



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Unidad Iztapalapa

División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Departamento de Biotecnología

**Estudio fisicoquímico comparativo de coacervados complejos
obtenidos a partir de mezclas binarias y ternarias de biopolímeros**

T E S I S

para obtener el grado de

Maestro en Biotecnología

P R E S E N T A

Ing. Marco Polo Carballo Sanchez

Director

Dr. Eduardo Jaime Vernon Carter

Asesoras

Dra. Ruth Pedroza Islas

Dra. María Eva Rodríguez Huevo

Septiembre de 2011

“La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001465”

Agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para la realización de estudios de maestría.

El trabajo realizado en esta tesis está vinculado al proyecto “Bioprocesos tecnología de alimentos” con número de estructura 1250227 del área de Ingeniería Química, departamento de Ingeniería de Procesos e Hidráulica de la división de Ciencias Básicas e Ingeniería de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa.

México D.F., 20 de septiembre de 2011

El jurado designado por la

División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis:

Estudio fisicoquímico comparativo de coacervados complejos obtenidos a partir de mezclas binarias y ternarias de biopolímeros

que presentó:

Marco Polo Carballo Sanchez

Comité Tutorial:

Director: **Dr. Eduardo Jaime Vernon Carter**

Asesor: **Dra. Ruth Pedroza Islas**

Asesor: **Dra. María Eva Rodríguez Huevo**

Jurado:

Presidente

Dr. Sergio Huerta Ochoa



Secretario

Dr. Francisco Cruz Sosa



Vocal

Dra. Consuelo Silvia Olivia Lobato Calleros



Vocal

Dr. Héctor Bernardo Escalona Buendía



Agradecimientos

Al Dr. Jaime Vernon por su apoyo, confianza y paciencia para realizar este trabajo de tesis.

A mis asesoras, Dra. Ruth Pedroza y Dra. Eva Rodríguez por su apoyo, confianza y consejos.

A los sinodales: Dra. Consuelo Lobato, Dr. Francisco Cruz, Dr. Héctor Escalona y Dr. Sergio Huerta por su aportación y dedicación para la calificación de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio: Abraham, Angélica, Benôit, Carmen, Eristeo, Landy y Rubén, por su confianza y apoyo durante mi estancia.

A Magdalena y Belem, por su amistad y apoyo.

A mis amigos y compañeros del posgrado.

A Andrea y a Sofía, mi hermana y mi mamá.

A toda mi familia.

A Violeta, du bist wunderbar.

Resumen

La industria alimentaria ha puesto el reto a los investigadores para que desarrollen nuevos biomateriales que puedan mejorar las características de sus productos, tanto para prolongar la vida de anaquel al estabilizar formulaciones, para mejorar las propiedades reológicas que repercutan en mejorar los procesos de fabricación, brindar nuevas propiedades favorables a las formulaciones o mejorar la experiencia sensorial de los consumidores; de sustitución de grasas u otro tipo de sustancias que resultan nocivas para algunas personas al ingerirlas en exceso o en pequeñas proporciones y que participan activamente en las propiedades reológicas de algunos alimentos. Dicho esto, se ha investigado el comportamiento de los complejos de biopolímeros. Resulta interesante la formación de complejos mediante interacciones electrostáticas entre sus componentes, debido a que sus propiedades reológicas resultan ser mucho más eficientes que las de los biopolímeros de manera individual o en mezclas. El fenómeno de la coacervación forma complejos de polielectrolitos de cargas opuestas que son electrostáticamente neutros.

El objetivo de este trabajo es la obtención y caracterización de coacervados complejos a partir de mezclas binarias y ternarias de biopolímeros (goma arábica (GA) y goma de mezquite (GM) como polianiones, quitosano (Q) y aislado de proteína de suero de leche (WPI), buscando probar que los coacervados obtenidos a partir de mezclas ternarias de biopolímeros presentan diferentes características fisicoquímicas que los coacervados obtenidos a partir de mezclas secundarias debidas a las interacciones favorables que ocurren entre sus componentes, las cuales influyen en su comportamiento reológico.

Se evaluaron las condiciones en las que ocurre la mínima diferencia entre los valores de potencial zeta de los biopolímeros polianiónicos y policatiónicos que forman parte de los coacervados, esto fue a valores de pH entre 3.5 y 5.5. Se hizo una relación de los miliequivalentes necesarios para titular una porción másica de biopolímeros en solución. Se evaluó el rendimiento de coacervación de todos los tratamientos. Los parámetros reológicos que fueron determinados a los coacervados consisten en pruebas de oscilación y amplitud en un reómetro rotacional.

