y Ring (1987) la cual consistió en disolver almidón de maíz ceroso en una mezcla dimetilsulfóxido/agua (85/15). Se desnaturalizaron 20 g de almidón en 1 L de solución de dimetilsulfóxido-agua, la disolución de los gránulos de almidón fue lenta, requirió de  $24 \pm 3$  h de agitación magnética continua a temperatura ambiente ( $20 \pm 2$  °C). Se formó una solución translúcida blanca azulosa a partir de la cual se precipitó la amilopectina con etanol utilizando una relación 2:1 (etanol : disolución de almidón). Se obtuvo un polímero blanco muy cohesivo, el cual se disolvió en agua desionizada mediante agitación magnética a temperatura ambiente para extraer el dimetilsulfóxido remanente. Después de 4 horas bajo agitación magnética, la amilopectina se precipitó nuevamente con etanol utilizando la misma relación. Este último precipitado se colocó en un desecador conectado a vacío en donde se secó a temperatura ambiente ( $20 \pm 2$  °C) durante 5 días. El residuo "seco" se trituró en un mortero y el polvo resultante se secó en un horno a 80 °C durante 3 horas. Se obtuvo un rendimiento del 92% y algunas de las características fisicoquímicas del polímero obtenido se muestran en el Cuadro 4.1.3-1.

**Cuadro 4.1.3-1** Características fisicoquímicas del almidón de maíz ceroso y la amilopectina obtenida a partir de éste.

	Almidón de maíz ceroso	Amilopectina
Humedad <sup>1</sup>	11.17% ± 0.08%	3.27% ± 0.06%
Proteína <sup>2</sup>	0.262% ± 0.01%	0.25% ± 0.02%
Cenizas <sup>3</sup>	0.12% ± 0.01%	0.10% ± 0.01%
Amilosa <sup>4</sup>	< 1.0%	-
Microscopía óptica (Temperatura ambiente)	Gránulos de forma oval de 4.8 a 6.5 µm	No se observaron gránulos
Complejo con Iodo <sup>5</sup> , λ <sub>máx</sub>	-	537 nm
Estabilidad de la dispersión acuosa	Baja, sedimentación de almidón	Alta, suspensión blanca-azulosa estable.

<sup>1</sup> Método AACC 44-15a

<sup>2</sup> Método AOAC 960.52, micro-Kjeldahl (Nx 6.25)

<sup>3</sup> Método AACC 08-17

<sup>4</sup> Proporcionado por el proveedor.

<sup>5</sup> λ<sub>máx</sub> del espectro de absorción del complejo con Iodo: λ<sub>máx</sub> = 640 nm a 650 nm para amilosa; λ<sub>máx</sub> = 540 nm a 550 nm para amilopectina (Doublie, 1981; Banks y Greenwood, 1975).

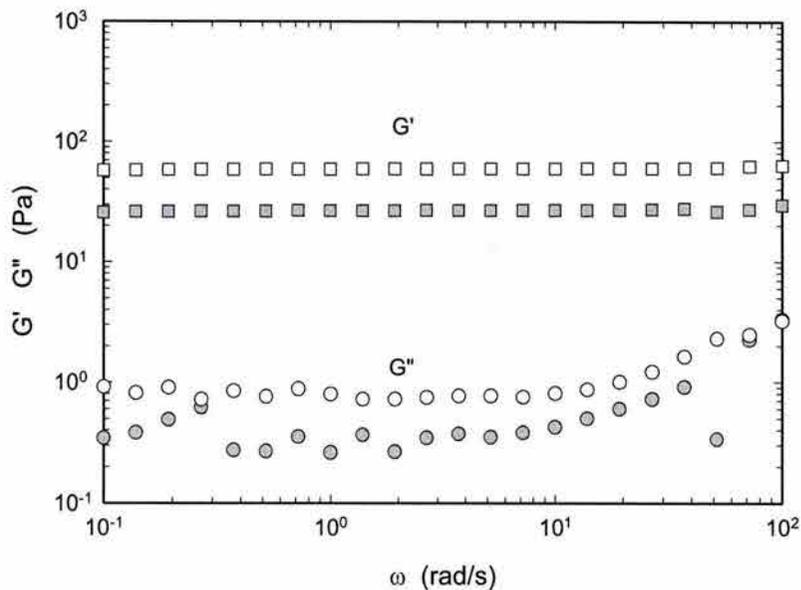
#### 4.1.4 Preparación de gelana fluorescente

La gelana sódica fue etiquetada con un fluoróforo para las observaciones de microscopía confocal láser. Fluoresceinamina (FA) fue unida covalentemente a la molécula de gelana modificando el procedimiento propuesto por De Belder y Wik (1975). El método original consiste en la unión covalente de moléculas de fluoresceinamina a moléculas de polisacárido (hialuronato) a través de enlaces amida, dando lugar a fluoróforos tiocarbonilos (color amarillo) o derivados de tiourea (naranja) dentro de la estructura polisacárida. De Belder y Wik reportaron bajos valores de sustitución (0.0013) y ligera degradación del polisacárido, de acuerdo con sus análisis de cromatografía en gel, viscosimetría y coeficientes de sedimentación y difusión.

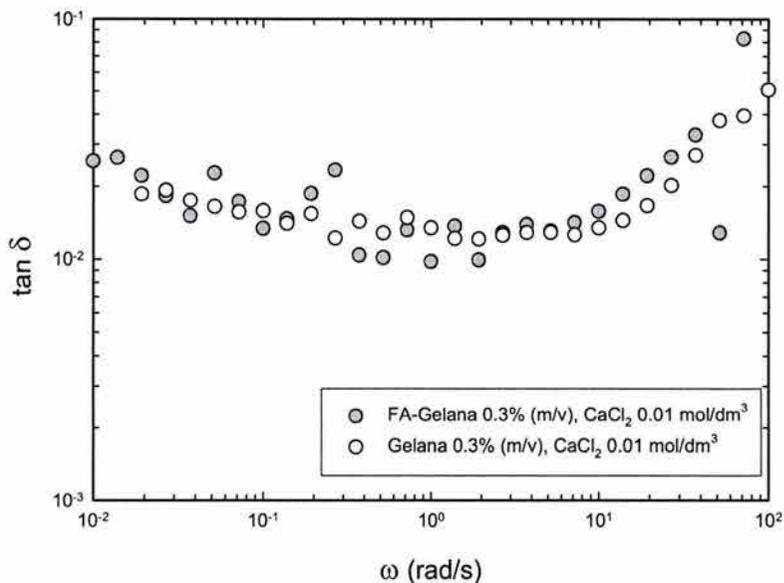
La gelana tiene sólo un grupo carboxilo en cada unidad tetrasacárida, el cual tiene un papel predominante en la gelificación y en las propiedades polielectrolíticas de la molécula, paradójicamente es muy probable que este grupo carboxilo sea el sitio de unión para el fluoróforo durante la reacción de etiquetado. Por lo tanto, aunque la optimización de la técnica de etiquetado no fue uno de los objetivos de este estudio, fue importante modificar al método

original de De Belder y Wik y determinar la relación de reactivos que no modificara las propiedades físicas ni la capacidad de agregación de las cadenas de gelana durante la gelificación, pero lograra una distribución de fluoróforo dentro de gelana lo suficientemente homogénea para que la emisión de fluorescencia en microscopía confocal láser proporcionara la información estructural que se busca en este trabajo. Esto se logró disminuyendo la cantidad de fluoresceinamina ligada a la molécula de gelana. Se realizaron varias reacciones de etiquetado, las cuales generaron modificaciones importantes en la molécula de gelana, dando lugar incluso a muestras de gelana sin capacidad de gelificar. Finalmente se obtuvo una muestra de gelana etiquetada con propiedades reológicas similares a la gelana de origen (Figura 4.1.4-1 y 4.1.4-2) utilizando alrededor del 6% del reactivo fluorescente usado en la técnica original.

La reacción de etiquetado consistió en disolver gelana (1 g) en agua desionizada (150 mL) bajo agitación magnética a temperatura ambiente, se adicionó dimetilsulfóxido (75 mL) y se continuó agitando de forma lenta. El pH de la dispersión permaneció en el intervalo de 5 a 7. Posteriormente se adicionaron 0.0281 g de fluoresceinamina, previamente dispersos en un volumen pequeño de dimetilsulfóxido, 0.0281 mL de ciclohexilisocianida y 0.0281 mL de acetaldehído. Después de 5 h a temperatura ambiente bajo agitación moderada, la mezcla reactiva fue vaciada en dos volúmenes de acetona para precipitar la gelana-FA. El precipitado obtenido se filtró en un embudo con vidrio poroso (porosidad gruesa) conectado al vacío y se lavó varias veces con acetona hasta obtener un polímero deshidratado. Posteriormente se utilizó etanol a 95°, etanol absoluto y nuevamente acetona para remover el exceso de colorante. El compuesto fibroso deshidratado obtenido se secó a 40 °C durante 16 h en horno convencional, una vez seco, se disolvió en agua y se dializó contra agua desionizada hasta no detectar color en el agua de diálisis. Finalmente la gelana-FA fue precipitada y secada siguiendo el procedimiento mencionado anteriormente. Se realizaron determinaciones de viscosidad intrínseca (Cuadro 4.2.1-1) para detectar la posible despolimerización de la molécula debido a la reacción de etiquetado.



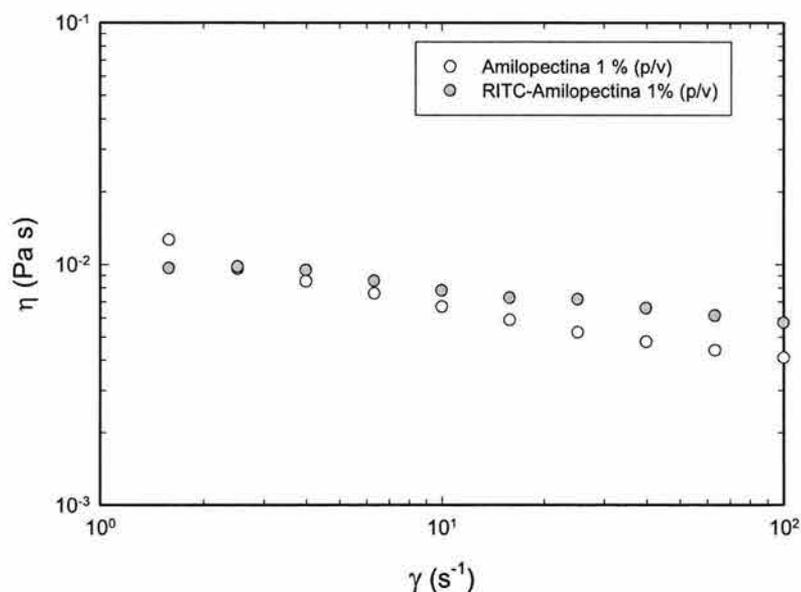
**Figura 4.1.4-1.** Dependencia del módulo de almacenamiento ( $G'$ ) y módulo de pérdida ( $G''$ ) con la frecuencia de gelana (símbolos blancos) y FA-gelana (símbolos grises) 0.3% (m/v) en presencia de  $\text{CaCl}_2$  0.01 mol/dm<sup>3</sup>. Determinaciones realizadas a 25 °C con  $\gamma = 10\%$  dentro de la zona de viscoelasticidad lineal.



**Figura 4.1.4-2.** Valores de tangente de delta de gelana (símbolos blancos) y FA-gelana (símbolos grises) 0.3% (m/v) en presencia de  $\text{CaCl}_2$  0.01 mol/dm<sup>3</sup>. Determinaciones realizadas a 25 °C con  $\gamma = 10\%$  dentro de la zona de viscoelasticidad lineal.

#### 4.1.5 Preparación de amilopectina fluorescente

Para el etiquetado fluorescente de la molécula de amilopectina se utilizó la técnica de Garnier *et al.*, (1997), la cual es una modificación de la propuesta por Belder y Granath (1973). La amilopectina (2 g) se dispersó en 40 mL de dimetilsulfóxido a temperatura ambiente utilizando agitación magnética. Se adicionaron 10 gotas de piridina, 0.15 g de isotiocianato de rodamina (RITC) y 50 mg de dibutiltindilaurato. La mezcla se calentó a 65 °C durante dos horas utilizando un baño de etilenglicol-agua, agitando suavemente la mezcla reactiva.



**Figura 4.1.5-1.** Viscosidad de soluciones de amilopectina a 25 °C. Determinaciones realizadas en geometría cono-plato, reómetro RFS II.

Después de la reacción, la mezcla se vació en etanol a 96° para precipitar el polímero, utilizando una relación etanol:mezcla reactiva igual a 2:1. El precipitado se lavó varias veces con etanol utilizando un embudo con vidrio poroso (porosidad gruesa) conectado al vacío, se utilizó etanol absoluto y acetona para lavar completamente el precipitado. El residuo deshidratado se secó en un horno convencional a 30 °C durante 16 h. El polisacárido seco se redisolvió en agua y se dializó contra agua desionizada hasta no detectar color en el agua de diálisis. Se precipitó con etanol a 96° y se lavó varias veces siguiendo el proceso anterior. Finalmente el residuo,

amilopectina-RITC, se secó nuevamente en un horno convencional a  $32 \pm 2$  °C durante el transcurso de la noche, se trituroó en un mortero y se realizaron determinaciones de cizalla estacionaria (Figura 4.1.5-1) y de viscosidad intrínseca (Cuadro 4.2.1-1) para detectar la posible despolimerización de la molécula debido a la reacción de etiquetado

## 4.2 MÉTODOS

### 4.2.1 Viscosidad intrínseca

Se realizaron determinaciones de viscosidad intrínseca para establecer posibles cambios en la estructura de los polímeros fluorescentes (gelana-FA y amilopectina-RITC) debidos a la reacción de etiquetado. Las determinaciones de cizalla estacionaria se realizaron a 25 °C en un reómetro de deformación controlada (Low shear 40, Contraves, Switzerland) en el intervalo de velocidad de corte de  $7 \text{ s}^{-1}$  a  $100 \text{ s}^{-1}$ , utilizando la geometría de cilindros concéntricos (diámetro externo = 13.008 mm, diámetro interno = 11.99 mm, altura = 18.055 mm). Se prepararon soluciones diluidas de gelana, gelana-FA, amilopectina y amilopectina-RITC utilizando como disolventes NaCl 0.01 M para el caso de gelana y agua desionizada para amilopectina. Se determinó la viscosidad del *plateau* newtoniano ( $\eta_0$ ) y partir de este valor se determinaron las viscosidades relativas, específicas y reducidas de cada dilución. El análisis de datos y los resultados se encuentran en el Anexo C y en el Cuadro 4.2.1-1. Para gelana se prepararon soluciones diluidas de gelana fluorescente y no fluorescente en el intervalo de concentraciones de 0.4 a 1.2 g/L, mientras que para amilopectina el intervalo de concentraciones utilizado fue 1 a 2 g/L.

Los valores de viscosidad intrínseca obtenidos para los polímeros fluorescentes sugieren una ligera despolimerización, principalmente en gelana, debida a la reacción durante el etiquetado. Sin embargo, con base en las propiedades reológicas mostradas en la sección previa, se consideró que la unión del cromóforo fluorescente no influye de manera importante en la microestructura de la muestra.

**Cuadro 4.2.1-1** Valores de viscosidad intrínseca de gelana y amilopectina

Polímero	$[\eta]$ dL/g
Gelana	6.37
Gelana-FA	5.56
Amilopectina	1.485
Amilopectina-RITC	1.425

#### 4.2.2 Preparación de sistemas monocomponentes

##### *Geles de gelana*

Los geles de gelana se prepararon dispersando gelana en agua desionizada utilizando agitación magnética y calentando en una parrilla desde temperatura ambiente hasta 90 °C. Para inducir la gelificación de gelana se utilizó  $\text{CaCl}_2$ , por lo que una masa de  $\text{CaCl}_2$  correspondiente a una concentración de 0.01 mol/dm<sup>3</sup> de  $\text{CaCl}_2$  en los geles, se adicionó al término del calentamiento, previamente disuelta en un volumen pequeño de agua desionizada. Se utilizaron dos intervalos de concentración de gelana: 0.005 a 0.05% (m/m) y 0.1 a 0.3% (m/m) a los que se denominaran en lo sucesivo “*concentraciones bajas de gelana*” y “*concentraciones altas de gelana*”, respectivamente. Finalizado el calentamiento, las soluciones calientes de gelana se enfriaron a 25 °C en moldes cilíndricos de plástico (diámetro interno: 20.3 mm, longitud: 80 mm a 90 mm) sellados en los extremos con tapones de caucho (concentraciones altas de gelana) o se enfriaron dentro de la geometría de medición del reómetro (concentraciones bajas de gelana).

##### *Soluciones de amilopectina*

Se prepararon soluciones acuosas de 3%, 5% y 7 % (m/m) de amilopectina, dispersando el polisacárido en agua desionizada con agitación magnética y calentando en una parrilla desde temperatura ambiente hasta 90 °C. Las soluciones calientes de amilopectina se enfriaron dentro de la geometría de medición del reómetro.

### *Pastas de almidón*

a) Se prepararon pastas de almidón (3 a 7 % m/m), en un recipiente de acero inoxidable (0.6 L) provisto de agitación mecánica (diseño propio, ver Figura 4.2.2-1). Se pesó la cantidad apropiada de almidón, considerando la humedad del polvo y se adicionó la masa correspondiente de agua desionizada evitando la formación de grumos y la sedimentación del almidón (masa total = 350 g). La suspensión obtenida se agitó a 200 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente previo al calentamiento, el cual se realizó en un baño de etilenglicol-agua. El calentamiento de las suspensiones de almidón se hizo gradualmente (1.5 °C/min) desde temperatura ambiente hasta 90 °C agitando a 75 rpm. Al llegar a la temperatura máxima de cocción (90 °C) ésta se mantuvo constante durante diez minutos (tiempo de sostenimiento) sin interrumpir la agitación. Las pastas obtenidas se enfriaron a 25 °C para las determinaciones reológicas. Para las determinaciones de hinchamiento y solubilidad se prepararon pastas de almidón (1 a 7 % m/m) siguiendo el mismo procedimiento a excepción de que la temperatura máxima de cocción fue 75 °C sin tiempo de sostenimiento.



**Figura 4.2.2-1** Preparación de pastas de almidón en tanque de acero inoxidable (0.6 L de capacidad).

b) Preparación de pastas de almidón en viscoamilógrafo Brabender.  
Para los estudios reológicos y de microscopía confocal láser donde se utilizó gelana a bajas concentraciones ( $\leq 0.05\%$ ), se prepararon pastas de almidón al 3% (m/m) en un viscoamilógrafo Brabender (Brabender® Viscograph-E Mod. 8 025). El almidón se suspendió en agua destilada

(masa total 485 g) y la lechada obtenida se calentó gradualmente hasta 90 °C o 75 °C (1.5 °C/min) agitando a 75 rpm. Para las pastas cocidas a 90 °C se utilizó un tiempo de sostenimiento de 10 minutos a esa temperatura. Una vez concluido el calentamiento, las pastas se enfriaron (1.5 °C/min) a  $62 \pm 2$  °C para las determinaciones reológicas.

#### **4.2.3 Preparación de sistemas mixtos**

##### *Mezclas gelana-almidón*

Estas mezclas fueron preparadas gelatinizando almidón en presencia de gelana. Se dispersó por separado la gelana en un tercio del volumen total del agua de la mezcla, y el almidón se suspendió en el resto del volumen. La gelana dispersa se mezcló con la lechada de almidón y se inició el tratamiento térmico de acuerdo con los procedimientos descritos anteriormente (sección 4.2.2) con la excepción de incluir al final del calentamiento, previo al tiempo de sostenimiento, CaCl<sub>2</sub> disuelto en un pequeño volumen de agua. En todos los casos la concentración de CaCl<sub>2</sub> en las mezclas fue 0.01 mol/dm<sup>3</sup>.

##### *Mezclas gelana-amilopectina*

Ambos polisacáridos se dispersaron en agua desionizada a temperatura ambiente, utilizando una parrilla con agitación magnética. Una vez dispersos, la mezcla fue calentada bajo agitación moderada a 90 °C. Al término del calentamiento, se adicionó CaCl<sub>2</sub>, disuelto en un volumen pequeño de agua desionizada para inducir la gelificación de gelana. Se prepararon mezclas con 3% y 7 % (m/m) de amilopectina y concentraciones de gelana en el intervalo 0.005 a 0.3% (m/m). En todos los casos la concentración de CaCl<sub>2</sub> en las mezclas fue 0.01 mol/dm<sup>3</sup>.

#### 4.2.4 Índices de hinchamiento y solubilidad

Los valores de solubilidad (S) e índice de hinchamiento (H) fueron obtenidos de acuerdo con la técnica propuesta por Leach *et al.*, (1959), la cual consiste en tomar alícuotas de pasta recién elaborada, diluir con agua caliente hasta una concentración de 0.5% de almidón y enfriar rápidamente para evitar el hinchamiento subsiguiente del gránulo de almidón. Mediante centrifugación se separó la fase continua y dispersa, analizándose cada una por separado para obtener los valores de S e H respectivamente. Esta técnica supone que la fase continua contiene a los componentes de almidón en solución (amilopectina), mientras que la fase dispersa está compuesta únicamente por gránulos hinchados de almidón. Mediante la técnica de fenol-sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956) se determinó la cantidad de almidón disuelto en el sobrenadante o fase continua, mientras que para la determinación del índice de H se utilizó el valor del peso seco del sedimento. El Anexo A describe la técnica utilizada.

La solubilidad (S) se define como el porcentaje de sólidos disueltos en la fase continua en función del almidón total en la dispersión, y el índice o poder de hinchamiento (H) como la cantidad de disolvente absorbido por las partículas de almidón (almidón no disuelto).

$$S = \frac{\text{almidón disuelto (g)}}{\text{almidón total (g)}} \quad (4.2.4 - 1)$$

$$H = \frac{\text{almidón hinchado (g)}}{\text{almidón no disuelto (g)}} \quad (4.2.4 - 2)$$

A partir de los índices de solubilidad e hinchamiento se calculó la fracción volumen de la fase dispersa,  $\Phi$ , considerando que sólo está compuesta por gránulos hinchados de almidón (Doublier, 1987).

$$\Phi = \left(1 - \frac{S}{100}\right)CH \quad (4.2.4 - 3)$$

Donde C es la concentración de almidón en la pasta, H y S son los índices de hinchamiento y solubilidad respectivamente.

#### 4.2.5 Microscopía óptica

Se realizaron observaciones al microscopio óptico (OLYMPUS CH130) de las pastas de almidón con la finalidad de comparar el grado de hinchamiento del gránulo de almidón a diferentes temperaturas (60, 65, 75, 90 °C). Las pastas se prepararon de acuerdo con la metodología descrita (sección 4.2.2). Se utilizaron pastas en el intervalo de concentración de 2 a 4 %. Durante el proceso de calentamiento se tomaron alícuotas de 5 mL en cada temperatura evaluada. Los 5 mL de la pasta se diluyeron con 5 mL de agua destilada a 60 °C, el contenido del tubo se agitó y la dilución se colocó en un baño a temperatura ambiente para evitar el hinchamiento subsiguiente del gránulo. De cada dilución se tomó 1 mL y se vació a tubos conteniendo 9 mL de agua destilada (dilución 1/10). Se colocó una gota de la dilución en un portaobjeto, se añadió una gota de lugol y observó al microscopio. En cada observación no pasaron más de 10 minutos entre la obtención de la muestra y la observación al microscopio.

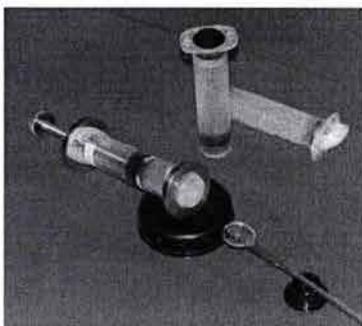
#### 4.2.6 Determinaciones reológicas

Se realizaron pruebas reológicas dinámicas utilizando dos reómetros de deformación controlada, a) Haake Rotovisco RV 20 CV 20N en aquellos sistemas donde la concentración de gelana fue mayor a 0.05%, y b) Rheometrics Fluid Spectrometer (RFS II) para el resto de los sistemas. El fundamento del flujo de cizalla de pequeña amplitud se describe en el Anexo D.

##### a) Haake Rotovisco RV 20 CV 20N

Se realizaron determinaciones de cizalla oscilatoria de pequeña amplitud a 25 °C utilizando geometría de placas paralelas (diámetro = 19.25 mm.,  $\Delta h = 3$  mm). El corte de la muestra (discos de 3 mm de espesor) se realizó con un dispositivo mecánico de diseño propio, utilizado en trabajos previos (Rodríguez-Hernández, 1997) que permite desmoldar el gel sin romper la estructura (Figura 4.2.6-1). Para evitar el deslizamiento de los geles en las placas de la geometría de medición durante el cizallamiento, éstas se cubrieron con arena fina (malla 100). Previo a la obtención de los módulos dinámicos ( $G'$  y  $G''$ ) en función de la frecuencia, se determinó la zona

de viscoelasticidad lineal a través de un barrido de deformación a una frecuencia de oscilación constante de 1 rad/s. El Anexo B muestra la zona de viscoelasticidad lineal observada en cada sistema y la geometría utilizada. Las determinaciones se realizaron en el intervalo de frecuencias de  $0.1 \text{ s}^{-1}$  a  $10 \text{ s}^{-1}$  dentro de la zona de viscoelasticidad lineal.



**Figura 4.2.6-1** Corte de geles en discos previo al análisis reométrico

#### **b) Rheometrics Fluid Spectrometer RFS II**

Se llevaron a cabo pruebas de cizalla oscilatoria de pequeña amplitud utilizando la geometría de cilindros concéntricos (diámetro interno: 32 mm; diámetro externo: 34 mm, longitud de inmersión: 33 mm). Las muestras calientes recién preparadas se vaciaron en la geometría del equipo, previamente calentada ( $62 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Éstas se enfriaron a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  bajo cizallamiento a frecuencia constante (1 rad/s) para obtener la evolución de los módulos dinámicos con la temperatura. Cuando la temperatura alcanzó  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  se realizó un barrido de tiempo a 1 rad/s para determinar los valores de equilibrio de los módulos. Posteriormente se obtuvieron los valores de los módulos dinámicos en función de la frecuencia en el intervalo de  $10^{-2} \text{ rad/s}$  a  $10^2 \text{ rad/s}$  y se realizó un barrido de deformación a 1 rad/s para verificar que las determinaciones hechas se ubicaran dentro de la región de viscoelasticidad lineal; cuando esto no se cumplió, las determinaciones anteriores se invalidaron y se repitió toda la rutina cambiando el valor de la deformación. Todas las muestras se cubrieron con una capa fina de aceite de parafina para evitar la deshidratación durante las determinaciones. Los barridos de frecuencia y deformación se realizaron a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ .

#### 4.2.7 Calorimetría diferencial de barrido

Se realizaron estudios de calorimetría diferencial de barrido en gelana comercial y en gelana sódica en un microcalorímetro SETARAM DSC III. Muestras recién preparadas de gelana al 1% (m/m) con  $0.01 \text{ mol/dm}^3$  de  $\text{CaCl}_2$  se pesaron (830 mg) y se sellaron herméticamente dentro de las cápsulas portamuestras del equipo. Una masa igual ( $\pm 20 \text{ mg}$ ) de  $0.01 \text{ mol/dm}^3$  de  $\text{CaCl}_2$ , fue utilizada como referencia. Las muestras fueron sometidas a la siguiente rutina: calentamiento de  $10$  a  $120 \text{ }^\circ\text{C}$  a  $0.5 \text{ }^\circ\text{C/min}$ , seguido de un descenso de  $120$  a  $10 \text{ }^\circ\text{C}$  a la misma velocidad, un período de estabilización a  $10 \text{ }^\circ\text{C}$  (15 minutos) para proseguir con un segundo ciclo calentamiento-enfriamiento utilizando las mismas condiciones. Previo al análisis calorimétrico de las muestras, se determinó la línea base utilizando el disolvente, solución de  $\text{CaCl}_2$   $0.01 \text{ mol/dm}^3$ , y la misma rutina de calentamiento-enfriamiento utilizada en las muestras a excepción de la velocidad que fue  $0.3 \text{ }^\circ\text{C/min}$ , tanto en el calentamiento como en el enfriamiento.

#### 4.2.8 Microscopía confocal de barrido láser

La microestructura de geles de gelana, de las mezclas almidón-gelana y amilopectina-gelana fue estudiada en microscopía confocal de barrido láser (MCBL) utilizando gelana y amilopectina previamente etiquetadas con los fluoróforos fluoresceinamina (FA) e isotiocianato de rodamina (RITC), respectivamente (sección 4.1.4 y 4.1.5). Recientemente, esta técnica ha sido utilizada para analizar la microestructura de sistemas biológicos debido a que la imagen generada no depende de la luz transmitida a través del grosor del espécimen, por lo tanto no se requiere seccionar la muestra, que frecuentemente se traduce en mayores tiempos de preparación y posibilidad de daños en la estructura (Brooker, 1995). MCBL sólo necesita la presencia de un fluoróforo ligado a la molécula en cuestión y la distribución espacial de ésta se detecta a través de la fluorescencia emitida al ser excitada la molécula por un haz de luz láser. La muestra no requiere ser congelada, secada o prensada como en otras técnicas de microscopía, por lo que se pueden obtener imágenes de la microestructura del sistema dentro de su ambiente sin daño estructural.

El equipo de microscopía utiliza un haz de luz láser que se enfoca en una capa interna del material, la información de ese plano focal iluminado regresa y se proyecta a una apertura confocal frente a un detector (Anexo E), de esta forma la información procedente del resto de la muestra no interfiere en la información estructural del plano focal iluminado (Bourriot *et al.*, 1999). La MCBL permite fijar planos focales  $xy$  a diferentes valores de  $z$ , de tal forma que se pueden generar imágenes a distintos espesores de la muestra y la sobreposición de imágenes consecutivas en la misma ubicación  $xy$  pero a distintos valores de  $z$  produce imágenes tridimensionales. En este trabajo, se tomó como  $z = 0$  la superficie del portaobjetos y las observaciones se hicieron en  $z = 25 \mu\text{m}$ . Sólo en algunos casos donde fue importante conocer la microestructura del sistema a lo largo de cierto espesor, se realizó un barrido tomando secciones de  $1 \mu\text{m}$  de espesor cada una, y la información obtenida en cada sección o plano  $xy$  se sobrepuso generando una imagen tridimensional.

La MCBL fue realizada en un microscopio Carl Zeiss LSM 410 Axiovert utilizando el modo de fluorescencia con un objetivo de inmersión en agua (40x). La preparación de las muestras se realizó de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente. Las muestras calientes, recién preparadas, fueron colocadas en un portaobjetos precalentado, se cubrieron con un cubreobjetos y se sellaron con barniz de uñas para evitar su deshidratación. En las mezclas amilopectina-gelana se utilizó el doble etiquetado mientras que en las mezclas almidón-gelana y gelana sola, únicamente la gelana estuvo marcada fluorescentemente. Todas las observaciones al microscopio se realizaron a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Se utilizó un haz de luz láser a una longitud de onda de  $488 \text{ nm}$  para excitar la fluoresceinamina ligada a la molécula de gelana y la emisión fluorescente fue examinada entre  $510$  y  $565 \text{ nm}$ . Para excitar el isotiocianato de rodamina ligado a la molécula de amilopectina, se utilizó un haz de luz láser de  $543 \text{ nm}$  de longitud de onda, obteniendo la emisión de fluorescencia entre  $570$  y  $640 \text{ nm}$ . En el caso de las mezclas gelana-amilopectina, la superposición de imágenes obtenidas a diferentes longitudes de onda permitió observar la localización exacta de ambos polímeros en la mezcla.

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## 5.1 GELANA

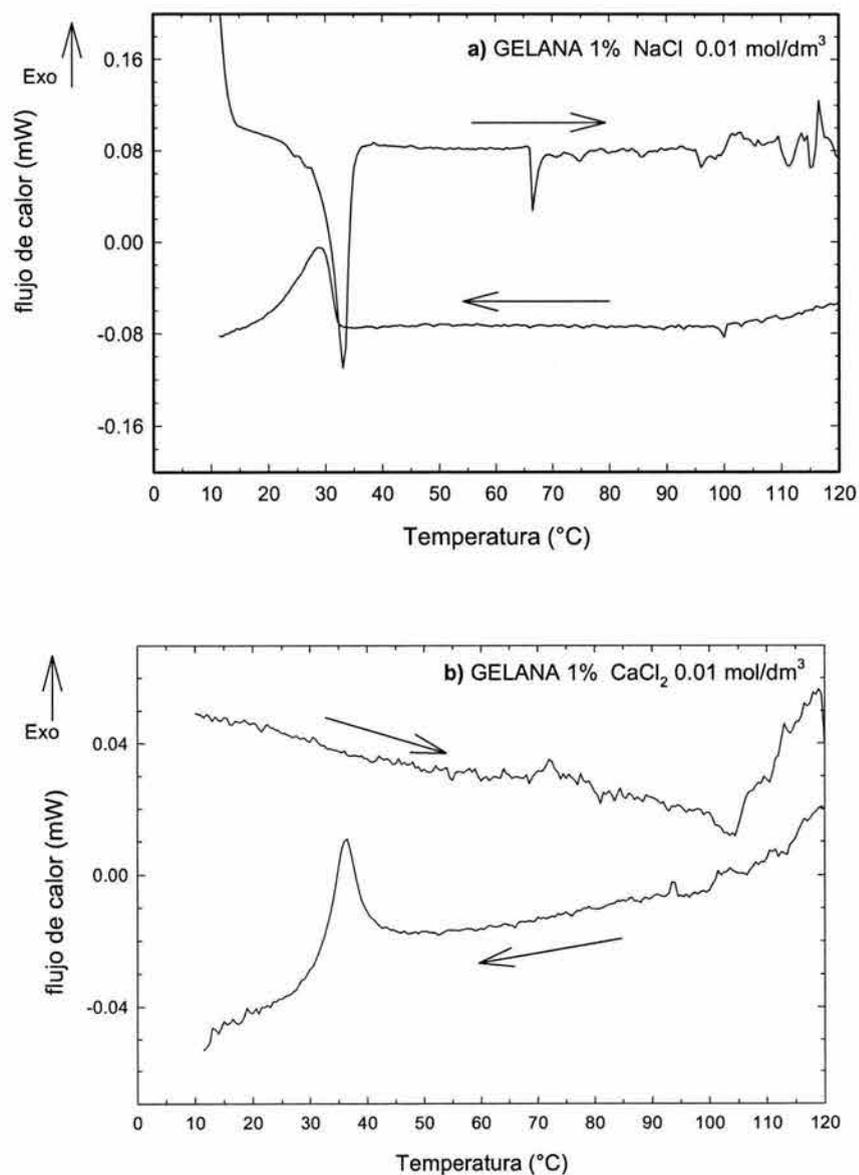
### 5.1.1 Calorimetría diferencial de barrido

Se realizaron estudios de calorimetría diferencial de barrido en dispersiones de gelana para verificar la temperatura de transición conformacional: *cadena-hélice* bajo las condiciones de fuerza iónica usadas en los estudios reológicos. Debido a su naturaleza polielectrolítica, la conformación ordenada (hélice) muestra selectividad iónica, por lo que la fuerza iónica del medio y la naturaleza del contraión son fundamentales para la transición conformacional y para la formación de geles de gelana. La Figura 5.1.1-1 muestra los termogramas de gelana obtenidos durante el segundo ciclo calentamiento-enfriamiento (sección 4.2.7), como se puede observar en dicha figura el comportamiento térmico de gelana 1% (m/m) es dependiente del tipo de contraión.

En presencia de sodio, durante el enfriamiento (termograma inferior de la Figura 5.1.1-1a) se generó un pico exotérmico relativamente ancho con histéresis entre el primer y segundo ciclo calentamiento-enfriamiento (Cuadro 5.1.1-1), mientras que en el calentamiento se obtuvo un pico endotérmico estrecho y con histéresis ligera (33.4 °C y 31 °C) en los dos ciclos de calentamiento-enfriamiento usados, lo cual denota cooperatividad en la transición conformacional *hélice-cadena*. Durante el proceso de calentamiento (termograma superior de la Figura 5.1.1-1a) también se detectó un pico menor a 66 °C, observado también en otros estudios y atribuido a la formación de agregados de dobles hélices (Mazen *et al.*, 2000). Las temperaturas de transición ( $T_m$ ) y las entalpías de conformación ( $\Delta H_m$ ) se muestran también en el Cuadro 5.1.1-1.

En presencia de calcio el comportamiento térmico fue diferente, el calcio generó una transición conformacional *cadena-hélice*, a mayor temperatura (36-36.5 °C) con un cambio entálpico menor y sin histéresis entre los ciclos de enfriamiento. Por otra parte, en el primer ciclo de calentamiento no se detectó pico alguno, pero durante el segundo ciclo se detectó un pico muy

ancho a 107.7 °C, lo cual confirma la estabilidad térmica de las hélices de gelana cuando un contraión divalente se encuentra en el medio y la importancia de la historia térmica de la muestra.



**Figura 5.1.1-1** Termogramas de dispersiones de gelana 1% en a) 0.01 mol/dm<sup>3</sup> de NaCl , b) 0.01 mol/dm<sup>3</sup> de CaCl<sub>2</sub>. Calentamiento (termogramas superiores) y enfriamiento (termogramas inferiores) realizados a 0.5 °C/min.

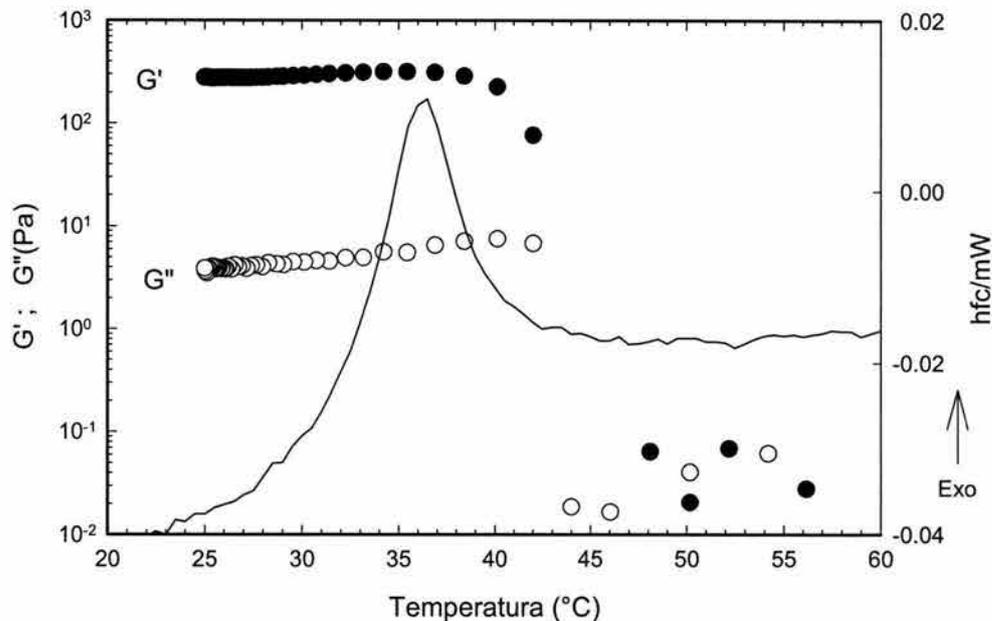
**Cuadro 5.1.1-1** Datos experimentales de calorimetría diferencial de barrido de gelana 1% (m/m) en presencia de  $\text{CaCl}_2$  0.01 mol/dm<sup>3</sup> y NaCl 0.01 mol/dm<sup>3</sup>.

Sal (mol/ dm <sup>3</sup> )	Ciclo térmico	corrida	T <sub>m</sub> (°C)	ΔH <sub>m</sub> (J/g)
CaCl <sub>2</sub> 0.01	Calentamiento	1	- <sup>a</sup> -	- <sup>a</sup> -
		2	107.74	10.38
	Enfriamiento	1	36.54	-3.39
		2	36.06	-2.3
NaCl 0.01	Calentamiento	1	33.43	10.92
		2	31.09	6.84
	Enfriamiento	1	29.47	-7.3
		2	25.60	-3.8

<sup>a</sup> No se detectó ningún pico

La Figura 5.1.1-2 compara la evolución de los módulos dinámicos con el comportamiento térmico de gelana durante el proceso de enfriamiento. Desafortunadamente, las concentraciones de gelana usadas en calorimetría y reometría no coinciden (1% y 0.05% respectivamente) debido a la ausencia de señales nítidas en calorimetría diferencial de barrido con concentraciones de gelana inferiores a 1%. Es importante mencionar que la evolución de los módulos dinámicos con la temperatura fue básicamente la misma en el intervalo de concentración de gelana de 0.005 a 0.05%, por lo tanto, se consideró válido contrastar el comportamiento térmico con la evolución de los módulos dinámicos a pesar de divergir en el valor de la concentración de gelana.

Como se puede observar en el termograma de la Figura 5.1.1-2, el inicio del cambio entálpico de la transición cadena-hélice ocurrió a  $\approx 41$  °C y el flujo máximo de calor se detectó a 36.5 °C. Por otra parte, a temperaturas mayores a 43 °C, los módulos dinámicos fueron muy pequeños, difícilmente detectables por el sensor de torque del reómetro. Sin embargo, cuando la temperatura llegó a 42 °C ambos módulos se incrementaron rápidamente. Esta temperatura coincide con el inicio de la transición cadena-hélice detectada por calorimetría diferencial de barrido. Comparando el pico exotérmico del termograma con los valores de los módulos dinámicos, se puede observar que aproximadamente a la temperatura del pico ( $\approx 36$  °C),  $G'$  alcanza su equilibrio. A temperaturas inferiores a esta transición se tiene un sistema en el estado ordenado, hélices rígidas, tal como se advierte tanto en calorimetría como en el comportamiento de los módulos con la temperatura.



**Figura 5.1.1-2** Termograma (enfriamiento, 0.5 °C/min) de gelana 1% en 0.01 mol/dm<sup>3</sup> de CaCl<sub>2</sub>, y evolución de los módulos dinámicos, G' y G'', con la temperatura de gelana 0.05% en 0.01 mol/dm<sup>3</sup> de CaCl<sub>2</sub>,  $\omega = 1\text{rad/s}$ ,  $\gamma = 2\%$ .

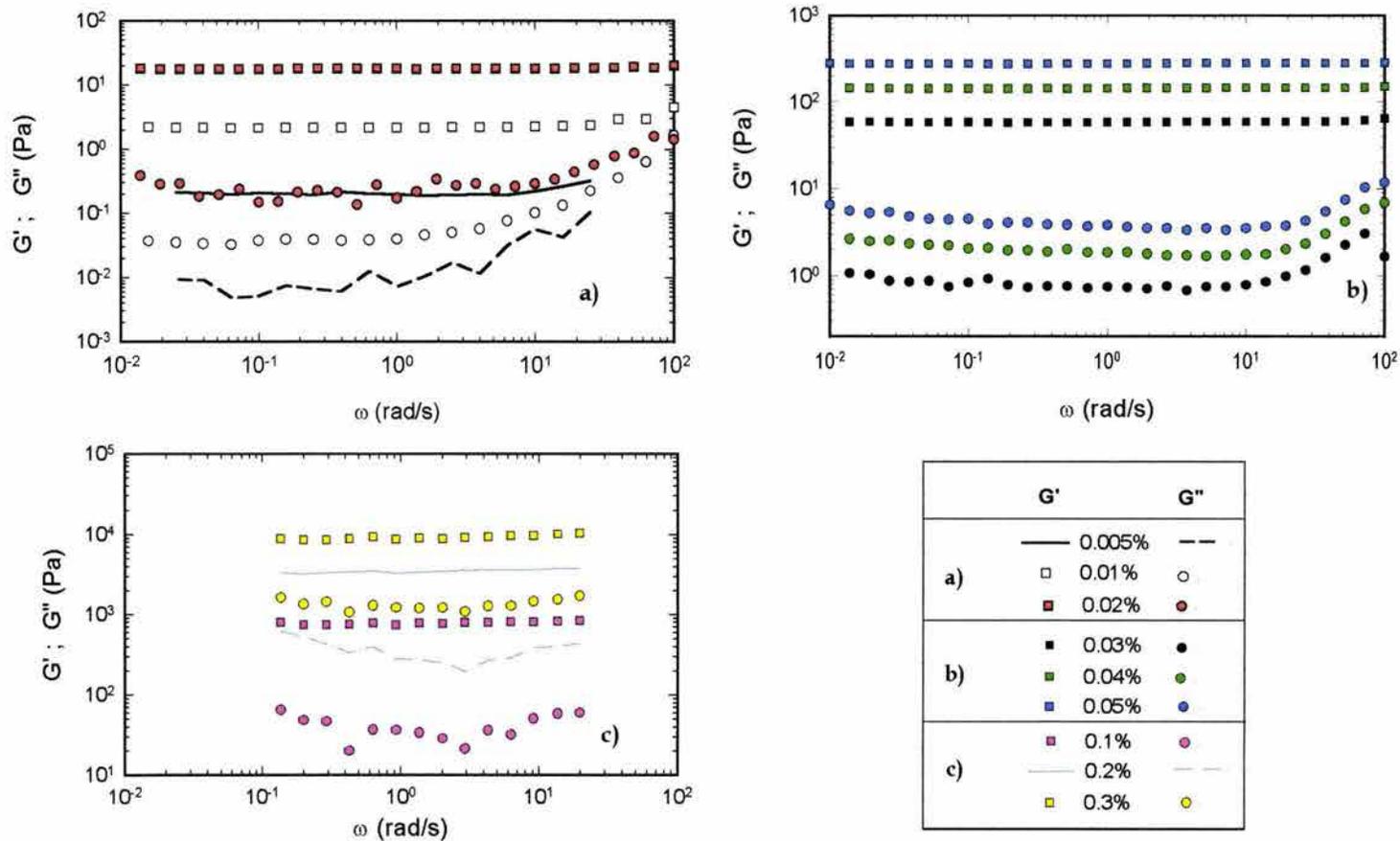
En trabajos previos se ha reportado que la temperatura de transición conformacional se ubica a temperaturas mayores al incrementarse la concentración salina del medio (Miyoshi *et al.*, 1994b; Nishinari *et al.*, 1996; Kasapis *et al.*, 1999) debido a que la conformación doble helicoidal es más estable en exceso de sal (Mazen *et al.*, 1999). La temperatura de transición conformacional obtenida en el presente estudio se acerca mucho a la reportada previamente por otros autores (Miyoshi *et al.*, 1994b) a pesar de las diferencias en la concentración de CaCl<sub>2</sub> usadas. En dicho trabajo se reportó un pico exotérmico a 34.2 °C para gelana 1% con 6.8 mM de CaCl<sub>2</sub> y dicha temperatura de transición se aproximó a aquella donde G' empezó a incrementarse en el proceso de enfriamiento (35 °C). La ligera diferencia entre la  $T_m$  reportada previamente en la literatura y la obtenida en el presente trabajo se puede atribuir al incremento en la concentración de CaCl<sub>2</sub>.

### 5.1.2 Relogía dinámica

Previo a la determinación de los módulos de almacenamiento ( $G'$ ) y de pérdida ( $G''$ ) en función de la frecuencia de oscilación en cada uno de los sistemas de gelana, se determinó el tiempo en el cual los módulos llegaban a su estado estacionario. Se realizó un barrido de  $G'$  y  $G''$  en función del tiempo inmediatamente después del enfriamiento de los geles a 25 °C (ver sección de Materiales y métodos). Las cinéticas realizadas mostraron que los módulos dinámicos alcanzaron el estado estacionario en tiempo cortos, 15 a 30 minutos, siendo más largo el tiempo a medida que la concentración de gelana disminuye. Los resultados evidencian la capacidad gelificante de gelana, su velocidad de gelificación, como se ha reportado previamente en la literatura, es alta comparada con otros hidrocoloides (Papageorgiou *et al.*, 1994; Clark *et al.*, 1999 y Amici *et al.*, 2001).

Las Figuras 5.1.2-1a y 5.1.2-1b muestran la variación con la frecuencia de  $G'$  y de  $G''$  de gelana en el intervalo de concentraciones de 0.005 a 0.05% (m/m) con 0.01 mol/dm<sup>3</sup> de CaCl<sub>2</sub>. En todos los casos, se observa claramente un comportamiento viscoelástico "tipo gel", a pesar de las bajas concentraciones de polisacárido usadas. El módulo de almacenamiento fue prácticamente independiente de la frecuencia de medición,  $G' \propto \omega^{0.003-0.04}$ , y mayor al módulo de pérdida en más de una orden de magnitud. En relación con éste último, se distingue un ligero incremento a frecuencias altas (> 10 rad/s), el cual es más notorio al disminuir la concentración de gelana.

Es importante mencionar que el aspecto físico de los sistemas de gelana anteriores se puede describir como "geles débiles", incapaces de autosostenerse y fáciles de transvasar. Un comportamiento totalmente opuesto se observó con gelana a concentraciones mayores a 0.05% (m/m) con la misma fuerza iónica en el medio, donde el aspecto físico es el que comúnmente se denomina "gel fuerte" (Ross-Murphy, 1995) donde el tiempo característico de las zonas de unión de la red es lo suficientemente grande para proveer la capacidad de autosostenimiento al gel y por lo tanto no muestran flujo en la escala de tiempo de medición.

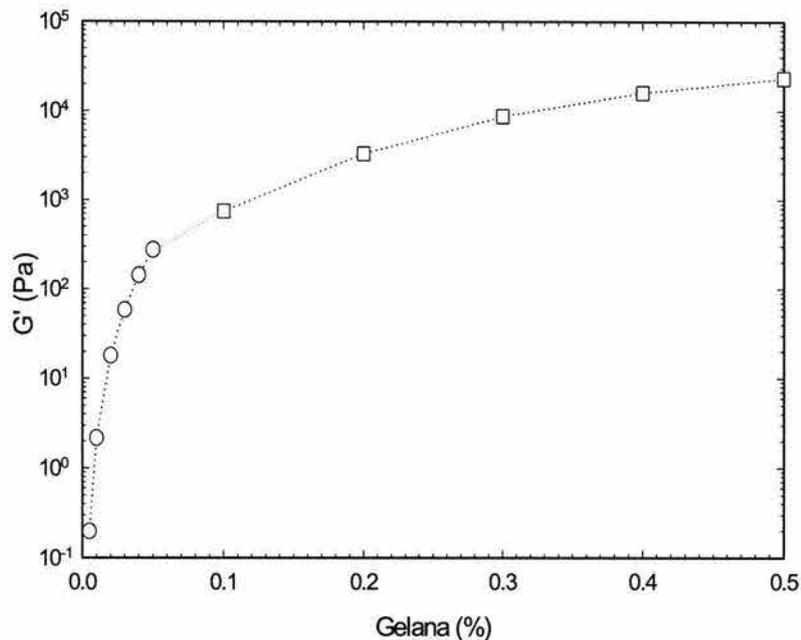


**Figura 5.1.2-1** Variación de los módulos dinámicos ( $G'$  y  $G''$ ) con la frecuencia, a) gelatina 0.005 a 0.02%, b) gelatina 0.03 a 0.05%, c) gelatina 0.1 a 0.3%. En todos los casos la concentración de  $\text{CaCl}_2$  fue  $0.01 \text{ mol/dm}^3$ .

Los espectros mecánicos de gelana en el intervalo de concentraciones de 0.1 a 0.3% (m/m) con 0.01 mol/dm<sup>3</sup> de CaCl<sub>2</sub>, se muestran en la Figura 5.1.2-1c. Debido a las características físicas de estos geles, las determinaciones se realizaron en la geometría de placas paralelas (ver sección de métodos) en un reómetro donde el intervalo de frecuencia de medición fue más estrecho, sin embargo se puede observar un comportamiento viscoelástico cualitativamente igual al de los sistemas anteriores (gelana <0.1%),  $G'$  independiente de la frecuencia y  $G' \gg G''$ , pero con módulos mayores.

En el intervalo de concentraciones de gelana usado en este estudio, se observó un incremento progresivo de los módulos con la concentración de gelana. La Figura 5.1.2-2 muestra los valores de  $G'$  a 1 rad/s en función de la concentración de gelana. En el intervalo de 0.005 a 0.05%, la dependencia de  $G'$  con la concentración de gelana se puede expresar como:  $G' \propto C^{3.12}$  ( $r^2 = 0.99$ ), mientras que en el intervalo de 0.1 a 0.5%, la relación fue  $G' \propto C^{2.17}$  ( $r^2 = 0.99$ ). Ambas dependencias concuerdan con lo reportado en la literatura de biopolímeros (Clark, 1992; Ross-Murphy, 1995), donde se ha asociado una dependencia de  $G'$  cercana a  $C^2$  cuando las concentraciones de polisacárido son muy superiores a la concentración crítica de gelificación ( $C_0$ ), aproximadamente  $5C_0$ ; por el contrario cuando la concentración de polisacárido se acerca a  $C_0$ , la dependencia de  $G'$  con la concentración puede alcanzar exponentes superiores.

Los ángulos de desfase o ángulos de pérdida ( $\delta$ ) de los geles de gelana a concentraciones bajas (0.005 a 0.05%) y altas (0.1 a 0.3%) se muestran en la Figura 5.1.2-3. A concentraciones bajas de gelana, los valores de  $\delta$  son muy pequeños e indistintamente a la concentración de gelana, son prácticamente independientes de la frecuencia hasta 10 rad/s, lo cual describe un comportamiento de geles fuertemente estructurados. A frecuencias mayores a 10 rad/s, se observó una disminución en los valores de delta conforme el contenido de gelana se incrementó; es decir concentraciones mayores de gelana incrementaron la elasticidad del sistema. Por otra parte, los valores de delta en los geles de gelana en el intervalo de 0.02 a 0.05%, no fueron significativamente diferentes ( $\alpha = 0.05$ ), aparentemente concentraciones superiores a 0.02% de gelana contribuyen muy poco al carácter elástico global del sistema.



**Figura 5.1.2-2** Módulo de almacenamiento en función de la concentración de gelana (% m/m),  $\omega = 1 \text{ rad/s}$ ,  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Círculos: determinaciones en reómetro RFS II utilizando geometría de cilindros concéntricos. Cuadrados; determinaciones realizadas en reómetro Haake CV20 utilizando geometría placa-placa.

En contraste, las concentraciones altas de gelana (0.1 a 0.3%) revelaron un comportamiento diferente, los valores de delta fueron mayores al incrementarse la concentración de gelana. Es decir el carácter elástico de estos sistemas fue inhibido al incrementarse la concentración de polisacárido en el sistema, a pesar de que los módulos dinámicos de estos geles fueron muy altos y sus espectros mecánicos evidenciaron un carácter sólido viscoelástico fuertemente estructurado (Figura 5.1.2-1c). Los valores mínimos de delta en el intervalo de concentración de gelana de 0.005 a 0.05% se ubicaron entre  $1.4^\circ$  y  $0.43^\circ$ , mientras que en el intervalo de 0.1 a 0.3% de gelana, éstos fueron mayores a  $1.5^\circ$ .

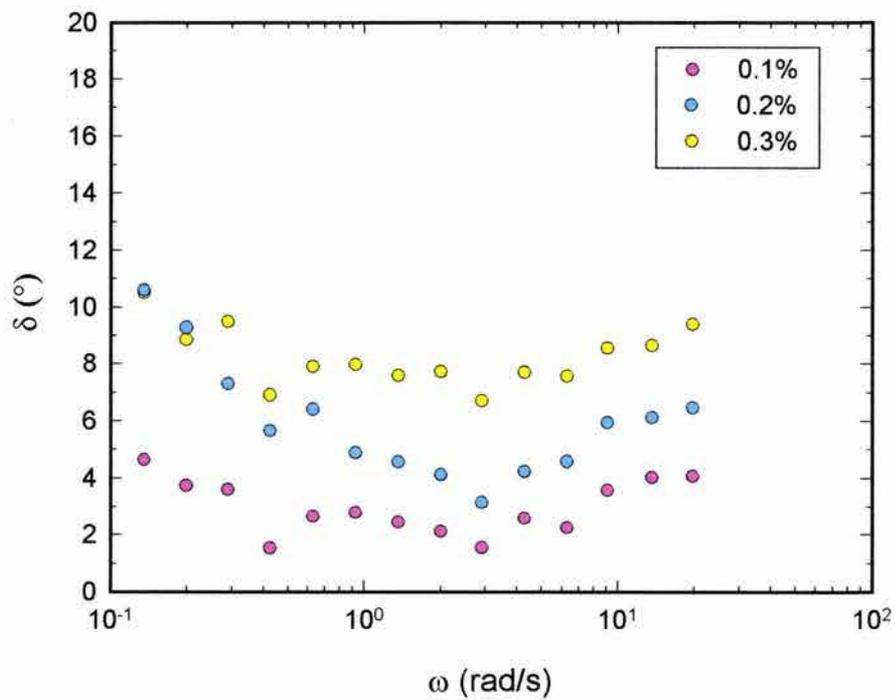
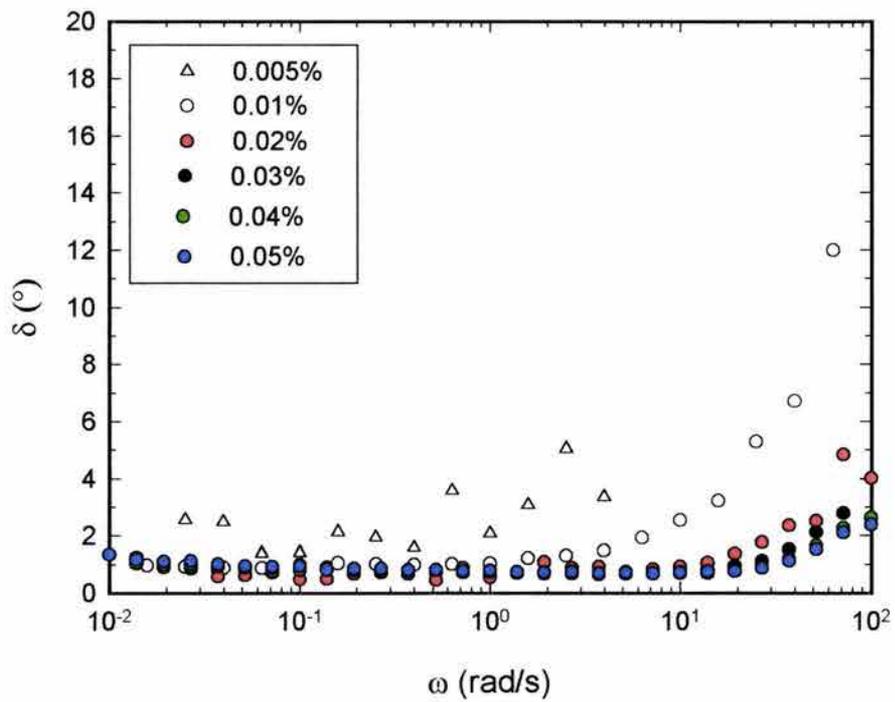
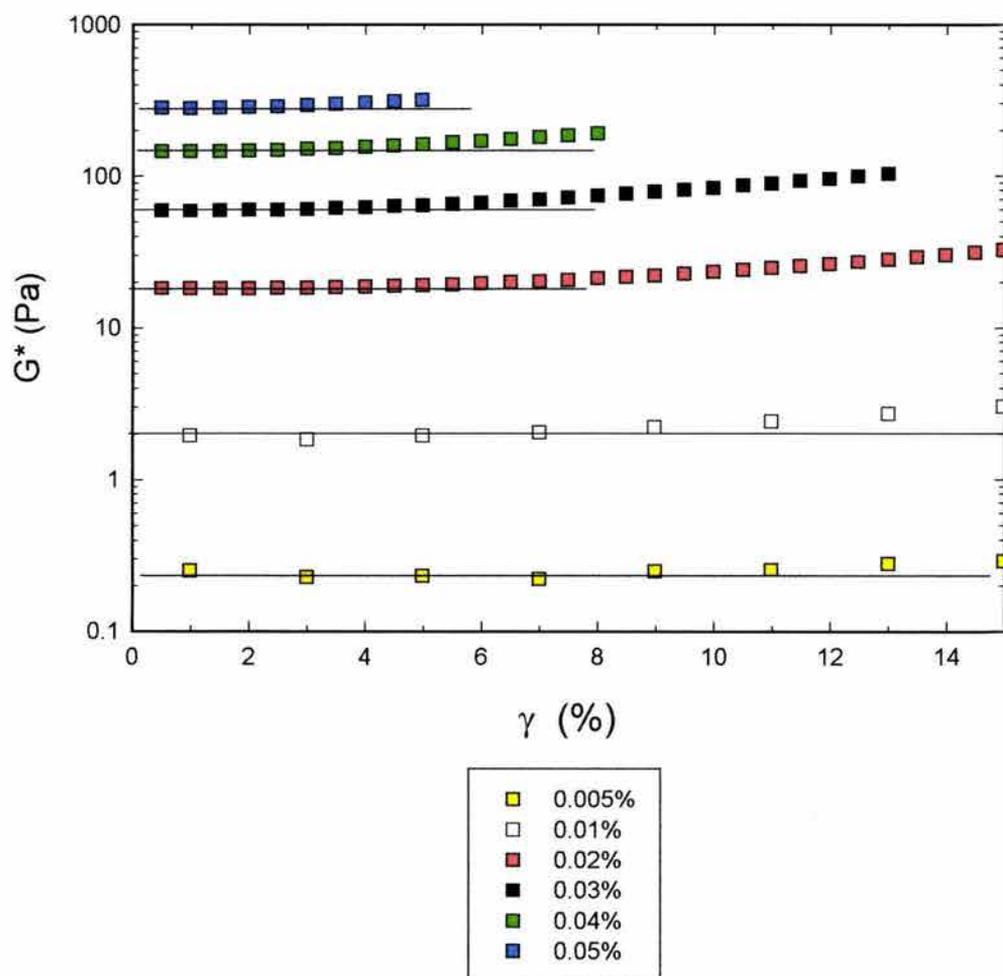


Figura 5.1.2-3 Ángulos de pérdida de gelana en 0.01 mol/dm<sup>3</sup> de CaCl<sub>2</sub>, T = 25 °C.

Todas las determinaciones reológicas se llevaron a cabo dentro de la zona de viscoelasticidad lineal, la cual fue determinada a través de un barrido de deformación a 25 °C y 1 rad/s de frecuencia. La Figura 5.1.2-4 muestra algunos de los barridos de deformación de gelana, donde se observa que la extensión de la zona de viscoelasticidad lineal disminuye conforme se incrementa la concentración de gelana. El Anexo B muestra los límites de esta zona y el valor de deformación utilizado en cada uno de los espectros.

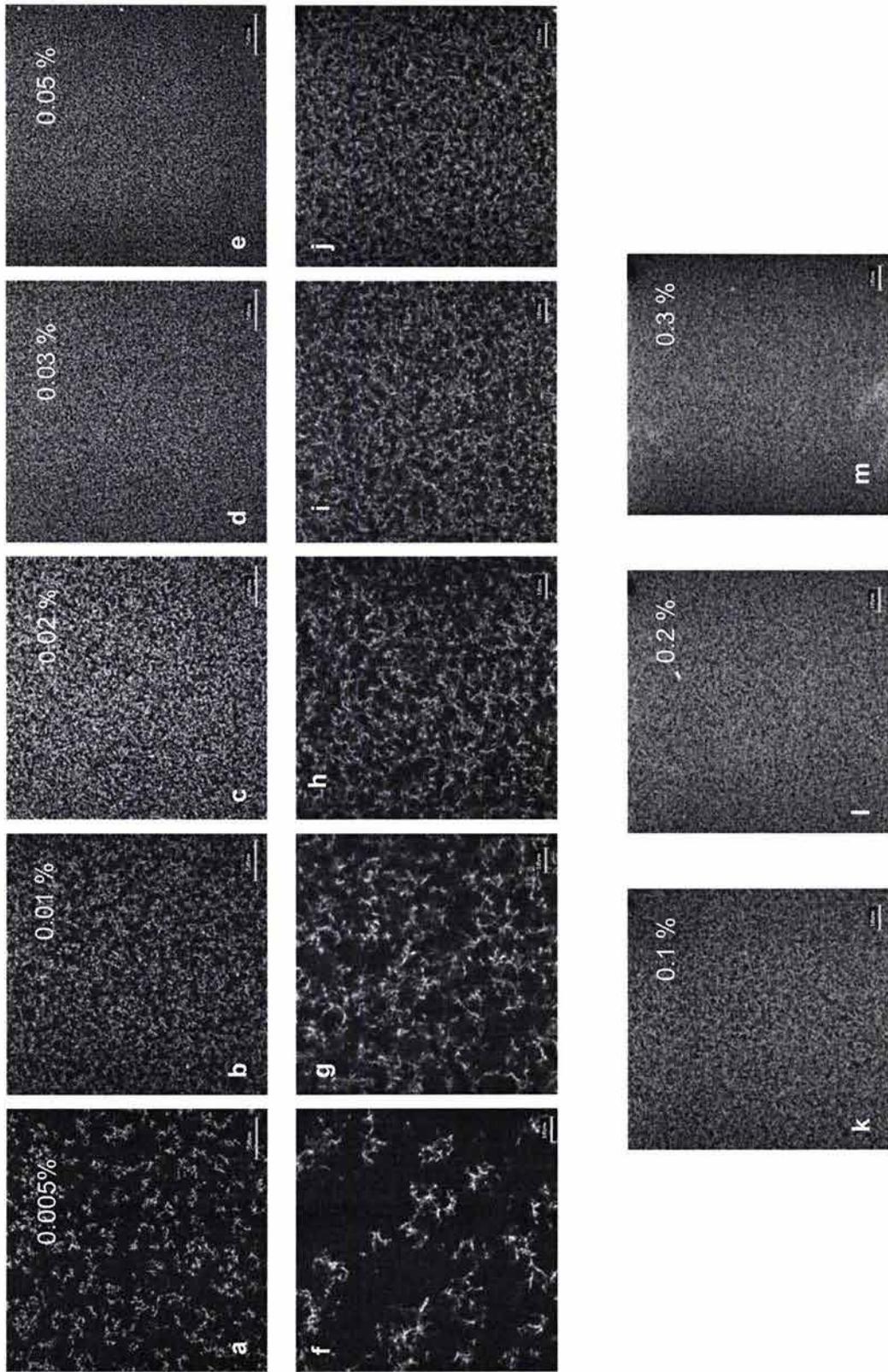


**Figura 5.1.2-4** Barridos de deformación a 1 rad/s y 25 °C de gelana en 0.01 mol/dm<sup>3</sup> de CaCl<sub>2</sub>.

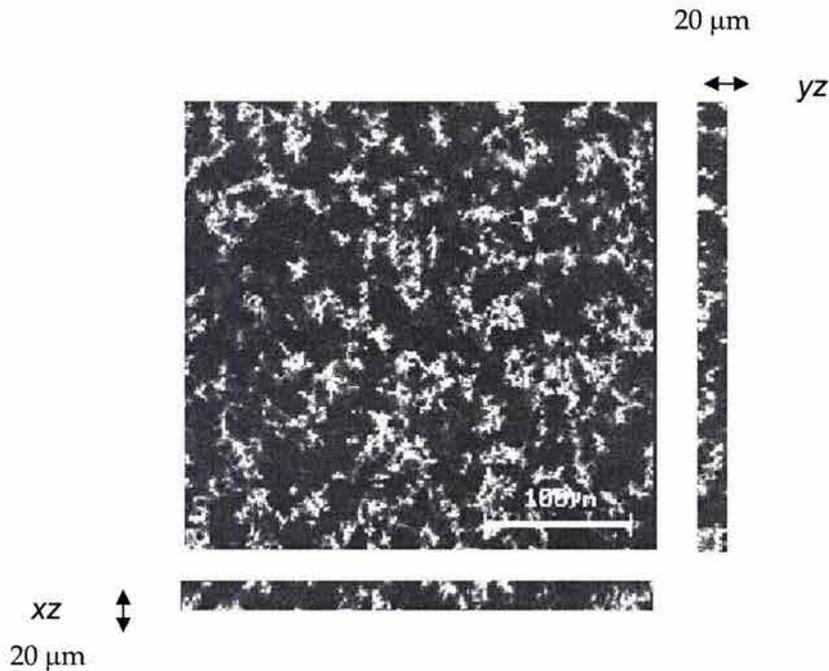
### 5.1.3 Microestructura

La Figura 5.1.3-1 muestra las microfotografías de gelana dentro del intervalo de concentraciones 0.005 a 0.3% (m/m) con 0.01 mol/dm<sup>3</sup> de CaCl<sub>2</sub> para inducir la gelificación. Se distinguen zonas claras en un fondo oscuro, las cuales corresponden a la fluorescencia de FA-gelana dispersa en el disolvente (zonas oscuras). Como se puede observar en la Figura 5.1.3-1a, la concentración más baja de gelana (0.005%) presenta una red muy tenue donde se ven zonas continuas de gelana. La Figura 5.1.3-2 muestra los cortes transversales realizados en gelana 0.005% para ver si había interconectividad en la red. Esta información fue obtenida de la sobreposición de veinte imágenes tomadas cada 1 μm ajustando inicialmente el plano *xy* a un espesor, *z* = 10 μm; por lo que se visualizó la estructura avanzando 29 μm dentro de la muestra. La sobreposición de imágenes resultó en una representación tridimensional que no es fácil analizar en papel, por lo que se muestran los cortes transversales en el plano *xz* (debajo de la figura central) y el plano *yz* (derecha de la figura central). Las secciones transversales *xz* y *yz* de gelana 0.005% muestran algunas zonas de interconexión dentro del volumen del gel; si bien estas zonas no son completamente continuas, evidencian baja interconectividad, la cual es suficiente para generar una red tenue con propiedades elásticas que imparten características sólidas al sistema, de acuerdo con lo observado en el espectro mecánico de la Figura 5.1.2-1.

La Figura 5.1.3-1b muestra una red más homogénea en gelana 0.01%; las zonas libres de polisacárido son más pequeñas que las observadas en gelana 0.005%. En la ampliación de la microfotografía (Figura 5.1.3-1g) se observa con mayor claridad una red continua de gelana con espacios intersticiales de menor tamaño. A concentraciones mayores de gelana, microfotografías *c*, *d* y *e* de la figura anterior, la estructura de los sistemas fue más densa y compacta, las estructuras amplificadas (microfotografías *h*, *i*, *j*) ponen en manifiesto una estructura continua con espacios intersticiales más pequeños a medida que se incrementa la concentración de gelana. Por lo tanto, no es sorprendente observar redes sumamente compactas a concentraciones mayores de gelana, 0.1 a 0.3% (microfotografías *k*, *l*, *m*), lo cual dificulta imaginar la organización estructural de gelana en presencia de otros macrocomponentes.



**Figura 5.1.3-1** Microfotografías de gelatina en  $0.01 \text{ mol/dm}^3$  de  $\text{CaCl}_2$ , observaciones realizadas en microscopía confocal de barrido láser a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . (a y f) 0.005%, (b y g) 0.01%, (c y h) 0.02%, (d e i) 0.03%, (e y j) 0.05%, (k) 0.1%, (l) 0.2%, (m) 0.3%. Las barras representan 50  $\mu\text{m}$  en las micrografías a-e y k-m; y 10  $\mu\text{m}$  en f-j.



**Figura 5.1.3-2** Secciones transversales de gelana 0.005% en 0.01 mol/dm<sup>3</sup> de CaCl<sub>2</sub>. El plano principal, *xy* (centro) fijo a 10 μm; las secciones *xz* (abajo) y *yz* (derecha) se obtuvieron de la superposición de 20 secciones consecutivas de 1 μm de espesor en el mismo plano *xy*.

Las microestructuras observadas no difieren de lo observado hasta ahora en gelana con otras técnicas de microscopía. Se ha reportado (Gunning *et al.*, 1996; Clark *et al.*, 1999) una estructura fibrosa, cuya interconectividad depende de la concentración de polisacárido y, del tipo y concentración de catión. Gunning *et al.*, (1996) reportaron la presencia de agregados o precursores de geles a concentraciones muy bajas de gelana (< 0.0003% m/m) en ausencia de iones. La adición de iones al medio favoreció el “reforzamiento” de la red, sin embargo no se obtuvieron imágenes nítidas a concentraciones mayores de gelana. Otros trabajos (Clark *et al.*, 1999) también han reportado la presencia de redes de gelana con carácter permanente y con espacios intersticiales pequeños, pero las concentraciones de gelana usadas fueron muy altas (0.4 a 3%) comparadas con las estudiadas en el presente trabajo.

#### 5.1.4 Discusión

Los resultados de calorimetría diferencial de barrido y la evolución de los módulos con la temperatura de gelana en presencia de  $0.01 \text{ mol/dm}^3$  de  $\text{CaCl}_2$ , señalaron que la temperatura de transición conformacional es  $36.5 \text{ }^\circ\text{C}$ . Esta transición corresponde al cambio conformacional de cadenas a hélices rígidas en presencia de sales externas (Shi, 1990). Con base en estos resultados se puede suponer que a temperaturas menores de  $42 \text{ }^\circ\text{C}$ , donde los módulos empiezan a alcanzar sus valores de equilibrio de acuerdo con la Figura 5.1.1-2, el sistema está formado por hélices rígidas asociadas a través de interacciones con calcio iónico. Dicho arreglo forma un gel o una red de polímero, la cual puede ser más o menos compacta dependiendo de la concentración de gelana y de la fuerza iónica en el sistema. Por consiguiente la reología de gelana realizada en este trabajo ( $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ), describe el comportamiento de moléculas rígidas y ordenadas de gelana dentro de una solución acuosa de  $\text{CaCl}_2$ .

Existen muchos estudios reológicos de gelana tanto acilada como desacilada; sin embargo la mayoría de éstos ha utilizado concentraciones sustancialmente mayores que las utilizadas en este trabajo (Miyoshi *et al.*, 1994a; Papageorgiou *et al.*, 1994; Kasapis *et al.*, 1999; Rodríguez-Hernández y Tecante, 1999). Los resultados obtenidos hasta ahora han evidenciado la gran capacidad gelificante de gelana, aunque en muchos casos la excesiva firmeza y tenacidad de sus geles ha dado pauta a la utilización de este hidrocoloide en mezclas con agentes espesantes para disminuir su firmeza e incrementar la elasticidad de sus geles (Sanderson, 1990; Sworn *et al.*, 1995; Rodríguez-Hernández y Tecante, 1999). Los sistemas de gelana con concentraciones tan bajas como  $0.005\%$  y con la fuerza iónica usada, presentaron un patrón reológico característico de un gel a pesar de la apariencia fluida observada en ellos. Otros estudios (Sworn *et al.*, 1995) han reportado la formación de líquidos estructurados, denominados geles fluidos, a partir de  $0.125\%$  de gelana desacilada en presencia de  $\text{NaCl } 6\%$ . La reología de estos geles fluidos ha sido de interés particular en la estabilización de suspensiones en donde no es deseable tener viscosidades altas, por ejemplo en la industria de bebidas (Sworn *et al.*, 1995).

Tanto la reología como la microscopía de los sistemas de gelana más diluidos (0.005% y 0.01%) revelaron la formación de una red tridimensional cuya naturaleza sólida fue bien evidenciada en el comportamiento de  $G'$  y  $G''$  con la frecuencia. Gelana 0.005% con 0.01 mol/dm<sup>3</sup> de CaCl<sub>2</sub>, sólo fue capaz de formar una red tenue con pocas zonas continuas de polímero suspendidas dentro del disolvente. Los resultados sugieren que el contenido de polímero no fue suficiente para generar una red tridimensional fuerte, lo cual se refleja en la tendencia de este sistema a fluir dentro de tiempos de observación pequeños (frecuencias altas). En esta clase de sistemas, usualmente denominados “geles débiles” (Ross-Murphy, 1995), el disolvente está lo suficientemente libre para poder moverse rápidamente a través de los espacios intersticiales de la red; es decir estos sistemas responden como fluidos estructurados cuando se someten a deformaciones grandes. Los resultados reológicos y estructurales sugieren que la concentración crítica,  $C_0$ , para la formación de geles de gelana en presencia de 0.01 mol/dm<sup>3</sup> de CaCl<sub>2</sub>, es ligeramente inferior a 0.005% m/m. Al incrementarse la concentración de gelana en el sistema, 0.01%, la extensión de la asociación de hélices de gelana se incrementó generando una red más compacta, más homogénea aunque todavía con grandes zonas no ocupadas por el polímero, cuyo carácter sólido fue más evidente en las determinaciones reológicas.

La microestructura de gelana 0.02% mostró una red más densa con espacios intersticiales de menor tamaño a través del volumen de la muestra y mayor conexión de las zonas de polímero. La reología de este sistema fue coherente con la microestructura observada; los valores de los ángulos de pérdida fueron casi independientes de la frecuencia, lo cual describe al sistema como un gel con interacciones intermoleculares más permanentes. El incremento en la concentración de gelana (> 0.02%) generó sistemas completamente estructurados con interacciones o zonas de unión permanentes dentro del tiempo de observación de las pruebas reológicas (10<sup>-2</sup> a 10<sup>2</sup> s); no se manifestaron procesos de relajación dentro del período de la prueba, tal como se observó en la similitud entre los valores de los ángulos de pérdida para gelana 0.03 a 0.05%, y en la total independencia de ambos módulos con la frecuencia.

El carácter elástico de los sistemas de gelana con 0.01 mol/dm<sup>3</sup> de CaCl<sub>2</sub> se intensificó progresivamente con el incremento de gelana hasta concentraciones de 0.03%. Este efecto fue confirmado en microscopía; se formaron redes más compactas e interconectadas a medida que la

concentración de gelana fue mayor. A pesar de que los módulos dinámicos se incrementaron con la concentración de gelana en el intervalo de 0.03 a 0.05%, la contribución elástica al comportamiento viscoelástico, visualizada a través de los valores del ángulo de pérdida (Figura 5.1.2-3), no mostró cambios significativos. El carácter elástico predominó en la misma proporción sobre la respuesta viscosa, independientemente de los valores de  $G'$ . Esto se relaciona bien con la microestructura de los sistemas, ya que no se observaron grandes diferencias en ese intervalo de concentraciones de gelana (Figura 5.1.3-1).

Por otra parte, la microscopía de gelana a concentraciones mayores, 0.1 a 0.3%, mostró redes de gelana sumamente compactas con espacios intersticiales diminutos distribuidos homogéneamente a través de todo el volumen de la muestra. Esta estructura refleja la excesiva tenacidad de los geles de gelana, la cual se manifiesta en los altos valores de  $G'$ ; pero paradójicamente estos sistemas son muy quebradizos, poco elásticos, lo cual se evidencia en los valores del ángulo de pérdida (Figura 5.1.2-3). A medida que se incrementó la concentración de gelana en el intervalo de concentración de 0.1 a 0.3% la elasticidad de éstos se atenuó.

## 5.2 ALMIDÓN

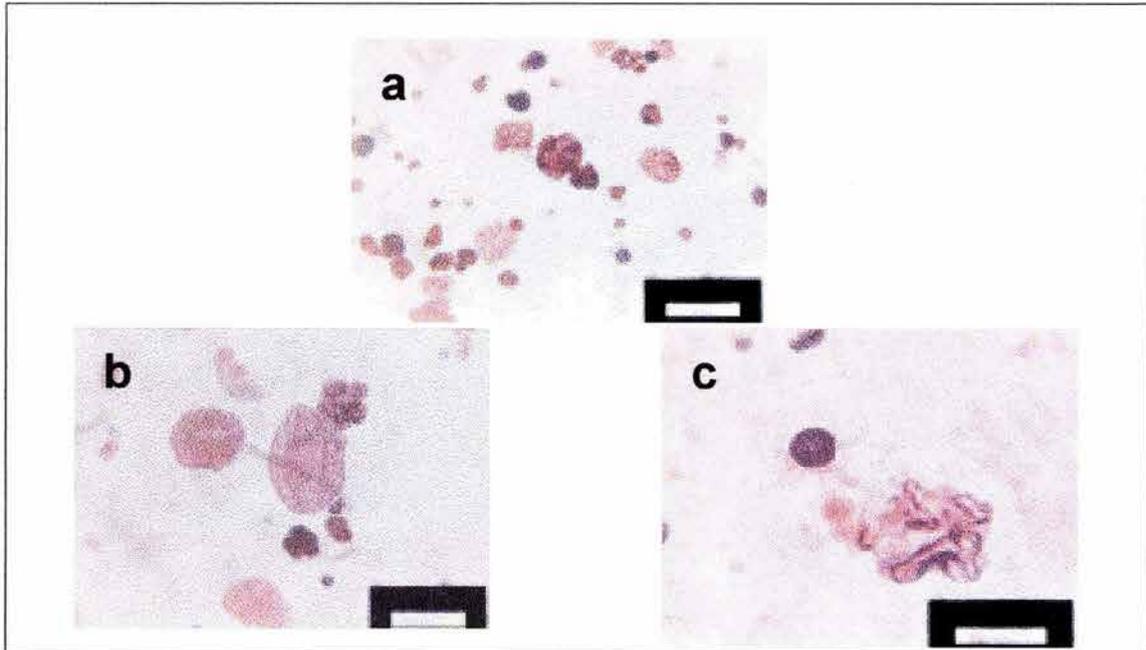
### 5.2.1 Índices de hinchamiento y solubilidad

Basándose en la descripción de pastas de almidón "*suspensión de gránulos hinchados dispersos en un medio macromolecular*" (Schoch, 1969 citado en Evans y Haisman, 1979) se optó por hacer experimentos de hinchamiento-solubilidad, considerando que estos parámetros han sido utilizados satisfactoriamente para describir la estructura o estado físico de pastas de almidón e interpretar la reología de éstas, incorporando el término de fracción volumen de partículas hinchadas ( $\Phi$ ) (Doublier, 1987; Doublier *et al.*, 1987; Alloncle *et al.*, 1989).

La revisión bibliografía ha mostrado evidencias de la alta capacidad de hinchamiento que tienen los gránulos de almidón de maíz ceroso y la sensibilidad de éstos a la cinética de calentamiento y/o condiciones de cizallamiento durante la cocción de las pastas (sección 2.4). Ensayos

preliminares con el almidón utilizado en este estudio confirmaron lo anterior, se observó que el cocimiento de pastas a temperaturas superiores a 80 °C dificultó la separación de las fases existentes por la presencia de partículas "tipo gel" en el sobrenadante. Observaciones al microscopio óptico durante la cocción de una pasta al 4% evidenciaron la fragilidad del gránulo de almidón de maíz ceroso.

La Figura 5.2.1-1 muestra la evolución del hinchamiento del gránulo en función de la temperatura, en dicha figura se observa que el hinchamiento del gránulo empieza después de 65 °C, a 70 °C se observan tanto gránulos hinchados como algunos aún sin hincharse, mientras que a 75 °C hay presencia de gránulos muy hinchados, turgentes, pero también algunos poco hinchados e incluso se presentan algunos gránulos reventados (izquierda de Figura 5.2.1-1b). Finalmente, a 90 °C el número de gránulos hinchados disminuye y éstos no muestran el grado de hinchamiento observado a 75 °C, simultáneamente se observan residuos de gránulos reventados (Figura 5.2.1-1c).



**Figura 5.2.1-1** Microscopía óptica de almidón de maíz ceroso nativo 4%, a) 65 °C, b) 75 °C y c) 90 °C. La barra representa 100 µm.

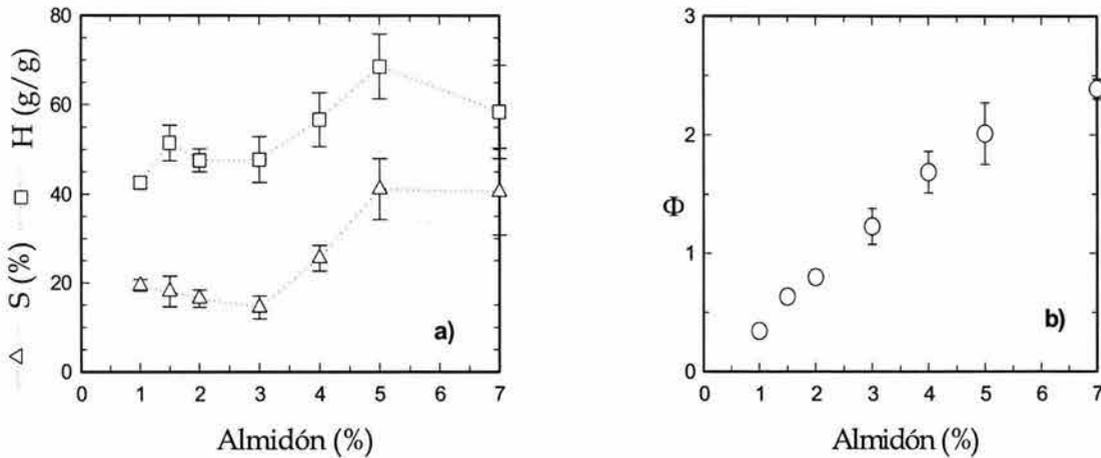
Con base en las observaciones al microscopio óptico de las pastas de almidón, se decidió utilizar como temperatura máxima de cocción de pastas, 75 °C (1.5 °C/min, 75 rpm), la cual de acuerdo con la Figura 5.2.1-1b favorece el hinchamiento con poca desintegración de gránulos. Con esto se procuró generar suspensiones de gránulos hinchados susceptibles a ser descritas utilizando el modelo bifásico usado en otros estudios (Doublier, 1981; Bagley y Christianson, 1982; Eliasson 1986; Steeneken 1989; Alloncle y Doublier 1991; Tecante y Doublier 1999).

#### *Efecto de la concentración de almidón en los índices de hinchamiento y solubilidad*

La Figura 5.2.1-2, muestra los parámetros: hinchamiento, solubilidad y fracción volumen de gránulos hinchados ( $\Phi$ ), de pastas de almidón con concentraciones (m/m) entre 1 y 7%. En pastas con contenido de almidón menor a 3% se observó solubilidad poco dependiente de la concentración de almidón en la pasta, a partir de 3% la solubilidad se incrementó notoriamente desde valores de 14 hasta 42%. Un comportamiento similar se presentó también en el índice de hinchamiento. Es importante mencionar que las determinaciones de estos índices se dificultaron al incrementar la concentración de almidón, la repetibilidad de los experimentos no fue buena cuando la concentración fue mayor de 5%, como se observa en las barras de error de la Figura 5.2.1-2. Esto se debió a la formación de un sobrenadante gelatinoso, generado durante la centrifugación, al incrementar la concentración de las pastas (ver Anexo A para detalles de la metodología). El sobrenadante mostró mayor turbidez, lo cual dificultó la apreciación visual de la interfase residuo-sobrenadante.

En trabajos anteriores (Steeneken, 1989) se reportaron también dificultades en la determinación de estos índices en pastas de almidón de maíz ceroso, a pesar de las diferencias en la técnica para cuantificar y en el tratamiento térmico al cual se sometieron dichas pastas (temperatura máxima de cocimiento: 97 °C). Steeneken observó material no disuelto en la fase continua que complicó la determinación de sólidos solubles y consecuentemente el índice de hinchamiento de este tipo de almidón. Esto confirma la fragilidad de los gránulos de almidón de maíz ceroso, los cuales han sido clasificados por Schoch y Maywald (Doublier, 1987) como tipo A caracterizados por capacidades de hinchamiento altas. Los datos de la Figura 5.2.1-2a muestran valores de

hinchamiento entre 42 y 70 g/g, muy superiores a los datos de índices de hinchamiento de almidón de maíz normal, los cuales se han reportado cercanos a 12 g/g, a 75 °C y con condiciones de preparación similares (Doublier, 1987; Doublier *et al.*, 1987).



**Figura 5.2.1-2** Índices de (a) solubilidad (S) e hinchamiento (H), y (b) fracción volumen de gránulos hinchados ( $\Phi$ ), de pastas de almidón de maíz ceroso en función de la concentración (% m/m). Las pastas ( $n = 3$ ) se prepararon calentando las dispersiones acuosas de almidón de 30 °C a 75 °C con una velocidad de calentamiento de 1.5 °C/min.

Por otra parte, el parámetro  $\Phi$  (Figura 5.2.1-2b), que representa la fracción volumen de gránulos hinchados, mostró valores mayores de uno en pastas con concentraciones de almidón mayores de 2%. Estos resultados son controversiales considerando que en el caso de partículas rígidas en suspensión los valores de la fracción volumen son inferiores a la unidad. Sin embargo, para el caso de partículas deformables como en el caso de gránulos de almidón, se ha reportado que este parámetro puede alcanzar valores cercanos a uno (en ausencia de material disuelto en la fase continua) o ligeramente inferiores debido a que la deformabilidad y el hinchamiento de los gránulos de almidón favorece la exclusión de disolvente entre partículas vecinas formándose un continuo de partículas deformadas (Bagley y Christianson, 1982).

Sin embargo, los valores altos obtenidos del parámetro  $\Phi$  en pastas con concentraciones mayores al 2% de almidón, no pueden ser considerados válidos para describir el estado físico de las

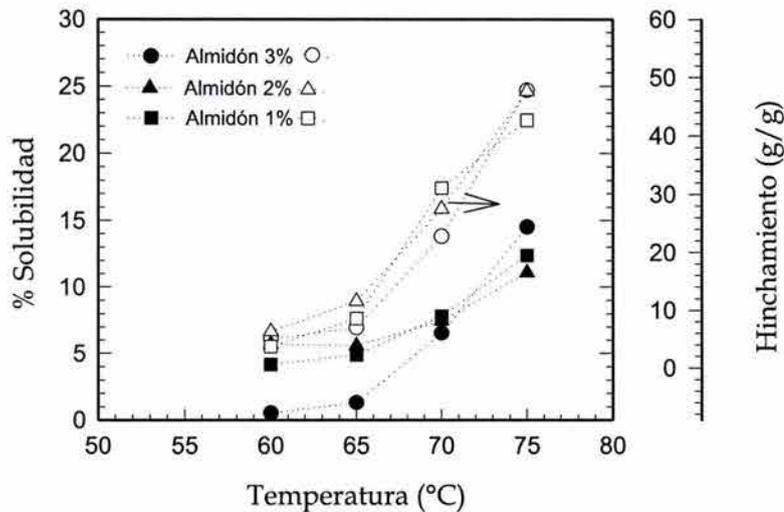
pastas en cuestión. En el presente estudio, a diferencia de la mayoría de los trabajos que han caracterizado el estado físico de las pastas de almidón a través de los parámetros,  $\Phi$ , H, y S; se utilizó un almidón prácticamente exento de amilosa. Esta particularidad trae como consecuencia que durante la gelatinización y cocción del almidón, sus gránulos alcancen hinchamientos altos y sean más propensos a fracturarse. Los valores de solubilidad en las pastas con concentraciones de almidón mayores de 3% (Figura 5.2.1-2a) y las dificultades encontradas durante la separación de la fase dispersa en las pastas, sugieren que al incrementarse la concentración de almidón mas allá del 2%, existe mayor cantidad de gránulos reventados que liberan su material macromolecular al medio continuo (altos valores de S, Figura 5.2.1-2a), generando un sistema tipo coloidal donde coexisten gránulos reventados, gránulos hinchados íntegros y material macromolecular en solución. En este sistema tan complejo es prácticamente imposible determinar tanto el índice de hinchamiento como la fracción volumen de gránulos hinchados en suspensión utilizando las técnicas de sedimentación convencionales.