Los rendimientos más altos son los que se relacionan con los coacervados binarios con goma de mezquite en ambos policationes (superiores al 70%), seguidos por el tratamiento

binario de goma arábica para ambas polimerizaciones (cercano al 50% en quitosano y superior al 50% en WPI). Los demás tratamientos ternarios tienen un comportamiento similar, superior al 40% con los de quitosano y superiores al 60% con los de WPI. El tratamiento con el rendimiento más bajo es el coacervado ternario 75%GM-25%GA tanto para quitosano (30%) como para WPI (40%). Algunas cuestiones favorables o desfavorables respecto a la interacción de los componentes de los coacervados se pueden explicar con respecto al comportamiento polielectrolítico de las macromoléculas en solución.

Los coacervados binarios y ternarios de los tratamientos con quitosano como polimerización y los coacervados ternarios de WPI como polimerización presentaron características predominantemente viscosas y comportamiento de gel débil. Los coacervados binarios de WPI como polimerización presentaron características predominantemente elásticas y comportamiento de gel débil también.

Todos los tratamientos presentaron un carácter reoadelgazante, ajustándose al modelo de Carreau con altos coeficientes de correlación.

No se observa evidencia de sinergia entre GA y GM tanto en tratamientos binarios y ternarios de Quitosano y WPI como polimerización.

Por el costo bajo que representa utilizar WPI como materia prima, los coacervados obtenidos a partir de esta polimerización tienen potencial de utilizarse como estabilizantes y como matriz para contener compuestos de alto valor agregado en formulaciones alimenticias. Los coacervados con quitosano como polimerización pueden aplicarse como estabilizante y como matriz contenedora de compuestos de alto valor agregado en formulaciones para el cuidado de la salud.

Abstract

Food industry has challenged researchers to develop new biomaterials capable to improve product features as microencapsulation matrix, shelf life extension by formulation stabilization, to improve rheological properties that ameliorate industrial processes, to endow new outstanding properties to formulations or enhancing a better sensorial experience to consumers, fat substitution or substances that result harmful in small or excessive amounts that participate in an active way in rheological properties of some food. Complex formation by electrostatic interactions between its components results important due to the efficiency in rheological properties compared with individual biopolymers on mixtures of them. Coacervation phenomenon consists in complex formation between opposite charged biopolymers resulting electrostatically neutral.

The aim of this work is to obtain and characterize complex coacervates obtained from binary and ternary biopolymer mixtures: arabic and mesquite gum (GA, GM) as polyanions and chitosan (Q) and whey protein isolate (WPI) as polycations. to probe that coacervates from ternary mixtures present different features than those obtained from binary mixtures, due to favorable interactions between its components, which impact on their rheological behavior.

Optimal conditions where zeta potential minimal difference occurs between polyanionic and polycationic biopolymers involved in coacervation were evaluated at pH values between 3.5 and 5.5. To determine amount of functional groups that react in biopolymer solution, a miliequivalent rate was made, taking account how many from NaOH are necessary to titrate a mass fraction of biopolymer solutions. Rheological parameters determined to coacervates were oscillation and flow tests in a rotational rheometer.

Highest yieldings are related to binary coacervates with mesquite gum in both polycations (more than 70%) followed by binary treatment of gum Arabic with both polycations (up to 50% with chitosan and over 50% with WPI). The other ternary treatments have a similar behavior, over 40% with chitosan and over 60% with WPI. The lowest treatment yielding is ternary coacervate 75%GM-25%GA even for chitosan (30%) as for WPI (40%). Some favorable or unfavorable facts about interaction between component interactions are explained about polyelectrolytic behavior of macromolecules in solution.

Binary and ternary coacervates obtained from treatments with chitosan as polycation and ternary coacervates with WPI as polycation presented predominantly viscous characteristics and weak gel behavior.

Every treatment presented a shear-thinning behavior, fitting to Carreau model with high correlation coefficients.

No evidence about synergy between GA and GM was found in binary and ternary treatments of Chitosan and WPI as polycation.

Due to WPI as a low cost material, coacervates obtained from it could be used potentially as stabilizers and as a matrix to contain high added value products in food formulations.

Coacervates with chitosan as polycation could be used potentially as stabilizers and as a matrix to contain high added value products in healthcare formulations.