#### *Efecto de la temperatura*

Se realizaron determinaciones de solubilidad, hinchamiento y  $\Phi$  en función de la temperatura en pastas con 1, 2 y 3% de almidón. La Figura 5.2.1-3 muestra los perfiles de solubilidad e hinchamiento para las tres pastas, las cuales básicamente siguieron un mismo patrón, dentro del error experimental generado, a excepción de la pasta al 3% cuyos valores de solubilidad fueron inferiores especialmente a temperaturas menores a 70 °C. Este comportamiento se puede suponer debido a que el modelo bifásico no puede aplicarse a esta concentración de almidón.

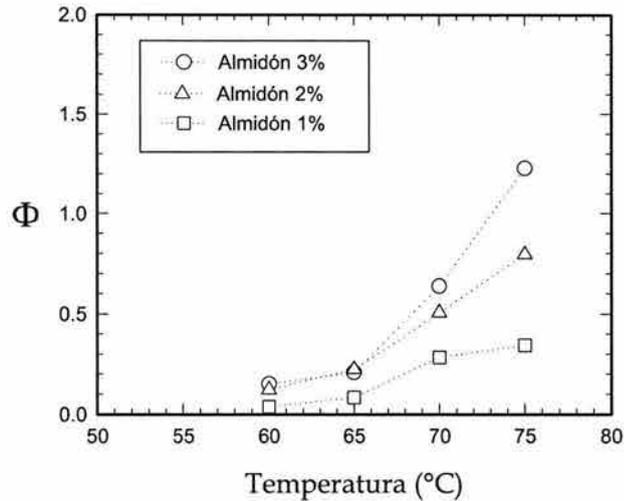
La Figura 5.2.1-4 presenta los datos de la fracción volumen ( $\Phi$ ) ocupada por los gránulos hinchados durante el cocimiento de pastas de almidón de maíz ceroso nativo. En las tres concentraciones estudiadas se observó que a partir de 65 °C hay un incremento más pronunciado de la fracción de gránulos hinchados, esto se debe a que a esta temperatura se ha iniciado la gelatinización, según los datos de calorimetría diferencial de barrido reportados por Tester *et al.*, en 2000 (Cuadro 2.4-1). De acuerdo con el comportamiento de  $\Phi$  de las pastas evaluadas, los gránulos han iniciado su hinchamiento a 65 °C y continúan sin aparente

perturbación alcanzando valores de  $\Phi > 0.7$  en las concentraciones 1 y 2%, mientras que la pasta al 3% generó valores de  $\Phi > 1$  y con mayor error experimental por la presencia de sólidos no solubles (fragmentos de gránulos reventados) en el sobrenadante que dificultó las determinaciones.



**Figura 5.2.1-3.** Valores de solubilidad (símbolos negros) e hinchamiento (símbolos blancos) de almidón de maíz ceroso nativo durante el cocimiento de las pastas.

La Figura 5.2.1-4 muestra que temperaturas inferiores a 75 °C podrían ser de utilidad para estudiar estas pastas como sistemas bifásicos con una fracción volumen de fase dispersa cuantificable, propiciando un intervalo de concentración más amplio donde las pastas se pudieran estudiar en función de los datos de hinchamiento, solubilidad y  $\Phi$ . Sin embargo, tanto las temperaturas inferiores a 75 °C, en donde las pastas se encuentran subcocidas, como las concentraciones bajas donde se puede aplicar la descripción propuesta, generan pastas sin interés tecnológico, más aún, en presencia de gelana el efecto del almidón en la mezcla quedaría totalmente enmascarado, ya que este hidrocoloide se caracteriza por ser un agente gelificante con prominentes propiedades elásticas a concentraciones bajas (sección 5.1.2).



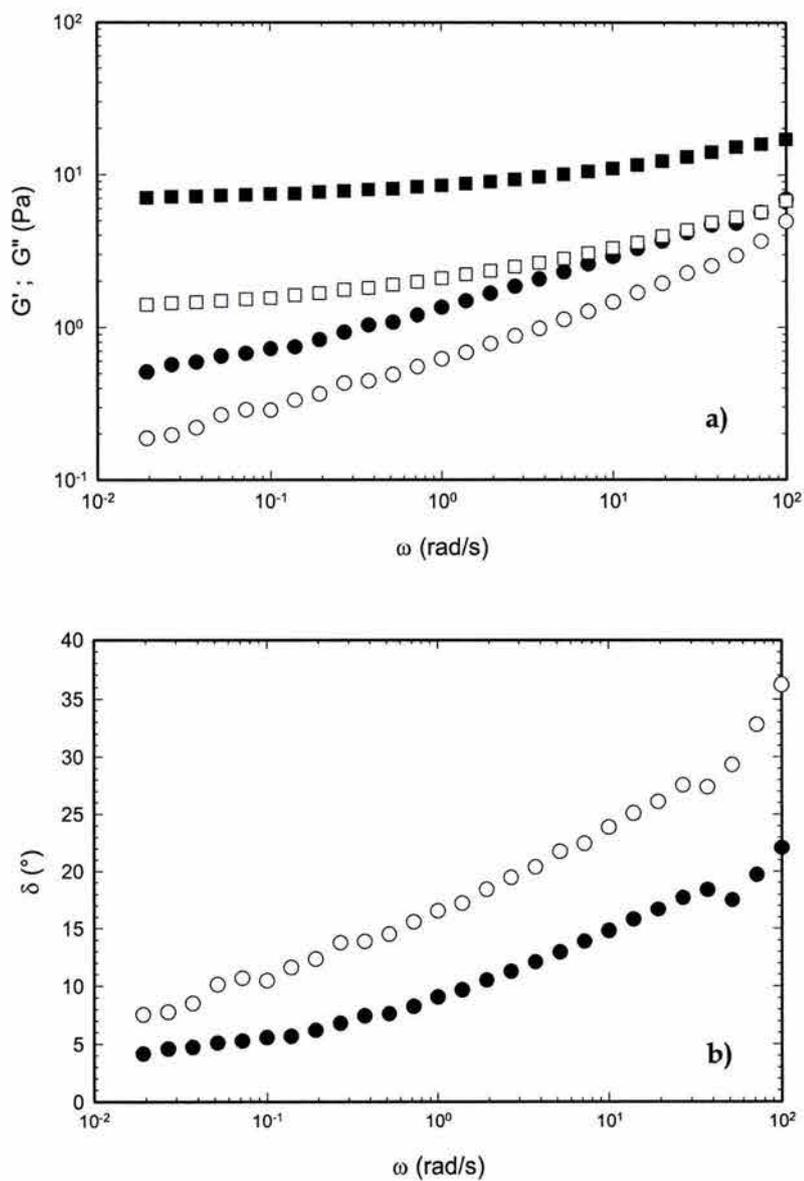
**Figura 5.2.1-4.** Evolución de la fracción volumen de los gránulos hinchados de almidón de maíz ceroso nativo durante el cocimiento de las pastas.

## 5.2.2 Reología dinámica

La Figura 5.2.2-1a contrasta el comportamiento de los módulos dinámicos,  $G'$  y  $G''$ , con la frecuencia (espectros mecánicos), de almidón al 3% cocido a dos temperaturas diferentes, 75 °C donde existe menor desintegración granular de acuerdo con las observaciones al microscopio óptico, y 90 °C donde predominan fragmentos de gránulos y amilopectina en solución. En ambos espectros se observa una dependencia de los módulos con la frecuencia, siendo ésta más pronunciada para altas frecuencias, sin embargo un ligero *plateau* en  $G'$  se distingue en la zona de frecuencias bajas ( $10^{-2}$  a  $10^{-1}$  rad/s) y  $G' > G''$  en todo el intervalo de frecuencia analizado. Estos rasgos denotan un carácter sólido-viscoelástico en dichas pastas a pesar de su apariencia física fluida.

Las condiciones de preparación de las pastas de almidón, concretamente la temperatura máxima a la cual se someten durante el cocimiento, generó como se esperaba diferencias en el comportamiento reológico. Las pastas cocidas a 90 °C mostraron módulos menores y ángulos de pérdida mayores (Figura 5.2.2-1b) que aquéllas cocidas a 75 °C. La Figura 5.2.2-1 ilustra bien la

fuerte influencia de la integridad del gránulo en las propiedades reológicas de las pastas de almidón.



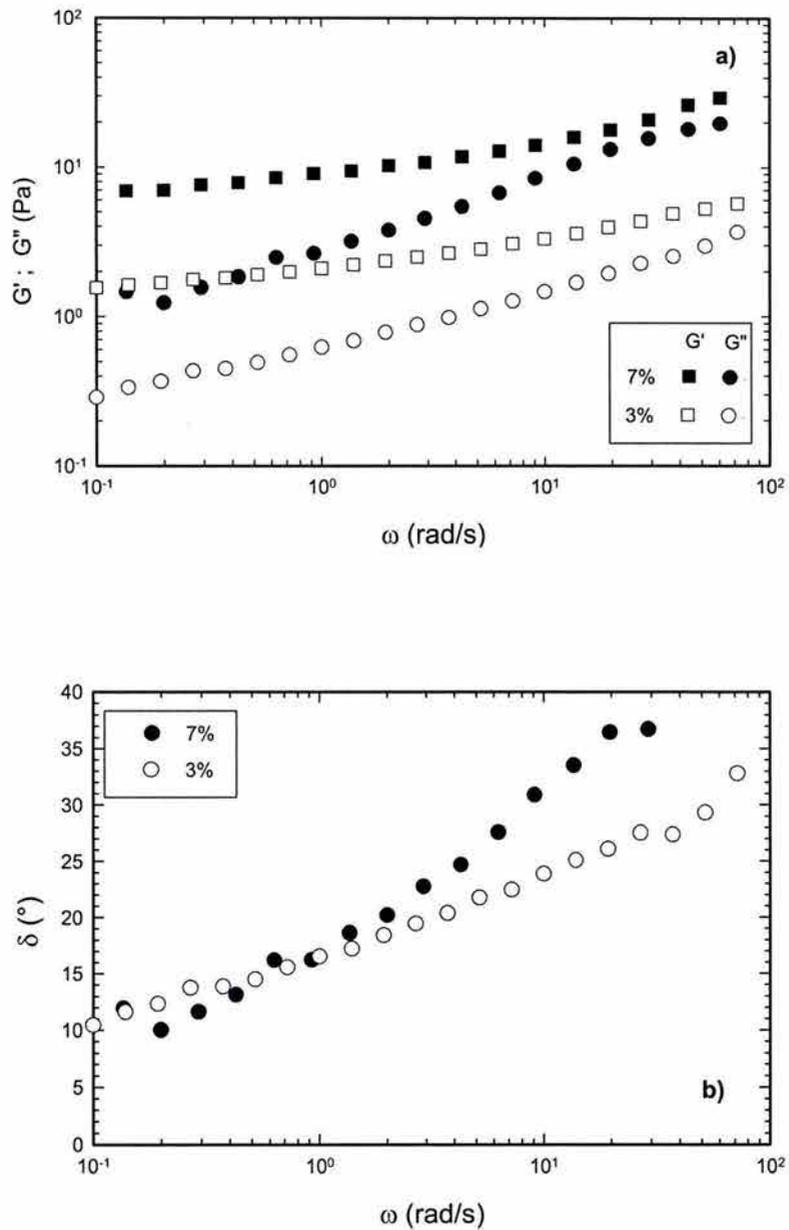
**Figura 5.2.2-1.** a) Módulos dinámicos,  $G'$  (cuadrados),  $G''$  (círculos), y b) Ángulos de pérdida de pastas de almidón de maíz ceroso nativo. Concentración de almidón: 3% (m/m), temperatura de cocción de las pastas: 75 °C (símbolos negros) y 90 °C (símbolos blancos). Determinaciones realizadas a 25 °C y  $\gamma = 5\%$ .

En relación con el efecto de la concentración de almidón, las Figuras 5.2.2-2a y 5.2.2-2b muestran los barridos de frecuencia de  $G'$  y  $G''$ , y los valores del ángulo de pérdida de pastas de almidón al 3% y 7% cocidas a 90 °C. En la Figura 5.2.2-2a se puede observar que a medida que se incrementa la concentración de almidón se generan módulos ligeramente mayores. No obstante que la temperatura de preparación de las pastas promueve desintegración de los gránulos de almidón, el comportamiento viscoelástico de éstas conserva los rasgos distintivos propios de las suspensiones de almidón,  $G' > G''$ , ligera dependencia de  $G'$  con la frecuencia (las pendientes de la curvas  $\log G'$  versus  $\log \omega$ , estuvieron dentro del intervalo: 0.11-0.18).

Por otra parte, Los valores de delta de las pastas de almidón preparadas a 90 °C (Figura 5.2.2-2b), ponen en evidencia el carácter fluido de las pastas de almidón cocidas a 90 °C, a pesar de que el incremento en la concentración de almidón generó mayores valores de  $G'$  en la pasta correspondiente, predomina el carácter viscoso sobre el elástico a mayores concentraciones de almidón. La Figura 5.2.2-2 también muestra que la carencia de gránulos hinchados como principal entidad estructural en estas pastas, resulta en propiedades elásticas disminuidas en comparación con las pastas de almidón cocidas a 75 °C (Figura 5.2.2-1).

### 5.2.3 Discusión

De acuerdo con los resultados mostrados, las pastas con concentraciones menores de 3% y cocidas a 75 °C, presentan índices de hinchamiento (42 a 52 g/g) y solubilidades (14 a 20%) similares, esto significa que a estas concentraciones los gránulos se hinchan en libertad, manifestando su capacidad de hinchamiento característica sin que la presencia de gránulos vecinos la inhiban; es decir el sistema puede describirse como bifásico donde una fracción de amilopectina se ha disuelto en la fase continua y la fase dispersa está constituida por gránulos hinchados total o parcialmente. Por otra parte, al aumentar la concentración de almidón,  $\Phi$  pierde su significado físico, no es posible tener fracciones volumen de partículas hinchadas mayores que la unidad sin destruir el gránulo.



**Figura 5.2.2-2.** a) Módulos dinámicos,  $G'$  (cuadrados),  $G''$  (círculos), y b) Ángulos de pérdida de pastas de almidón de maíz ceroso nativo. Temperatura de cocción de las pastas: 90 °C. Determinaciones realizadas a 25 °C.

Los resultados de hinchamiento-solubilidad confirman lo expuesto en la literatura en relación con la alta capacidad de hinchamiento de los almidones de cereal ceroso y como resultado de esta capacidad, la fragilidad del gránulo durante la preparación de las pastas (Tester y Morrison, 1990; Loh 1992; Ziegler *et al.*, 1993; Atkin *et al.*, 1998a). Por lo tanto, en estos sistemas no se cumple lo observado por Bagley y Christianson (1982), quienes predicen que en pastas de almidón lo suficientemente concentradas, los gránulos por ser partículas deformables se empacaran en forma tal que todo el volumen disponible lo ocupen estos gránulos hinchados.

De esta forma las pastas de almidón de maíz ceroso cocidas a temperatura máxima de 75 °C, sólo pueden describirse como "suspensión de gránulos hinchados dispersos en un medio macromolecular", cuando las concentraciones sean menores de 3%, en donde posiblemente existan también gránulos desintegrados pero predominan los gránulos hinchados inmersos en una solución macromolecular de amilopectina. Las pastas cuyas concentraciones son mayores o iguales a 3%, se adaptan más a la descripción de un sistema coloidal, con gránulos hinchados, gránulos parcialmente hinchados y gránulos desintegrados en un medio macromolecular compuesto por amilopectina en solución.

Los resultados reológicos de pastas de almidón a 3% mostraron que las pastas cocidas a 75 °C son más elásticas (valores de delta menores y módulos dinámicos mayores) que aquéllas cocidas a 90 °C. Estas diferencias se atribuyen a la existencia de sistemas no homogéneos compuestos por amilopectina en solución, gránulos fragmentados y gránulos hinchados cuya proporción depende del tratamiento aplicado. Así en las pastas cocidas a 75 °C existe mayor proporción de gránulos hinchados cuya deformabilidad contribuye de forma importante al comportamiento sólido del sistema (*plateau* elástico a bajas frecuencias,  $G' > G''$ ), mientras que las pastas cocidas a 90 °C tienen mayor amilopectina en solución y gránulos reventados que aún contribuyen al carácter sólido y elástico de las pastas pero en menor medida. Estas pastas se pueden describir como soluciones relativamente concentradas de amilopectina con restos de material sólido suspendido. Resultados similares se han reportado con pastas de almidón donde se usaron diferentes niveles de amilopectina en solución y desintegración granular (Closs *et al.*, 1999). Los resultados comprueban la fuerte influencia del gránulo (concentración, tamaño y distribución) en la reología del sistema y la fragilidad del gránulo en el tipo de almidón usado en este trabajo.

## 5.3 MEZCLAS ALMIDÓN-GELANA

### 5.3.1 Reología dinámica de mezclas con concentraciones de gelana 0.1 a 0.3% (m/m)

En esta sección se presentan los primeros estudios reológicos realizados en las mezclas almidón-gelana. Tomando como base los estudios reológicos de gelana reportados en la literatura y estudios previos realizados con este hidrocoloide (Rodríguez-Hernández y Tecante, 1999) se optó por trabajar con concentraciones de gelana en el intervalo de 0.3 a 0.5% utilizando 0.01 mol/dm<sup>3</sup> de CaCl<sub>2</sub> para inducir su gelificación. Las mezclas se prepararon dispersando el almidón en las soluciones de gelana hasta alcanzar 90 °C, como se describe en la sección de materiales y métodos.

La Figura 5.3.1-1 muestra el comportamiento de  $G'$  y  $G''$  en función de la frecuencia y los valores de delta de las mezclas almidón-gelana con concentraciones de ésta última entre 0.1 y 0.3%. En el intervalo de frecuencia evaluado, las mezclas mostraron espectros mecánicos característicos de geles fuertes. Los módulos (especialmente  $G'$ ) fueron poco dependientes de la frecuencia,  $G' \propto \omega^{0.1}$  (ver Cuadro 5.3.1-1),  $G' \gg G''$  en el intervalo de frecuencia analizado y las mezclas mostraron una zona de viscoelasticidad lineal estrecha (Cuadro B-1 del Anexo B), lo cual denota propiedades reológicas fuertemente dependientes de la deformación. Este comportamiento es el característico de geles de gelana sola y contrasta con el comportamiento reológico de pastas de almidón (símbolos negros en Figura 5.3.1-1), donde se observó una ligera dependencia de los módulos con la frecuencia y una zona lineal viscoelástica muy amplia (sistemas que fluyen a deformaciones altas sin fracturarse).

En los espectros mecánicos de la Figura 5.3.1-1 se observa que indistintamente de la concentración de almidón, la adición progresiva de gelana incrementó progresivamente los módulos dinámicos de las mezclas sin llegar éstos a ser mayores que los de gelana sola a la misma concentración que aquélla presente en la mezcla. En todos los casos las mezclas se ubicaron entre almidón solo y gelana sola. Para visualizar mejor el dominio de gelana en las mezclas, el Cuadro 5.3.1-2 muestra los valores del módulo de almacenamiento ( $G'$ ) a 1 rad/s en las diferentes mezclas almidón-gelana y en los componentes individuales.

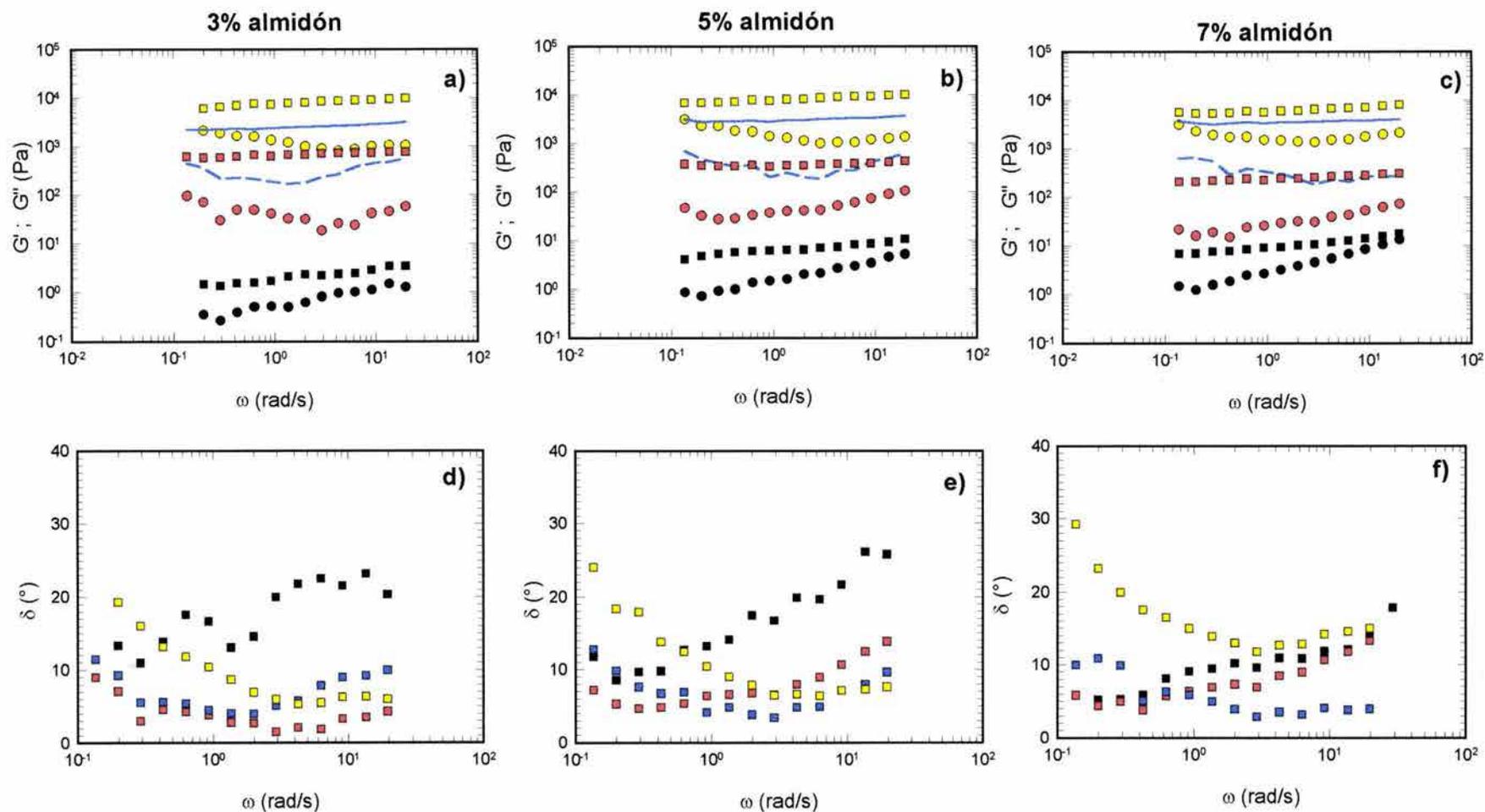
**Cuadro 5.3.1-1.** Dependencia de  $G'$  con la frecuencia ( $G' \propto \omega^a$ ). Mezclas almidón-gelana preparadas a 90 °C.

Almidón/Gelana	$a^{(1)}$
7/0.3	0.08
5/0.3	0.08
3/0.3	0.10
0/0.3	0.03
7/0.2	0.03
5/0.2	0.05
3/0.2	0.07
0/0.2	0.03
7/0.1	0.08
5/0.1	0.04
3/0.1	0.06
0/0.1	0.02
7/0.0	0.19
5/0.0	0.16
3/0.0	0.20

Donde  $a$  forma parte de la relación:  $G' \propto \omega^a$   
 $r^2 = 0.98$  a  $0.99$

**Cuadro 5.3.1-2.** Valores del módulo de almacenamiento ( $G'$ ) y del ángulo de pérdida de gelana (0.1 a 0.3%) y de las diferentes mezclas almidón-gelana. Valores a  $\omega = 1$  rad/s.

	Módulo de almacenamiento (Pa)				
	% gelana				
	0	0.1	0.2	0.3	
Gelana	-	744.0	3283.3	8646.6	
Gelana-3% almidón	1.7	634.0	2445.0	7355.0	
Gelana-5% almidón	6.2	332.0	2820.0	7596.6	
Gelana-7% almidón	6.2	228.0	3310.0	5555.0	
	Ángulo de pérdida (°)				
	Gelana	-	2.79	4.89	7.96
	Gelana-3% almidón	16.64	3.78	4.50	10.40
	Gelana-5% almidón	13.18	6.35	4.12	10.44
	Gelana-7% almidón	9.07	6.42	5.85	14.97

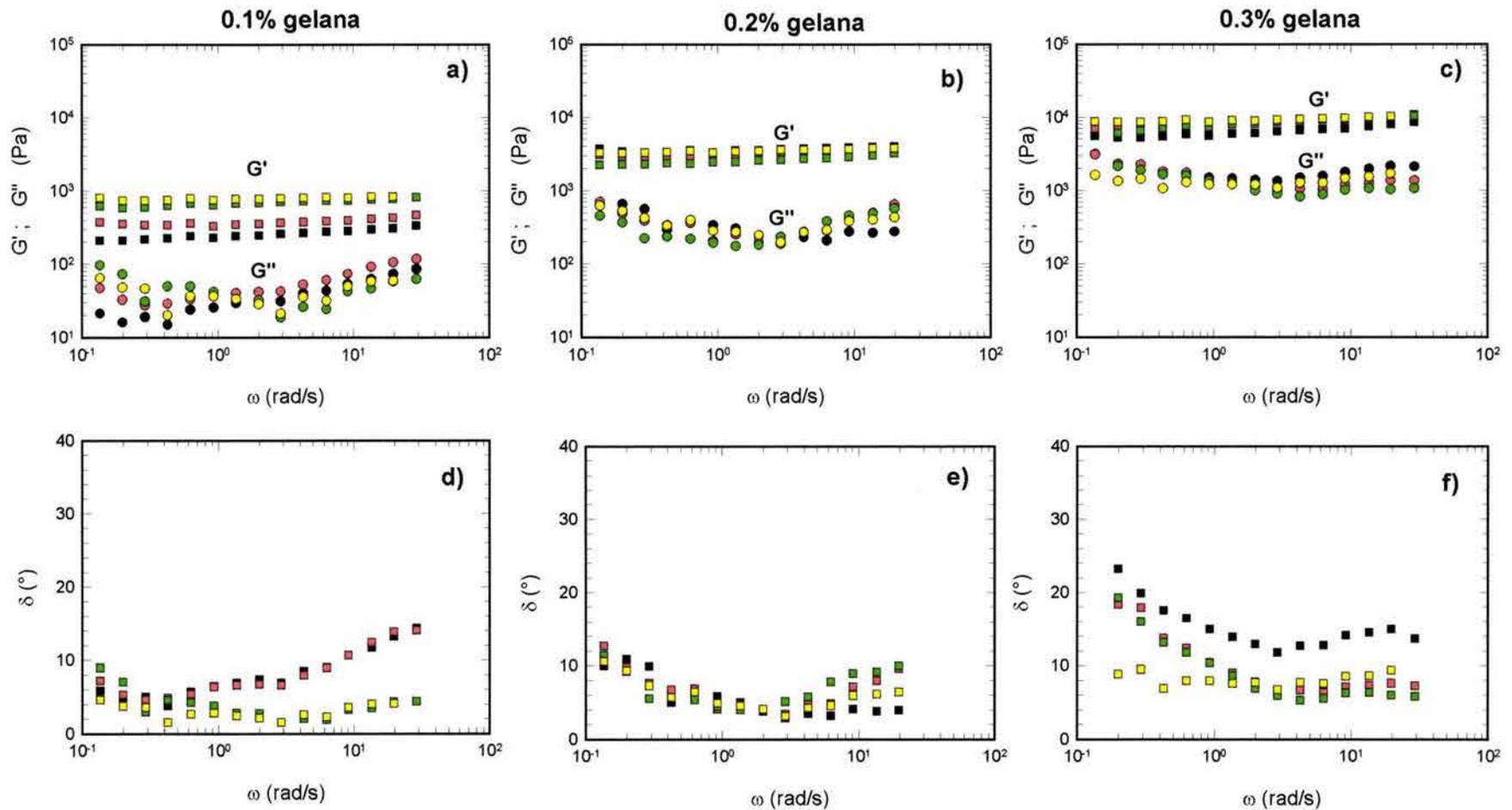


**Figura 5.3.1-1** Módulos dinámicos en función de la frecuencia ( $G'$ : cuadrados y línea continua,  $G''$ : círculos y línea discontinua) y ángulos de pérdida de mezclas almidón-gelana. a) y d) mezclas con 3% de almidón; b) y e) mezclas con 5% de almidón; c) y f) mezclas con 7% de almidón. Las concentraciones de gelana en las mezclas fueron: 0% (símbolos negros), 0.1% (símbolos rojos), 0.2% (símbolos y líneas azules) y 0.3% (símbolos amarillos). Determinaciones realizadas a 25 °C. No se muestran los espectros de gelana sola.

El comportamiento de los módulos dinámicos en función de la concentración de almidón fue más difícil de analizar, los espectros fueron muy parecidos e incluso se sobreponen en algunos casos. En la Figura 5.3.1-2 se observa que a diferencia del efecto de gelana, aquí el aumento progresivo de almidón afectó en menor medida los valores de los módulos (mezclas con 0.2% gelana) e incluso disminuyó el módulo de almacenamiento en algunos casos (mezclas con 0.1 y 0.3% gelana). Al parecer a las concentraciones usadas de gelana, se enmascaró el efecto de la concentración de almidón en la reología global de las mezclas.

Por otra parte, el ángulo de pérdida ( $\delta$ ) mostró comportamientos difíciles de interpretar. En la Figura 5.3.1-2 se puede observar de manera global el efecto de la concentración de gelana en los valores de los ángulos de pérdida de las mezclas. En las mezclas con 0.1% de gelana (Figura 5.3.1-2d) se notó el efecto de gelana y de almidón principalmente a frecuencias altas, el predominio de almidón en el sistema se manifestó en la clara tendencia a fluir en estos sistemas a medida que se incrementa la frecuencia de medición, tal como se manifestó en las pastas de almidón (símbolos negros en Figuras 5.3.1-1a, 5.3.1-1b y 5.3.1-1c). Por otro lado la mezcla con menor contenido de almidón mostró un comportamiento muy parecido a gelana sola a 0.1%, lo cual denota el dominio de gelana en la reología global de los sistemas a pesar de estar presente en menor proporción.

Las mezclas con 0.2% de gelana (Figura 5.3.1-2e) tuvieron prácticamente el mismo comportamiento sin importar el contenido de almidón en éstas (3 a 7%). Un comportamiento totalmente diferente se observó en las mezclas con 0.3% de gelana (Figura 5.3.1-2f), a bajas frecuencias el carácter elástico se incrementó al aumentar la frecuencia hasta llegar a un máximo (mínimo en  $\delta$ ) en 3 rad/s, en donde a partir de entonces prácticamente permaneció invariable. Es decir en estos geles el efecto de gelana se manifestó en el segundo ciclo logarítmico. Esto sugiere que durante la estructuración de estos sistemas se forman interacciones de vida corta las cuales proporcionan el carácter sólido viscoelástico en frecuencias de medición altas. Sin embargo, a medida que el tiempo de observación aumenta pareciera que la presencia de almidón dificulta la formación de redes de gelana con carácter más permanente.



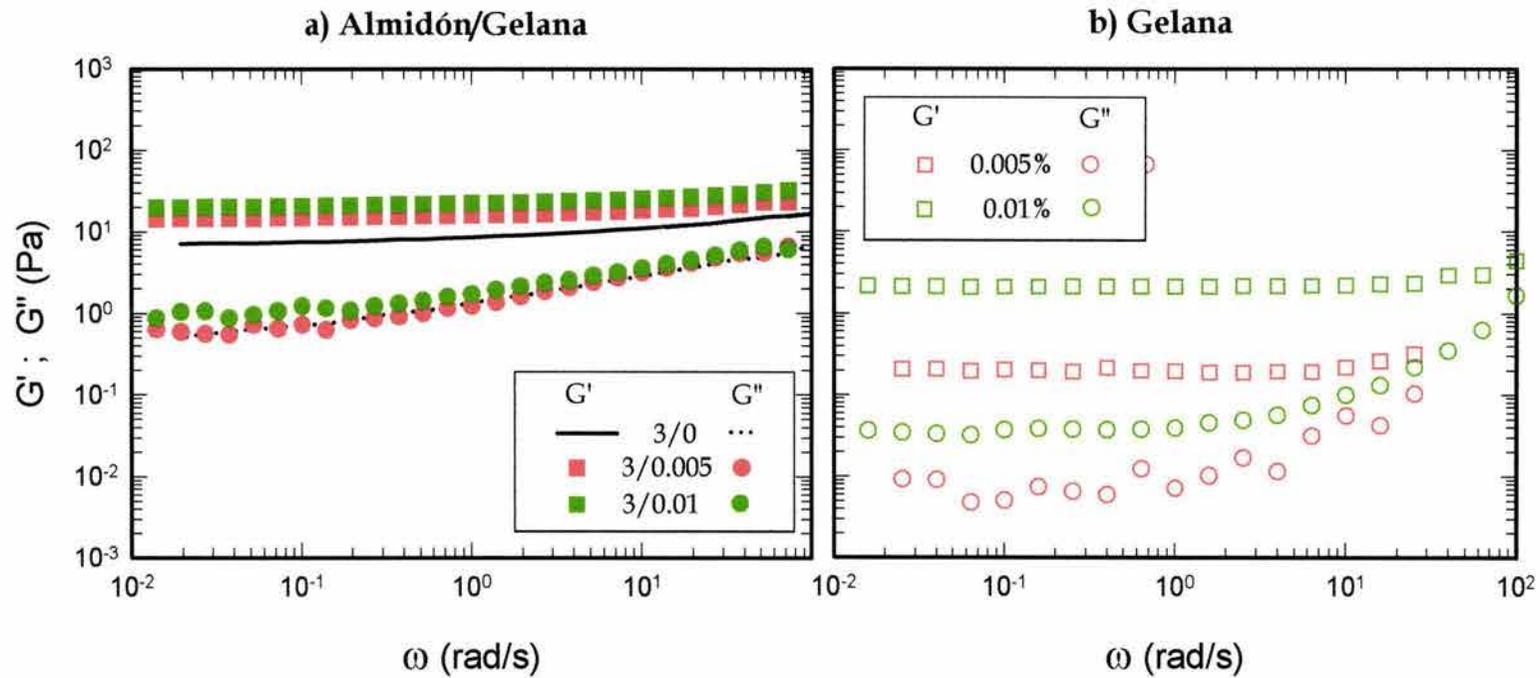
**Figura 5.3.1-2** Módulos dinámicos en función de la frecuencia ( $G'$ : cuadrados,  $G''$ : círculos) y ángulos de pérdida de mezclas almidón-gelana. a) y d) mezclas con 0.1% de gelana; b) y e) mezclas con 0.2% de gelana; c) y f) mezclas con 0.3% de gelana. Las concentraciones de almidón en las mezclas fueron: 7% (símbolos negros), 5% (símbolos rojos), 3% (símbolos verdes) y 0% (símbolos amarillos). Determinaciones realizadas a 25 °C. No se muestran los espectros de almidón solo.

### 5.3.2 Reología dinámica de mezclas con concentraciones de gelana $\leq 0.05\%$ (m/m)

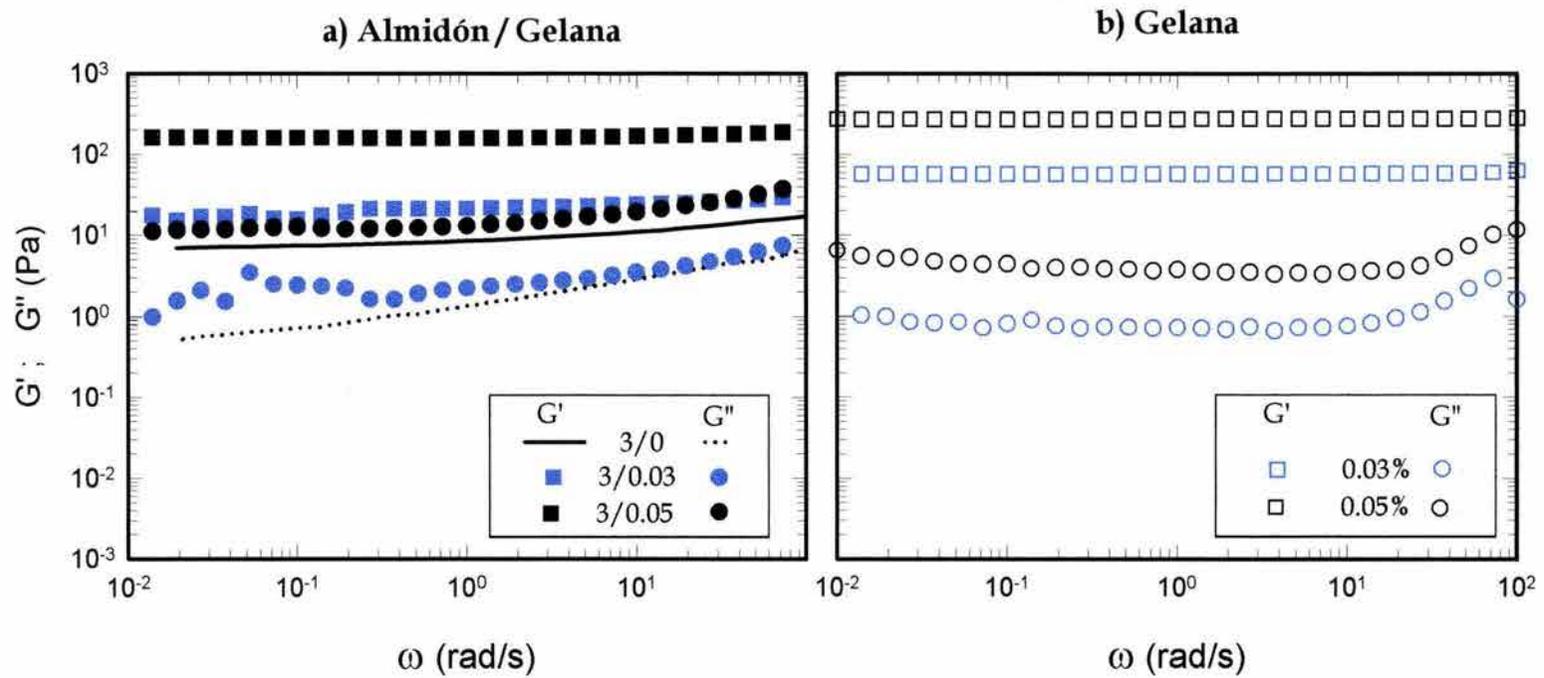
Los resultados previos mostraron un efecto marcado de gelana en la reología global de las mezclas almidón-gelana, sin embargo para entender la contribución de ambos polisacáridos, gelana y almidón, en la reología de sus mezclas y visualizar posibles interacciones entre los macrocomponentes, se estudiaron mezclas con concentraciones menores de gelana (0.005% a 0.05% m/m) manteniendo fija la concentración de almidón (3%) y la fuerza iónica del medio ( $\text{CaCl}_2$  0.01 mol/dm<sup>3</sup>). De igual forma se evaluaron mezclas con dos temperaturas diferentes de cocción de las pastas de almidón, 75 y 90 °C, con el fin de determinar la contribución del estado granular o fase dispersa de las pastas de almidón en la reología global de las mezclas.

Las Figuras 5.3.2-1 y 5.3.2-2 muestran la dependencia de los módulos dinámicos,  $G'$  y  $G''$ , con la frecuencia de: (a) las mezclas almidón-gelana preparadas a 75 °C y (b) geles de gelana a la misma concentración presente en las mezclas. Contrariamente a lo observado en otras mezclas gelana-polisacárido, la Figura 5.3.2-1 revela un comportamiento sinérgico en las propiedades viscoelásticas cuando las concentraciones de gelana en la mezcla son menores de 0.02%. Estas mezclas mostraron módulos dinámicos superiores a los componentes por separado. Adicionalmente, la presencia de gelana en las pastas de almidón llevó a la formación de un ligero *plateau* en  $G''$  a bajas frecuencias, el cual es poco evidente en almidón solo.

Por otra parte, la presencia de gelana en las mezclas con concentraciones superiores de 0.02% incrementó en mayor medida los valores de los módulos dinámicos de almidón e incluso  $G'$  presentó menor dependencia con la frecuencia (ver Cuadro 5.3.2-1), pero gelana sola mostró siempre los valores mayores de ambos módulos y éstos fueron menos dependientes de la frecuencia, como se observa en la Figura 5.3.2-2.



**Figura 5.3.2-1** Módulos dinámicos en función de la frecuencia de: (a) mezclas almidón-gelana preparadas a 75 °C y (b) gelana sola a la misma concentración presente en las mezclas (0.005% y 0.1%). Determinaciones realizadas dentro de la zona de viscoelasticidad lineal a 25 °C.



**Figura 5.3.2-2** Módulos dinámicos en función de la frecuencia de: (a) mezclas almidón-gelana preparadas a 75 °C y (b) gelana sola a la misma concentración presente en las mezclas (0.03% y 0.05%). Determinaciones realizadas dentro de la zona de viscoelasticidad lineal a 25 °C.

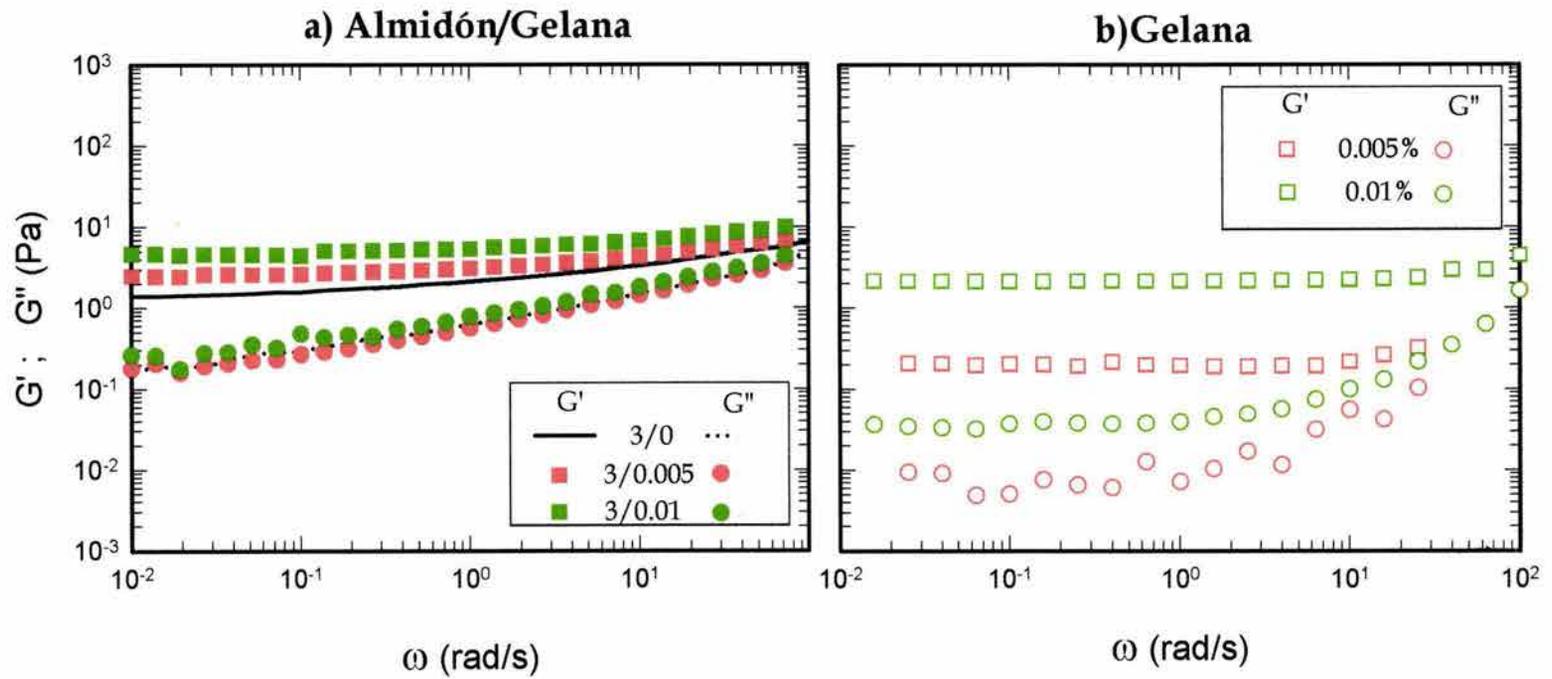
**Cuadro 5.3.2-1.** Dependencia de  $G'$  con la frecuencia ( $G' \propto \omega^a$ ). Mezclas almidón-gelana preparadas a 75 °C y 90 °C, y geles de gelana

Almidón/Gelana ( $T_p = 75\text{ °C}$ )	$a^{(1)}$	Almidón/Gelana ( $T_p = 90\text{ °C}$ )	$a$	Gelana	$a$
3/0	0.100	3/0	0.170		
3/0.005	0.057	3/0.005	0.114	0.005	0.031
3/0.01	0.053	3/0.01	0.087	0.01	0.044
3/0.02	-	3/0.02	0.057	0.02	0.008
3/0.03	0.068	3/0.03	0.050	0.03	0.005
3/0.04	-	3/0.04	0.047	0.04	0.004
3/0.05	0.016	3/0.05	0.037	0.05	0.003

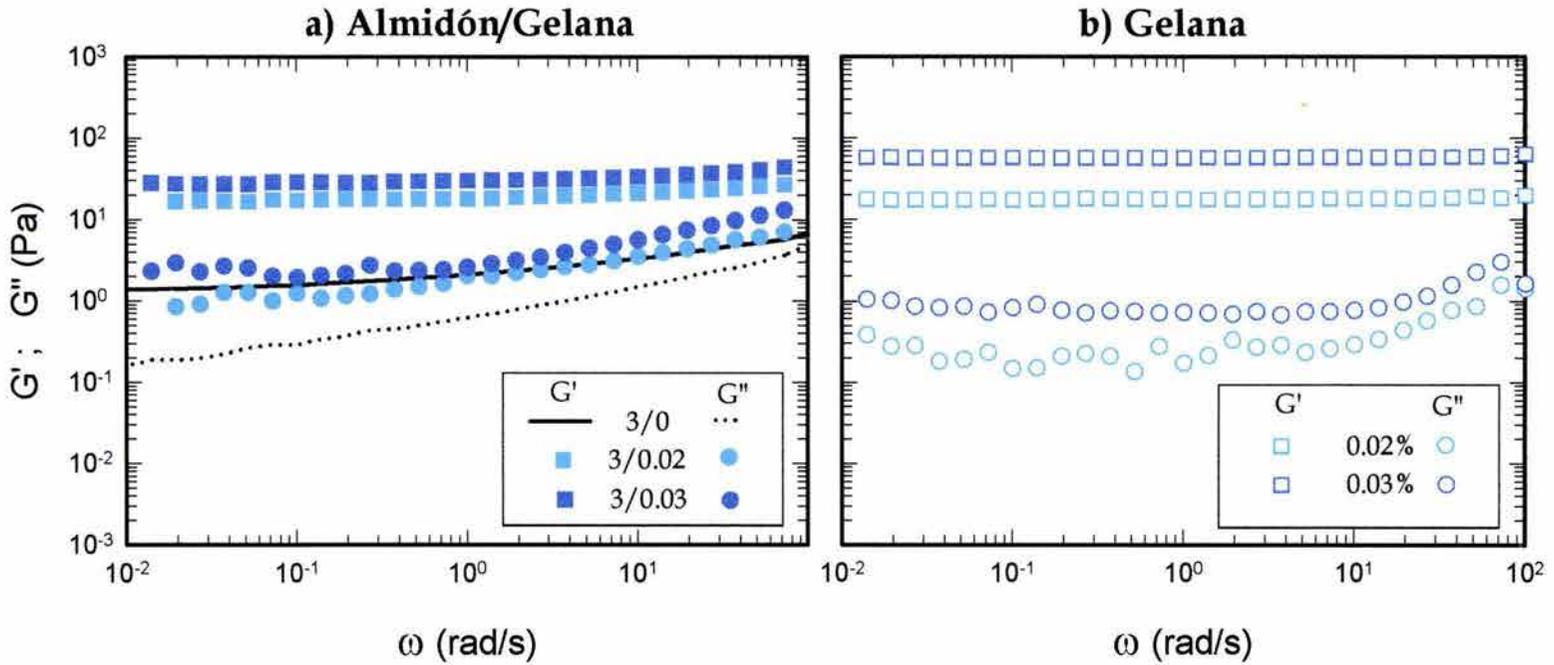
<sup>(1)</sup>Donde  $a$  forma parte de la relación:  $G' \propto \omega^a$ , ( $r^2: 0.83-0.96$ )  
 $T_p$ : Temperatura de preparación

Las Figuras 5.3.2-3, 5.3.2-4 y 5.3.2-5 muestran el comportamiento de los módulos dinámicos,  $G'$  y  $G''$ , en función de la frecuencia de las mezclas preparadas a 90 °C. Cualitativamente el comportamiento reológico fue similar a las mezclas anteriores pero los valores de los módulos fueron en todos los casos inferiores a las mezclas correspondientes cocidas a 75 °C. Como se puede observar en las figuras citadas, el incremento de la concentración de gelana en las mezclas generó módulos progresivamente mayores a la pasta de almidón. Además, a medida que se incrementó la concentración de gelana en las mezclas, la dependencia de  $G'$  con la frecuencia se ve disminuida (Cuadro 5.3.2-1).

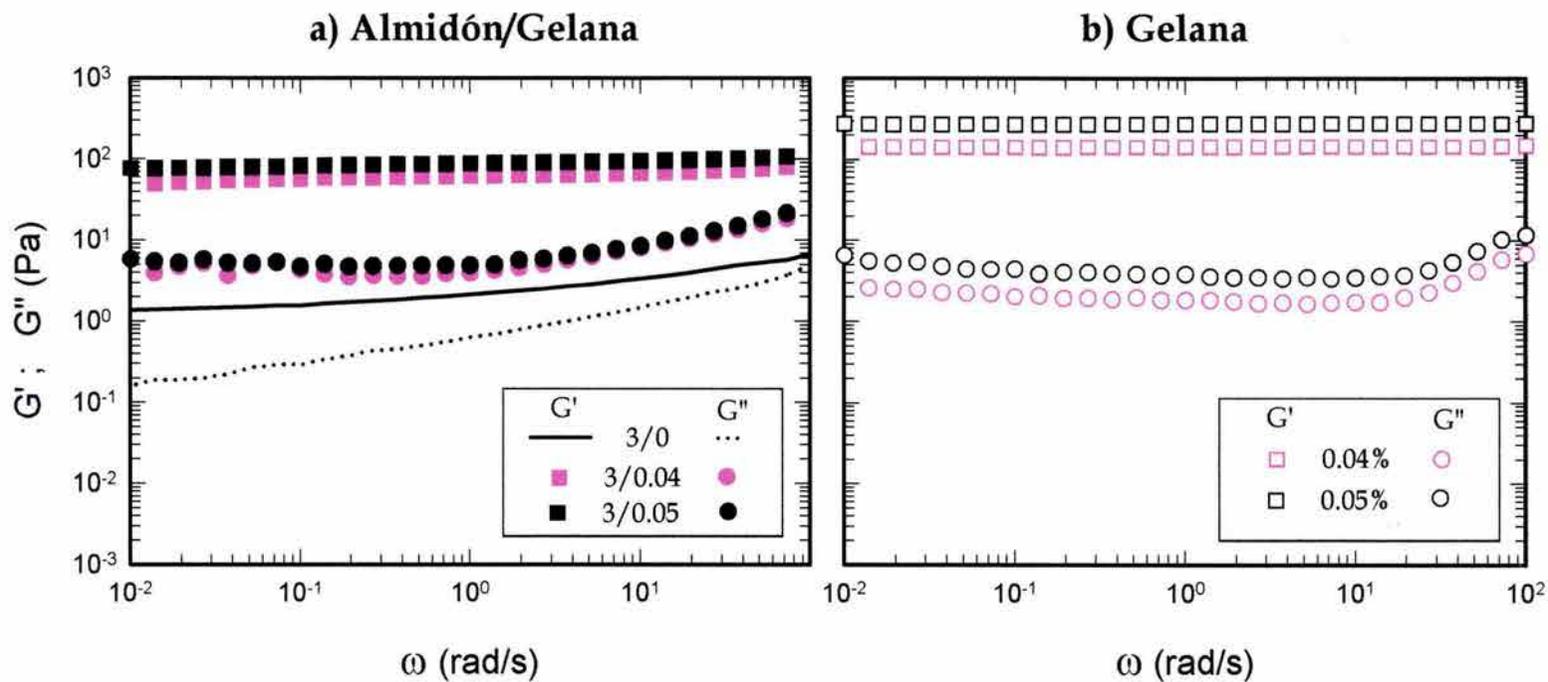
Por otra parte,  $G''$  también se afectó por la incorporación de gelana en las mezclas cocidas a 90 °C. A concentraciones bajas de gelana (Figura 5.3.2-3),  $G''$  tuvo valores cercanos a los de almidón solo e incluso genera un trazo paralelo, mientras que a concentraciones mayores de gelana (Figura 5.3.2-4 y 5.3.2-5) los valores de este módulo evidencian la formación de un *plateau* a bajas frecuencias de medición, el cual se amplía al incrementarse el contenido de gelana en las mezclas. Al comparar los espectros de las mezclas con los respectivos a gelana sola, se distingue que a bajas concentraciones de gelana los módulos de las mezclas fueron mayores que los del gel de gelana a la misma concentración presente en la mezcla respectiva. De forma similar a las mezclas preparadas a 75 °C, las concentraciones de gelana menores de 0.02% en almidón al 3% cocido a 90 °C, muestran sinergia en sus propiedades viscoelásticas. Por otra parte, a concentraciones mayores de gelana en la mezcla los valores de los módulos siempre fueron intermedios entre almidón al 3% y gelana a la misma concentración presente en la mezcla.



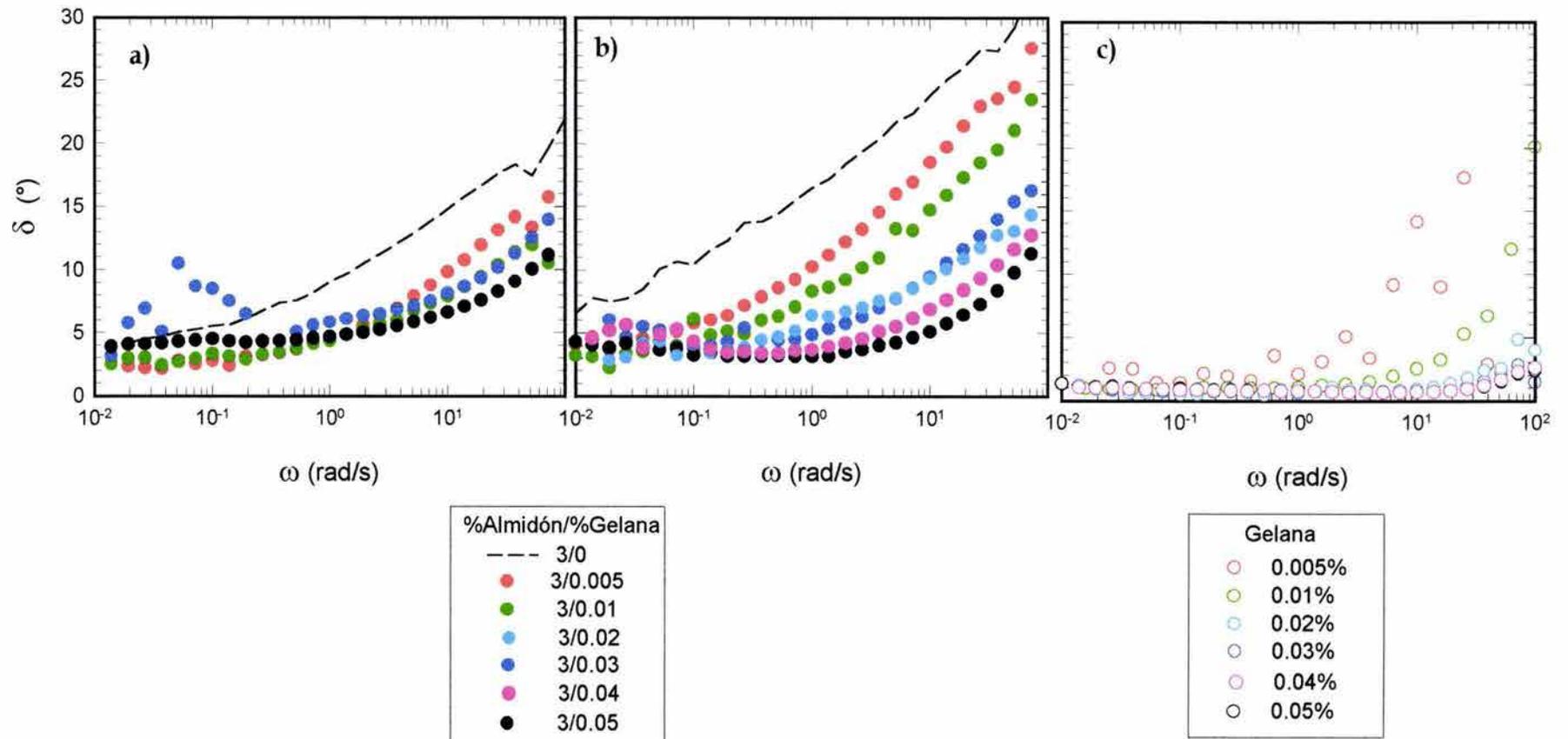
**Figura 5.3.2-3** Módulos dinámicos en función de la frecuencia de: (a) mezclas almidón-gelana preparadas a 90 °C y (b) gelana sola (0.005 y 0.01%). Determinaciones realizadas dentro de la zona de viscoelasticidad lineal a 25 °C.



**Figura 5.3.2-4** Módulos dinámicos en función de la frecuencia de: (a) mezclas almidón-gelana preparadas a 90 °C y (b) gelana sola (0.02% y 0.03%). Determinaciones realizadas dentro de la zona de viscoelasticidad lineal a 25 °C



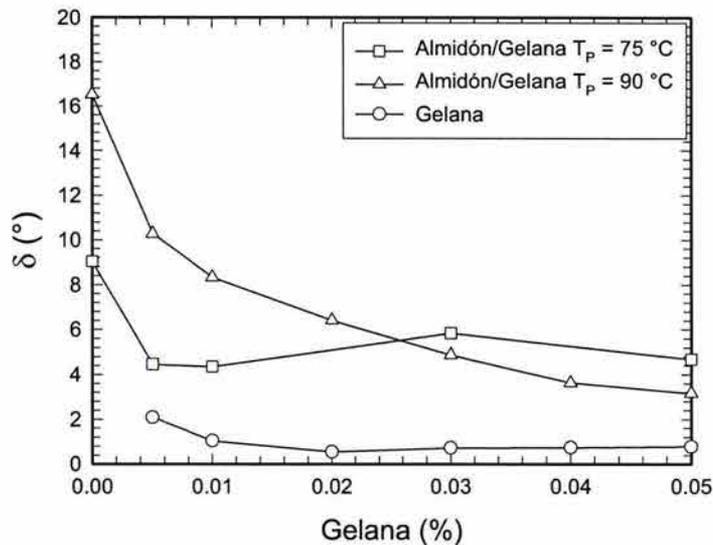
**Figura 5.3.2-5** Módulos dinámicos en función de la frecuencia de: (a) mezclas almidón-gelana preparadas a 90 °C y (b) gelana sola (0.04% y 0.05%). Determinaciones realizadas dentro de la zona de viscoelasticidad lineal a 25 °C



**Figura 5.3.2-6** Ángulos de pérdida de mezclas almidón-gelana preparadas a: (a) 75 °C, (b) 90 °C y (c) gelana sola. La concentración de almidón en todas las mezclas fue 3% .

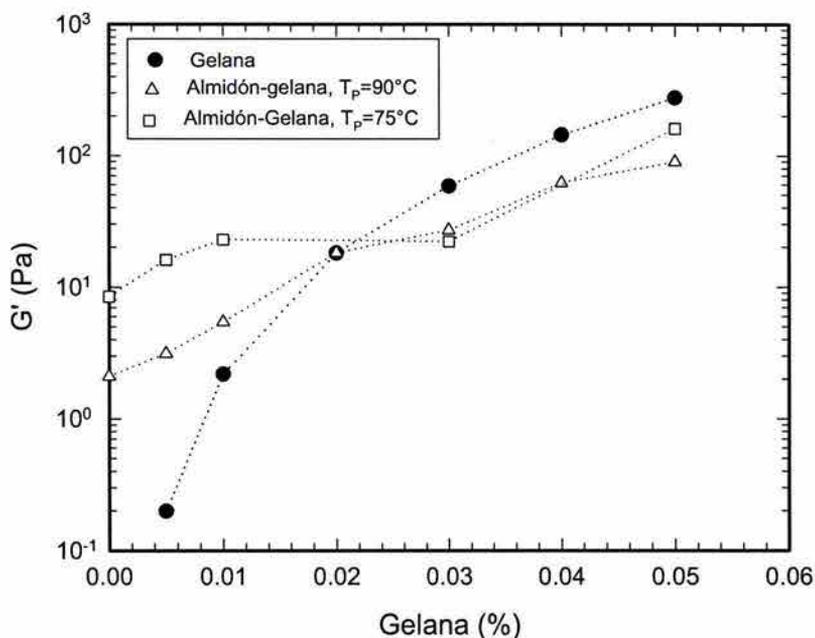
La Figura 5.3.2-6 muestra los ángulos de pérdida de las mezclas preparadas a 75 °C (Figura 5.3.2-6a), 90 °C (Figura 5.3.2-6b) y los ángulos de pérdida de los geles de gelana a las concentraciones presentes en las mezclas anteriores (Figura 5.3.2-6c). Las mezclas preparadas a 75 °C tuvieron valores de delta menos dependientes de la frecuencia y menores a los correspondientes a las mezclas preparadas a 90 °C. Sin embargo, al incrementarse la concentración de gelana (> 0.03%) en las mezclas, los valores de delta entre ambos procesos de preparación difieren poco e incluso las mezclas preparadas a 90 °C muestran valores menos dependientes de la frecuencia en el intervalo  $10^{-2}$  a 1 rad/s. No obstante, de forma general, el comportamiento de delta en función de la frecuencia de oscilación mostró que los sistemas preparados a 75 °C fueron más sólido-viscoelásticos que sus contrapartes preparadas a 90 °C.

La Figura 5.3.2-7 muestra los valores del ángulo de pérdida ( $\delta$ ), a  $\omega = 1\text{rad/s}$ , de los sistemas estudiados en función de la concentración de gelana. A diferencia del comportamiento observado en el módulo de almacenamiento, los valores de delta de las mezclas, independientemente de la temperatura de cocción de las pastas, fueron siempre mayores a los de gelana sola, lo cual destaca las propiedades gelificantes de gelana aún a bajas concentraciones como se discutió en la sección 5.1. Por otra parte, la Figura 5.3.2-7 muestra que a medida que se incrementó la concentración de gelana en las mezclas preparadas a 90 °C, los valores de delta disminuyeron progresivamente aludiendo a un carácter más elástico de los sistemas mixtos debido a la incorporación de gelana. Contrariamente este efecto no se observó en los sistemas preparados a 75 °C, en estas mezclas la presencia de 0.005% de gelana disminuyó notoriamente los valores del ángulo de pérdida de la pasta de almidón, y comparando los valores de delta de ambas temperaturas de cocción, las pastas cocidas a 75 °C fueron más elásticas que aquéllas preparadas a 90 °C solamente en el intervalo de concentración de gelana de 0.005 a 0.01%, concentraciones mayores de gelana tuvieron poco efecto en el predominio del carácter elástico sobre el viscoso de las mezclas preparadas a 75 °C



**Figura 5.3.2-7** Ángulos de pérdida ( $\delta$ ) en función de la concentración de gelana. Mezclas preparadas a  $75\text{ }^\circ\text{C}$  (cuadrados),  $90\text{ }^\circ\text{C}$  (triángulos) y gelana sola (círculos). Determinaciones realizadas dentro de la zona de viscoelasticidad lineal a  $1\text{ rad/s}$  y  $25\text{ }^\circ\text{C}$ .

La Figura 5.3.2-8 muestra la dependencia de  $G'$  con el contenido de gelana tanto en sistemas monocomponentes (geles de gelana) como en los sistemas mixtos. Es evidente, de acuerdo con esta figura, la creación de sistemas con sinergia cuando la concentración de gelana es menor a  $0.02\%$ . Independientemente del tratamiento térmico aplicado a las mezclas, existe una contribución importante de ambos macrocomponentes, almidón y gelana, en la reología global del sistema. Sin embargo, cuando la concentración de gelana es mayor de  $0.02\%$ , la reología del sistema es dominada por el componente gelificante (gelana), existiendo poca diferencia entre las mezclas preparadas a  $90\text{ }^\circ\text{C}$  y aquellas preparadas a  $75\text{ }^\circ\text{C}$ , en lo referente tanto a  $G'$  como a  $\delta$ . Este dominio de gelana en la reología de sistemas mezclados recuerda lo observado en las mezclas con mayores concentraciones de gelana ( $0.1$  a  $0.3\%$ ) (sección 5.3.1) y lo reportado en otros estudios (Papageorgiou *et al.*, 1994; Nishinari *et al.*, 1996; Miyoshi *et al.*, 1996; Rodríguez-Hernández y Tecante 1999).



**Figura 5.3.2-8** Módulo de almacenamiento ( $G'$ ) en función de la concentración de gelana en las mezclas con 3% de almidón. Mezclas preparadas a 90 °C (triángulos), 75 °C (cuadrados) y gelana sola (círculos). Determinaciones realizadas dentro de la zona de viscoelasticidad lineal a  $\omega = 1 \text{ rad/s}$  y 25 °C.

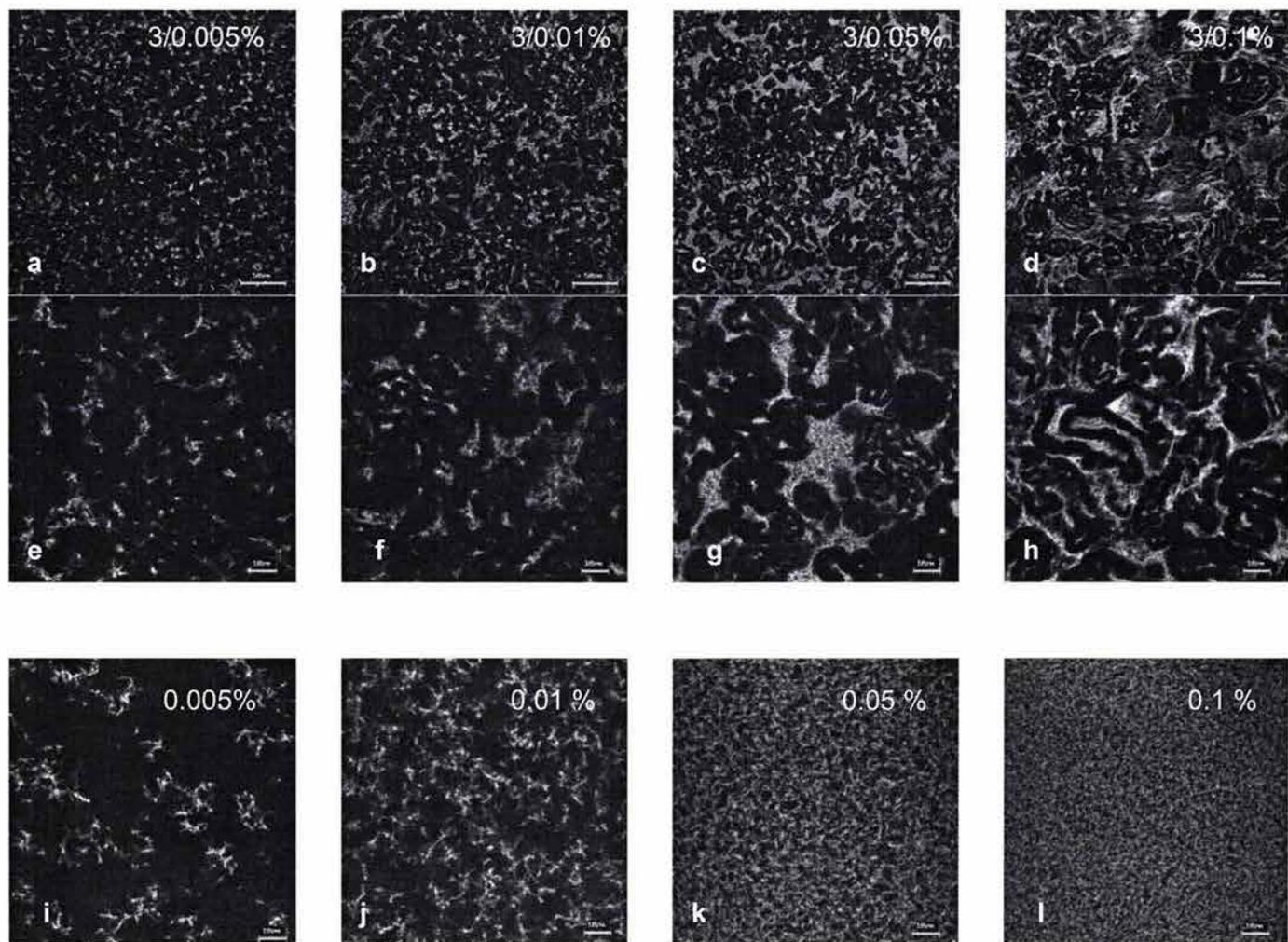
### 5.3.3 Microestructura de mezclas almidón-gelana

La microestructura de las mezclas almidón-gelana se observó a través de microscopía confocal láser ligando un cromóforo fluorescente solamente a la molécula de gelana. El almidón no fue etiquetado fluorescentemente debido a su fragilidad. Consecuentemente, las microfotografías muestran zonas brillantes (blancas), correspondientes a la fluorescencia de gelana, en un fondo oscuro donde se presume existe sólo almidón y agua. La Figura 5.3.3-1 muestra las microfotografías de las mezclas preparadas a 75 °C (a-h), para facilitar su discusión se han incluido las microfotografías de gelana en la parte inferior. Las observaciones al microscopio revelaron diferencias en la organización estructural de gelana cuando ésta se haya en presencia de almidón. Si se compara la microestructura de la mezcla 3/0.005 con gelana 0.005%, la mezcla evidenció zonas más

compactas de gelana con grandes espacios sin fluorescencia (zonas oscuras), irregularmente distribuidos y que se pueden atribuir a zonas ricas en almidón. En contraste, gelana 0.005% mostró una red tenue, no compacta y poco interconectada, con grandes zonas libres de gelana.

La gelatinización de almidón en presencia de gelana generó rasgos distintivos, las microfotografías *b, c, d* revelaron la presencia de grandes zonas libres de gelana que promueven que ésta se asocie formando zonas ricas en gelana muy compactas, lo cual se observa con mayor detalle en las microfotografías *f, g, h*. De acuerdo con las observaciones al microscopio óptico de las pastas de almidón preparadas a 75 °C y a las características de hinchamiento del tipo de almidón usado (sección 5.2), es razonable suponer que esos espacios libres de gelana son gránulos hinchados rodeados de una red de gelana gradualmente más compacta a medida que la concentración de ésta se incrementa. Este fenómeno de exclusión de gelana por la presencia de gránulos hinchados en la mezcla fue más marcado en las concentraciones mayores de gelana (0.05% y 0.1%), donde es evidente incluso la distorsión de las zonas atribuidas a los gránulos de almidón (micrografía *h*) y la formación de zonas muy compactas de gelana

En el mismo sentido, la microestructura de las mezclas preparadas a 90 °C y su comparación con gelana sola a la misma concentración, se muestra en la Figura 5.3.3-2. La co-gelificación de gelana en presencia de almidón disuelto, gránulos fragmentados y gránulos hinchados (pastas de almidón cocidas a 90 °C), generaron estructuras diferentes a los sistemas previos. Las mezclas con bajas concentraciones de gelana, 0.005% y 0.01%, mostraron una estructura con redes de gelana mejor distribuidas (microfotografías *a, b, f, g*), incluso la asociación de las redes de gelana en la mezcla fue más homogénea que en los geles de gelana sola (microfotografías *k, l*).

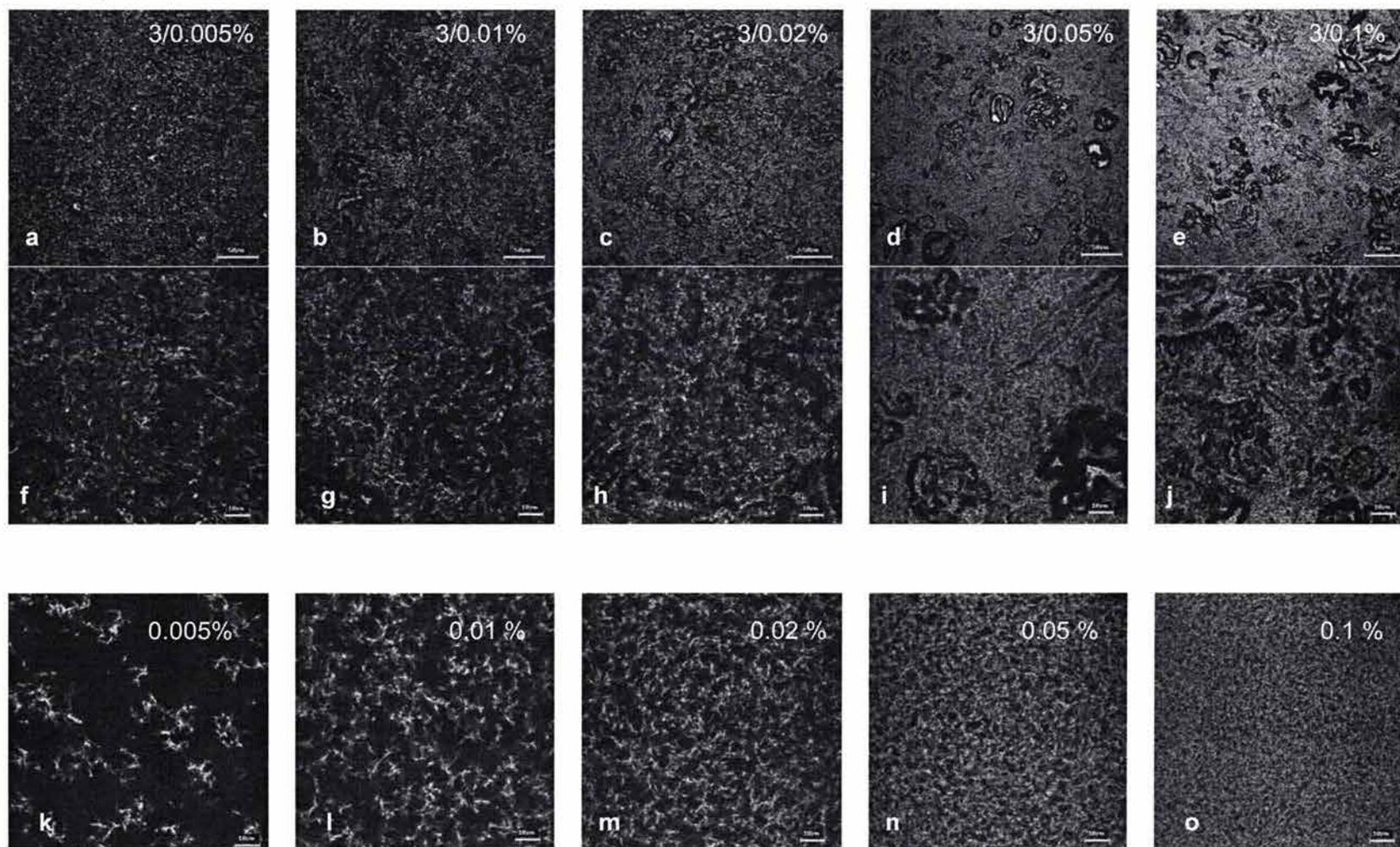


**Figura 5.3.3-1.** Microfotografías confocal de barrido láser de mezclas almidón-gelana (*a-h*) en  $0.01 \text{ mol/dm}^3$  de  $\text{CaCl}_2$ , preparadas a  $75 \text{ }^\circ\text{C}$ . La concentración de almidón en todas las mezclas fue 3% y la de gelana: 0.005% (*a* y *e*), 0.01% (*b* y *f*), 0.05% (*c* y *g*) y 0.1% (*d* y *h*). Las figuras *i*, *j*, *k* y *l* muestran la microestructura de gelana a la misma concentración presente en las mezclas anteriores. Las barras representan  $50 \text{ }\mu\text{m}$  en las micrografías *a-d* y  $10 \text{ }\mu\text{m}$  en *e-l*. Las observaciones al microscopio se realizaron a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Por otra parte, concentraciones mayores de gelana en las mezclas generaron estructuras de gelana más compactas alternadas entre espacios sin fluorescencia, que como en el caso anterior se presume sean zonas ricas en almidón (microfotografías *c, d, e*). La ampliación de las microfotografías anteriores (*h, i, j*) hace posible distinguir zonas irregulares libres de gelana que promueven que ésta se agreguen en dominios formando estructuras más compactas pero a diferencia de las mezclas anteriores, con redes más interconectadas debido a la irregularidad en las zonas de almidón, presumiblemente por que la mayoría de los gránulos han perdido su integridad durante el cocimiento de la pasta. Sin embargo, a pesar de existir mayor continuidad de la red de gelana y espacios libres de ésta más pequeños, la estructura de las mezclas es completamente diferente de la presentada por los geles de gelana respectivos, la presencia de gránulos remanentes o incluso fragmentos de éstos generan irregularidades en la red de gelana.

#### 5.3.4 Discusión

Las propiedades viscoelásticas de mezclas almidón de maíz ceroso con gelana, cuando ésta se usó a concentraciones mayores de 0.05%, estuvieron dominadas por el componente gelana. La presencia de pequeñas cantidades de gelana incrementó notablemente los módulos y aumentó la elasticidad de las mezclas; sin embargo, estas características siempre fueron superiores en geles de gelana sola a la misma concentración. El efecto de almidón en las propiedades viscoelásticas de las mezclas se manifestó principalmente en la ampliación de la zona lineal. El uso de concentraciones bajas de gelana permitió observar la contribución de almidón en la reología global de las mezclas e incluso distinguir sinergia en estas mezclas. Por otra parte el uso de dos temperaturas de preparación de las mezclas proporcionó evidencias del efecto que tienen los gránulos de almidón gelatinizados en el carácter elástico del sistema. De acuerdo con los resultados de la sección 5.2.2, el carácter sólido viscoelástico de las pastas de almidón está fuertemente influenciado por la integridad y extensión del hinchamiento del gránulo.



**Figura 5.3.3-2.** Microfotografías confocal de barrido láser de mezclas almidón-gelana (*a-j*) en  $0.01 \text{ mol/dm}^3$  de  $\text{CaCl}_2$ , preparadas a  $90 \text{ }^\circ\text{C}$ . La concentración de almidón en todas las mezclas fue 3% y la de gelana: 0.005% (*a* y *f*), 0.01% (*b* y *g*), 0.02% (*c* y *h*), 0.05% (*d* e *i*) y 0.1% (*e* y *j*). Las figuras *k*, *l*, *m*, *n*, *o* muestran la microestructura de gelana a la misma concentración presente en las mezclas anteriores. Las barras representan  $50 \mu\text{m}$  en las micrografías *a-e* y  $10 \mu\text{m}$  en *f-o*. Las observaciones al microscopio se realizaron a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Existe por supuesto la interrogante del papel que tiene el hidrocoloide en el hinchamiento del gránulo. Como se discutió en la sección 2.6, existen algunos estudios que muestran diferencias en la cantidad de amilosa disuelta durante la gelatinización del almidón, en ausencia y en presencia de hidrocoloide, lo cual hace suponer que este último restringe el hinchamiento del gránulo y ese hinchamiento menor retarda su desintegración durante la cocción de las pastas (Conde-Petit *et al.*, 1997). Otros estudios han supuesto que durante el hinchamiento del gránulo de almidón, el hidrocoloide promueve la adhesión de gránulos (Abdulmola *et al.*, 1996a) o bien que al incrementarse la viscosidad de la fase continua debido a la presencia del hidrocoloide, la transferencia de calor durante la cocción de las pastas se ve disminuida provocando menores grados de hinchamiento en los gránulos (Krüger *et al.*, 2003).

En este estudio no fue posible constatar si existieron diferencias en el hinchamiento del gránulo de almidón debido a la presencia de gelana. Como se mencionó en la sección 5.2.1 y en la revisión bibliográfica (sección 2.4) el gránulo de almidón de maíz ceroso nativo se caracteriza por sus valores grandes de hinchamiento y su extrema fragilidad durante la cocción de las pastas, por lo que las técnicas convencionales de sedimentación para cuantificar la fase dispersa en las pastas de almidón no pudieron ser aplicadas ni en las pastas ni en sus mezclas con gelana, donde la complejidad de los sistemas fue aún mayor. Por otra parte, el almidón no fue etiquetado fluorescentemente para no dañar la estructura del gránulo, consecuentemente, no se visualizó durante el análisis de microscopía confocal láser, esto podría haber dado evidencias de su grado de hinchamiento en presencia y ausencia de gelana.

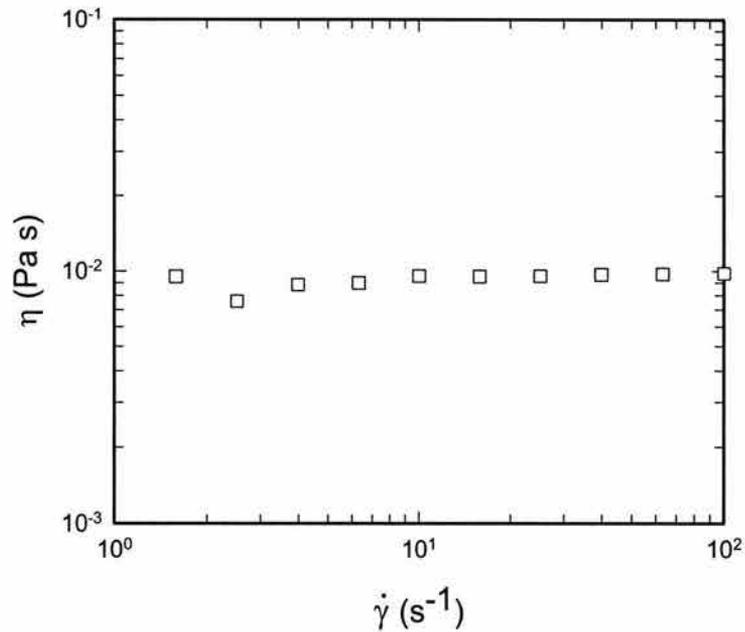
No obstante, a diferencia de la mayoría de los estudios de mezclas almidón-hidrocoloide, en este trabajo no se usó un hidrocoloide espesante sino un agente gelificante cuyas concentraciones fueron considerablemente inferiores (0.005 a 0.05%) a las típicamente usadas en otros estudios (> 0.1%). Con base en esas bajas concentraciones de gelana, es posible suponer que el proceso de hinchamiento del gránulo no está afectado debido a la presencia de gelana en la fase continua. La Figura 5.3.4-1 muestra la viscosidad de una

solución de gelana de 0.5% a 25 °C. Esta concentración es superior a la máxima concentración de gelana usada en este trabajo, y como se puede observar el comportamiento reológico de esta solución es Newtoniano con una viscosidad de  $9.26 \pm 0.65$  mPa en el intervalo de velocidad de cizalla evaluado. Por lo tanto se puede afirmar que las viscosidades de gelana (0.005 a 0.3%) durante el proceso de cocción de las pastas de almidón ( $T > 65$  °C), cuando aún no se adicionan los iones de calcio, debió ser inferior a la mostrada en la Figura 5.3.4-1, por lo que es poco factible que la transferencia de calor en las mezclas se modifique sustancialmente de manera tal que interfiera en el hinchamiento del gránulo de almidón.

Consecuentemente, teniendo en mente que ambos polímeros, gelana y almidón, se encuentran presentes desde el inicio de la gelatinización, se asume que durante el calentamiento de la mezcla, la gelana se dispersa y se disuelve en el medio continuo existiendo en conformación desordenada a temperaturas mayores a 62 °C donde de acuerdo con lo reportado se inicia la gelatinización de este tipo de almidón (ver Cuadro 2.4-1). Por lo tanto, durante el proceso de calentamiento de la mezcla, el gránulo de almidón se hincha libremente dentro de la solución de gelana, sin que la presencia de ésta interfiera significativamente en su capacidad de absorber agua del medio, y una vez concluida la cocción de las pastas, existirá una población de gránulos con diferentes extensiones de hinchamiento y/o fragmentos de gránulos inmersos en una solución macromolecular de gelana y amilopectina, esta última liberada del gránulo y parcialmente disuelta en el medio continuo durante el tratamiento térmico. Por lo tanto, durante el enfriamiento de las mezclas, la gelana pasa a su conformación ordenada ( $T = 36.5$  °C, sección 5.1) y gelifica debido a la presencia de  $\text{CaCl}_2$  en el medio dando origen a redes de gelana más o menos interconectadas que atrapan a las entidades granulares previamente formadas como se observa en las Figuras 5.3.3-1 y 5.3.3-2.

Los resultados evidencian que las propiedades reológicas de las mezclas almidón de maíz ceroso nativo con gelana están regidos por dos factores principales: a) la extensión del hinchamiento e integridad del gránulo, y b) la concentración de gelana en la mezcla. En

este sentido, la reología y microestructura de las mezclas revelaron dos regímenes de concentración de gelana: 0.005-0.02% y 0.03-0.1%, observándose efectos singulares en el primer régimen.



**Figura 5.3.4-1.** Viscosidad de gelana 0.5% (m/m) en solución acuosa sin adición de iones. Determinaciones realizadas a 25 °C en cilindros concéntricos reómetro RFS II.

Cuando gelana está presente en bajas concentraciones en la mezcla (0.005 a 0.02%), el almidón tiene una fuerte contribución a la reología global, éste proporciona partículas hinchadas y gelana construye una red rodeando dichas partículas (microfotografías *e, f* de Figura 5.3.3-1 y *f, g, h* de Figura 5.3.3-2), esta sinergia hace posible tener mezclas con mayores propiedades elásticas. Sin embargo, aun cuando en ambos procesos de preparación de las mezclas, cocción a 75 °C y a 90 °C, se generaron sistemas con sinergia, las propiedades viscoelásticas de las mezclas no fueron del mismo orden de magnitud. Las mezclas cocidas a 75 °C generaron sistemas compuestos, *composite systems* (Figura 5.3.3-1a y 5.3.3-1b), donde el comportamiento sólido-viscoelástico estuvo dominado por las

partículas hinchadas de almidón y la gelana tuvo un papel secundario debido a que a las concentraciones usadas, ésta muestra una red con baja interconectividad (Figura 5.3.3-1i, 5.3.3-1j), no permanente con tendencia a fluir en tiempos cortos de observación (Figura 5.1.2-1a).

Por otra parte, cuando los contenidos de gelana en las mezclas fueron 0.03 a 0.1%, no se presentaron mezclas con sinergia en ninguno de los dos procesos de preparación. En comparación con los geles de gelana respectivos, el carácter elástico de las mezclas es menos prominente debido a “interrupciones en la red” por la presencia de gránulos hinchados y fragmentados dentro de la matriz de gelana. La microscopía de las mezclas cocidas a 75 °C mostró grandes zonas, atribuidas a los gránulos hinchados, que promueven la formación de zonas ricas en gelana (microscopías *g* y *h* de Figura 5.3.3-1) en donde ésta forma redes densas que no son capaces de incrementar el carácter elástico del sistema debido a que su interconectividad a través del volumen de la mezcla es reducida si se comparara con los geles de gelana sola a la misma concentración (microscopías *k* y *l* de Figura 5.3.3-1). Esto generó que las propiedades elásticas de estas mezclas (i.e.  $G'$  y  $\delta$ ) fueran inferiores a los de gelana sola.

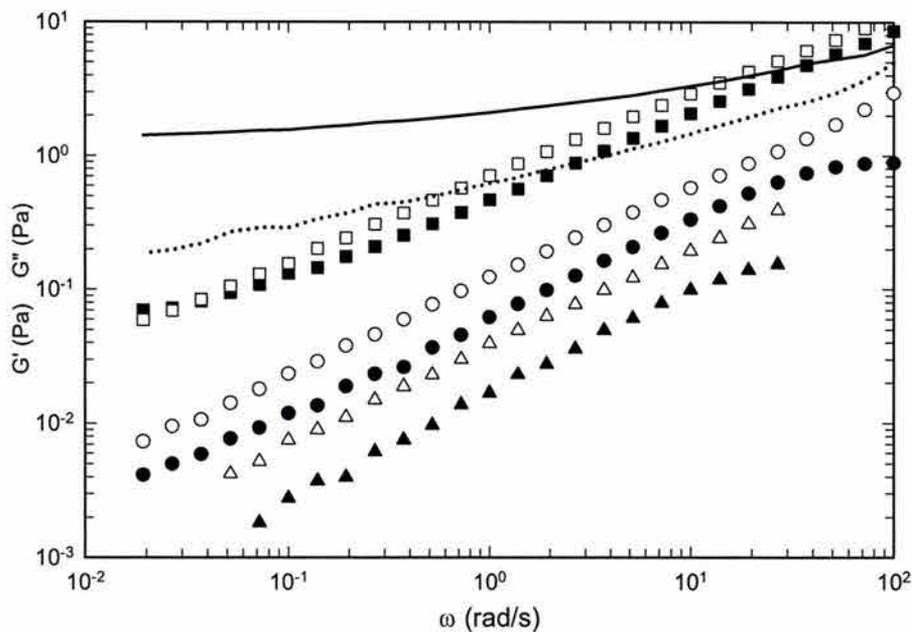
En contraste, las mezclas preparadas a 90 °C con los mismos contenidos de gelana (i.e. 0.03 a 0.1%), mostraron mayor destrucción de gránulos hinchados pero paradójicamente esto generó que la red de gelana pudiera estar mejor distribuida e interconectada a través de todo el volumen de la mezcla gelificada (microfotografías *i* y *j* de Figura 5.3.3-2), y se manifestara un predominio del carácter elástico con zonas de unión más permanentes (valores más bajos de  $\delta$ ) dentro del tiempo de observación de las pruebas reológicas (Figura 5.3.2-7). En estas mezclas las propiedades reológicas están regidas predominantemente por la gelana y el almidón tienen un efecto “debilitador” debido a que los fragmentos de gránulos hinchados y quizá la amilopectina parcialmente disuelta interfieren en la interconectividad de la red de gelana.