Contenido

Resumen	4
Abstract	7
Índice de figuras	10
Índice de tablas	12
Introducción	13
Aplicaciones de coacervados y biopolímeros utilizados en la formación de complejos.....	15
Bases moleculares de la conformación y de agregación en interacciones electrostáticas .	17
Potencial Zeta.....	17
Entropía configuracional.....	20
Reología de complejos	22
Líquidos	23
Viscosidad newtoniana y no newtoniana	26
Materiales Viscoelásticos	26
Pruebas oscilatorias dinámicas	27
Flujo y modelos funcionales para las propiedades reológicas de fluidos	30
Relaciones entre la viscosidad aparente y la tasa de corte de los materiales reoadelgazantes.....	30
Modelamiento matemático de curvas de flujo.....	31
Medición de propiedades reológicas	32
Biopolímeros polianiónicos y policatiónicos	35
Goma de Mezquite	35
Goma arábica	35
Aislado de proteína de suero de leche	38
Quitosano.....	40
Justificación	42
Hipótesis.....	43
Objetivo General.....	43
Objetivos Particulares.....	43
Materiales y métodos.....	44
Materiales	44
Preparación de soluciones	44

Ventana de interacción de los biopolímeros en función del pH.....	44
Puntos de equivalencia de las dispersiones de biopolímeros	45
Formación de coacervados	45
Cálculo del rendimiento de la coacervación.....	46
Reología.....	47
Resultados.....	48
Puntos de Equivalencia	48
Ventana de interacción.....	51
Rendimiento de coacervación	52
Análisis de la metodología de las pruebas reológicas de coacervados.....	55
Reología de coacervados binarios y ternarios con quitosano como policación.....	55
Reología de coacervados binarios y ternarios con WPI como policación	60
Conclusiones	65
Perspectivas	66
Referencias	67
Anexo 1. Curvas de titulación para Biopolímeros polianiónicos y policatiónicos.....	72

Índice de figuras

Figura 1. Polianiones y policationes más usados para formar coacervados (deKruif y col. 2004).	16
Figura 2. Representación esquemática del potencial zeta. (Extraído de “Zeta Potential: An introduction in 30 minutes” Malvern Instruments).	19
Figura 3. Diagrama de la relación entre la viscosidad del líquido y la fricción entre capas. Entre más grande es la fricción, mayor la viscosidad.....	25
Figura 4. Respuesta del esfuerzo y deformación de un líquido newtoniano y un sólido perfectamente elástico sometidos a pruebas dinámicas armónicas (Rao, 1999)	28
Figura 5. Ejemplo de pruebas de oscilación, siendo A) la correspondiente a un barrido de deformación y B) un barrido de frecuencia.....	29
Figura 6. Curva de flujo en función de la tasa de corte con viscosidad aparente como variable dependiente para materiales reoadelgazantes, identificando tres regiones separadas: una región de viscosidad constante cero a bajas tasas de corte, una región de la ley de potencia a tasa de corte intermedias y una región de viscosidad constante infinita a altas tasas de corte (Rao, 1999).	31
Figura 7. . Arreglo de geometrías de los platos del reómetro dinámico a) Cilindros concéntricos; b) Plato y cono; c) Platos paralelos.	33