## 5.4 MEZCLAS AMILOPECTINA-GELANA

En esta sección se presentan los estudios reológicos y de microestructura de mezclas amilopectina-gelana, obtenida ésta última a través de la desnaturalización del almidón ceroso utilizado en los estudios anteriores. Debido a que en los estudios de microscopía de las mezclas almidón-gelana éste no se etiquetó con cromóforos fluorescentes, en esta sección se realizaron estudios de microscopía utilizando la técnica de doble localización, es decir tanto gelana como amilopectina se pueden visualizar en una misma microfotografía debido a la sobreposición de fluorescencia emitida por ambos polímeros previamente etiquetados. La correlación de microscopía con los estudios reológicos de estas mezclas podrá descartar o confirmar la existencia de separación de fases entre gelana y amilopectina, y proporcionar información sobre la posible interacción de estas macromoléculas en la fase continua de las mezclas formadas por almidón y gelana.

### 5.4.1 Reología dinámica

La Figura 5.4.1-1 muestra el comportamiento de los módulos dinámicos con la frecuencia de soluciones acuosas de amilopectina, 3, 5 y 7%, y de almidón de maíz ceroso nativo al 3% cocido a 90 °C (líneas). En todas las concentraciones de amilopectina evaluadas,  $G'$  fue siempre menor a  $G''$  y ambos módulos presentaron una fuerte dependencia con la frecuencia de medición. El comportamiento de  $G'$  y  $G''$  fue característico de una solución polimérica sin entrecruzamientos lo cual favorece el flujo en el intervalo de frecuencia analizado. Por otra parte, el espectro de almidón al 3% denota un comportamiento reológico donde predomina  $G'$  sobre  $G''$  y ambos módulos son mayores, en más de dos órdenes de magnitud, que amilopectina a la misma concentración. Este contraste en el comportamiento reológico de almidón y amilopectina muestra nuevamente el papel que tienen los gránulos hinchados o incluso fragmentados, en la reología de pastas de almidón.



**Figura 5.4.1-1** Variación de  $G'$  y  $G''$  con la frecuencia de soluciones acuosas de amilopectina al 7% (cuadrados), 5% (círculos) y 3% (triángulos), y pasta de almidón de maíz ceroso nativo al 3% (líneas) cocido a 90 °C. Los símbolos negros y la línea continua corresponden a  $G'$  mientras que los símbolos blancos y la línea punteada a  $G''$ . Las determinaciones se realizaron a 25 °C dentro de la zona de viscoelasticidad lineal.

La Figura 5.4.1-2 muestra los espectros mecánicos de las mezclas formadas por 3% amilopectina y gelana en el intervalo de concentraciones de 0.005 a 0.05%. A la derecha de los espectros de las mezclas se muestran los espectros de gelana sola a la misma concentración que la usada en la mezcla respectiva. En los espectros mecánicos de las mezclas se puede observar que la adición de bajas concentraciones de gelana, 0.005 a 0.01%, a 3% amilopectina, generó sistemas más elásticos a medida que la concentración de gelana en la mezcla se incrementó. El espectro de la mezcla 3/0.005 muestra valores de  $G'$  mayores que amilopectina 3% (línea continua en la Figura 5.4.1-2a) y con menor dependencia con la frecuencia, mientras que  $G''$  prácticamente no mostró cambios con respecto a amilopectina 3% (línea discontinua en la Figura 5.4.1-2a) ni en valores ni en su dependencia con la frecuencia. Además, al incrementar la concentración de gelana a 0.01%

en la mezcla, los módulos dinámicos de la mezcla resultante aumentaron más de diez veces su valor comparado con el respectivo de la mezcla 3/0.005.

Las mezclas restantes mostraron valores mayores de  $G'$  y  $G''$ , pero éstos fueron muy similares entre sí. Adicionalmente en ese intervalo de concentración de gelana ( $> 0.01\%$ ),  $G'$  y  $G''$  de las mezclas muestran menor dependencia con la frecuencia a bajos valores de ésta. Comparando los espectros de las mezclas con gelana sola, éstas siempre mostraron valores de  $G'$  y  $G''$  inferiores a los geles respectivos de gelana, haciéndose mayor esta diferencia a medida que la concentración de gelana en la mezcla se incrementa. Igualmente, la independencia de los módulos con la frecuencia, característico de los geles de gelana sola, se evidenció en las mezclas sólo a bajas frecuencias, siendo más pronunciado a medida que la concentración de gelana se incrementó, mientras que el típico comportamiento fluido de las soluciones de amilopectina, se manifestó en las mezclas a altas frecuencias de medición.

La Figura 5.4.1-3 muestra los espectros mecánicos de las mezclas formadas por 7% amilopectina y gelana en el intervalo de concentraciones de 0.005 a 0.05%. De forma similar a la figura anterior, a la derecha se han graficado los espectros de gelana sola a las mismas concentraciones presentes en las mezclas. A diferencia de las mezclas con 3% amilopectina, la adición de 0.005% gelana a 7% amilopectina redujo ligeramente los valores de los módulos y se generó un comportamiento reológico completamente diferente a amilopectina 7% y a la mezcla 3/0.005. En el intervalo de frecuencia 0.01 a 0.2 rad/s predominó  $G'$  sobre  $G''$ , y a frecuencias mayores la mezcla mostró un comportamiento reológico similar a amilopectina sola.

Concentraciones mayores de gelana en las mezclas formadas por 7% de amilopectina impartieron características elásticas. A diferencia de los sistemas formados únicamente por amilopectina y la mezcla 7/0.005, las mezclas con concentraciones mayores de gelana presentaron valores de  $G'$  mayores a  $G''$  en todo el intervalo de frecuencia analizado. De igual forma que las mezclas 3% amilopectina-gelana, los espectros de las mezclas

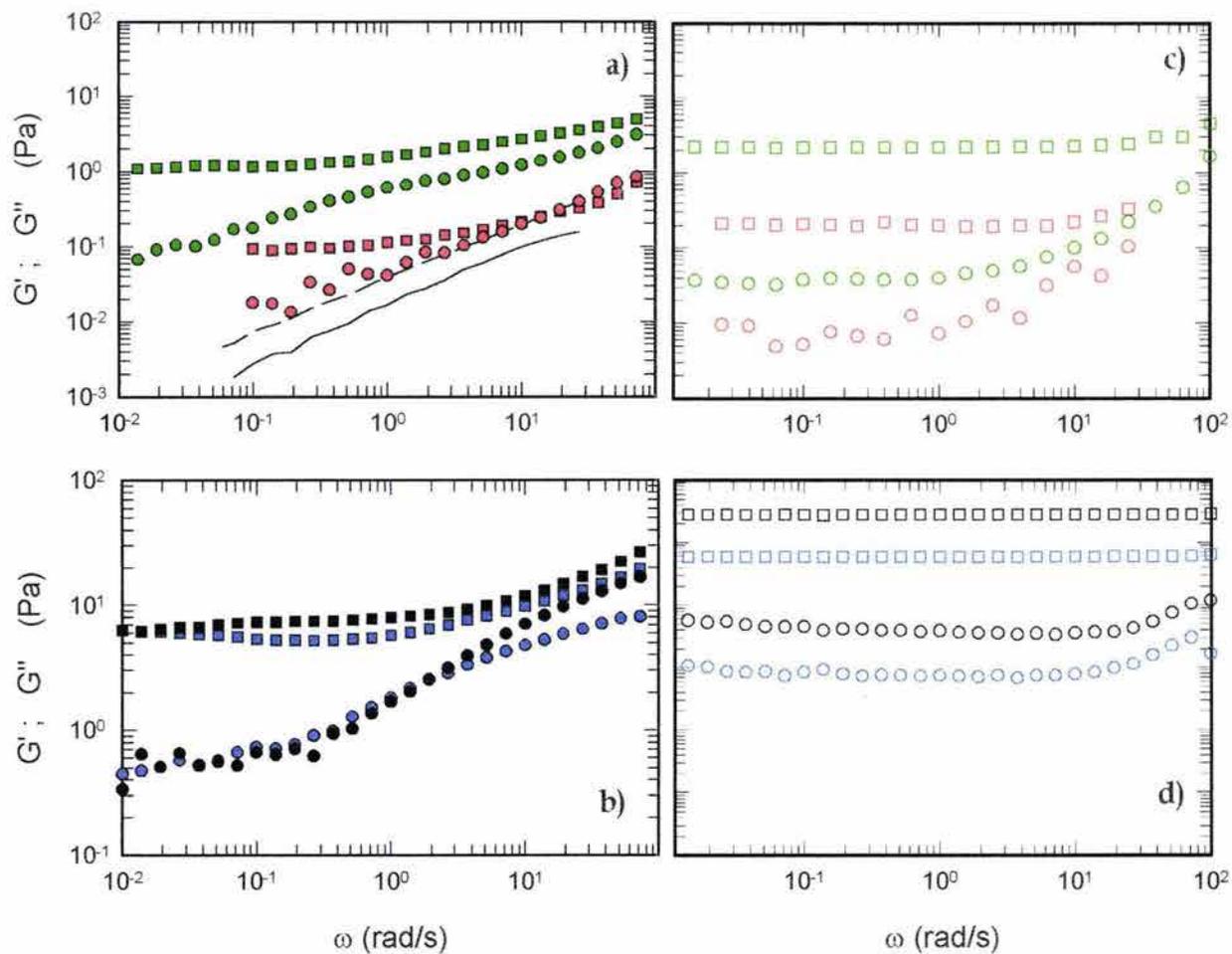
formadas por 7% amilopectina y concentraciones de gelana entre 0.01 y 0.05%, tuvieron poca diferencia entre sí, pero el incremento de amilopectina generó menor independencia de los módulos, principalmente  $G''$ , con la frecuencia. El Cuadro 5.4.1-1 muestra los valores de la pendiente de los módulos *versus*  $\omega$  en gráficas logarítmicas, y el intervalo de frecuencia en donde se realizó la regresión.

**Cuadro 5.4.1-1.** Dependencia de  $G'$  y  $G''$  con la frecuencia de las mezclas amilopectina-gelana (A/G). Regresión lineal ( $r^2 = 0.95$  a  $0.99$ ) realizada en las gráficas  $\log G'$  ó  $G''$  *versus*  $\log \omega$  el intervalo de frecuencia  $10^{-2}$  a  $10^0$  rad/s.

% gelana en las mezclas A/G	a <sup>(1)</sup> G'	a G''
3/0	0.822	0.746
3/0.005	0.085*	0.514*
3/0.01	0.068	0.519
3/0.03	0.032	0.282*
3/0.05	0.051	0.237*
7/0	0.493	0.638
7/0.005	0.245	0.610
7/0.01	0.085	0.448
7/0.02	0.096*	0.327*
7/0.05	0.077	0.365*

Donde  $a$  forma parte de la relación:  $G' \propto \omega^a$  y  $G'' \propto \omega^a$   
 \*  $r^2 < 0.95$

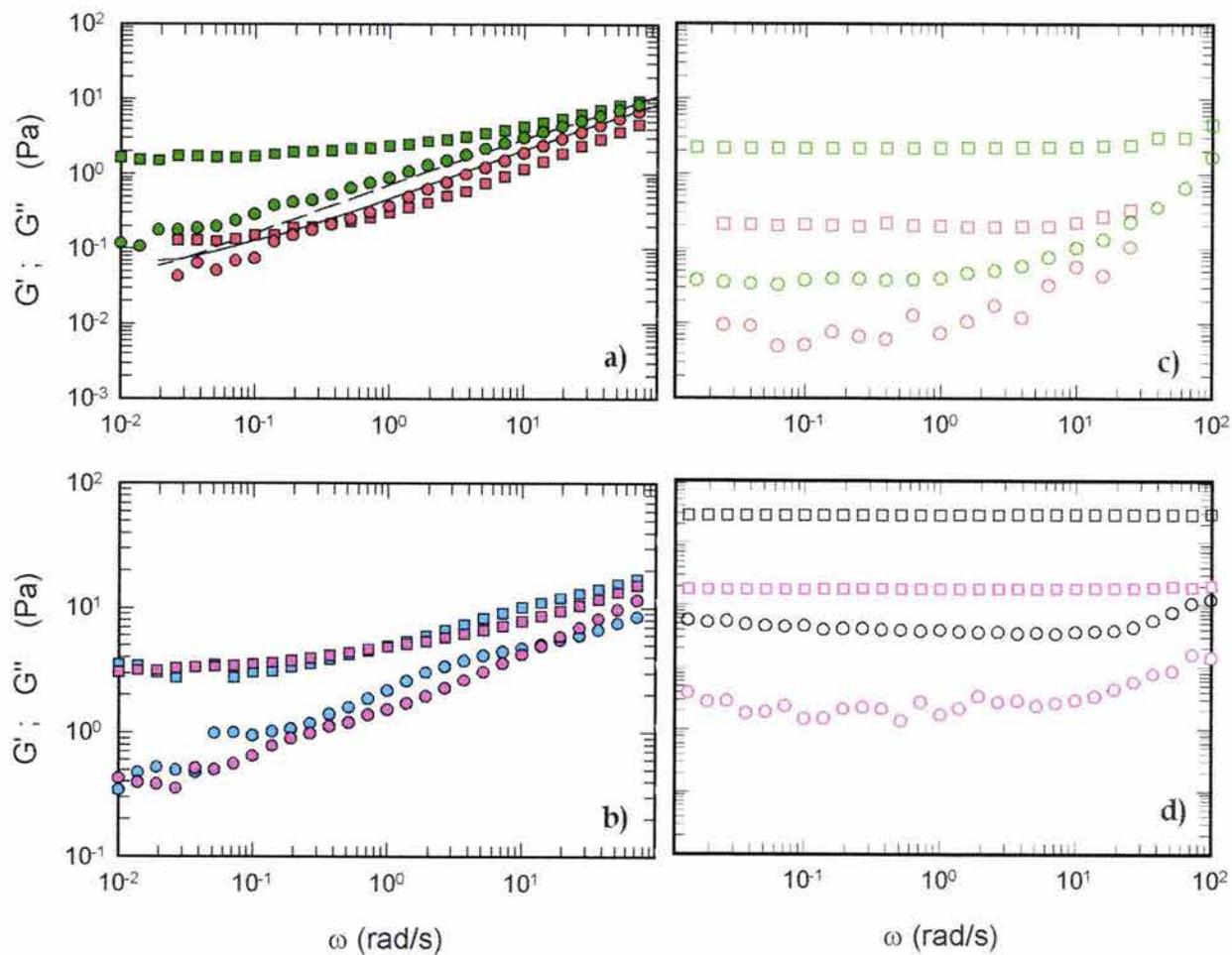
Comparando el comportamiento viscoelástico de las mezclas 7% amilopectina-gelana con el del gel respectivo de gelana a la misma concentración, se observa que a bajas concentraciones de gelana, 0.005% a 0.01%, los valores de  $G'$  en los primeros dos ciclos logarítmicos de frecuencia fueron prácticamente iguales a los de gelana sola mientras que a mayores concentraciones de ésta,  $G'$  divergió en mayor medida con gelana sola.



Amilopectina/Gelana		
	G'	G''
3/0	—	—
3/0.005	■	●
3/0.01	■	●
3/0.03	■	●
3/0.05	■	●

Gelana		
	G'	G''
0.005	□	○
0.01	□	○
0.03	□	○
0.05	□	○

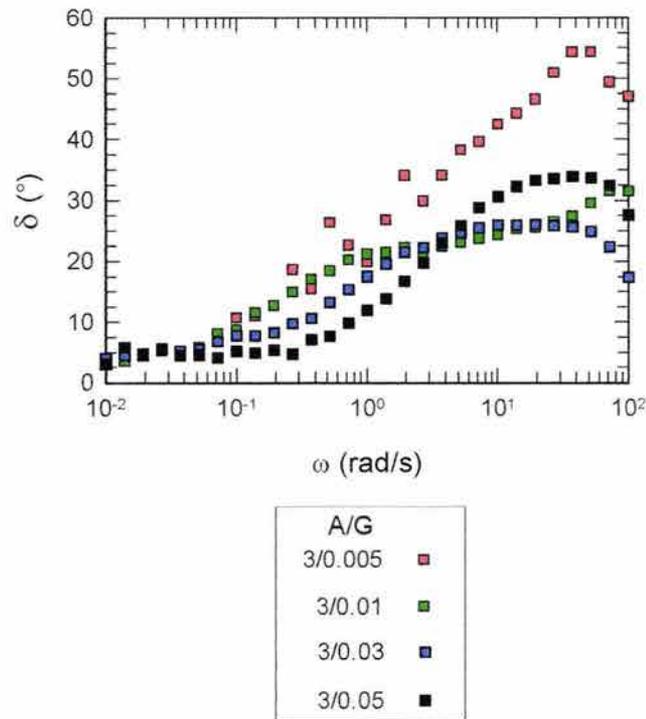
**Figura 5.4.1-2** Módulos dinámicos en función de la frecuencia de las mezclas formadas por 3% amilopectina-gelana (*a, b*) y de geles de gelatina (*c, d*). Determinaciones realizadas a 25 °C.



Amilopectina/Gelana		
	G'	G''
7/0	—	---
7/0.005	■	●
7/0.01	■	●
7/0.02	■	●
7/0.05	■	●

Gelana		
	G'	G''
0.005	□	○
0.01	□	○
0.02	□	○
0.05	□	○

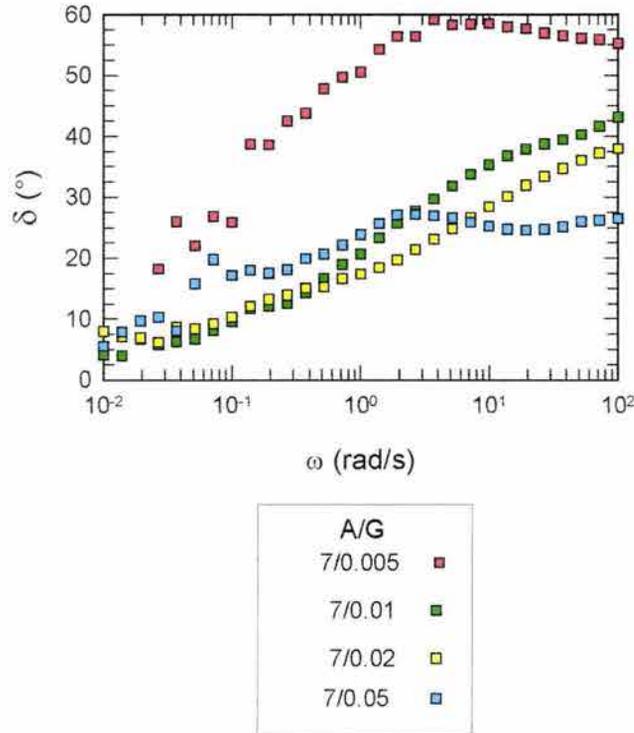
**Figura 5.4.1-3** Módulos dinámicos en función de la frecuencia de las mezclas formadas por 7% amilopectina-gelana (*a, b*) y de geles de gelatina (*c, d*). Determinaciones realizadas a 25 °C.



**Figura 5.4.1-4.** Ángulo de pérdida de las mezclas formadas por 3% amilopectina y gelana. Determinaciones realizadas a 25 °C.

El comportamiento del ángulo de pérdida ( $\delta$ ) en función de la frecuencia de las mezclas amilopectina-gelana se muestra en las Figuras 5.4.1-4 y 5.4.1-5. Las mezclas formadas por 3% amilopectina mostraron valores de delta bajos en el primer ciclo logarítmico de frecuencias, sin embargo a medida que se incrementó la frecuencia de medición, estos valores se incrementaron notablemente e incluso alcanzaron valores cercanos a 50°. Por otra parte las mezclas que contienen 7% de amilopectina presentaron valores mayores de delta que las mezclas anteriores pero igual que éstas, delta se incrementó con la frecuencia de medición. Este comportamiento de delta en las mezclas muestra que el carácter elástico característico de los geles de gelana se evidenció en las mezclas amilopectina-gelana a bajas frecuencias (tiempos largos de observación), mientras que el carácter viscoso, proporcionado por amilopectina, lo hizo a frecuencias altas (tiempos cortos de

observación). Esto mismo se observó en el comportamiento de  $G'$  y  $G''$  con la frecuencia (Figuras 5.4.1-2 y 5.4.1-3).



**Figura 5.4.1-5.** Ángulo de pérdida de las mezclas formadas por 7% amilopectina y gelana. Determinaciones realizadas a 25 °C.

Si bien el comportamiento de los módulos dinámicos de las mezclas formadas por amilopectina y gelana, denotó un carácter sólido-viscoelástico, el comportamiento de delta de estos sistemas puso en evidencia su carácter poco elástico y débilmente estructurado lo cual se hizo más notable a frecuencias altas de medición (tiempos cortos de observación).

La Figura 5.4.1-6 muestra el comportamiento de  $\delta$  en función del contenido de gelana en dos frecuencias de medición, 0.1 y 1 rad/s, de las mezclas 3%-amilopectina-gelana, 3%-almidón-gelana cocidas a 90 °C, y de los geles de gelana sola. Como se puede observar en la figura, el comportamiento de delta de las mezclas con amilopectina mostró un incremento en el carácter elástico a medida que la concentración de gelana aumentó hasta

0.02%, en donde se registró un mínimo local en delta tanto a 1 rad/s como a bajas frecuencias, 0.1 rad/s. Concentraciones mayores de gelana (hasta 0.04%) incrementaron los valores de delta, sin embargo se detectó otro mínimo en delta cuando la concentración de gelana fue 0.05%. No obstante que la presencia de pequeñas proporciones de gelana, 0.005%, en amilopectina 3% aumentó notablemente su carácter elástico (delta disminuyó de  $\approx 70^\circ$  a  $\approx 10^\circ$  a 0.1 rad/s), éste fue siempre menor que en las mezclas almidón-gelana cocidas a 90 °C, en donde la estructura granular del almidón fue destruida en gran proporción, y notablemente inferior a los geles de gelana. Por otra parte, el módulo de almacenamiento de las mezclas formadas por amilopectina y gelana, fue poco sensible a la concentración de amilopectina, la reología global de las mezclas parece estar gobernada por la concentración de gelana existiendo poca diferencia en  $G'$  entre las mezclas formadas por 3% y 7% de amilopectina de igual contenido de gelana. La Figura 5.4.1-7 ilustra este comportamiento.

#### 5.4.2 Microestructura

La microestructura de las mezclas amilopectina-gelana se visualizó usando dos cromóforos fluorescentes, fluoresceinamina (FA) unida a gelana igual que en las mezclas con almidón, e isotiocianato de rodamina (RITC) unido a la molécula de amilopectina. Se utilizó un haz de luz láser a 488 nm para excitar la FA-gelana y 543 nm para RITC-amilopectina. Las microfotografías de las mezclas formadas por amilopectina 3% y gelana se muestran en la Figura 5.4.2-1. Las microfotografías *a*, *b*, *c*, *d* muestran la fluorescencia emitida por RITC-amilopectina en las mezclas amilopectina-gelana, las zonas más claras representan la fluorescencia de la molécula de amilopectina, mientras que las zonas oscuras denotan la presencia de gelana y/o disolvente. Las microfotografías anteriores muestran pequeñas zonas fluorescentes homogéneamente distribuidas en el plano focal de la mezcla, aunque se alcanzan a detectar pequeñas zonas más fluorescentes dentro de las microfotografías en algunas mezclas (flechas), no se observaron agregados o zonas ricas en amilopectina.

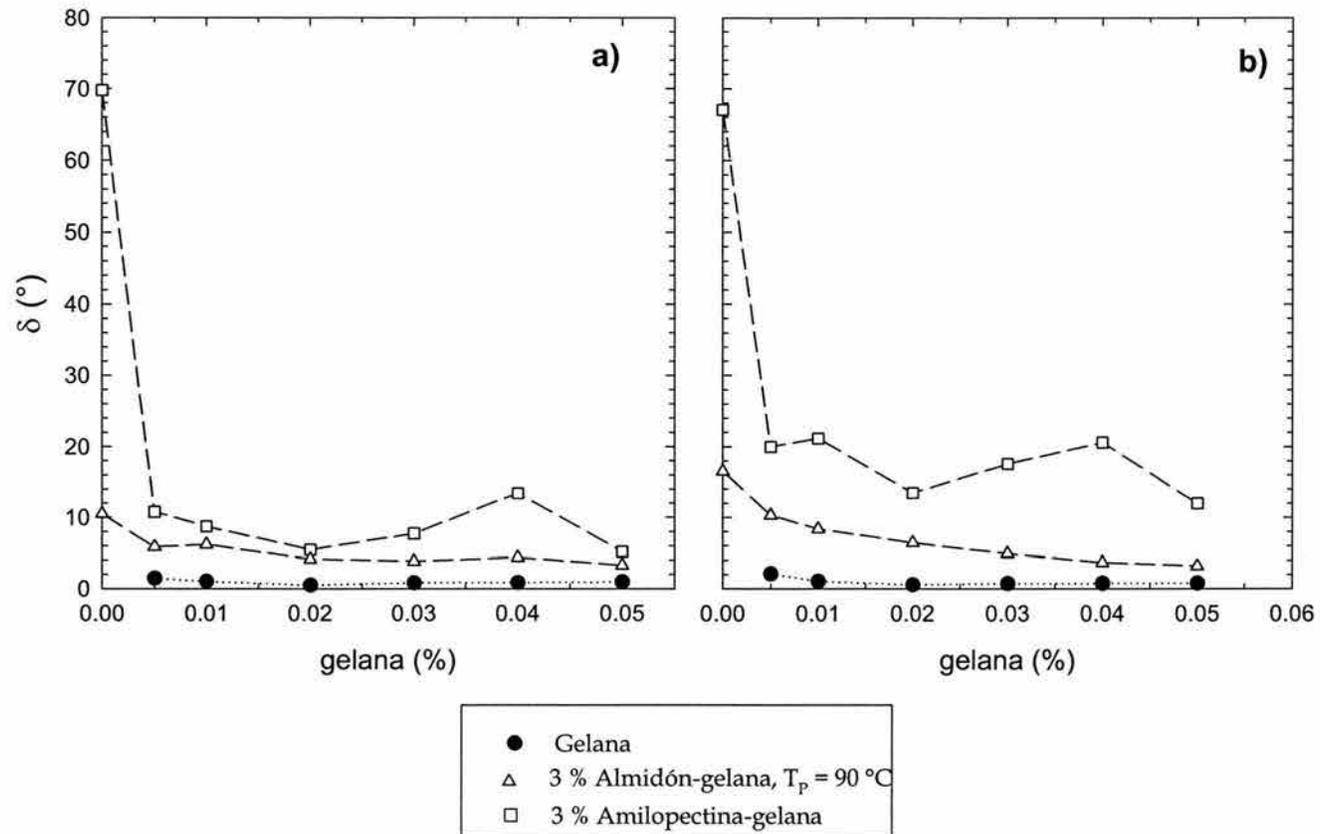
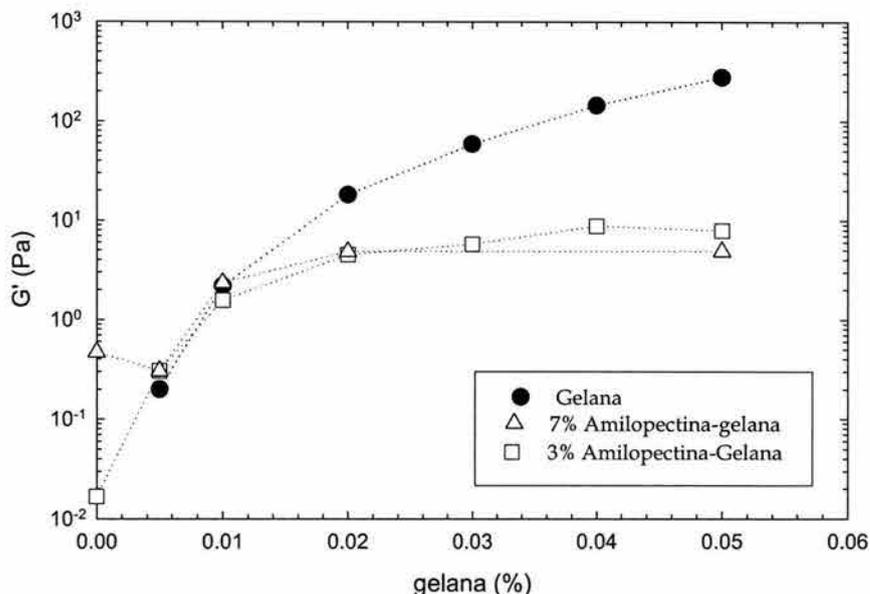


Figura 5.4.1-6 Comportamiento del ángulo de pérdida en función de la concentración de gelatina, a)  $\omega = 0.1 \text{ rad/s}$  y b)  $\omega = 1 \text{ rad/s}$ .



**Figura 5.4.1-7.** Módulo de almacenamiento de las mezclas amilopectina-gelana y de geles de gelana en función de la concentración de gelana. Determinaciones a 1 rad/s y 25 °C.

Por otra parte, las microfotografías *e, f, g, h* muestran la fluorescencia de gelana (zonas claras) dentro de las mezclas amilopectina-gelana. En estas microfotografías se aprecia claramente que la red de gelana se distribuyó de manera homogénea en la mezcla y no se observaron grandes “interrupciones” en la red atribuidas a la presencia de amilopectina. Estas observaciones se realizaron en la misma muestra y en el mismo plano focal que las microfotografías anteriores (*a, b, c, d*) por lo que se pueden comparar para visualizar la distribución y estado de agregación de cada macrocomponente por separado dentro de la mezcla. Si se comparan las dos microfotografías generadas en cada mezcla, *a-e, b-f, c-g, d-h*, se observa que aquellas zonas más fluorescentes detectadas al excitar la molécula de amilopectina (RITC-amilopectina) y señaladas con flechas en la Figura 5.4.2-1, no interrumpieron la continuidad de la red de gelana al menos dentro de la resolución de la técnica de microscopía usada.

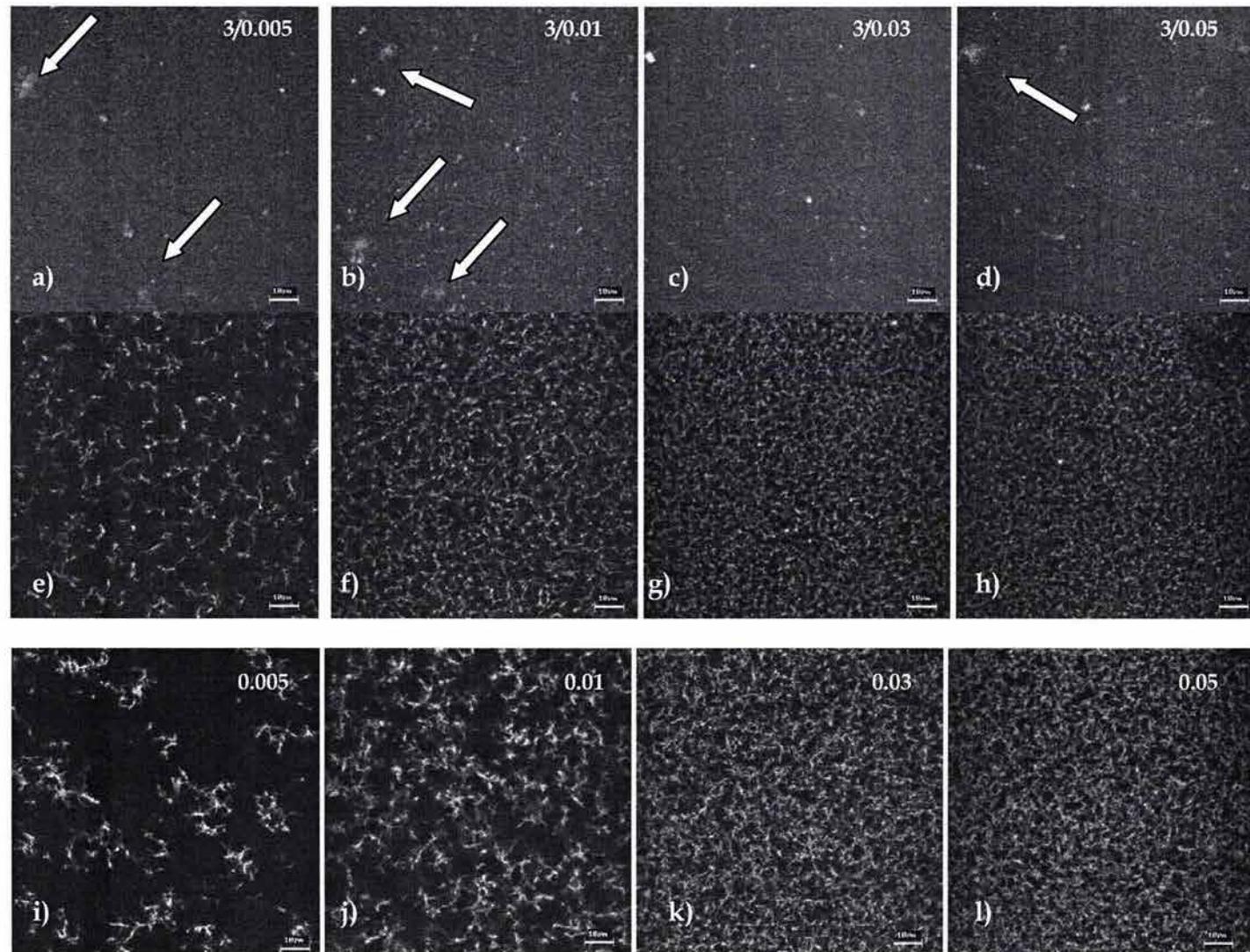


Figura 5.4.2-1. Microfotografías confocal de barrido láser de mezclas amilopectina 3% con gelana (0.005 a 0.05%). Excitación de fluorescencia de RITC-amilopectina en las mezclas (*a, b, c, d*), y de FA-gelana en las mezclas (*e, f, g, h*). Abajo (*i, j, k, l*) se muestran la microestructuras de los geles de gelana respectivos. Las barras representan 10  $\mu\text{m}$ .

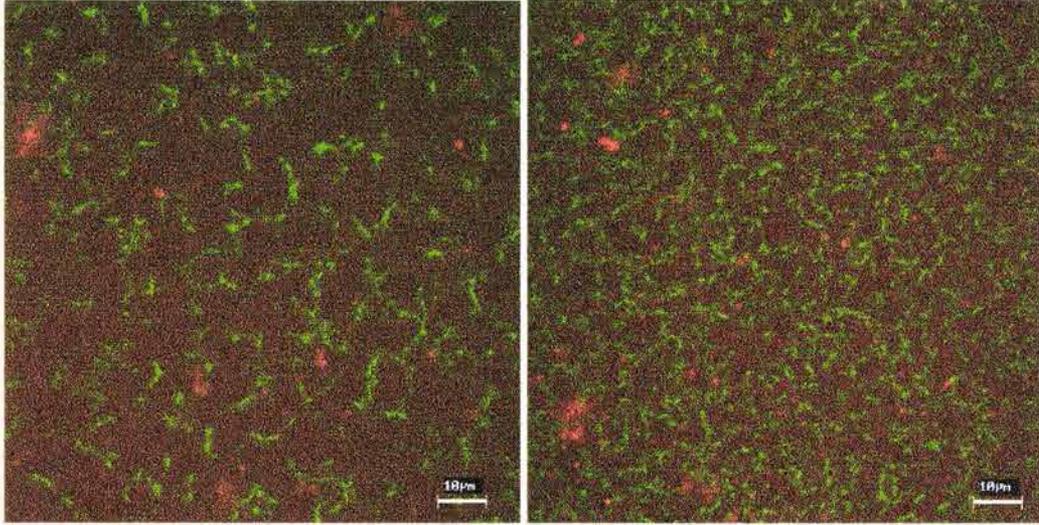
La sobreposición de las imágenes *a-e*, *b-f*, *c-g*, *d-h*, llamada técnica de doble localización, se muestra en la Figura 5.4.2-2. Las zonas verdes corresponden a la red de gelana mientras que las zonas rojas corresponden a amilopeptina. En estas microfotografías se observa con mayor claridad la ubicación de ambos macrocomponentes en la mezcla. Las zonas con mayor fluorescencia en las microfotografías *a*, *b*, *c*, *d* se detectaron fácilmente en las microfotografías de la Figura 5.4.2-2, en donde aparecieron como zonas rojas dentro de los espacios intersticiales de la red de gelana. A excepción de la mezcla 3/0.05 en donde se apreciaron zonas más concentradas en amilopeptina que ligeramente perturbaban la red de gelana (flechas en Figuras 5.4.2-2 y esquina superior derecha de la micrografía 5.4.2-1h), en general no se visualizó distorsión en la red de gelana debido a la presencia de amilopeptina como la observada en las mezclas con almidón.

Las microfotografías *i*, *j*, *k*, *l* de la Figura 5.4.2-1 muestran la microestructura de los geles de gelana con la misma concentración que aquélla presente en las mezclas 3 %amilopeptina-gelana. Observando detenidamente la red de gelana formada en las mezclas (microfotografías *e*, *f*, *g*, *h*) con la red de geles de gelana sola (*i*, *j*, *k*, *l*), se aprecia que en ambos casos se formó una red continua de gelana con espacios intersticiales más pequeños a medida que la concentración de ésta aumentó. Sin embargo, los geles de gelana sola mostraron redes densas con filamentos más gruesos que los observados en la red de gelana de las mezclas.

La microestructura de las mezclas con 7% amilopeptina se muestra en la Figura 5.4.2-3. Las microfotografías *a*, *b*, *c*, *d* muestran la emisión de fluorescencia (zonas claras) de la amilopeptina en las mezclas amilopeptina-gelana. De forma similar a las mezclas con 3% amilopeptina, la amilopeptina en las mezclas formadas por 7% amilopeptina se dispersó de manera homogénea. A excepción de la mezcla 7/0.05, en donde se distinguió una aglomeración de amilopeptina (flecha), no se observaron agregados de amilopeptina y en ningún caso existió perturbación de la red de gelana como se muestra en las microfotografías *e*, *f*, *g*, *h*. En estas microfotografías se observó una red de gelana homogéneamente distribuida, sin embargo esta red fue más débil, menos densa y con filamentos más delgados que la red de los geles de gelana sola (microfotografías *i*, *j*, *k*, *l*) y que la red de gelana formada en presencia de 3% amilopeptina.

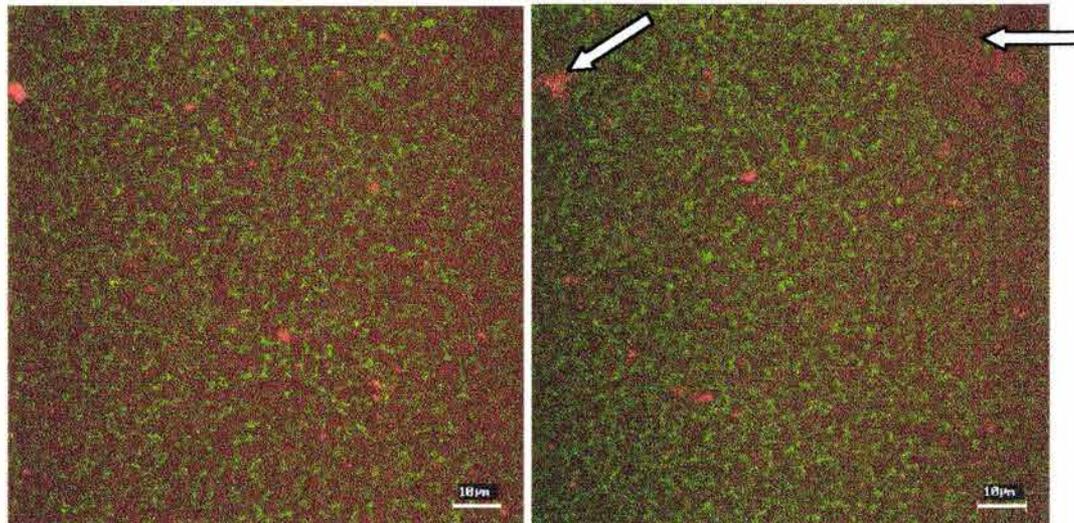
A/G 3/0.005

A/G 3/0.01

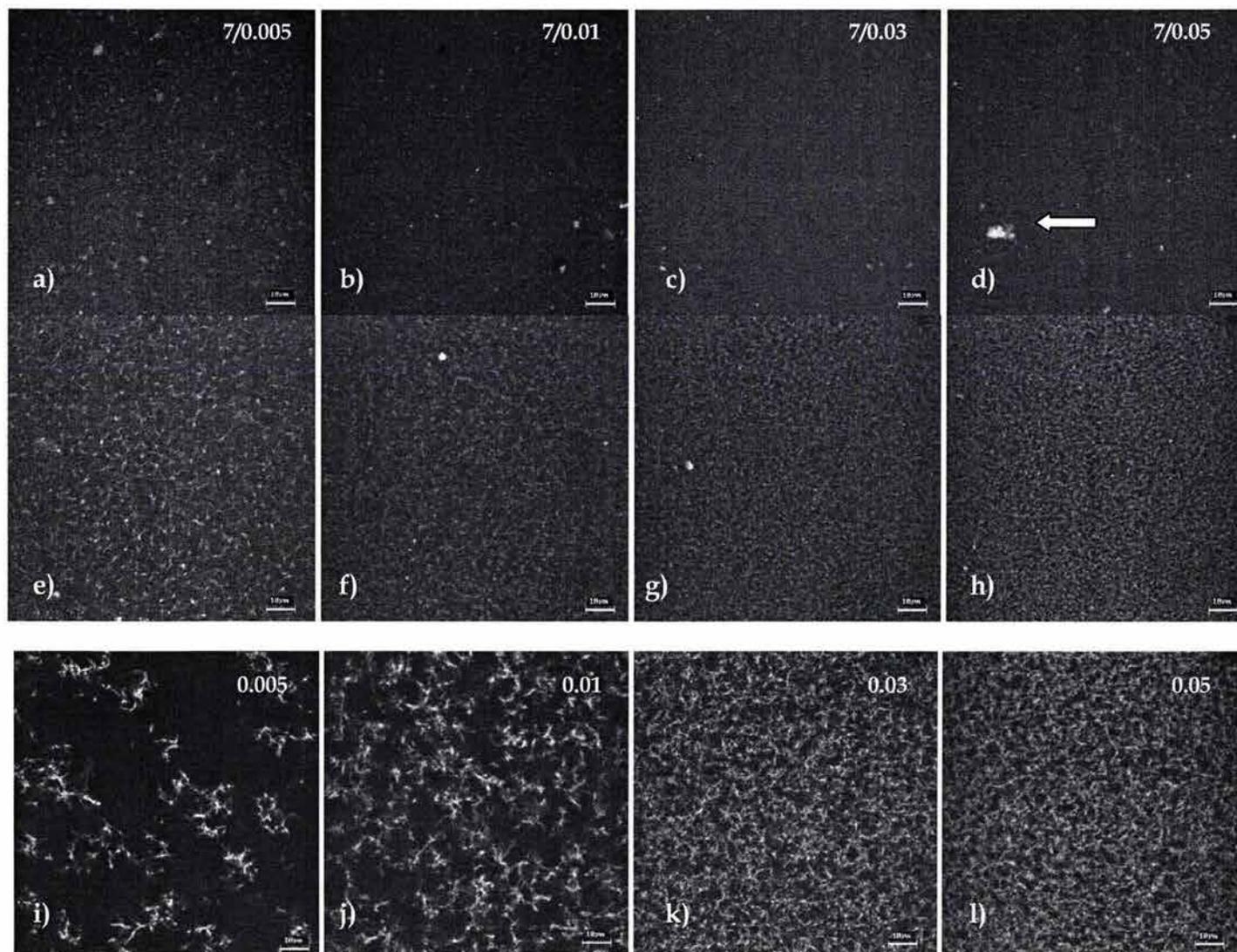


A/G 3/0.03

A/G 3/0.05



**Figura 5.4.2-2.** Microestructura de mezclas amilopectina 3% con gelana (0.005 a 0.05%). Técnica de doble localización en donde las zonas verdes corresponden a las redes de gelana y las zonas rojas a la presencia de amilopectina. Las barras representan 10 µm. Las observaciones al microscopio se realizaron a 25 °C:



**Figura 5.4.2-3.** Microfotografías confocal de barrido láser de mezclas amilopeptina 7% con gelatina (0.005 a 0.05%). Excitación de fluorescencia de RITC-amilopeptina en las mezclas (*a, b, c, d*), y de FA-gelatina en las mezclas (*e, f, g, h*). Abajo (*i, j, k, l*) se muestran la microestructuras de los geles de gelatina respectivos. Las barras representan 10  $\mu\text{m}$ .

Las microfotografías con doble localización (Figura 5.4.2-4) revelan en la mezcla 7/0.005 poca interconectividad de la red de gelana. En esta mezcla la amilopectina se visualizó mejor que en la mezcla 3/0.005 y el sistema puede describirse como una solución macromolecular de amilopectina en donde se encuentran “suspendidas” redes incipientes de gelana. A concentraciones mayores de gelana se observó una red continua de gelana con espacios intersticiales pequeños en donde se ubicó la amilopectina.

En este estudio, la microestructura de las mezclas no reveló separación de fases aún incrementando la concentración de gelana hasta 0.3% como se muestra en la Figura 5.4.2-5. Bajo esos regímenes de concentración de gelana ( $> 0.05\%$ ), la microestructura de las mezclas fue similar a la de gelana sola (microfotografías *i, j, k* de la Figura 5.4.2-5).

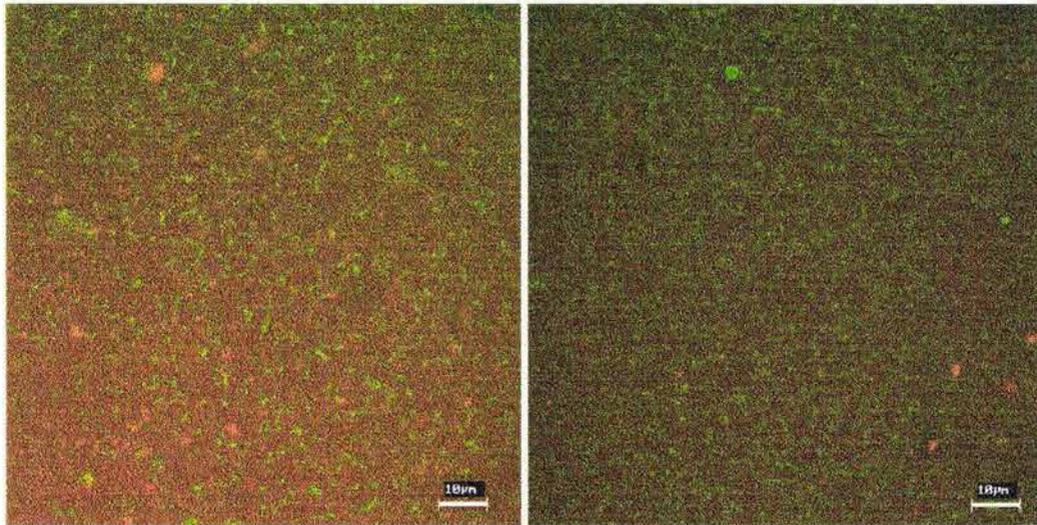
### 5.4.3 Discusión

Se ha reportado que la amilopectina es un polisacárido de alto peso molecular pero su extensa ramificación propicia que tenga valores bajos de viscosidad intrínseca, por lo tanto en solución es una molécula muy compacta. La muestra de amilopectina usada en este estudio se obtuvo a partir de almidón de maíz ceroso nativo y el valor de su viscosidad intrínseca en solución acuosa a 25 °C fue 148 mL/g (Anexo C), ligeramente superior al reportado en otros trabajos (Banks y Greenwood, 1975; Ring *et al.*, 1987; Kalichevsky *et al.*, 1987), lo cual indica que la preparación de amilopectina fue de mayor peso molecular que la utilizada en los estudios citados, los cuales han reportado pesos moleculares en el intervalo de 65 a 400  $\times 10^6$  g/mol.

Por otra parte, está bien documentado en la literatura que el proceso de agregación de cadenas de amilopectina para formar geles es muy lento y requiere de altas concentraciones de amilopectina y bajas temperaturas para formar una red tipo gel. Se ha reportado la formación de geles de amilopectina con soluciones acuosas de concentraciones mayores a 10% (m/m) (Ring *et al.*, 1987; Durrani y Donald, 1995) almacenadas a bajas temperaturas (1 a 5 °C) durante periodos largos de tiempo, desde 48 h (Durrani y Donald, 1995) hasta 40 a 60 días (Ring y Oxford, 1985; Ring *et al.*, 1987).

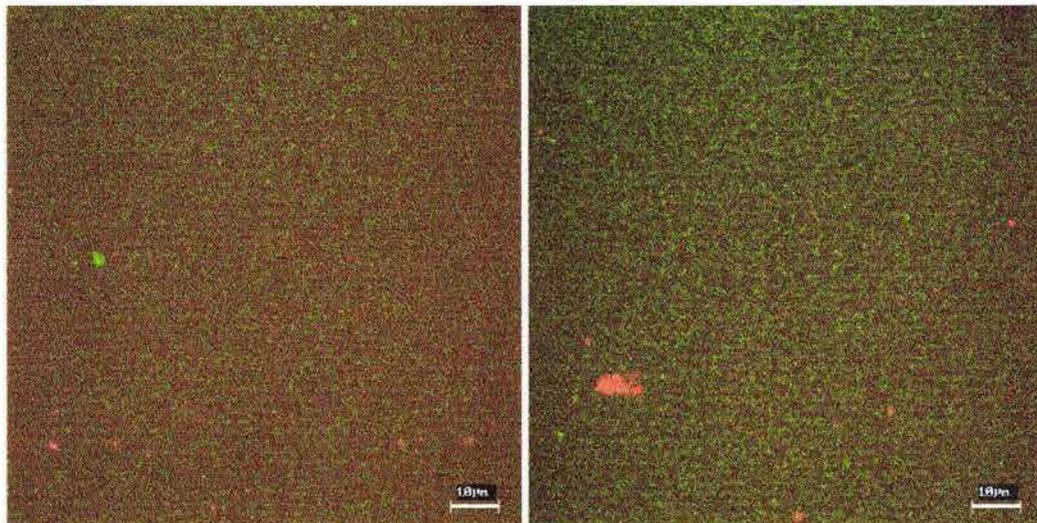
A/G 7/0.005

A/G 7/0.01

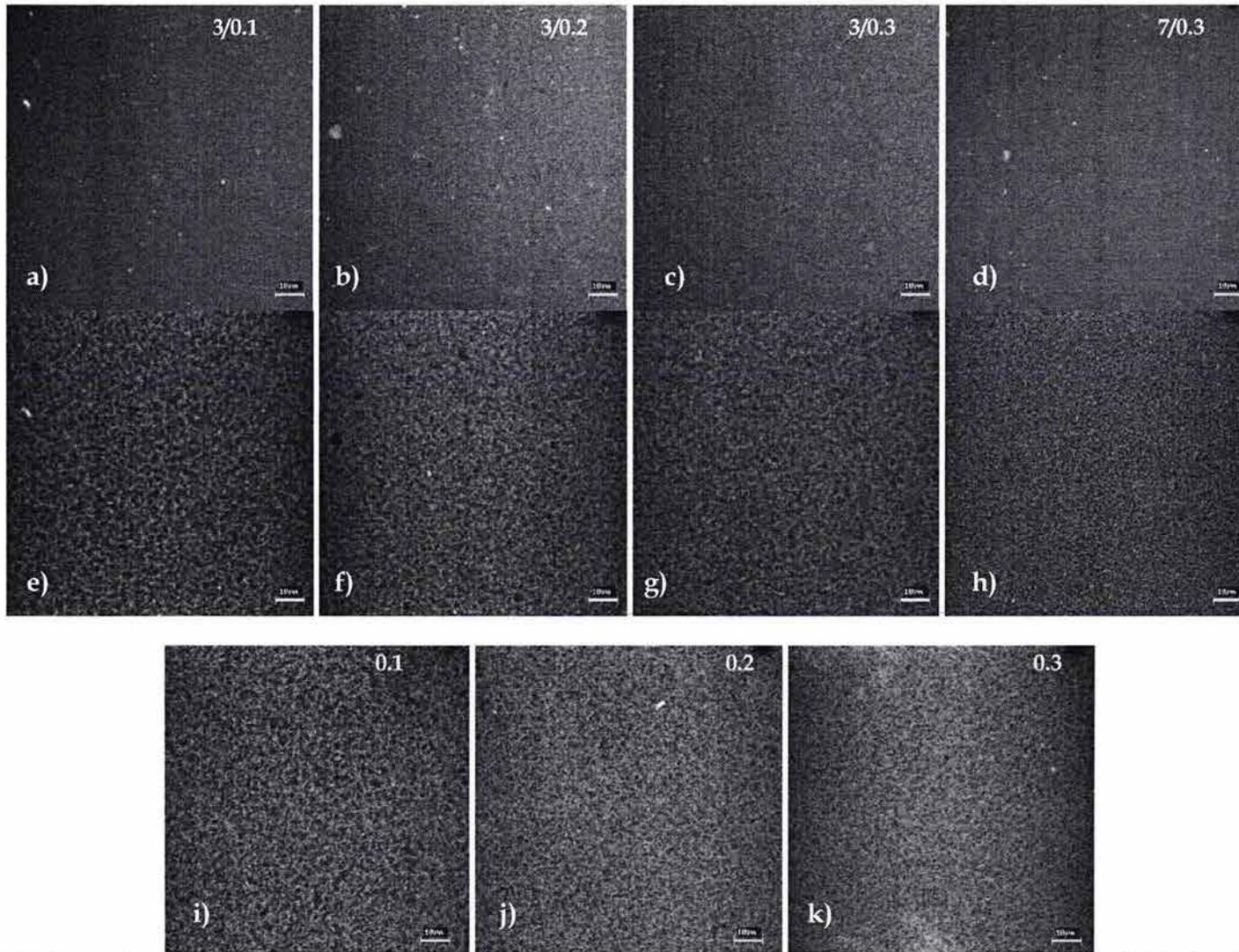


A/G 7/0.03

A/G 7/0.05



**Figura 5.4.2-4.** Microestructura de mezclas amilopectina 7% con gelatina (0.005 a 0.05%). Técnica de doble localización en donde las zonas verdes corresponden a las redes de gelatina y las zonas rojas a la presencia de amilopectina. Las barras representan 10 µm. Las observaciones al microscopio se realizaron a 25 °C.



**Figura 5.4.2-5.** Microfotografías confocal de barrido láser de mezclas amilopectina 3% y 7% con gelatina (0.1 a 0.3%). Excitación de la fluorescencia de RITC-amilopectina en las mezclas (*a, b, c, d*), y FA-gelatina en las mezclas (*e, f, g, h*). Abajo (*i, j, k*) se muestran la microestructuras de los geles de gelatina respectivos. Las barras representan 10 μm.

Los módulos dinámicos de amilopectina en función de la frecuencia, a las concentraciones y condiciones de preparación usadas en este estudio, denotaron un comportamiento fluido sin entrecruzamientos de vida corta. Sin embargo, el comportamiento de amilopectina 7% mostró valores de  $G'$  y  $G''$  muy cercanos entre sí principalmente a bajas frecuencias, lo cual hace suponer que esta concentración es lo suficientemente alta para promover la agregación de cadenas de amilopectina y la formación de una red si el tiempo de envejecimiento de las soluciones es mayor al usado en este estudio.

Además de que los valores de los módulos de las mezclas son inferiores a los de gelana sola para la misma concentración que en sus mezclas, el comportamiento reológico de éstas fue tipo sólido-viscoelástico (con excepción de la mezcla 7/0.005) sin llegar a mostrar el espectro característico de un gel como el observado para gelana en todas las concentraciones examinadas. La amilopectina, a pesar de estar en concentraciones muy superiores a gelana, tiene poco efecto en la reología de las mezclas e incluso muestra un efecto “depresor” de las propiedades elásticas de gelana sola. Existen algunos estudios (Syrbe *et al.*, 1995; Olsson *et al.*, 2000) donde se ha observado que las mezclas formadas por un biopolímero gelificante y un espesante pueden generar sistemas con mejores propiedades mecánicas debido a la inclusión del biopolímero espesante en los “poros” o espacios intersticiales de la red formada por el gelificante. En las mezclas estudiadas a pesar de contar con amilopectina no gelificante no se generaron incrementos en las propiedades elásticas. Existió una notable disminución en  $G'$  en las mezclas comparadas con gelana sola e incluso el incremento de amilopectina de 3 a 7% no produjo cambios sustanciales en los módulos de las mezclas. La “dilución” de las propiedades reológicas de gelana al ser ésta mezclada con otro polisacárido es un fenómeno que se ha observado anteriormente (Rodríguez-Hernández y Tecante 1999) y se ha explicado en términos de separación de fases e inhibición de la red de gelana por competencia con el disolvente con el otro polisacárido presente en la mezcla, sin embargo no se presentaron estudios de microscopía ni de diagramas de fases para ayudar a esclarecer este comportamiento.

Existen numerosos estudios acerca de la incompatibilidad termodinámica de biopolímeros (Piculell *et al.*, 1995; Clark 1995; Kasapis 1995; Norton y Frith, 2001) por citar sólo algunos. Muchos de ellos se han enfocado en la determinación y análisis de diagramas de fase

(Kalichevsky *et al.*, 1986; Kalichevsky *et al.*, 1987; Closs *et al.*, 1997; Alves *et al.*, 2000) y recientemente se ha hecho uso de las técnicas de microscopía para discutir este fenómeno (Bourriot *et al.*, 1999; Schorsch *et al.*, 1999; Lorén *et al.*, 1999; Lorén *et al.*, 2000; Tromp *et al.*, 2001). Se han propuesto varios mecanismos que llevan a la separación de fases en mezclas de biopolímeros, sin embargo muchos estudios coinciden en afirmar que en la mayoría de las mezclas de biopolímeros, éstos ocupan su propio espacio y al ocurrir un cambio conformacional debido al descenso de la temperatura de la mezcla, ocurre la separación de fases. Este fenómeno se vuelve complejo al existir macromoléculas con carga y la existencia de mezclas de polímeros gelificantes con no gelificantes, debido a que la cinética de gelificación tiene un papel importante en la estructura final de la mezcla.

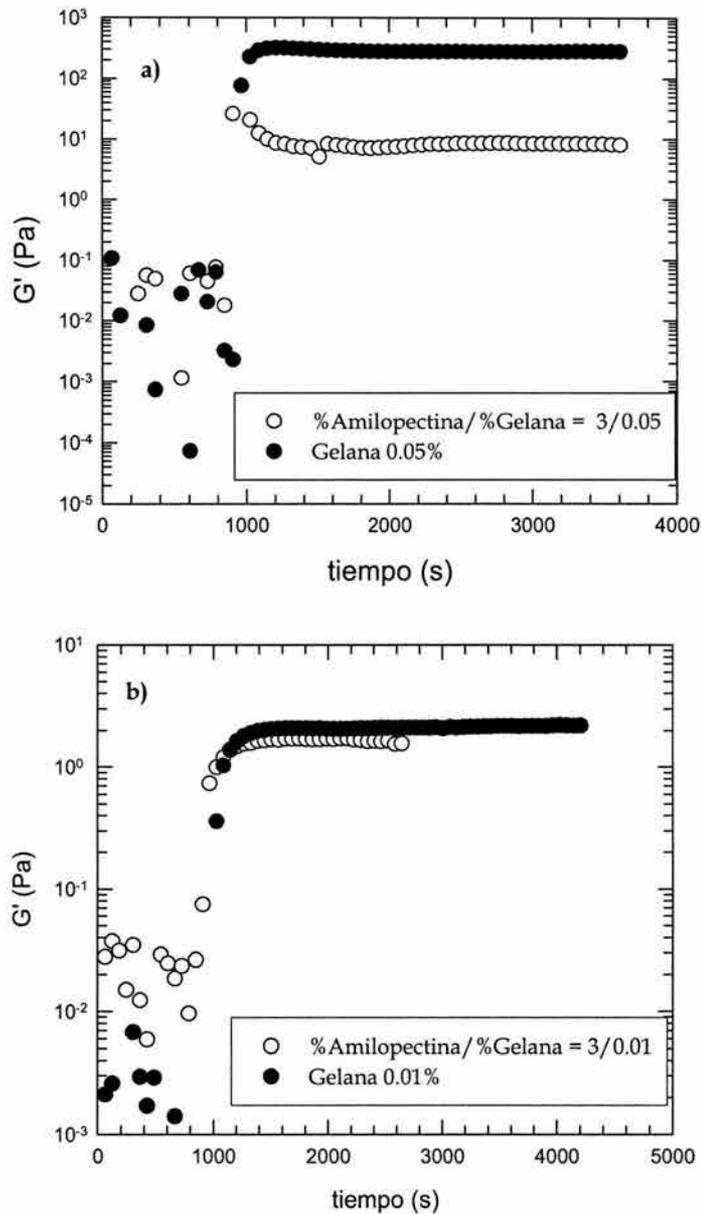
Algunos estudios de incompatibilidad termodinámica de biopolímeros han reportado que la inmiscibilidad es mayor a medida que se incrementa el peso molecular y la concentración de los biopolímeros, y es fuertemente dependiente de la calidad del disolvente (pH, fuerza iónica, temperatura). En el caso de mezclas con amilopectina se ha reportado incompatibilidad termodinámica con galactomananos (Closs *et al.*, 1997), amilosa (Kalichevsky *et al.*, 1987) y gelatina (Durrani *et al.*, 1993) entre otros. Sin embargo, las propiedades fisicoquímicas de la amilopectina utilizada, incluyendo el peso molecular, y las condiciones experimentales de los estudios reportados han sido diferentes en todos los casos, por lo que es difícil hacer comparaciones.

Aunque el objetivo de este trabajo no fue el estudio de incompatibilidad termodinámica entre los biopolímeros utilizados, es posible afirmar, de acuerdo con la microestructura observada de las mezclas amilopectina-gelana, que no existe separación de fases debido a la posible incompatibilidad de gelana con amilopectina. La red de gelana se formó dentro de una solución macromolecular de amilopectina y a medida que se incrementó la concentración de gelana, la red de ésta fue más compacta, con espacios intersticiales de menor tamaño, los cuales albergaron la solución de amilopectina. Debido a las características fuertemente gelificantes de gelana, lo cual se demuestra en la reología de sus soluciones (sección 5.1), es probable que su cinética de gelificación contribuya a la formación de geles que “atrapan” la amilopectina antes de que se pueda llevar a cabo una separación de fases. Este tipo de estructuras se ha denominado por

algunos como redes bicontinuas o interpenetradas y se ha observado en otras mezclas con gelana (Amici *et al.*, 2000).

La integración de la información reológica con la microestructura de las mezclas amilopectina-gelana, muestra que las propiedades elásticas de las mezclas dependen en gran medida de la concentración de gelana y la amilopectina tiene un efecto "diluyente" en estas características. La microestructura de las mezclas se puede describir como una red de gelana en cuyos espacios intersticiales se ubica la amilopectina, presumiblemente de acuerdo con la reología de sus soluciones, en forma no gelificada. La presencia de amilopectina en la red de gelana no produce separación de fases ni distorsiones en la red de gelana, tampoco retrasa la gelificación de gelana como se observa en la Figura 5.4.3-1. No obstante, la disminución en los valores de  $G'$  y la red débil observada en microscopía, hacen presumir que la amilopectina debido a su viscosidad dificulta la agregación de cadenas de gelana durante su gelificación generando redes menos densas con propiedades elásticas disminuidas, y este efecto se acentúa al aumentar la concentración de gelana.

Es importante mencionar que los estudios de microscopía por sí solos no proporcionan la información necesaria para esclarecer las relaciones propiedades-estructura de las mezclas amilopectina-gelana, por ejemplo las microfotografías de las mezclas 3/0.01 y 7/0.005 no parecen diferir en la forma en la cual se encuentra la red de gelana, a simple vista la interconectividad en el plano focal y el tamaño de los espacios intersticiales de la red son similares, incluso si se compara la microestructura de estas mezclas con la de gelana 0.005% podría suponerse que esta última estructura tendrá menores propiedades elásticas. Sin embargo, la reología de estos tres sistemas citados es muy diferente y valdría la pena auxiliarse de técnicas que proporcionen información cuantitativa de la interconectividad de la red a través del volumen de la muestra y no sólo del plano visualizado, además de integrar información sobre el tamaño de los espacios intersticiales de la red y el grosor de sus filamentos. Si bien existen algunos trabajos donde han usado métodos de análisis tridimensional de imágenes (Kinney y Ladd, 1998) y otros donde se han usado diferentes técnicas de microscopía para explicar las propiedades reológicas de mezclas de biopolímeros (Olsson *et al.*, 2000; Olsson *et al.*, 2002, Wilkenström *et al.*, 2003), el avance en esta área es todavía incipiente.



**Figura 5.4.3-1.** Evolución del módulo de almacenamiento con el tiempo de algunas mezclas amilopectina/gelatina y geles de gelatina. Determinaciones realizadas a 1 rad/s durante el enfriamiento gradual de las muestras desde 65 °C hasta 25 °C. El valor de la deformación impuesta fue el mismo que el usado para los espectros mecánicos respectivos y se muestra en el Anexo B.

# CONCLUSIONES

## 6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES PARA TRABAJOS FUTUROS

### 6.1 CONCLUSIONES

Se pudo verificar que el almidón de maíz ceroso nativo usado en este estudio, posee altos valores de hinchamiento y por lo tanto la fragilidad de su gránulo es mayor que la presentada por los almidones del tipo no cerosos. Debido a esta fragilidad, las pastas de este tipo de almidón no pueden ser modeladas con los parámetros: índice de hinchamiento (H), solubilidad (S) y fracción volumen de gránulos hinchados ( $\Phi$ ), usando las técnicas convencionales de sedimentación. Por lo tanto no fue posible demostrar el efecto de  $\Phi$  en la reología de las mezclas almidón-gelana como se planteó en la hipótesis. Sin embargo, se pudo comprobar que el grado de desintegración de los gránulos hinchados durante la preparación de las pastas influye de manera directa en su carácter sólido-viscoelástico. Aquellas pastas cuyo tratamiento térmico generó menor desintegración granular (temperatura de cocción 75 °C) mostraron propiedades elásticas mayores. Por lo tanto, la presencia de gránulos tiene mayor influencia en las propiedades viscoelásticas de los sistemas con almidón en su composición, que la disolución de amilopectina en la fase continua.

Los resultados reológicos y de microestructura de gelana sugieren que la concentración crítica,  $C_0$ , para la formación de geles de gelana en presencia de 0.01 mol/dm<sup>3</sup> de CaCl<sub>2</sub>, es ligeramente inferior a 0.005% m/m. Por otra parte, en el intervalo de concentraciones de gelana estudiado, la magnitud de las propiedades elásticas ( $G'$ ,  $\delta$ ) de sus geles depende principalmente del grado de interconexión y de la densidad de la red de gelana. En este sentido se detectaron dos regímenes de concentración:

- a) Concentraciones de gelana entre 0.005 y 0.02% m/m en donde los geles son progresivamente más elásticos con redes paulatinamente más densas, interconectadas y con espacios intersticiales de menor tamaño, y

b) Concentraciones de gelana  $> 0.02\%$  m/m, en donde la formación de redes densamente entrelazadas con intersticios progresivamente más pequeños generaron altos valores de  $G'$ , pero la elasticidad de los geles (evaluada a través de  $\delta$ ) fue poco sensible a los incrementos de concentración.

Los resultados muestran que las concentraciones de gelana utilizadas en la industria de alimentos podrían estar excedidas y quizá esto ha dado como resultado la conveniencia de usar gelana mezclada con hidrocoloides espesantes, para “diluir” sus propiedades reológicas. Adicionalmente la creación de geles con apariencia fluida, utilizando concentraciones de hidrocoloide más bajas que las reportadas hasta ahora, pudiera ser de especial interés para la estabilización de suspensiones de sólidos dispersos en medios en donde no es deseable incrementar sus viscosidades.

Por otra parte, los resultados de las mezclas almidón-gelana muestran que sus propiedades viscoelásticas están regidas por:

- a) la extensión del hinchamiento del gránulo de almidón y su degradación, y
- b) la concentración de gelana.

En este sentido, la creación de sistemas con sinergia se presenta sólo cuando ambos macrocomponentes de la mezcla pueden contribuir “libremente” en la reología del sistema, lo cual se observó solamente en las mezclas almidón-gelana cuando gelana está presente a concentraciones cercanas a sus valores críticos de gelificación. En estos sistemas con sinergia en sus propiedades viscoelásticas, existe un efecto combinado de las partículas hinchadas del almidón, las cuales contribuyen al carácter sólido-viscoelástico, y de la elasticidad característica de la red de gelana. Asimismo, a medida que la concentración de gelana se incrementa, la red de este polisacárido muestra heterogeneidades debidas a la inclusión de partículas hinchadas de almidón, lo cual resulta en propiedades elásticas disminuidas en comparación con los geles de gelana sola. Dichas heterogeneidades en la red de gelana son más mayores cuando existe menor desintegración de gránulos de almidón.

La gelificación de gelana en presencia de amilopectina disminuyó las propiedades elásticas de los geles de gelana debido a la formación de redes menos robustas que albergan en sus espacios intersticiales a la amilopectina no gelificada. La microscopía de estas mezclas no evidencia separación de fases entre ambas macromoléculas. Por lo que se refuta la hipótesis de que la creación de mezclas menos elásticas que gelana sola se debe a la separación de fases entre las macromoléculas amilopectina y gelana.

## 6.2 SUGERENCIAS PARA TRABAJOS FUTUROS

En este trabajo se utilizó  $\text{CaCl}_2$  como sal promotora de la gelificación de gelana y la concentración se eligió en base a un estudio previo (Rodríguez-Hernández & Tecante, 1999). Sin embargo, esta concentración de calcio ( $0.01 \text{ mol/dm}^3$ ) es superior a la requerida para neutralizar los grupos carboxilos de gelana, en todas las concentraciones de gelana examinadas en este trabajo. Por lo tanto, resulta pertinente recomendar estudios donde se usen concentraciones de calcio, menores y mayores que las estequiométricamente requeridas para neutralizar los grupos carboxilo de su molécula para obtener más información acerca de su mecanismo de gelificación.

Un aspecto controversial en el estudio reológico de mezclas almidón-hidrocoloide es determinar si efectivamente existe un efecto de inhibición en el hinchamiento del gránulo debido a la presencia de hidrocoloide. Por lo tanto el uso de técnicas más finas (distribución de tamaño de partícula, microscopía con análisis de imágenes) que las clásicamente usadas para evaluar el hinchamiento del gránulo de almidón podría contribuir a esclarecer esta interrogante.

Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron la importancia de parámetros como: la interconexión de la red de gelana, el grosor de los filamentos que conforman su red y el tamaño de los espacios intersticiales en las propiedades reológicas de los geles. Sin embargo, con los recursos disponibles en el momento de realizar este estudio, no se pudo realizar un análisis cuantitativo de la microscopía de las muestras, lo cual pudiera ampliar el conocimiento de la organización estructural en estos sistemas y su efecto en sus propiedades reológicas.

# ANEXOS

## ANEXO A

### DETERMINACIÓN DE SOLUBILIDAD E ÍNDICE DE HINCHAMIENTO DE ALMIDÓN.

Se determinaron los parámetros de solubilidad e hinchamiento por triplicado en dispersiones de almidón preparadas siguiendo una cinética de calentamiento y velocidad de agitación establecidas (1.5 °C/min y 75 rpm respectivamente). Se obtuvieron alícuotas de pastas de almidón (1, 2 y 3% m/m) en intervalos de 5 °C a partir de 60 °C y hasta el final de la preparación (75 °C) para las curvas de hinchamiento y solubilidad en función de la temperatura, y alícuotas sólo al final de la preparación (75 °C) para las concentraciones restantes de almidón (4 a 7%).

- 1) Las alícuotas de las pastas se diluyeron a 0.5% (m/m) con agua destilada caliente ( $60 \pm 5$  °C) en tubos de ensaye con tapón roscado invirtiendo suavemente los tubos para homogeneizar la dilución.
- 2) Los tubos con las diluciones se colocaron inmediatamente en agua a temperatura ambiente para evitar que la cocción continúe. La masa final de la dilución se procuró que estuviera entre 16 y 20 gramos.
- 3) Una vez a temperatura ambiente, de cada tubo se tomó una alícuota de 8 mL y se colocó en un tubo de centrifuga previamente pesado y etiquetado. Estos tubos se centrifugaron a 700 g (2200 rpm) durante 15 minutos (Leach *et al*, 1959).
- 4) El resto del contenido de los tubos se colocó en cápsulas de aluminio a peso constante. Se pesaron las muestras y se secaron en una estufa a 100 °C durante 24 horas para determinar sólidos secos totales ( $C_s$ ) en la dilución preparada. Se considera que las diluciones tienen densidad igual a la del agua, de esta forma  $C_s$  se puede expresar en mg/mL.

- 5) Al término de la centrifugación, en cada tubo se separó, cuidadosamente (procurando no tomar sólidos), el sobrenadante del sedimento (almidón hinchado). Se utilizó una pipeta automática para succionar el sobrenadante lentamente evitando tocar la interfase. El sobrenadante obtenido se colocó en tubos graduados para medir su volumen ( $V_s$ ) y los tubos de centrifuga con el residuo húmedo se pesaron obteniéndose el peso de residuo húmedo ( $Rh$ ) por diferencia.

$$Rh = (\text{masa de tubos con residuo}) - (\text{masa de tubos})$$

De acuerdo con Leach *et al* (1959), la solubilidad se obtiene determinando los sólidos presentes en el sobrenadante a partir de secado a vacío durante 4 horas a 120 °C. Sin embargo, en este trabajo se utilizó otra técnica para cuantificar el almidón en solución. El índice de hinchamiento por otra parte, se obtiene relacionando la masa de residuo húmedo entre la masa de almidón seco no disuelto.

La solubilidad ( $S$ ) fue determinada cuantificando carbohidratos totales en el sobrenadante ( $Cas$ ) por el método fenol-sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956), relacionando la masa de éstos con la masa total de almidón en la dilución (Ecuación A-1).

$$S = \frac{CasVs}{8Cs} 100 \quad (A - 1)$$

Donde:

$S$  = solubilidad de almidón (%)

$Cas$  = concentración de almidón soluble en el sobrenadante (mg/mL)

$V_s$  = volumen de sobrenadante en mL

$Cs$  = sólidos secos totales en la dilución (mg/mL)

y 8 es el volumen de la alícuota (mL).

El grado de hinchamiento de los gránulos en las pastas estudiadas se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$H = \frac{Rh}{(8Cs - CasVs)} \quad (A - 2)$$

Donde:

$H$  = índice de hinchamiento del gránulo de almidón en las pastas (mg/mg)

$Rh$  = Masa del residuo húmedo (mg)

En el divisor de la ecuación anterior se hace la corrección por solubilidad del almidón total, de tal forma que el hinchamiento es la masa del almidón hinchado referida a la masa de almidón que no se disolvió (masa total-masa disuelta).

Bagley y Christianson (1982) propusieron que el producto del índice de hinchamiento y la concentración de suspensiones de almidón puede aproximarse a una fracción volumen si la densidad de las dispersiones se aproxima a la unidad. De aquí la importancia de utilizar diluciones de baja concentración ( $\approx 0.5\%$ ) e interpolar los resultados a las concentraciones de las pastas.

$$CQ = \left[ \frac{\text{masa de almidón total}}{\text{masa de suspensión}} \right] \left( \frac{\text{masa de almidón hinchado}}{\text{masa de almidón total}} \right) = \left( \frac{\text{masa de almidón hinchado}}{\text{masa de suspensión}} \right)$$

Considerando que parte del almidón se disuelve y no participa en la fracción volumen de gránulos hinchados, Doublier (1987) propuso una corrección por solubilización al parámetro anterior al que han denominado  $\Phi$ .

$$\Phi = \left( 1 - \frac{S}{100} \right) CH \quad (\text{A - 3})$$

Donde:

$C$  = concentración de almidón en la pasta (g/g)

$H$  = índice de hinchamiento (g/g)

$S$  = solubilidad (%)

Esta ecuación supone que el sedimento está compuesto únicamente por partículas hinchadas de almidón, consecuentemente en la fase continua se encontrarán las macromoléculas que lograron disolverse.

## ANEXO B

### ZONA DE VISCOELASTICIDAD LINEAL DE LOS SISTEMAS ESTUDIADOS

La zona de viscoelasticidad lineal se determinó a partir de un barrido de deformación a una frecuencia de oscilación constante (1 rad/s) y a temperatura de 25 °C. El siguiente cuadro muestra los límites de esta zona en los distintos sistemas estudiados, así como el valor de deformación (%) en el cual se determinaron los espectros mecánicos y la geometría de medición en el equipo utilizado.

MEZCLA	ZONA LINEAL % $\gamma$	ESPECTRO MECÁNICO (% $\gamma$ )	GEOMETRIA
<b>ALMIDÓNAGELANA</b>			
Concentraciones altas de gelana Pastas cocidas a 90 °C			
7/0.3	2.0 a 3.0	3	PP
5/0.3	1.8 a 2.8	2.5	PP
3/0.3	1.8 a 2.3	2.3	PP
7/0.2	2.0 a 5.0	3	PP
5/0.2	1.8 a 3.0	2.5	PP
3/0.2	1.8 a 2.8	2.5	PP
7/0.1	4.0 a 15	12	PP
5/0.1	2.0 a 9.0	9	PP
3/0.1	2.0 a 3.0	3	PP
7/0	1 a (>25)	10	CC
5/0	30 a (>40)	35	CC
3/0	0 a (>20)	5	CC
Concentraciones bajas de gelana Pastas cocidas a 90 °C			
3/0.05	0.5 a 2.0	1.5	CC
3/0.04	0.5 a 2.0	1.5	CC
3/0.03	0.5 a 3.5	2.0	CC

3/0.02	1 a 9	2.5	CC
3/0.01	0.5 a 3.5	1	CC
3/0.005	0.5 a (>20)	5	CC
Pastas cocidas a 75 °C			
3/0.05	1 a 4	2.5	CC
3/0.03	1 a 4	2.5	CC
3/0.01	1 a (>15)	2.5	CC
3/0.005	1 a (>15)	2.5	CC
3/0	1 a (>15)	5	CC
AMILOPECTINAAGELANA			
Concentraciones bajas de gelana			
7/0.05	1 a 8	2.5	CC
7/0.02	1 a (>20)	5	CC
7/0.01	1 a (>20)	5	CC
7/0.005	5 a (>20)	7	CC
3/0.05	1 a 2	1.5	CC
3/0.03	1 a 6	2.5	CC
3/0.01	1 a 7	5	CC
3/0.005	8 a (>20)	10	CC
AMILOPECTINA			
7/0	4 a (>30)	20	CC
5/0	7 a (>50)	25	CC
3/0	10 a (>50)	35	CC
GELANA			
0.3	2.0 a 4.0	4.0	PP
0.2	1.8 a 3.0	2.8	PP
0.1	2.5 a 4.5	4.5	PP
0.05	0 a 4	2.0	CC
0.04	0 a 4.5	2.5	CC
0.03	0 a 5	2.5	CC
0.02	0 a 6	2.5	CC
0.01	0 a 10	10	CC
0.005	0 a 13	10	CC

CC: Cilindros concéntricos (diámetro interno: 32 mm; diámetro externo: 34 mm, longitud de inmersión: 33 mm)  
Rheometrics Fluid Spectrometer, Rheometric Sci.

PP: Placas paralelas (Distancia entre placas= 3 mm) Haake Rotovisco RV 20 CV 20N.

## ANEXO C

### VISCOSIDAD INTRÍNSECA

#### 1. Determinación de viscosidad intrínseca

Se realizó cizallamiento simple estacionario en disoluciones diluidas de gelana, gelana fluorescente (gelana-FA), amilopectina y amilopectina fluorescente (Amilopectina-RITC). Las determinaciones se hicieron a 25 °C en un reómetro de deformación controlada (Low shear 40, Contraves, Switzerland). Se determinó la viscosidad a velocidad de cizalla cero ( $\eta_0$ ) a partir de la curva de flujo y se realizó el análisis correspondiente para obtener la viscosidad relativa ( $\eta_{rel}$ ), la viscosidad específica ( $\eta_{sp}$ ), la viscosidad reducida ( $\eta_{red} = \eta_{sp}/C$ ) y la viscosidad intrínseca  $[\eta]$ , extrapolando a concentración nula el valor de  $\eta_{sp}/C$  y  $\ln(\eta_{rel})/C$ , de acuerdo con las ecuaciones de Huggins y de Kraemer respectivamente. El valor de viscosidad intrínseca proporcionó una estimación indirecta del tamaño molecular de las macromoléculas estudiadas, por lo que se pudo determinar si el grado de despolimerización ocurrido durante el etiquetado fluorescente de los polisacáridos, podría modificar de forma importante su organización estructural, lo cual impediría correlacionar la información de microscopía confocal de barrido láser con las determinaciones reológicas de estos sistemas.

A partir de los datos de viscosidad de las soluciones diluidas de polisacárido ( $\eta$ ) y del disolvente utilizado ( $\eta_s$ ) se obtiene la viscosidad relativa definida como:

$$\eta_{rel} = \frac{\eta}{\eta_s} \quad (\text{C.1-1})$$

por otra parte la viscosidad específica se define como:

$$\eta_{sp} = \eta_{rel} - 1 \quad (\text{C.1-2})$$

y la viscosidad reducida

$$\eta_{red} = \frac{\eta_{sp}}{C} \quad (\text{C.1-3})$$

Donde C es la concentración del polisacárido expresada en g/L, g/dL o g/mL. Por definición la viscosidad intrínseca es:

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\eta_{sp}}{C} \quad (\text{C.1-4})$$

Este parámetro corresponde al volumen ocupado por unidad de masa en condiciones de dilución infinita (Doublier y Cuvelier, 1996), y está directamente relacionado con el peso molecular de la macromolécula en solución. Para polímeros neutros o polielectrolitos en exceso de sal o a fuerza iónica constante, la viscosidad relativa es una función monotonía de la concentración; por lo que la viscosidad relativa se puede expresar en series de potencias, donde el término enésimo se identifica como la contribución de la enésima interacción molecular. Sin embargo, cuando las condiciones de dilución permiten despreciar las interacciones cadena-cadena, la viscosidad relativa varía linealmente con la concentración del polímero (Lapasin y Pricl, 1995). Con base en lo anterior, se utilizan frecuentemente como alternativas analíticas la ecuación de Huggins (C.1-5) y la de Kraemer (C.1-6) para determinar el valor de  $[\eta]$  por extrapolación a concentración cero (dilución infinita). Se debe tener cuidado especial en evaluar el coeficiente de Huggins ( $k'$ ), un valor mayor que la unidad indica agregación de las cadenas poliméricas (Lapasin y Pricl, 1995), lo cual daría valores sobreestimados de la viscosidad intrínseca.

Ecuación de Huggins

$$\frac{\eta_{sp}}{C} = [\eta] + k'[\eta]^2 C \quad (\text{C.1-5})$$

Ecuación de Kraemer

$$\frac{\ln \eta_{rel}}{C} = [\eta] + k''[\eta]^2 C \quad (\text{C.1-6})$$

## 2. Gelana y gelana-FA

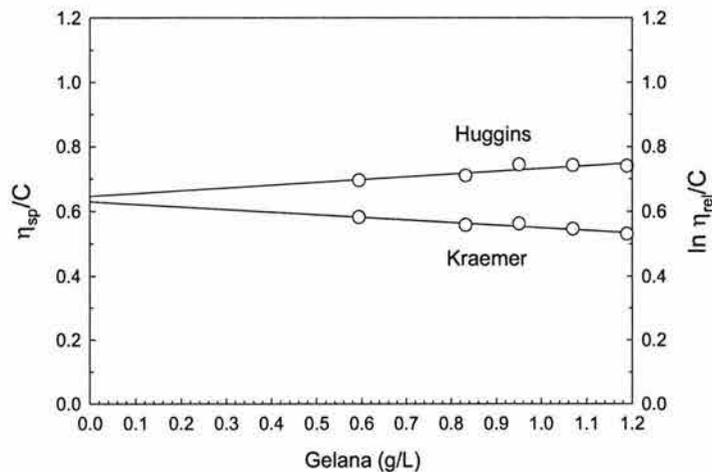
Se prepararon soluciones de gelana y gelana-FA (1 g/L) utilizando NaCl 0.01 mol/dm<sup>3</sup> como disolvente. Los polisacáridos se dispersaron a temperatura ambiente utilizando agitación magnética, posteriormente las dispersiones se calentaron a 85 °C para completar la disolución.

Las soluciones se enfriaron a temperatura ambiente y se utilizaron para preparar diluciones en el intervalo de concentraciones de 0.5 a 1.2 g/L. Se hicieron dos réplicas de cada concentración y éstas se sometieron a cizallamiento simple en el intervalo de velocidad de cizalla:  $100 - 7 \text{ s}^{-1}$ , para determinar el valor de viscosidad,  $\eta_0$ . Los valores de viscosidad relativa, específica y reducida se muestran en los Cuadros C.2-1 y C.2-2. La concentración de cada dilución se corrigió tomando el valor de los sólidos totales determinado por desecación de las muestras en un horno a  $103 \text{ }^\circ\text{C}$  durante el transcurso de la noche. Se realizó un ajuste de los datos de viscosidad reducida y  $\ln(\eta_{rel})/C$  a la ecuación de Huggins y a la ecuación de Kraemer, respectivamente, por medio de una regresión lineal como se muestra en las Figuras C.2-1 y C.2-2.

**Cuadro C.2-1.** Viscosidades de soluciones de gelana en NaCl  $0.01 \text{ mol/dm}^3$  a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Gelana (g/L)	$\eta_0$ (mPa)	$\eta_{rel}$	$\eta_{sp}$	$\eta_{sp}/C$	$\ln(\eta_{rel})/C$
0.594	1.289	1.413	0.413	0.696	0.582
0.832	1.451	1.591	0.591	0.710	0.558
0.951	1.557	1.707	0.707	0.744	0.563
1.070	1.636	1.794	0.794	0.742	0.546
1.189	1.714	1.879	0.879	0.739	0.531

$\eta_{disolvente} : 0.912 \text{ mPa}$



**Figura C.2-1.** Determinación de viscosidad intrínseca de gelana.

HUGGINS:

$$\frac{\eta_{sp}}{C} = [\eta] + k'[\eta]^2 C$$

$$[\eta] = 0.645 \text{ L/g}$$

$$k' = 0.2057$$

KRAEMER:

$$\frac{\ln \eta_{rel}}{C} = [\eta] + k''[\eta]^2 C$$

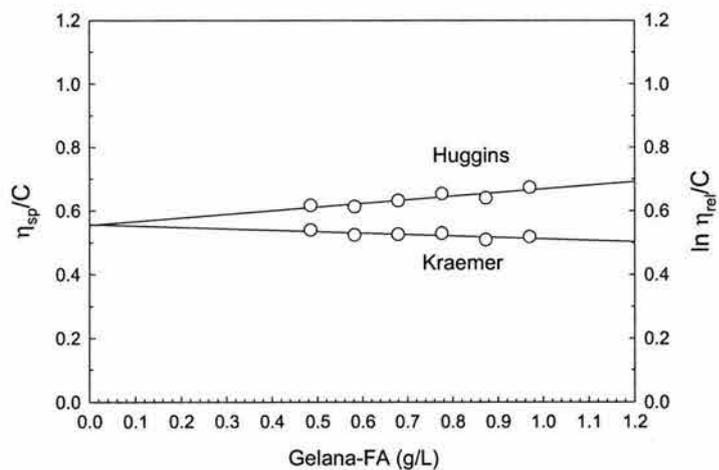
$$[\eta] = 0.630 \text{ L/g}$$

$$k'' = 0.2013$$

**Cuadro C.2-2.** Viscosidades de soluciones de gelana-FA en NaCl 0.01 mol/dm<sup>3</sup> a 25 °C.

Gelana-FA (g/L)	$\eta_0$ (mPa)	$\eta_{rel}$	$\eta_{sp}$	$\eta_{sp}/C$	$\ln(\eta_{rel})/C$
0.485	1.209	1.299	0.299	0.617	0.539
0.582	1.262	1.357	0.357	0.613	0.524
0.679	1.329	1.430	0.430	0.632	0.526
0.776	1.4028	1.507	0.507	0.654	0.529
0.873	1.450	1.559	0.559	0.640	0.509
0.970	1.538	1.653	0.653	0.674	0.518

$\eta_{disolvente} : 0.9302 \text{ mPa}$



**Figura C.2-2.** Determinación de viscosidad intrínseca de gelana-FA.

HUGGINS:

$$\frac{\eta_{sp}}{C} = [\eta] + k'[\eta]^2 C$$

$$[\eta] = 0.555 \text{ L/g}$$

$$k' = 0.369$$

KRAEMER:

$$\frac{\ln \eta_{rel}}{C} = [\eta] + k''[\eta]^2 C$$

$$[\eta] = 0.556 \text{ L/g}$$

$$k'' = 0.1432$$

### 3. Amilopectina y amilopectina-RITC

Se prepararon soluciones de amilopectina y amilopectina-RITC (2 g/L) utilizando agua desionizada como disolvente. Los polisacáridos se dispersaron a temperatura ambiente utilizando agitación magnética, posteriormente las dispersiones se calentaron hasta 90 °C para completar la disolución. Las soluciones se enfriaron a temperatura ambiente y se utilizaron para preparar diluciones en el intervalo de concentraciones: 1 a 2 g/L. Se hicieron dos réplicas de cada concentración y éstas se sometieron a cizallamiento simple en el intervalo de velocidad de cizalla: 100 -7 s<sup>-1</sup>, para determinar el valor de viscosidad,  $\eta_0$ . Los valores de viscosidad relativa, específica y reducida se muestran en los Cuadros C.3-1 y C.3-2. La concentración de cada dilución se corrigió tomando el valor de los sólidos totales determinado por desecación de las muestras en un horno a 103 °C durante el transcurso de la noche. Se realizó un ajuste de los datos de viscosidad reducida y  $\ln(\eta_{rel})/C$  a la ecuación de Huggins y a la ecuación de Kraemer, respectivamente, por medio de una regresión lineal como se muestra en las Figuras C.3-1 y C.3-2.

**Cuadro C.3-1.** Viscosidades de soluciones acuosas de amilopectina a 25 °C.

Amilopectina (g/L)	$\eta_0$ (mPa)	$\eta_{rel}$	$\eta_{sp}$	$\eta_{sp}/C$	$\ln(\eta_{rel})/C$
1.077	1.0440	1.166	0.166	0.155	0.143
1.293	1.066	1.191	0.191	0.148	0.135
1.508	1.107	1.237	0.237	0.157	0.141
1.723	1.139	1.273	0.273	0.158	0.140
1.939	1.161	1.297	0.297	0.153	0.134

$\eta_{disolvente} = 0.895 \text{ mPa}$

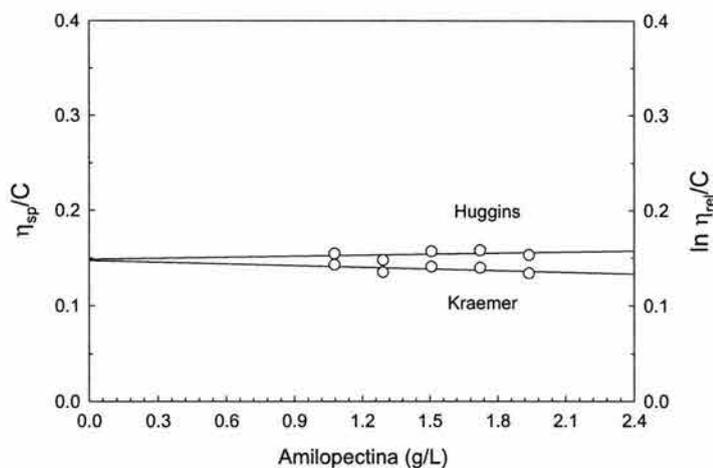


Figura C.3-1. Determinación de viscosidad intrínseca de amilopectina.

HUGGINS:

$$\frac{\eta_{sp}}{C} = [\eta] + k'[\eta]^2 C$$

$$[\eta] = 0.149 \text{ L/g}$$

$$k' = 0.167$$

KRAEMER:

$$\frac{\ln \eta_{rel}}{C} = [\eta] + k''[\eta]^2 C$$

$$[\eta] = 0.148 \text{ L/g}$$

$$k'' = 0.271$$

Cuadro C.3-2. Viscosidades de soluciones acuosas de amilopectina-RITC a 25 °C.

Amilopectina (g/L)	$\eta_0$ (mPa)	$\eta_{rel}$	$\eta_{sp}$	$\eta_{sp}/C$	$\ln (\eta_{rel})/C$
0.969	1.021	1.141	0.141	0.145	0.136
1.163	1.037	1.159	0.159	0.136	0.127
1.357	1.079	1.206	0.206	0.151	0.138
1.551	1.096	1.224	0.224	0.144	0.130
1.744	1.117	1.247	0.247	0.142	0.127

$\eta_{disolvente} : 0.895 \text{ mPa}$

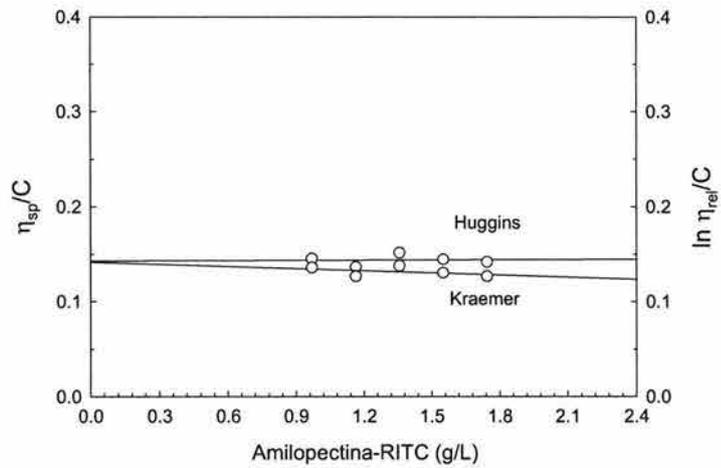


Figura C.3-2. Determinación de viscosidad intrínseca de amilopectina-RITC.

HUGGINS:

$$\frac{\eta_{sp}}{C} = [\eta] + k'[\eta]^2 C$$

$$[\eta] = 0.143 \text{ L/g}$$

$$k' = 0.035$$

KRAEMER:

$$\frac{\ln \eta_{rel}}{C} = [\eta] + k''[\eta]^2 C$$

$$[\eta] = 0.142 \text{ L/g}$$

$$k'' = 0.369$$

## ANEXO D

### REOMETRÍA DE CIZALLA OSCILATORIA DE PEQUEÑA AMPLITUD

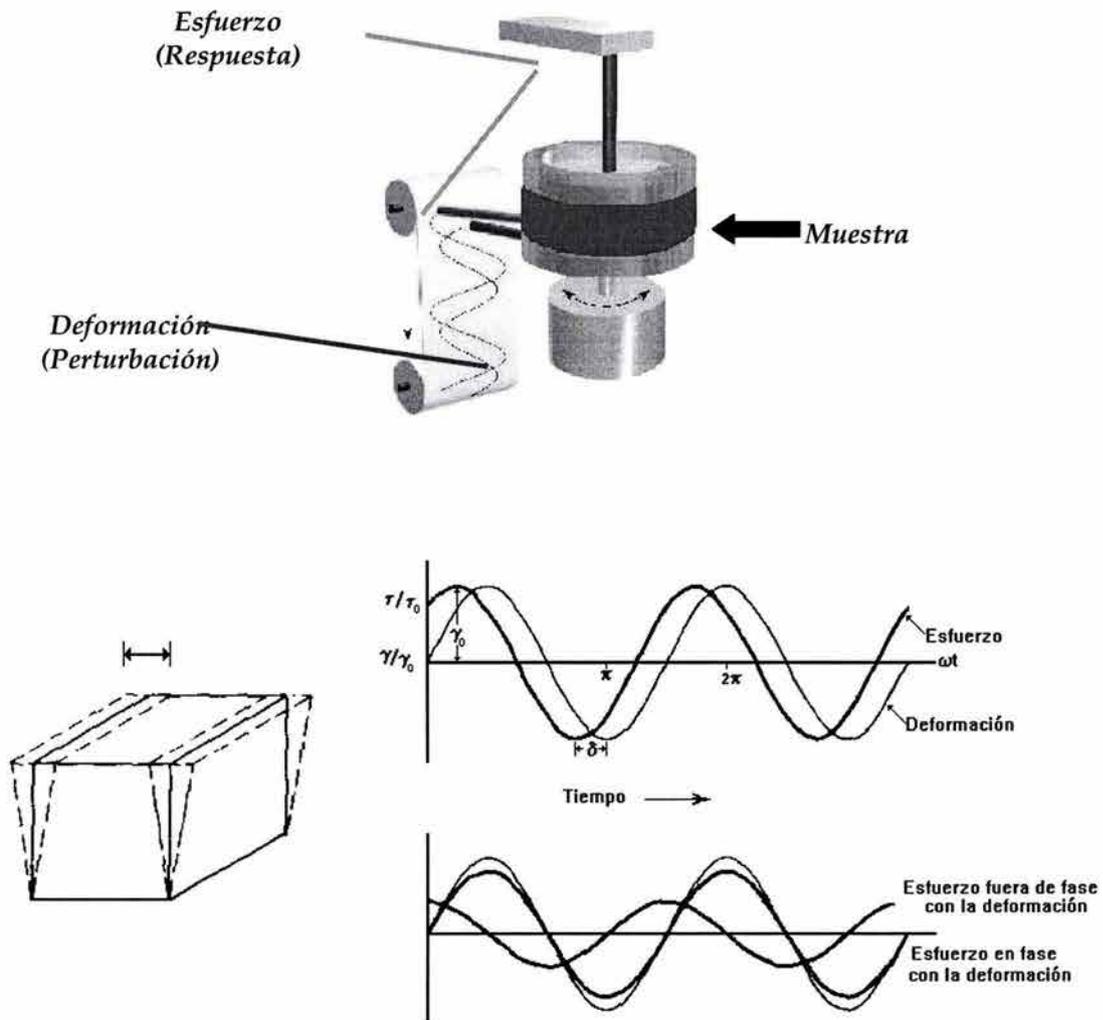


Figura D-1 Geometría y perfil de tiempo de un experimento de cizalla simple oscilatoria

### Flujo de cizalla simple, no estacionario reológicamente, oscilatorio de pequeña amplitud.

Este tipo de experimentos proporciona información del material a tiempos muy cortos de observación, 0.1 a 100 s, aunque usualmente durante la experimentación, sólo se pueden cubrir 2 o 3 ciclos logarítmicos. El material se somete a un esfuerzo (o deformación) oscilatorio sinusoidal a una frecuencia  $\omega$  (Hz, rad/s), si el comportamiento viscoelástico es lineal, la respuesta del material (deformación o esfuerzo) oscilará también sinusoidalmente pero estará fuera de fase con la perturbación aplicada, como se ha esquematizado en la Figura D-1. La diferencia de fase entre el esfuerzo y la deformación así como la amplitud de la deformación (o esfuerzo) resultante, se miden y se utilizan para determinar las funciones materiales propias de este tipo de prueba. El desarrollo matemático para la obtención de las funciones materiales ( $G'$ ,  $G''$ ,  $\tan \delta$ ,  $\eta'$ ,  $\eta''$ ) en este tipo de experimentos, implica las siguientes suposiciones:

- a) efectos de inercia despreciables
- b) deformación relativa homogénea
- c) oscilación armónica simple
- d) la amplitud del esfuerzo es proporcional a la amplitud de la deformación
- e) el desfase ( $\delta$ ) es independiente de la amplitud del esfuerzo o deformación aplicada
- f) deformación relativa lineal.

Este último punto se debe verificar previo al estudio reométrico para garantizar que las funciones materiales obtenidas sean función únicamente del tiempo y no de la magnitud del esfuerzo o deformación impuesta al material; lo anterior se puede hacer observando el cambio que tienen los módulos o la tangente de delta al incrementar la amplitud de oscilación manteniendo la frecuencia constante. El intervalo de linealidad se registra donde  $G'$  y  $G''$  se consideran constantes.

Partiendo de una deformación impuesta al material:

$$\gamma = \gamma_0 \cos(\omega t) \quad (D - 1)$$

La respuesta del material a esta perturbación sería:

$$\sigma = \sigma_0 \cos(\omega t + \delta) \quad (D - 2)$$

Usando la identidad trigonométrica:

$$\cos(\alpha \pm \beta) = \cos \alpha \cos \beta \mp \text{sen} \alpha \text{sen} \beta \quad (D - 3)$$

y adaptándola a la Ecuación D-2:

$$\sigma = \sigma_0 \cos \delta \cos \omega t - \sigma_0 \text{sen} \delta \text{sen} \omega t \quad (D - 4)$$

dividiendo por  $\gamma_0$  la Ecuación D-4:

$$\frac{\sigma}{\gamma_0} = \frac{\sigma_0}{\gamma_0} \cos \delta \cos \omega t - \frac{\sigma_0}{\gamma_0} \text{sen} \delta \text{sen} \omega t \quad (D - 5)$$

Si ahora de la Ecuación D-5 tomamos los términos independientes de la amplitud de deformación aplicada que se consideren propiedades sólo del material ( $\sigma_0/\gamma_0$  y  $\delta$ ) y definimos a partir de ellos a los módulos dinámicos ( $G'$  y  $G''$ ), tenemos:

$$\frac{\sigma_0}{\gamma_0} \cos \delta \equiv G' \quad (D - 6)$$

$$\frac{\sigma_0}{\gamma_0} \text{sen} \delta \equiv G'' \quad (D - 7)$$

En donde  $G'$  y  $G''$  son los módulos de almacenamiento y de pérdida, respectivamente; el primero indica la cantidad de energía que se almacena en el material en cada ciclo de deformación y el último es un indicativo de la cantidad de energía disipada durante cada ciclo de deformación. Para un sólido perfectamente elástico, donde toda la energía se almacena y recupera en cada ciclo,  $G''$  tendrá un valor de cero y el esfuerzo y deformación estarán en fase ( $\delta = 0$ ); contrariamente, para un líquido perfectamente viscoso, donde toda la energía se disipa en forma de calor,  $G'$  tendrá un valor de cero y el esfuerzo y la deformación estarán desfasados  $90^\circ$ .

Por lo tanto para un material viscoelástico, donde tanto la componente elástica como la viscosa están presentes, el ángulo de desfase ( $\delta$ ) tendrá un valor intermedio entre  $0^\circ$  y  $90^\circ$ .

Sustituyendo ahora D-6 y D-7 en Ecuación D-5:

$$\sigma = \gamma_0 (G' \cos \omega t - G'' \sin \omega t) \quad (D - 8)$$

Comparando la Ecuación D-8 y la Ecuación D-1, es evidente que el término que contiene  $\cos \omega t$  está en fase con la deformación impuesta y que el término que contiene  $\sin \omega t$  está desfasado  $90^\circ$  con respecto a la deformación impuesta, por lo tanto  $G'$  y  $G''$  también se pueden definir como:

$$G' = \frac{\text{amplitud del esfuerzo en fase con la deformacion relativa}}{\text{amplitud de la deformacion relativa}}$$

$$G'' = \frac{\text{amplitud del esfuerzo fuera de fase } 90^\circ \text{ con la deformacion relativa}}{\text{amplitud de la deformacion relativa}}$$

dividiendo ahora la Ecuación D-7 entre la Ecuación D-6,

$$\tan \delta = \frac{G''}{G'} \quad (D - 9)$$

Este parámetro adimensional es una relación entre la energía almacenada y la disipada en cada ciclo de deformación. El valor de delta indica la tendencia del comportamiento del material, para un comportamiento completamente elástico el valor de delta será cero y para un comportamiento completamente viscoso, delta valdrá  $90^\circ$ , por lo tanto materiales con tangentes de delta con tendencia a cero tendrán un comportamiento reológico donde predomine la componente elástico y viceversa.

A menudo es conveniente expresar los módulos en notación compleja y además definir un módulo dinámico complejo, para tal efecto se presenta la deducción haciendo uso de la ecuación de Euler:

$$e^{i\omega t} = \cos \omega t + i \sin \omega t \quad (D - 10)$$

utilizando notación compleja, la Ecuación D-1 la podemos escribir como:

$$\gamma = \gamma_0 \Re(e^{i\omega t}) \quad (D - 11)$$

y el esfuerzo de cizalla

$$\sigma = \sigma_0 \Re(e^{i(\omega t + \delta)}) \quad (D - 12)$$

desarrollando la Ecuación D-12 utilizando la Ecuación de Euler y dividiendo entre  $\gamma_0$ :

$$\frac{\sigma}{\gamma_0} = \frac{\sigma_0}{\gamma_0} (\cos \omega t \cos \delta - \text{sen} \omega t \text{sen} \delta) \quad (D - 13)$$

definiendo a  $G'$  y  $G''$  como el componente en fase y desfasado  $90^\circ$  con la deformación, respectivamente, obtenemos nuevamente:

$$G' \equiv \frac{\sigma_0}{\gamma_0} \cos \delta$$

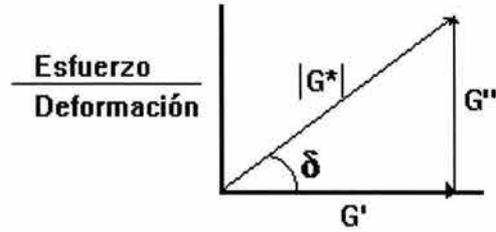
$$G'' \equiv \frac{\sigma_0}{\gamma_0} \text{sen} \delta$$

Para definir un módulo complejo  $G^*$ , ubicamos al módulo  $G'$  y  $G''$  en el plano complejo como se muestra en la Figura D-2 de tal forma que  $G'$  corresponda a la relación esfuerzo/deformación en fase con la deformación ( $\delta = 0$ ) y  $G''$  al módulo o relación esfuerzo/deformación fuera de fase  $90^\circ$  con la deformación; sumando vectorialmente las dos componentes (elástica y viscosa) del comportamiento viscoelástico obtenemos:

$$G^* = G' + iG'' \quad (D - 14)$$

y la magnitud del módulo complejo estará dada por la Ecuación D-15, de acuerdo a lo representado en el plano complejo (Figura D-2)

$$|G^*| = \sqrt{(G'^2 + G''^2)} \quad (D - 15)$$



**Figura D-2** Resolución vectorial de los componentes del módulo complejo en deformaciones de cizalla oscilatoria

Para obtener la representación compleja del módulo complejo  $G^*$ , se sustituyen las Ecuaciones D-6 y D-7 en la ecuación que define a  $G^*$  (Ecuación D-14)

$$G^* = \frac{\tau_0}{\gamma_0} e^{i\delta} \quad (D-16)$$

Las expresiones anteriores son útiles para caracterizar materiales viscoelásticos. Para el caso concreto de líquidos viscoelásticos es más práctico utilizar viscosidades ( $\eta'$ ,  $\eta''$  y  $\eta^*$ ), las cuales se han definido como las relaciones esfuerzo/velocidad de deformación en fase con la rapidez de deformación ( $\eta'$ ) o desfasado  $90^\circ$  con respecto a la rapidez de deformación ( $\eta''$ ). Para la deducción de estas expresiones se parte de un análisis similar al anterior pero la perturbación que se le proporciona al material es la rapidez de deformación en lugar de una deformación relativa, por lo tanto derivando la Ecuación D-1 con respecto al tiempo para obtener la rapidez de deformación relativa, obtenemos:

$$\dot{\gamma} = -\gamma_0 \omega \text{sen} \omega t \quad (D-17)$$

si definimos a la amplitud de la rapidez de deformación como:

$$\dot{\gamma}_0 = \omega \gamma_0 \quad (D-18)$$

combinando las Ecuaciones D-18 y D-17 se obtiene la perturbación que se le impone al material en función de la amplitud de la rapidez de deformación

$$\dot{\gamma} = -\dot{\gamma}_0 \text{sen} \omega t \quad (D-19)$$

la respuesta del material a esta perturbación será entonces:

$$\sigma = \sigma_0 \cos(\omega t + \delta) \quad (D - 20)$$

utilizando nuevamente la Ecuación D-2 y dividiendo entre  $\dot{\gamma}_0$

$$\frac{\sigma}{\dot{\gamma}_0} = \frac{\sigma_0}{\dot{\gamma}_0} (\cos \omega t \cos \delta - \text{sen} \omega t \text{sen} \delta) \quad (D - 21)$$

Observando la Ecuación D-21 y la D-19 resulta claro que en este caso el componente en fase con la rapidez de deformación es el término que contiene la función seno, mientras que el término que involucra a la función coseno está fuera de fase en  $90^\circ$  con  $\dot{\gamma}$ ; por lo tanto definiendo ahora dos nuevas funciones materiales,  $\eta'$  y  $\eta''$ , viscosidad en fase con la rapidez de deformación, o viscosidad dinámica, y viscosidad fuera de fase en  $90^\circ$  con la rapidez de deformación:

$$\eta' \equiv \frac{\sigma_0}{\dot{\gamma}_0} \text{sen} \delta \quad (D - 22)$$

$$\eta'' \equiv \frac{\sigma_0}{\dot{\gamma}_0} \cos \delta \quad (D - 23)$$

sustituyendo D-22 y D-23 en la Ecuación D-21:

$$\sigma = \dot{\gamma}_0 (\eta'' \cos \omega t - \eta' \text{sen} \omega t) \quad (D - 24)$$

ecuación que expresa la respuesta de un material sometido a una rapidez de deformación oscilatoria, en función de las componentes en fase y fuera de fase con la rapidez de deformación.

Combinando las Ecuaciones D-19 y D-24:

$$\sigma = \eta' \dot{\gamma} + \eta'' \dot{\gamma}_0 \cos \omega t \quad (D - 25)$$

para un material puramente viscoso, donde  $\eta'' = 0$ ,

$$\eta' \rightarrow \eta(\dot{\gamma}) \text{ cuando } \omega \rightarrow 0$$

De igual forma que para el caso de los módulos dinámicos, se puede definir una viscosidad compleja, para lo cual partiremos de la definición de deformación y esfuerzo complejo

$$\gamma^* = \gamma_0 e^{i\omega t} \quad (D - 26)$$

$$\sigma^* = \sigma_0 e^{i(\omega t + \delta)} \quad (D - 27)$$

derivando la Ecuación D-26 con respecto al tiempo obtenemos una expresión compleja de la rapidez de deformación

$$\dot{\gamma}^* = \gamma_0 i \omega e^{i\omega t} \quad (D - 28)$$

a partir de estas tres últimas expresiones se definirá  $\eta^*$

$$\eta^* = \frac{\sigma^*}{\dot{\gamma}^*} \quad (D - 29)$$

sustituyendo D-27 y D-28 en Ecuación D-29

$$\eta^* = \frac{\sigma_0}{\gamma_0 i \omega} e^{i\delta} \quad (D - 30)$$

utilizando la ecuación de Euler y desarrollando el producto

$$\eta^* = -i \frac{\sigma_0}{\dot{\gamma}_0} \cos \delta + \frac{\sigma_0}{\dot{\gamma}_0} \text{sen} \delta \quad (D - 31)$$

sustituyendo las expresiones que definen  $\eta'$  y  $\eta''$  (Ecuaciones D-22 y D-23) en D-31 se llega a la expresión que define a la viscosidad compleja en función de sus dos componentes, componente viscosa ( $\eta'$ ) y elástica ( $\eta''$ ).

$$\eta^* = \eta' - i\eta'' \quad (D - 32)$$

Es muy práctico tener ecuaciones que relacionen las viscosidades y los módulos dinámicos, las expresiones más sencillas se obtienen relacionando  $G'$  con  $\eta''$ ,  $G''$  con  $\eta'$  y  $G^*$  con  $\eta^*$

$$\frac{G'}{\eta''} = \omega \quad (D - 33)$$

$$\frac{G''}{\eta'} = \omega \quad (D - 34)$$

$$\frac{G^*}{\eta^*} = i\omega \quad (D - 35)$$

## ANEXO E

### MICROSCOPIA CONFOCAL DE BARRIDO LÁSER

La microscopía confocal de barrido láser (MCBL) ha emergido como una nueva herramienta analítica para estudiar la microestructura de sistemas biológicos. Su principal aplicación ha sido en medicina y fisiología celular; sin embargo la microestructura y composición de alimentos también han sido beneficiadas. La Figura E-1 muestra un diagrama del principio de operación de la MCBL. El instrumento usa fuente de luz láser para iluminar, por medio del objetivo, un punto bien definido del espécimen (punto focal). Un escáner re-direcciona el haz de luz en el plano  $xy$ ,  $xz$  o  $yz$ , haciendo un barrido del punto iluminado del espécimen. La luz fluorescente y reflejada del espécimen se enfoca, mediante la óptica del equipo, a un punto confocal en el centro de la abertura confocal, *pinhole*. Solamente la luz procedente del plano focal definido en el espécimen es capaz de atravesar la apertura confocal y llegar al detector para producir una imagen que es en realidad una "sección óptica" del espécimen analizado (Brooker, 1995).

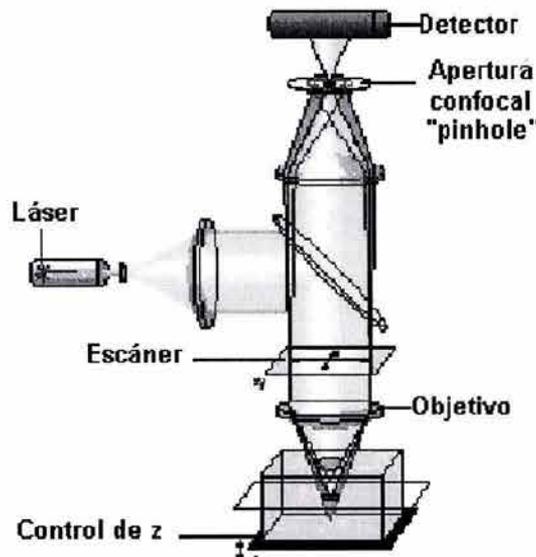


Figura E-1. Diagrama del principio de operación de MCBL

MCBL es hasta ahora la técnica de microscopía con mayores ventajas para producir secciones ópticas, extraordinariamente delgadas y con alta resolución, de especímenes gruesos (Aguilera *et al.*, 2000). Adicionalmente, MCBL permite obtener una serie de secciones ópticas al fijar el plano focal,  $xy$ , y mover el espécimen a lo largo del eje  $z$  bajo incrementos controlados. El resultado de la sobreposición de esta colección de imágenes es una representación tridimensional de la estructura espacial de la muestra, cuya calidad depende básicamente del espesor de cada sección óptica.

La mayoría de los equipos de MCBL comerciales son usados como microscopios confocales en el modo fluorescencia, aunque también estén adaptados para trabajar con luz láser transmitida o luz reflejada. En el modo de fluorescencia, las imágenes de varios componentes de la muestra se producen usando luz láser para excitar un pigmento fluorescente que ha sido ligado o difundido dentro del sistema a visualizar. Actualmente se disponen de una amplia variedad de cromóforos fluorescentes altamente especializados para ligar componentes como proteínas, carbohidratos, lípidos, iones, etc.

La ventaja principal de MCBL sobre microscopía óptica convencional es obvia, por ejemplo en microscopía de epifluorescencia, se obtiene simultáneamente una imagen de todo el espécimen, la cual incluye luz emitida fuera de foco a través del espesor de la muestra, tanto arriba como abajo del plano focal del objetivo. Estas imágenes pierden resolución y claridad, y se reconocen por resplandores asociados a estructuras de interés (Aguilera *et al.*, 2000). Actualmente, la tecnología de MCBL ha mejorado sustancialmente y los nuevos equipos tienen la posibilidad de producir luz de dos o más longitudes de onda diferentes, lo cual facilita visualizar distribuciones espaciales de diferentes componentes químicos dentro de una misma muestra.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AACC (2000). Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists, 10<sup>th</sup> edition, the American Association of Cereal Chemists, Inc.
- Abdulmola, N.A., Hember, M.W.N., Richardson, R.K. y Morris, E.R. (1996a). Application of polymer blending laws to starch-gelatin composites. *Carbohydrate Polymers*, 31, 53-63.
- Abdulmola, N.A., Hember, M.W.N., Richardson, R.K. y Morris, E.R. (1996b). Effect of xanthan on the small-deformation rheology of crosslinked and uncrosslinked waxy maize starch. *Carbohydrate Polymers*, 31, 65-78.
- Aguilera, J.M., Stanley, D.W. y Baker, K. W. (2000). New dimensions in microstructure of food products. *Trends in Food Science y Technology*, 11, 3-9.
- Alloncle M. (1990). Etude rheologique et structurale des interactions amidon-hydrocolloide, Thèse de Docteur en Sciences, Université de Paris-Sud Centre D'Orsay.
- Alloncle, M. y Doublier, J.L. (1991). Viscoelastic properties of maize starch/hydrocolloid pastes and gels. *Food Hydrocolloids*, 5, 455-467.
- Alloncle, M., Lefebvre, J., Llamas, G. y Doublier, J.L. (1989). A rheological characterization of cereal starch-galactomannan mixtures. *Cereal Chemistry*, 66, 90-93.
- Alves, M.M., Antonov, Yu. A. y Goncalves, M.P. (2000). Phase equilibria and mechanical properties of gel-like water-gelatin-locus bean gum systems. *International Journal of Biological Macromolecules*, 27, 41-47.
- Amici, E., Clark, A.H., Normand, V. y Johnson, N.B. (2001). Interpenetrating network formation in agarose-sodium gellan gel composites. *Carbohydrate Polymers*, 46, 383-391.
- Anónimo (1996). Multi-functional polysaccharide for gelling and texturizing-Gellan gum. San Diego, CA: Kelco Incorporated, a división of Monsanto Co.
- AOAC International (1990). Official Methods of Analysis of AOAC International, 15<sup>th</sup> edition, The Association. Arlington, VA.
- Appelqvist, I.A.M. y Debet, M. R. M. (1997). Starch-biopolymer interactions-a review. *Food Reviews International*, 13, 163-224.

- Atkin, N.J., Abeysekera, R.M., Cheng, S.L. y Robards, A.W. (1998a). An experimentally-based predictive model for the separation of amylopectin subunits during starch gelatinization. *Carbohydrate Polymers*, 36, 173-192.
- Atkin, N.J., Abeysekera, R.M. y Robards, A.W. (1998b). The events leading to the formation of ghost remnants from the starch granule surface and the contribution of the granule surface to the gelatinization endotherm. *Carbohydrate Polymers*, 36, 193-204.
- Ayres G.H. (1970). Determinación gravimétrica del cloruro y de la plata en "Análisis Químico Cuantitativo", Harla y Row Latinoamericana, México, pp 229-235.
- Bagley, E.B. y Christianson, D.D. (1982). Swelling capacity of starch and its relationship to suspension viscosity-effect of cooking time, temperature and concentration. *Journal of Texture Studies*, 13, 115-126.
- Banks, W. y Greenwood, C. T. (1975). Starch and its components, Edinburgh University Press, Edinburgh, 38-45, 67-87, 110-112.
- Banks, W., Geddes, R., Greenwood, C.T. y Jones, I.G. (1972). Physicochemical studies on starches Part 63. The molecular size and shape of amylopectin. *Starch/Stärke*, 24, 245-251.
- Biliaderis, C.G., Maurice, T.J. y Vose, J.R. (1980). Starch gelatinization phenomena studied by differential scanning calorimetry, *Journal of Food Science*, 45, 1669-1674.
- Biliaderis, C.G., Page, C.M., Maurice, T.J. y Juliano, B.O. (1986). Thermal characterization of rice starches: A polymeric approach to phase transitions of granular starch. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 34, 6-14.
- Bourriot, S., Garnier, C. y Doublier, J.L.(1999). Micellar-casein- $\kappa$ -carrageenan mixtures. I. Phase separation and ultrastructure. *Carbohydrate Polymers*, 40, 145-157.
- Bowler, P., Williams, M.R. y Angold, R.E. (1980). A hypothesis of the morphological changes which occur on heating lenticular wheat starch in water. *Starch/Stärke*, 32, 186-189.
- Brooker, B.E. (1995). Imaging food systems by confocal laser scanning microscopy. En "New Physico-Chemical Techniques for the Characterization of Complex Food Systems", E. Dickinson (ed.), Glasgow, Blackie Academic y Professional, Chapman y Hall. Gran Bretaña, pp. 53-68
- Buléon, A., Colonna, P., Planchot, V. y Ball, S. (1998). Starch granules: structure and biosynthesis, mini review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 23, 85-112.

- Chandrasekaran, R. y Radha, A. (1995). Molecular architectures and functional properties of gellan gum and related polysaccharides. *Trends in food Science y Technology*, 6, 143-148.
- Chandrasekaran, R., Lee, E.J., Radha, A., y Thailambal, V.G. (1992). Correlation of molecular architectures with physical properties of gellan related polymers. En "Frontiers in Carbohydrate Research", R. Chandrasekaran (ed), Elsevier Applied Science. Londres, pp. 65-84.
- Chandrasekaran, R., Millane, R.P., Arnott, S. y Atkins, E.D.T. (1988a). The crystal structure of gellan. *Carbohydrate Research*, 175, 1-15.
- Chandrasekaran, R., Puigjaner, L. C., Joyce, K. L., y Arnott, S. (1988b). Cation interactions in gellan: An X-ray study of the potassium salt. *Carbohydrate Research*, 181, 23-40.
- Christianson, D.D., Hodge, J.E., Osborne, D. y Detroy, R.W. (1981). Gelatinization of wheat starch as modified by xanthan gum, guar gum, and cellulose gum, *Cereal Chemistry*, 58, 513-517.
- Clark, A.H. (1992). Gels and gelling. En "Physical Chemistry of Foods", H.G. Schwartzberg y R.W. Harter (eds). Marcel Dekker, Inc., Nueva York, pp. 263-305.
- Clark, A.H. (1995). Kinetics of demixing. En "Biopolymer Mixtures", S.E. Harding, S.E. Hill y J.R. Mitchell (eds.), Nottingham University Press. Gran Bretaña, pp. 193-224
- Clark, A.H., Eyre, S.C.E., Ferdinando, D.P. y Lagarrigue, S. (1999). Interpenetrating network formation in gellan-maltodextrin gel composites. *Macromolecules*, 32, 7897-7906.
- Closs, C.B., Conde-Petit, B., Roberts, I.D., Tolstoguzov, V.B., y Escher, F. (1999). Phase separation and rheology of aqueous starch/galactomannan systems. *Carbohydrate Polymers*, 39, 67-77.
- Closs, C.B., Tolstoguzov, V.B., Conde-Petit, B. y Escher, F. (1997). Phase separation of aqueous starch/galactomannan systems: Influence of  $\beta$ -lactoglobulin addition. En "Gums and Stabilisers for the Food Industry 9". P.A. Williams y G.O. Phillips (eds.), The Royal Society of Chemistry. Cambridge, pp. 231-238
- Conde-Petit, B., Marchiondi, C., Closs, C., y Escher, F. (1997). Interactions between starch and non-starch hydrocolloids in aqueous food models, Proceedings of the 1st International Symposium on Food Rheology and Structure, E.J. Windhab and B. Wolf (eds.), Zurich, Switzerland, pp 233-237.

- Crescenzi, V., Dentini, M., y Dea, I.C.M. (1987). The influence of side-chains on the dilute-solution properties of three structurally related bacterial anionic polysaccharides. *Carbohydrate Research*, 160, 283-302.
- Da Silva, P.M.S., Oliveira, J.C. y Rao, M.A. (1997). Granule size distribution and rheological behavior of heated modified waxy and unmodified maize starch dispersions. *Journal of Texture Studies*, 28, 123-138.
- De Belder, A.N. y Granath, K. (1973). Preparation and properties of fluorescein-labelled dextrans, *Carbohydrate Research*, 30, 375-378.
- De Belder, A.N. y Wik, K.O. (1975). Preparation and properties of fluorescein-labelled hyaluronate. *Carbohydrate Research*, 44, 251-257.
- Doublier, J.L. y Cuvelier, G. (1996). Gums and Hydrocolloids: Functional Aspects. En "Carbohydrates in Food", A.C. Eliasson (ed.), Marcel Dekker, Inc. Nueva York, pp 283-318.
- Doublier, J.L. (1981). Rheological studies on starch-flow behaviour of wheat starch pastes, *Starch/Stärke*, 33, 416-420.
- Doublier, J.L. (1987). A rheological comparison of wheat, maize, faba bean and smooth pea starches. *Journal of Cereal Science*, 5, 247-262.
- Doublier, J.L., Llamas, G. y Le Meur, M. (1987). A rheological investigation of cereal starch pastes and gels. Effect of pasting procedures. *Carbohydrate Polymers*, 7, 251-275.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. y Smith F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28, 350-356.
- Durrani, C.M. y Donald, A.M. (1995). Physical characterisation of amylopectin gels. *Polymer Gels and Networks*, 3, 1-27.
- Durrani, C.M. y Donald, A.M. (2000). Shape, molecular weight distribution and viscosity of amylopectin in dilute solution. *Carbohydrate Polymers*, 41, 207-217.
- Durrani, C.M. Prystupa, D.A., Donald, A.M. y Clark A.H. (1993). Phase diagram of mixtures of polymers in aqueous solution using Fourier transform infrared spectroscopy. *Macromolecules*, 26, 981-987.
- Eidam, D. y Kulicke, W.M. (1995). Formation of maize starch gels selectively regulated by the addition of hydrocolloids. *Starch/Stärke*, 47, 378-384.

- Eliasson, A. y Gudmundsson, M. (1996). Starch: physicochemical and functional aspects. En "Carbohydrates in Food", Eliasson A. (ed.), Marcel Dekker. Inc. Nueva York, pp 431-503.
- Eliasson, A.C. (1986). Viscoelastic behaviour during the gelatinization of starch. 1. Comparison of wheat, maize, potato and waxy-barley starches. *Journal of Texture Studies*, 17, 253-265.
- Evans, I.D. y Haisman, D.R. (1979). Rheology of gelatinised starch suspensions. *Journal of Texture Studies*, 10, 347-370.
- Evans, I.D. y Lips, A. (1992). Viscoelasticity of gelatinized starch dispersions, *Journal of Texture Studies*, 23, 69-86.
- Fannon, J.E., Hauber, R.J. y BeMiller, J.N. (1992). Use of low-temperature scanning electron microscopy to examine starch granule structure and behavior. En "Frontiers in Carbohydrate Research-2", R. Chandrasekaran (ed.), Elsevier Applied Science. Londres, pp 1-23.
- Ferry, J.D. (1980). Viscoelastic properties of polymers, John Wiley y Sons, pp 426-428.
- Galliard, T. y Bowler, P. (1987). Morphology and composition of starch. *Critical Reports on Applied Chemistry*, 13, 55-78.
- Garnier, C., Bourriot, S. y Doublier, J.L. (1997). The use of confocal laser scanning microscopy in studying mixed biopolymer systems. En Gums and Stabilisers for the Food Industry 9, G.O. Phillips y P.A. Williams (eds.), Elsevier Applied Science, Londres, pp 247-256
- Grasdalen, H. y Smidsrod, O. (1987). Gelation of gellan gum. *Carbohydrate Polymers*, 7, 371-393.
- Gunning, A. P., Kirby, A.R., Ridout, M.J., Brownsey, G.J. y Morris, V.J. (1996). Investigation of gellan networks and gels by Atomic Force Microscopy. *Macromolecules*, 29, 6791-6796.
- Hizukuri, S. (1996). Starch: analytical aspects en " Carbohydrates in Food". Eliasson A. (ed.), Marcel Dekker. Inc., Nueva York, pp 347-429.
- Jansson, P., y Lindberg, B. (1983). Structural studies of gellan gum, an extracellular polysaccharide elaborated by *Pseudomonas elodea*. *Carbohydrate Research*, 124, 135-139.
- Kalichevsky, M.T. y Ring, S.G. (1987). Incompatibility of amylose and amylopectin in aqueous solution. *Carbohydrate Research*, 162, 323-328.
- Kalichevsky, M.T. Orford, P.D y Ring, S.G. (1986). The incompatibility of concentrated aqueous solutions of dextran and amylose and its effect on amylose gelation. *Carbohydrate Polymers*, 6, 145-154.

- Kasapis, S. (1995). Phase separation in hydrocolloids gels En "Biopolymer Mixtures", S.E. Harding, S.E. Hill y J.R. Mitchell (eds.), Nottingham University Press. Gran Bretaña, pp. 193-224
- Kasapis, S., Giannouli, P., Hember, M.W.N., Evageliou, V., Poulard, C., Tort-Bourgeois, B. y Sworn, G. (1999). Structural aspects and phase behavior in deacylated and high acyl gellan systems. *Carbohydrate Polymers*, 38, 145-154.
- Kinney, J.H. y Ladd, A. J. C. (1998). The relationships between three-dimensional connectivity and the elastic properties of trabecular Bone, *Journal of Bone and Mineral Research*, 13, 839-845.
- Krüger, A., Ferrero, C. y Zaritzky, N.E. (2003). Modelling corn starch swelling in batch systems: effect of sucrose and hydrocolloids. *Journal of Food Engineering*, 58, 125-133.
- Lapasin R. y Prici S. (1995). Rheology of polysaccharide systems En "Rheology of Industrial Polysaccharides: Theory and Applications". Chapman and Hall, Gran Bretaña, pp 267-306.
- Leach, H.W., McCowen, L.D. y Schoch, J. (1959). Structure of the starch granule. 1. Swelling and solubility patterns of various starches. *Cereal Chemistry*, 36, 534-544.
- Loh, J. (1992). The effect of shear rate and strain on the pasting behavior of food starches, *Journal of Food Engineering*, 16, 75-89.
- Loisel, C., Tecante, A., Cantoni, P. y Doublier, J.L. (1998). Influence de la composition et du traitement thermique sur les propriétés rhéologiques d'un système polyphasique: amidon-carraghénanes. *Les Cahiers de Rhéologie*, 16, 152-158.
- Lorén, N y Hermansson A.M. (2000). Phase separation and gel formation in kinetically trapped gelatin/ maltodextrin gels. *International Journal of Biological Macromolecules*, 27, 249-262.
- Lorén, N, Langton, M, y Hermansson A.M. (1999). Confocal laser scanning microscopy and image analysis of kinetically trapped phase-separated gelatin/ maltodextrin gels. *Food Hydrocolloids*, 13, 185-198.
- Mannion, R. O.; Melia, C. D.; Launay, B.; Cuvelier, G.; Hill, S. E.; Harding, S. E. y Mitchell, J. R. (1992). Xanthan/locust bean gum interactions at room temperature. *Carbohydrate Polymers.*, 19, 91-97
- Mao, R., Tang, J. y Swanson, B.G. (2000). Texture properties of high and low acyl mixed gellan gels. *Carbohydrate Polymers*, 41, 331-338.

- McIntire, T. M., y Brant, D.A. (1997). Imaging of individual biopolymers and supramolecular assemblies using non-contact Atomic Force Microscopy. *Biopolymers*, 42, 133-146.
- Milas, M. y Rinaudo, M. (1996). The gellan sol-gel transition. *Carbohydrate Polymers*, 30, 177-184.
- Milas, M., Shi, X., y Rinaudo, M. (1990). On the physicochemical properties of gellan gum. *Biopolymers*, 30, 451-464.
- Miyoshi, E. y Nishinari, K. (1999). Non-newtonian flow behaviour of gellan gum aqueous solutions. *Colloid Polymer Science*, 277, 727-734.
- Miyoshi, E., Takaya, T. Williams, P.A. y Nishinari, K. (1996). Effects of sodium chloride and calcium chloride on the interaction between gellan gum and konjac glucomannan. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 44, 2486-2495.
- Miyoshi, E., Takaya, T. y Nishinari, K. (1994a). Gel-sol transition in gellan gum solutions. I. Rheological studies on the effects of salts. *Food Hydrocolloids*, 8, 505-527.
- Miyoshi, E., Takaya, T. y Nishinari, K. (1994b). Gel-sol transition in gellan gum solutions. II. DSC studies on the effects of salts. *Food Hydrocolloids*, 8, 529-542.
- Mohammed, Z.H., Hember, M.W.N., Richardson, R.K. y Morris, E.R. (1998). Co-gelation of agarose and waxy maize starch. *Carbohydrate Polymers*, 36, 37-48.
- Morris, E.D. (1995). Polysaccharide synergism-more questions than answers? En "Biopolymer Mixtures", S.E. Harding, S.E. Hill y J.R. Mitchell (eds.), Nottingham University Press. Gran Bretaña, pp. 247-288.
- Morris, V.J. (1991). Weak and strong polysaccharide gels, En " Food Polymers, Gels and Colloids", Dickinson, E. (ed.), The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp 310-321.
- Morrison, W. R., Tester, R.F., Snape C.E., Law R. y Gidley M.J. (1993). Swelling and gelatinisation of cereal starches. IV. Some effects of lipid-complexed amylose and free amylose in waxy and normal barley starches. *Cereal Chemistry*, 70, 385-391.
- Nishinari, K., Watase, M., Rinaudo, M. y Milas, M. (1996). Characterization and properties of gellan- $\kappa$ -carrageenan mixed gels. *Food Hydrocolloids*, 10, 277-283.
- Norton, I.T. y Frith, W.J. (2001). Microstructure design in mixed biopolymer composites, *Food Hydrocolloids*, 15, 543-553.
- Okechukwu, P.E. y Rao, M.A. (1995). Influence of granule size on viscosity of cornstarch suspension, *Journal of Texture Studies*, 26, 501-516.

- Olkku, T. y Rha, C. (1978). Gelatinization of starch and wheat flour starch. A Review. *Food Chemistry*, 3, 293-317.
- Olsson, C., Langton, M, y Hermansson A.M. (2002). Microstructures of  $\beta$ -lactoglobulin/amylopectin gels on different length scales and their significance for rheological properties. *Food Hydrocolloids*, 16, 111-126.
- Olsson, C., Stading, M y Hermansson A.M. (2000). Rheological influence of non-gelling amylopectins on  $\beta$ -lactoglobulin gel structures. *Food Hydrocolloids*, 14, 473-483.
- Papageorgiou, M., Kasapis, S., y Richardson, R.K. (1994). Steric exclusion phenomena in gellan/gelatin systems. I. Physical properties of single and binary gels. *Food Hydrocolloids*, 8, 97-112.
- Piculell, L. Bergfeldt, K., y Nilsson, S. (1995). Factors determining phase behaviour of multicomponent polymer systems, En "Biopolymer Mixtures", S.E. Harding, S.E. Hill y J.R. Mitchell (eds.), Nottingham University Press. Gran Bretaña, pp. 193-224.
- Piculell, L., Nilsson, S. y Muhrbeck, P. (1992). Effect of small amounts of kappa-carrageenan on the rheology of aqueous iota-carrageenan. *Carbohydrate Polymers.*, 18, 199-208.
- Pomeranz Y. (1991). Carbohydrates: starch En "Functional Properties of Food Components", Academic Press. Nueva York, pp 24-78.
- Quemada, D. (1975). Rhéologie des systèmes dispersés. Une nouvelle loi viscosité-concentration pour les solutions et les suspensions concentrées. C.R. Acad. Sci. Paris, 281 (B), 173-176.
- Rao, M.A. y Tattiyakul, J. (1999). Granule size and rheological behavior of heated tapioca starch dispersions., *Carbohydrate Polymers*, 38, 123-132.
- Ring, S.G. y Orford, P.D. (1985). Recent observations on the retrogradation of amylopectin. En Gums and Stabilisers for the Food Industry 3, G.O. Phillips, D.J Wedlock y P.A. Williams (eds.), Elsevier Applied Science. Londres, pp 159-165.
- Ring, S.G., Colonna, P., l'Anson, M. T., Kalichevsky, M., Miles, J., Morris, V.J y Orford, P. D. (1987). The gelation and crystallisation of amylopectin. *Carbohydrate Research*, 162, 277-293.
- Rodríguez-Hernández, A. I. (1997). Propiedades reológicas dinámicas de geles formados por mezclas gelana-xantana y gelana-i-carragenina. Tesis de Maestría. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F.

- Rodríguez-Hernández, A.I. y Tecante, A. (1999). Dynamic viscoelastic properties behavior of gellan- $\iota$ -carrageenan and gellan-xanthan gels. *Food Hydrocolloids*, 13, 54-62.
- Ross-Murphy, S.B. (1995). Rheology of biopolymer solutions and gels. En "New Physico-Chemical Techiques for the Characterization of Complex Food Systems", E. Dickinson (ed.), Blackie Academic y Professional, Chapman y Hall. Gran Bretaña, pp. 139-156.
- Sanderson, G.R. (1990). Gellan Gum. En "Food Gels", P. Harris (ed.), Elsevier Applied Science. Nueva York, pp. 201-232.
- Sworn, G., Sanderson, G.R y Gibson, W. (1995). Gellan gum fluid gels. *Food Hydrocolloids*, 9, 265-271.
- Schorsch, C., Jones, M.G. y Norton, I.T. (1999). Thermodynamic incompatibility and microstructure of milk protein/locust bean gum/sucrose systems. *Food Hydrocolloids*, 13, 89-99.
- Shi, X. (1990). Relation entre la conformation et les propriétés d'un polysaccharide bactérien, le gellane. Tesis, Université Joseph-Fourier, Grenoble, France.
- Steeneken, P.A.M. (1989). Rheological properties of aqueous suspensions of swollen starch granules, *Carbohydrate Polymers*, 11, 23-42.
- Syrbe, A., Fernandes, P.B., Dannenberg, F., Bauer, W. y Klostermeyer, H. (1995). Whey protein+polysaccharide mixtures: polymer incompatibility and its application. En "Food Macromolecules and Colloids", E. Dickinson y D. Lorient (eds.), The Royal Society of Chemistry. Cambridge, pp 328-339.
- Takeda, Y., Shitaozono, T., Hizukuri, S. y Kagoshima (1988). Molecular structure of corn starch. *Starch/Stärke*, 40, 51-54.
- Tang, J., Tung, M.A. y Zeng, Y. (1996). Compression strength and deformation of gellan gels formed with mono and divalent cations, *Carbohydrate Polymers*, 29, 11-16.
- Tecante, A. y Doublier, J.L. (1999). Steady flow and viscoelastic behavior of crosslinked waxy corn starch- $\kappa$ -carrageenan pastes and gels, *Carbohydrate Polymers*, 40, 221-231.
- Tester, R.F. y Morrison, W.R. (1990). Swelling and gelatinization of cereal starches. I. effects of amylopectin, amylose, and lipids, *Cereal Chemistry*, 67, 551-557.
- Tester, R.F., Debon, S.J.J. y Sommerville, M.D. (2000). Annealing of maize starch. *Carbohydrate Polymers*, 42, 287-299.

- Tolstoguzov, V. (2003). Thermodynamic considerations of starch functionality in foods. *Carbohydrate Polymers*, 51, 99-111.
- Tromp, R.H., van de Velde, F., van Riel, J. y Paques, M. (2001). Confocal scanning light microscopy (CSLM) on mixtures of gelatine and polysaccharides. *Food Research International*, 34, 931-938.
- Upstill, C. Atkins, E.D.T y Attwool, P.T. (1986). Helical conformations of gellan gum. *International Journal of Biological Macromolecules*, 8, 275-288.
- Walkenström, P., Kidman, S., Hermansson, A.M., Rasmussen, P.B. y Hoegh, L. (2003). Microstructure and rheological behaviour of alginate/pectin mixed gels. *Food Hydrocolloids*, 17, 593-603.
- Williams, M.R., Bowler, P. (1982). Starch gelatinization: a morphological study of *Triticeae* and other starches. *Starch/Stärke*, 34, 221-223.
- Zhan, D. F. , Ridout, M. J. , Brownsey, G. J. y Morris, V. J. (1993). Xanthan-locust bean gum interactions and gelation. *Carbohydrate Polymers*, 21, 53-58.
- Ziegler, G.R., Thompson, D.B., Casasnovas, J. (1993). Dynamic measurement of starch granule swelling during gelatinization, *Cereal Chemistry*, 70, 247-251.
- Zobel, H.F. (1988). Molecules to granules: a comprehensive starch review. *Starch/Stärke*, 40, 44-50.



ELSEVIER

Food Hydrocolloids 17 (2003) 621–628

FOOD  
HYDROCOLLOIDS

www.elsevier.com/locate/foodhyd

## Rheology-structure properties of gellan systems: evidence of network formation at low gellan concentrations

A.I. Rodríguez-Hernández<sup>a</sup>, S. Durand<sup>b</sup>, C. Garnier<sup>b</sup>, A. Tecante<sup>a,\*</sup>, J.L. Doublier<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química "E", UNAM, Cd. Universitaria, 04510 México, DF, Mexico

<sup>b</sup>Laboratoire de Physico-Chimie des Macromolécules, INRA, BP 71627, 44316 Nantes Cedex 3, France

Received 12 June 2002; accepted 11 November 2002

### Abstract

The dynamic rheology and confocal laser scanning microscopy (CLSM) of gellan at low concentrations (0.005–0.05 wt%) in the presence of 10 mM CaCl<sub>2</sub> were investigated at 25 °C. DSC thermograms showed a conformational transition from coil to rigid helix at approximately 41 °C. Microscopy observations demonstrated that at these low gellan concentrations, the level of counter ions induced formation of a network, the compactness of which depended on gellan concentration. The reinforcement of the network structures by the increase of gellan concentration resulted in more elastic gels well evidenced through the rheology of the systems.

© 2003 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Gellan; Rheology; Confocal microscopy; Viscoelasticity; Gels

### 1. Introduction

Gellan is an extracellular polysaccharide produced by aerobic fermentation of *Sphingomonas elodea* (Sworn, Sanderson, & Gibson, 1995). The deacylated form is an anionic polysaccharide consisting of a linear tetrasaccharide repeating unit of [→3)-β-D-Glcp-(1→4)-β-D-GlcpA-(1→4)-β-D-Glcp-(1→4)-α-L-Rhap-(1→)] (Jansson & Lindberg, 1983). It forms firm, hard, and brittle gels, with gelation being dependent on the type of cation, ionic strength, temperature, and polymer concentration (Sanderson, 1990). It has been reported that gellan is able to form gels at concentrations as low as 0.05 wt%, however, the concentrations commonly used in food manufacture range from 0.2 to 0.4 wt% (Kelco International, 1991). Such low concentrations and gum multifunctional properties allow to get a wide spectrum of textures and to use gellan in combination with other hydrocolloids to enhance stability, structure formation and flavor release in food systems.

X-ray diffraction data conducted on Li<sup>+</sup>-gellan indicated that the molecular structure is an extended, intertwined, threefold left-handed double helix where the polysaccharide

is stabilized by interchain hydrogen bonds (Upstill, Atkins, & Attwool, 1986). X-ray examination of the K<sup>+</sup> salt (Upstill et al., 1986) showed that one K<sup>+</sup> ion is associated with the carboxylate group in every tetrasaccharide repeating unit surrounded by six ligands to induce the potassium coordination where both chains in the double helix participate. The ligands include two carboxylate oxygen atoms and a hydroxyl group in one chain, two hydroxyl groups in the other chain and a crystalline water molecule. All this structural organization is responsible for the high stability of the gellan double helix.

The gellan sol–gel transition and solution properties have been studied by several authors (Crescenzi, Dentini, & Dea, 1987; Grasdalen & Smidsrod, 1987; Milas, Shi, & Rinaudo, 1990; Shi, 1990). These studies revealed the existence of a reversible transition between a random coil (disordered structure) and a helical arrangement (ordered structure) in solution. The sol–gel transition showed an ionic selectivity, corresponding to the order of ability of cations to promote gelation, similar to that proposed for gelation of κ-carrageenan (Milas & Rinaudo, 1996). The gelation mechanism has been explained as a two-step process in which the first step is helix ordering followed by interaction between double helices (Chandrasekaran, Puigjaner, Joyce, & Arnott, 1988; Shi, 1990). The mechanical properties of gellan gels as a function of

\* Corresponding author. Tel.: +52-55-56-22-53-07; fax: +52-55-56-22-53-09.

E-mail address: tecante@servidor.unam.mx (A. Tecante).

the nature of cation have suggested that aggregation of the double helices follows different mechanisms; in the presence of divalent ions, at a given ionic strength, gellan gels are firmer and harder than those from monovalent ions. However, so far, there is no X-ray diffraction analysis of divalent salts of gellan but computer modeling based on  $K^+$ -gellan data (Chandrasekaran, Lee, Radha, & Thailambal, 1992) showing that the carboxylate-cation<sup>+</sup>-water-cation<sup>+</sup>-carboxylate interactions in the presence of monovalent cations are expected to be replaced by stronger carboxylate-cation<sup>2+</sup>-carboxylate interactions, rendering a higher capacity of adjacent helices cross-linking at significantly lower ionic strength when divalent ions are involved.

Till date, most of the investigations on gellan gelation are based on physico-chemical studies and they have revealed important details on the molecular structure and have proposed association mechanisms between gellan macromolecules. Recently, Atomic Force Microscopy (Gunning, Kirby, Ridout, Brownsey, & Morris, 1996; McIntire & Brant, 1997) has been used to investigate the proposed models for gelation and to visualize the long-range distributions of gellan macromolecules within the gel network; such microscopy images of gellan showed a fibrous network in the presence of gel-promoting cations. Rheological measurements are appropriate tools for obtaining information about the organization of macromolecules in the medium, thus the correlation of rheology with microstructure information is useful to understand the macroscopic behavior in terms of the microstructure organization. There are few studies where the rheology of polysaccharide systems is discussed in terms of the visualized microstructure due to the difficulty to develop a successful method for imaging biopolymers in aqueous solution. Recently, confocal laser scanning microscopy (CLSM) has been used for imaging food systems because it produces good quality and high-resolution images of the internal structure of biological systems without structural damage. The instrument uses a focused scanning laser to illumine a sub-surface layer of the specimen; the information from this focal plane passes back and is projected onto a confocal aperture in front of a detector. The CLSM controls the production of images in the *z*-direction due to the adjustable focal plane, so large numbers of consecutive optical sections with improved lateral resolution can be obtained and three-dimensional figures can be constructed by stacking a number of consecutive images at the same location in the *xy*-direction, but at different depths into the sample (Brooker, 1995). The aim of this work was to correlate the confocal microscopy observations of gellan aqueous systems with their rheological behavior in order to know the extent of chain associations and explain the rheological properties of these systems in terms of their visualized microstructure.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

The sodium salt of the deacylated form of gellan was obtained by ion exchange of commercial gellan (Kelcogel, lot 07254A; Kelco, San Diego, USA) following the procedure proposed in the literature (Papageorgiou, Kasapis, & Richardson, 1994). A cation-exchange column was packed with sodium exchange resin (Amberlite IR 120 PLUS); the resin was first exchanged to the acid form by eluting with 0.1N HCl until the eluant reached pH 1, then the column was rinsed with deionized water until the eluant was neutral. Afterwards, the column was exchanged to the sodium form by elution with a 0.1 M NaCl until the eluant was again neutral; finally the column was rinsed with deionized water until the salt excess was removed which was confirmed through no precipitation of AgCl into an acidified silver nitrate solution where the washings were added. During ion exchange, a gellan solution in deionized water (0.5–0.8 wt%) at 90 °C was passed through the prepared column. At the end of the procedure, the resin was washed with hot deionized water and these washings were also collected. The eluted polysaccharide solution was poured into two volumes of 2-propanol. The precipitate, a white fibrous material, was redispersed in 2-propanol to unswell the polymer, recovered by squeezing the excess of alcohol and finally dried at 30 °C under vacuum.

### 2.2. Preparation of fluorescent gellan

Gellan was covalently labeled with fluoresceinamine (FA) by modifying the procedure of De Belder and Wik (1975). Gellan (1 g) was dissolved in deionized water (150 ml) under magnetic stirring at room temperature. Dimethyl sulphoxide (75 ml) was added and mixed by gentle stirring, the final pH of the dispersion should not exceed 5–7; then 0.0281 g of fluoresceinamine, dissolved in a small volume of dimethyl sulphoxide; 0.0281 ml of cyclohexyl isocyanide and 0.0281 ml of acetaldehyde were added. After 5 h at room temperature with gentle agitation, the reaction mixture was poured into two volumes of acetone to precipitate the FA-gellan. The polymer was washed several times with acetone until getting a dehydrated polymer; then it was washed with ethanol 95°, once with absolute ethanol, and once with acetone to remove the free dye. The FA-gellan was dried overnight in an oven at 40 °C, then solubilized in water and dialyzed against deionized water until no detection of free dye. Finally, the FA-gellan was precipitated and dried again as mentioned before.

### 2.3. Gel preparation

Gellan solutions (0.005–0.5 wt%) were prepared by dissolving the gellan or FA-gellan in deionized water under

magnetic stirring and then heating to 90 °C. Gellan gelation was induced by addition of 10 mM CaCl<sub>2</sub> which was dissolved in a small volume of deionized water and added to gellan solution at the end of preparation before cooling.

#### 2.4. Differential scanning calorimetry

Differential scanning calorimetry measurements were performed in a Setaram micro DSC-III calorimeter. A mass (ca. 830 mg) of a recently prepared gellan solution was sealed hermetically into the DSC pan. The solvent, 10 mM CaCl<sub>2</sub> solution weighted to within  $\pm 20$  mg of the weight of the gellan sample, was used as a reference. Samples were heated from 10 to 120 °C at 0.5 °C/min and then cooled to 10 °C at the same rate. Two heating–cooling cycles were carried out to characterize the material.

#### 2.5. Intrinsic viscosity

Intrinsic viscosities of unlabeled and labeled gellan were determined at 25 °C in a strain rheometer (Low shear 40, Contraves, Switzerland). The range of polymer concentration was 0.4–1.2 g/l in 0.01 M NaCl; the diluted gellan solutions were sheared from 100 to 7 s<sup>-1</sup> in a coaxial cylinders fixture. The intrinsic viscosity of unlabeled and labeled gellan was 6.37 and 5.56 dl/g, respectively. The value obtained for FA-gellan suggests a slight depolymerization due to the labeling reaction, but it was considered acceptable with respect to possible modification of the microstructure of the sample.

#### 2.6. Dynamic rheology

Low amplitude oscillatory shear tests were carried out in a controlled strain rheometer (Rheometrics Fluid Spectrometer RFS II) using the coaxial cylinders fixture (inner diameter: 32 mm; outer diameter: 34 mm, immersion length: 33 mm). The hot samples were poured into the preheated geometry (65–60 °C) and then cooled to 25 °C under a constant oscillation frequency of 1 rad/s to get the temperature evolution of dynamic moduli. A time sweep at 1 rad/s was also performed to determine the equilibrium values of the dynamic moduli. The moduli reached their equilibrium value in 15–30 min depending on gellan concentration. Thereafter, the mechanical spectra were obtained from 10<sup>-2</sup> to 10<sup>2</sup> rad/s and strain sweeps were completed to verify that all measurements were carried out within the linear region of viscoelasticity. All samples were covered with a thin layer of paraffin oil to avoid dehydration. Gellan concentrations higher than 0.05% were studied under low amplitude oscillatory shear tests in a HAAKE RV20 CV 20N using the plate–plate fixture (diameter = 19.25 mm,  $\Delta h = 3$  mm) both plates were covered with fine sand (mesh 100) to avoid slippage during oscillation. Strain sweeps were performed previous to each

mechanical spectrum to determine the linear zone of viscoelasticity. All determinations were carried out at 25 °C.

#### 2.7. Confocal laser scanning microscopy

CLSM was performed with a Carl Zeiss LSM 410 Axiovert microscope in the fluorescence mode with a water-immersed 40 $\times$  objective. The hot samples, recently prepared, were placed between a preheated slide and cover slip and sealed to avoid dehydration. CLSM observations were performed at 25 °C. A laser beam at a wavelength of 488 nm was used to excite the FA and the emission of fluorescence was recorded between 510 and 565 nm. CLSM allowed to adjust the *xy* plane and take images at different *z*-values into the sample; in this work, all observations reported were taken at the same depth into the sample (25  $\mu$ m).

### 3. Results

#### 3.1. DSC and temperature evolution of dynamic moduli

Fig. 1 reproduces the DSC exothermic peak upon cooling a 1% gellan solution containing 10 mM CaCl<sub>2</sub> together with the *G'* and *G''* trace of a 0.05% gellan solution. It should have been more appropriate to get the DSC thermograms of gellan systems with the same concentrations as those for rheological characterization (0.005–0.05%), however, it was impossible to get good quality signals under the experimental conditions used due to the low gellan concentrations. As seen on the thermogram the onset of transition occurred at 41 °C and the maximum of the peak

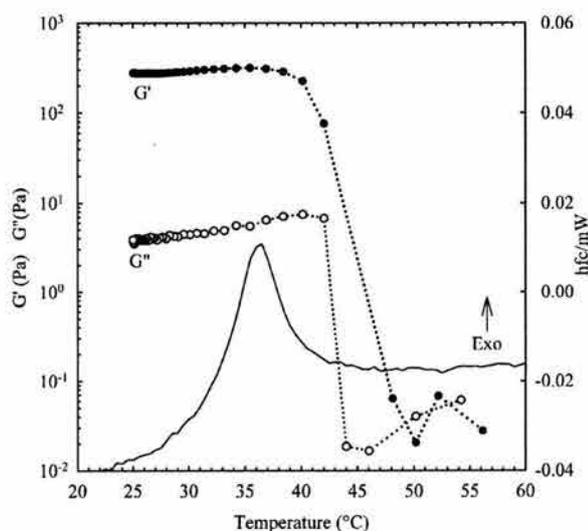


Fig. 1. Differential scanning calorimetry cooling curve of 1% gellan in 10 mM CaCl<sub>2</sub> at a cooling rate of 0.5 °C/min and temperature evolution of dynamic moduli of 0.05% gellan in 10 mM CaCl<sub>2</sub> solution at an oscillation frequency of 1 rad/s and 2% strain.

was 36.5 °C, which was taken as the coil-helix transition temperature. In a previous work (Miyoshi, Takaya, & Nishinari, 1994b) the exothermic peak temperature of 1% gellan with 6.8 mM CaCl<sub>2</sub> was detected at 34.2 °C, which nearly corresponded to the temperature where  $G'$  began to increase rapidly during the cooling process (35 °C) (Miyoshi, Takaya, & Nishinari, 1994a). Our results are close to those reported previously (Miyoshi et al., 1994b) in spite of the higher salt concentration used here. It has been reported that the conformational transition shifts to higher temperatures when salt concentration is increased (Kasapis et al., 1999; Miyoshi et al., 1994b; Nishinari, Watase, Rinaudo, Milas, & 1996) because of the higher stability of the double helix in excess of salt (Mazen, Milas, & Rinaudo, 1999). Thus, the slightly higher transition temperature observed can be due to the increase in CaCl<sub>2</sub> concentration.

Fig. 1 also shows the dynamic moduli evolution with temperature of 0.05% gellan in the presence of 10 mM CaCl<sub>2</sub> during the cooling process. At temperatures higher than 43 °C, the dynamic moduli were too small and hardly detected by the torque sensor of the rheometer. As soon as temperature reached 42 °C both moduli began to increase rapidly. This temperature coincided with the beginning of the coil-helix transition observed in DSC. Comparing the DSC peak with the  $G'$  and  $G''$  traces, it can be noticed that approximately at the temperature of the DSC peak (36.5 °C), the moduli, especially  $G'$ , reached the equilibrium value corresponding to the ordered state (rigid helices). It is worth saying that the temperature evolution of the dynamic moduli was basically the same for all gellan concentrations (0.005–0.05%), but it was not possible to evaluate their thermal behavior by DSC for the reason mentioned above.

### 3.2. Rheological behavior

Fig. 2 shows the mechanical spectra of 0.005, 0.01 and 0.03% gellan with 10 mM CaCl<sub>2</sub>. The mechanical spectra of all gellan systems (0.005–0.05%) displayed a typical gel behavior in spite of the low concentrations and the physical appearance of these systems that were 'pourable liquids' instead of 'self-supporting solids' normally referred to as 'true' gels. The storage moduli were independent of frequency,  $G' \propto \omega^{0.003-0.04}$ , and greater than  $G''$  over the frequency range. We can observe the practically complete independence on frequency of the storage modulus over the experimental range, principally at concentrations greater than 0.005%. The spectra show the characteristic behavior of viscoelastic solids where the crosslinks between macromolecules are not permanent but a dynamic equilibrium between formation and rupture of intermolecular interactions can exist that contributes to the preservation of the structure during long observation times. Considering the loss modulus, at the lowest concentrations of 0.005 and 0.01%, an increase was experienced towards the highest frequencies. Tests with a low viscosity (20 mPa s) Newtonian fluid did not show this increase in modulus at high

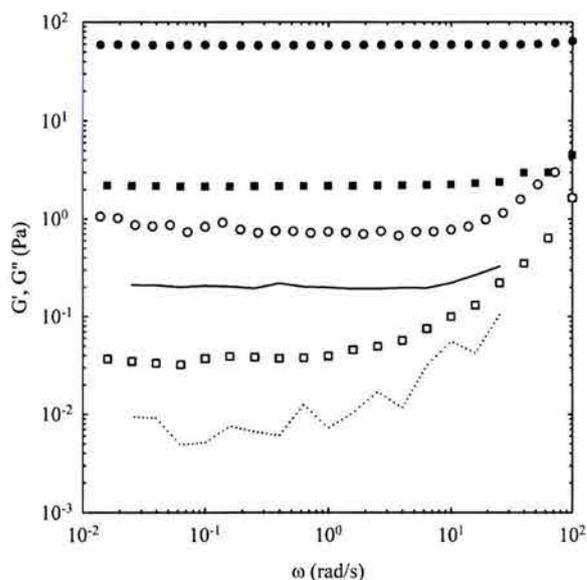


Fig. 2. Mechanical spectra of aqueous gellan in 10 mM CaCl<sub>2</sub> at 25 °C. Gellan concentrations: 0.005% (lines); 0.01% (squares); 0.03% (circles). Filled symbols and solid line:  $G'$ ; void symbols and dotted line:  $G''$ . 10% strain was used in 0.005% and 0.01% gellan, 2.5% strain was used in 0.03% gellan.

frequencies. It is therefore assumed that such effect can be attributed to the behavior of the material and not to the inertia of the rheometer.

All rheological determinations were carried out within the zone of linear viscoelasticity, which was confirmed by the strain sweep carried out after the frequency sweep (Fig. 3). Table 1 shows the upper limit of this zone ( $\gamma_c$ ); its magnitude was progressively narrowed with addition of gellan. The scatter of loss modulus values, mainly at high frequencies, for systems with 0.005% gellan can be attributed to the closeness to the lower limit of torque detection of the rheometer. The loss angles of 0.005–0.03%

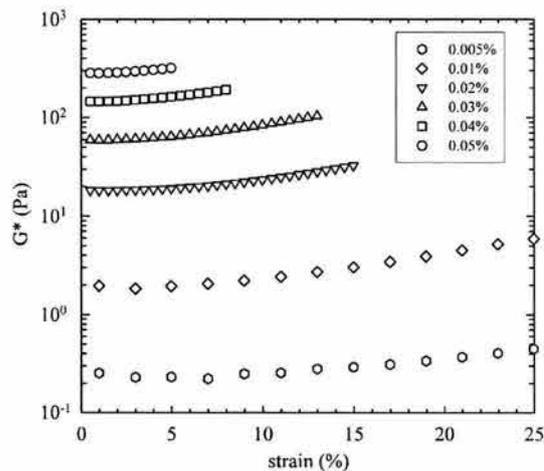


Fig. 3. Strain sweep of gellan systems at 25 °C and 1 Hz.

Table 1  
Upper limits of linear viscoelasticity of gellan gels. Strain sweeps were carried out at 1 rad/s and 25 °C from 1 to 20% strain

Gellan concentration (%)	Upper limit of strain, $\gamma_c$ , (%)
0.005	13
0.01	10
0.02	6
0.03	5
0.04	4.5
0.05	4.0

gellan gels are shown in Fig. 4. Those of 0.03–0.05% gellan were not significantly different ( $\alpha = 0.05$ ) to each other within the frequency range (data not shown). The low values of loss angles, regardless of gellan concentration, and their frequency-independent behavior below 10 rad/s denote a structured gel-like behavior. Beyond 10 rad/s, the loss angles were lower for higher gellan concentrations; in other words, the progressive increase of polymer concentration enhanced the elastic character of the gellan systems. In contrast, a previous work (Rodríguez-Hernández & Tecante, 1999) revealed different features; gellan gels at higher concentrations (0.1–0.5%) but with the same ionic strength (10 mM  $\text{CaCl}_2$ ) showed a strong gel-like behavior with moduli independent of frequency and  $G' > G''$ . However, the elastic character of the gels was progressively attenuated as gellan concentration increased (loss angles increased with concentration) while the dynamic moduli increased with gellan concentration.

Fig. 5 shows the mechanical spectra of FA-gellan and non-fluorescent gellan. Both exhibited typical gel behavior but the storage modulus of the marked

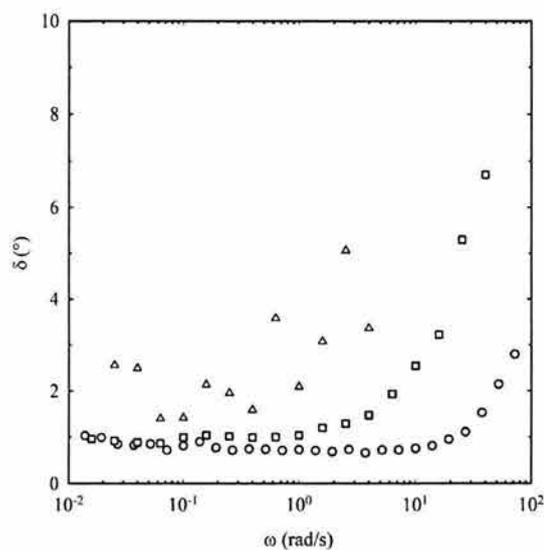


Fig. 4. Loss angles of gellan in aqueous 10 mM  $\text{CaCl}_2$  at 25 °C. Gellan concentrations: 0.005% (triangles); 0.01% (squares) and 0.03% (circles). Strains are those indicated in Fig. 2.

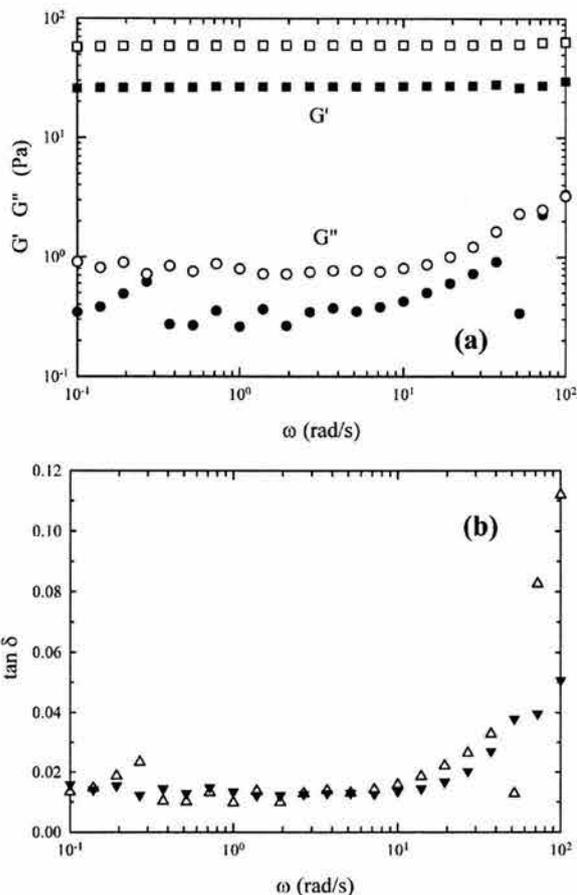


Fig. 5. Viscoelastic behavior of aqueous 0.03% gellan in 10 mM  $\text{CaCl}_2$  at 25 °C and 2% strain. Mechanical spectra (a) and loss angles (b) of fluorescent (filled symbols) and non-fluorescent gellan (void symbols).

polysaccharide was about one half that of the unmarked one (Fig. 5(a)). Also larger differences between the corresponding loss moduli were observed. However, the loss tangent of both gellan preparations were essentially the same (Fig. 5(b)) confirming the elastic character of the respective gels. The difference shown in Fig. 5 is consistent with the observation that the labeling process lead to some degree of depolymerization; the intrinsic viscosity of unlabeled and labeled gellan was 6.37 and 5.56 dl/g, respectively.

The change of  $G'$  with gellan concentration is shown in Fig. 6. From 0.005 to 0.05%,  $G'$  varied as  $C^{3.12}$  ( $r^2 = 0.99$ ), whereas from 0.1 to 0.5% it did as  $C^{2.17}$  ( $r^2 = 0.99$ ). In the latter case, 'self-supporting' gels were formed and the rheological determinations were performed in the parallel plates geometry. The behavior shown in Fig. 6 follows the trend reported in the literature (Clark, 1992; Ross-Murphy, 1995), where the dependence of  $G'$  on polysaccharide concentration has been associated with the limit  $C^2$  at concentrations of approximately  $5C_0$ , where  $C_0$  is the critical gel concentration, while such dependence can get

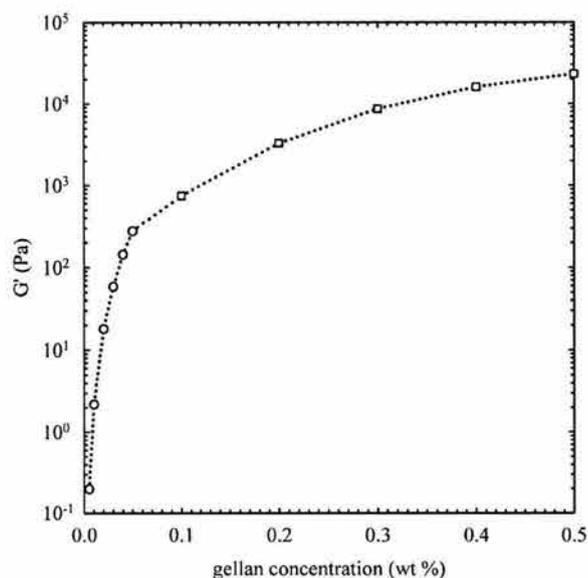


Fig. 6. Storage modulus as a function of gellan concentration at 1 rad/s and 25 °C. Determinations carried out in RFS II rheometer using coaxial cylinders (circles) and in Haake CV20N using plate–plate fixture (squares).

higher exponents as polysaccharide concentration approaches  $C_0$ . In the present case,  $C_0$  is slightly lower than 0.005%.

### 3.3. Microstructure

The microstructure of gellan was studied by CLSM. This technique allows to focus on one plane at a well-defined depth, 25  $\mu\text{m}$  for this work, so that the emission of fluorescence of the rest of the sample does not interfere with the structural information coming from the focal plane (Bourriot, Granier, & Doublier, 1999). Fig. 7 shows the micrographs of gellan at the same concentrations used in the rheological tests; clear zones correspond to the fluorescence of labeled gellan and dark ones to the solvent or zones devoid of gellan. At 0.005%, the lowest concentration tested, a tenuous network was evidenced as shown in Fig. 7(a). Continuous zones of gellan can be observed although there are large void zones irregularly spread over the focal plane (Fig. 7(f)). Fig. 8 shows the  $xz$  and  $yz$  cross-sections of 0.005% gellan. These images were obtained adjusting the first  $xy$  plane at  $z = 10 \mu\text{m}$  and then taking twenty images every 1  $\mu\text{m}$ , thus reaching a depth of 29  $\mu\text{m}$  into the sample. The stacked images resulted in a three-dimensional representation, not shown for practical reasons, but the  $xz$  (below) and  $yz$  (right) cross-sections are shown beside the  $xy$  plane. From the  $xz$  and  $yz$  sections of 0.005% gellan, few interconnected zones throughout the volume of the gel can be observed. Such zones were not completely continuous but this clearly evidences that connectivity, although very low, yielded a tenuous network able to impart a solid-like

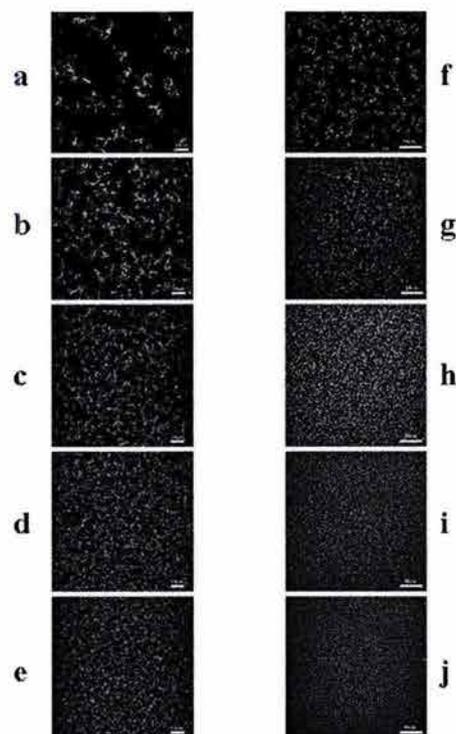


Fig. 7. CLSM at 25 °C of gellan systems in 10 mM  $\text{CaCl}_2$ . Gellan concentrations: 0.005% (a and f), 0.01% (b and g), 0.02% (c and h), 0.03% (d and i) and 0.05% (e and j). Scale bars represent 10  $\mu\text{m}$  in a–e and 50  $\mu\text{m}$  in f–j observations, respectively.

behavior to the system as assessed by the rheological behavior.

Fig. 7(b) shows the micrograph of 0.01% gellan where a more homogeneous network is evidenced; the pores or polymer-free zones are smaller than those of 0.005%.

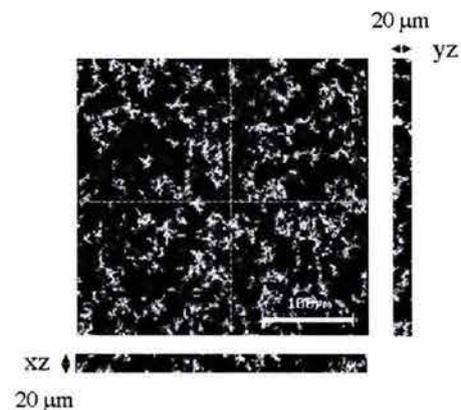


Fig. 8. Cross-sections of 0.005% gellan. The plane  $xy$  was fixed at 10  $\mu\text{m}$ ;  $xz$  section (below) and  $yz$  (right) were obtained by collecting 20 consecutive sections every 1  $\mu\text{m}$  at the same location in the  $xy$ -direction. The dotted lines indicate where cuts were made.

The amplification of the image shown in Fig. 7(b) and (g) makes clear the formation of a continuous network with pores throughout the system. At higher gellan concentrations, the network structures of the systems were more continuous and denser (Fig. 7(c)–(e)), the corresponding amplifications (Fig. 7(h)–(j)) showed more compact gellan networks with progressively smaller voids throughout the gel.

#### 4. Discussion

According to the DSC results as well as temperature evolution of dynamic moduli, gellan in the presence of 0.01 M CaCl<sub>2</sub> had a transition temperature of 36.5 °C. Such temperature corresponds to the change of molecular conformation from random coil to rigid helices in the presence of exterior salt (Shi, 1990). Therefore, it can be assumed that below 42 °C, where moduli began to reach their equilibrium value (Fig. 1), the system is formed by rigid helices associated through interaction with calcium ions that form a gel or structured network the compactness of which depends on polymer content and ionic strength. This simply emphasizes the fact that the rheological data, which were obtained at 25 °C, describe the behavior of ordered and rigid gellan molecules into a CaCl<sub>2</sub> aqueous medium.

So far, most of the rheological studies on gellan have been carried out using concentrations substantially higher than the ones used here (Kasapis et al., 1999; Miyoshi et al., 1994a; Papageorgiou et al., 1994; Rodríguez-Hernández & Tecante, 1999). On the contrary to what was expected, gellan systems with concentrations as low as 0.005% displayed a gel-like behavior under the ionic strength used. At the lowest gellan contents, 0.005 and 0.01%, the mechanical spectra showed a solid-like nature, while microscopy observations (Fig. 7(a) and (b)) revealed the formation of three-dimensional networks rather than gellan aggregates. However, such networks can be the result of helical chains association mediated by calcium ions. According to CLSM observations and rheological tests, 0.005% gellan in 10 mM CaCl<sub>2</sub> was able to form only a tenuous network with few continuous polymer zones throughout the sample volume (Fig. 8). At this concentration, results suggest that the polymer content was not high enough to produce a strong three-dimensional network, which is evidenced by the tendency to flow at small observation times (Fig. 4). This kind of systems is usually called 'weak gel' the solvent is quite free to move rapidly through the interstices of the network. Such systems respond as structured fluids at large deformations; that is, they flow given sufficient shear. The high gelling ability of gellan is evidenced by the fact that at concentrations as low as 0.005%, which are ineffective for other hydrocolloids, the polysaccharide was able to form a defined but tenuous

network certainly as a result of the presence of divalent ions in the medium.

At a higher gellan content, 0.01%, the extent of gellan association increased yielding a less tenuous but homogenous network (Fig. 7(b)), although great pores or zones devoid of polymer were also observed (Fig. 7(g)). From the rheological tests, this better distributed network resulted in a more evident solid-like behavior. The microstructure of 0.02% gellan showed a denser network with few pores throughout the sample volume and more interconnected zones (Fig. 7(c) and (h)). The rheology of this system was consistent with the structure observed; the values of the loss angle were almost independent of frequency, which could be interpreted as a gel with more permanent junction zones or interchains associations. Gellan concentrations higher than 0.02% resulted in completely structured systems with permanent junction zones within the observation time of the rheological tests; no relaxation processes took place within this period as evidenced by the similarity between loss angle values for 0.03–0.05% gellan and by the total independence of both moduli with frequency. The elastic character of gellan systems with 10 mM CaCl<sub>2</sub> was enhanced as the polymer content was increased up to 0.03%. This was confirmed by microscopy observations where progressively more compact and more interconnected networks were detected.

However, although the values of the dynamic moduli increased with gellan content from 0.03 to 0.05%, the elastic contribution to the viscoelastic behavior visualized through the loss angle values did not undergo appreciable changes. The elastic character predominated in the same way independently of the value of the storage modulus. This is consistent with the microscopy of the systems because no large differences among these concentrations were found (Fig. 7(d) and (e)). On the other hand, the CLSM of higher gellan concentrations, 0.1–0.3%, displayed gellan networks so compact that virtually all the sample volume was covered with the polysaccharide leaving only very small pores throughout the system (micrographs not shown). The extremely compact network structure observed at concentrations higher than 0.05% makes difficult to visualize how the polymer distribution could be in the case of mixtures of gellan with other hydrocolloids. The results shown here lead one to suggest that the best concentrations for foodstuffs and for model systems in scientific studies, are lower than those habitually used so far.

#### 5. Conclusions

The gellan concentrations studied here allowed us to distinguish different levels of structure organization well consistent with their rheological behaviors. From the log  $G'$  versus gellan concentration relationships, it can be seen that the low polysaccharide concentrations used here are close to the critical gel concentration. In this way, such

concentrations evidence the onset of network formation. The magnitude of the solid-like properties of these systems depends on the extent of connectivity and compactness of the gellan network as well as on the cation content of the samples. The correlation of rheology with CLSM observations allow us to see how the progressively higher gellan concentrations, into the range 0.005–0.02%, result in more elastic systems well evidenced by the reinforcement of network structures while at higher gellan concentrations the changes in the rheological and microstructural aspects are not so strongly noticeable as gellan content is increased.

On the other hand, it is well known that the mechanical properties of gellan gels are strongly dependent on the nature and content of cations. In this work  $\text{CaCl}_2$  was used as added salt to promote gelation and the concentration was chosen on the basis of a previous work (Rodríguez-Hernández & Tecante, 1999). Further studies using different levels of cations could be necessary to get more information about the mechanism of gellan gelation.

#### Acknowledgements

Financial support from DGAPA-UNAM through research grant IN 112399 and scholarship to A.I. Rodríguez-Hernández are gratefully acknowledged.

#### References

- Bourriot, S., Garnier, C., & Doublier, J. L. (1999). Micellar-casein- $\kappa$ -carrageenan mixtures. I. Phase separation and ultra structure. *Carbohydrate Polymers*, *40*, 145–157.
- Brooker, B. E. (1995). Imaging food systems by confocal laser scanning microscopy. In E. Dickinson (Ed.), *New physico-chemical techniques for the characterization of complex food systems* (pp. 53–68). Great Britain: Blackie Academic and Professional/Chapman and Hall.
- Chandrasekaran, R., Lee, E. J., Radha, A., & Thailambal, V. G. (1992). Correlation of molecular architectures with physical properties of gellan related polymers. In R. Chandrasekaran (Ed.), *Frontiers in carbohydrate research* (pp. 65–84). London: Elsevier.
- Chandrasekaran, R., Puigjaner, L. C., Joyce, K. L., & Arnott, S. (1988). Cation interactions in gellan: an X-ray study of the potassium salt. *Carbohydrate Research*, *181*, 23–40.
- Clark, A. H. (1992). Gels and gelling. In H. G. Schwartzberg, & R. W. Hartner (Eds.), *Physical chemistry of foods* (pp. 263–305). New York: Marcel Dekker.
- Crescenzi, V., Dentini, M., & Dea, I. C. M. (1987). The influence of side-chains on the dilute-solution properties of three structurally related bacterial anionic polysaccharides. *Carbohydrate Research*, *160*, 283–302.
- De Belder, A. N., & Wik, K. O. (1975). Preparation and properties of fluorescein-labelled hyaluronate. *Carbohydrate Research*, *44*, 251–257.
- Grasdalen, H., & Smidsrod, O. (1987). Gelation of gellan gum. *Carbohydrate Polymers*, *7*, 371–393.
- Gunning, A. P., Kirby, A. R., Ridout, M. J., Brownsey, G. J., & Morris, V. J. (1996). Investigation of gellan networks and gels by atomic force microscopy. *Macromolecules*, *29*, 6791–6796.
- Jansson, P., & Lindberg, B. (1983). Structural studies of gellan gum an extracellular polysaccharide elaborated by *Pseudomonas elodea*. *Carbohydrate Research*, *124*, 135–139.
- Kasapis, S., Giannouli, P., Hember, M. W. N., Evageliou, V., Poulard, C., Tort-Bourgeois, B., & Sworn, G. (1999). Structural aspects and phase behavior in deacylated and high acyl gellan systems. *Carbohydrate Polymers*, *38*, 145–154.
- Kelco International (1991). *Kelco international kelcogel gellan gum*. London: Kelco Division of Merck and Co. Inc., Kelco International.
- Mazen, F., Milas, M., & Rinaudo, M. (1999). Conformational transition of native and modified gellan. *International Journal of Biological Macromolecules*, *26*, 109–118.
- McIntire, T. M., & Brant, D. A. (1997). Imaging of individual biopolymers and supramolecular assemblies using noncontact atomic force microscopy. *Biopolymers*, *42*, 133–146.
- Milas, M., & Rinaudo, M. (1996). The gellan sol–gel transition. *Carbohydrate Polymers*, *30*, 177–184.
- Milas, M., Shi, X., & Rinaudo, M. (1990). On the physicochemical properties of gellan gum. *Biopolymers*, *30*, 451–464.
- Miyoshi, E., Takaya, T., & Nishinari, K. (1994a). Gel–sol transition in gellan gum solutions. I. Rheological studies on the effects of salts. *Food Hydrocolloids*, *8*, 505–527.
- Miyoshi, E., Takaya, T., & Nishinari, K. (1994b). Gel–sol transition in gellan gum solutions. II. DSC studies on the effects of salts. *Food Hydrocolloids*, *8*, 529–542.
- Nishinari, K., Watase, M., Rinaudo, M., & Milas, M. (1996). Characterization and properties of gellan- $\kappa$ -carrageenan mixed gels. *Food Hydrocolloids*, *10*, 277–283.
- Papageorgiou, M., Kasapis, S., & Richardson, R. K. (1994). Steric exclusion phenomena in gellan/gelatin systems. I. Physical properties of single and binary gels. *Food Hydrocolloids*, *8*, 97–112.
- Rodríguez-Hernández, A. I., & Tecante, A. (1999). Dynamic viscoelastic properties behavior of gellan- $\kappa$ -carrageenan and gellan-xanthan gels. *Food Hydrocolloids*, *13*(1), 54–62.
- Ross-Murphy, S. B. (1995). Rheology of biopolymer solutions and gels. In E. Dickinson (Ed.), *New physico-chemical techniques for the characterization of complex food systems* (pp. 139–156). Great Britain: Blackie Academic and Professional/Chapman and Hall.
- Sanderson, G. R. (1990). Gellan gum. In P. Harris (Ed.), *Food gels* (pp. 201–232). New York: Elsevier.
- Shi, X. (1990). Relation entre la Conformation et les Propriétés d'un Polysaccharide Bactérien, le Gellane. Thesis, Grenoble, France.
- Sworn, G., Sanderson, G. R., & Gibson, W. (1995). Gellan gum fluid gels. *Food Hydrocolloids*, *9*, 265–271.
- Upstill, C., Atkins, E. D. T., & Attwood, P. T. (1986). Helical conformations of gellan gum. *International Journal of Biological Macromolecules*, *8*, 275–288.