Figura 8. Estructura de la celulosa, la quitina y el quitosano	42
Figura 9. Ventana de interacción para biopolímeros de carga negativa (GM y GA) y biopolímeros de carga positiva (Q y WPI). Las región de estequiometría de cargas para GM+GA-WPI es de pH 3.8 y la región para GM+GA-Q es de pH 5.3.....	51
Figura 10. Rendimiento de coacervación en tratamientos binarios y ternarios con quitosano como policación.....	54
Figura 11. Rendimiento de coacervación para tratamientos binarios y ternarios con WPI como policación.....	54
Figura 12. Módulo elástico o de almacenamiento en función de la deformación para coacervados binarios y ternarios con quitosano como policación.	56
Figura 13. Módulo viscoso o de pérdida en función de la deformación para coacervados binarios y ternarios con quitosano como policación.	57
Figura 14. Módulo viscoso o de pérdida en función de la frecuencia para coacervados binarios y ternarios con quitosano como policación.	58
Figura 15. Módulo elástico o de almacenamiento en función de la frecuencia para coacervados binarios y ternarios con quitosano como policación.	58
Figura 16. Curva de flujo para coacervados binarios y ternarios de mezclas de gomas con quitosano como policación	59
Figura 17. Módulo elástico o de almacenamiento en función de la deformación para coacervados binarios y ternarios con WPI como policación.....	61
Figura 18. Módulo viscoso o de pérdida en función de la deformación para coacervados binarios y ternarios con WPI como policación.....	61
Figura 19. Módulo elástico o de almacenamiento en función de la frecuencia para coacervados binarios y ternarios con WPI como policación.....	62
Figura 20 Módulo viscoso o de pérdida en función de la frecuencia para coacervados binarios y ternarios con quitosano como policación.	63
Figura 21. Curvas de flujo para coacervados binarios y ternarios de mezclas de gomas con WPI como policación	63
Figura 22. Curva de titulación y punto de equivalencia para la solución de goma de mezquite.....	72
Figura 24. Curva de titulación y punto de equivalencia para la solución 75% GM-25% GA...	73
Figura 23. Curva de titulación y punto de equivalencia para la solución de goma arábica. ...	73
Figura 25. Curva de titulación y punto de equivalencia para la solución 50% GM-50%GA. ..	74
Figura 26. Curva de titulación y punto de equivalencia para la solución 25%GM-75%GA. ...	75
Figura 27. Curva de titulación y punto de equivalencia para la solución de quitosano.	75
Figura 28. Curva de titulación y punto de equivalencia para la solución de aislado de proteína de suero de leche (WPI).	76

Índice de tablas

Tabla 1. Composición de aminoácidos de exudados de árboles de las especies <i>Prosopis laevigata</i> (goma de mezquite) y <i>Acacia senegal</i> (goma arábiga) (Residuos por cada 1000 residuos) (Anderson y col. 1985).....	36
Tabla 2. Intervalos de concentración de las proteínas del suero, basadas en la totalidad de proteínas presentes en la leche (Philips y Williams, 2000)	38
Tabla 3. Características fisicoquímicas de las proteínas del suero (Philips y Williams, 2000)	39
Tabla 4. Proporciones de gomas usadas en las mezclas binarias y ternarias de polianiones con quitosano y WPI como policación	45
Tabla 5. Concentración total de biopolímeros en las soluciones utilizadas para formar complejos insolubles (%p/p).....	46
Tabla 6. pH inicial de las dispersiones de biopolímeros	49
Tabla 7. Miliequivalentes por gramo de biopolímero, tanto para dispersiones de polianiones en singular o en mezcla y para politaciones.	49
Tabla 8. Relaciones estequiométricas para las mezclas de biopolímeros de carga negativa con los biopolímeros de carga positiva.....	50
Tabla 9. Parámetros obtenidos del modelo de Carreau para coacervados binarios y ternarios con quitosano como policación	59
Tabla 10. Parámetros obtenidos del modelo de Carreau para coacervados binarios y ternarios con WPI como policación	64

Introducción

La industria alimentaria ha puesto el reto a los investigadores para que desarrollen nuevos biomateriales que puedan mejorar las características de sus productos, para prolongar la vida de anaquel al estabilizar formulaciones, para mejorar las propiedades reológicas que repercutan en mejorar los procesos de fabricación, para brindar nuevas propiedades favorables a las formulaciones o mejorar la experiencia sensorial de los consumidores; sustitución de grasas u otro tipo de sustancias que resultan nocivas para algunas personas al ingerirlas en exceso o en pequeñas proporciones y que participan activamente en las propiedades reológicas de algunos alimentos. Una alternativa es la investigación sobre el comportamiento de los complejos elaborados a partir de biopolímeros, mediante interacciones electrostáticas entre sus componentes, debido a que sus propiedades reológicas resultan ser mucho más eficientes que las de los biopolímeros de manera individual o en mezclas (Semenova, 2007).

Las interacciones entre biopolímeros pueden ser de repulsión o de atracción. Las primeras originan incompatibilidad termodinámica; mientras que las segundas inducen la formación de complejos a través de interacciones entre biopolímeros cargados opuestamente (Tolstoguzov, 2003). Las interacciones de atracción dan lugar al fenómeno de la coacervación.

El término coacervación fue acuñado por Bungenberg de Jong y Kruyt, (1929) que se deriva de las raíz griega *acervus*=agregación y el prefijo *co*=junto para describir la unión de partículas coloidales. Al hablar de partículas coloidales se hace referencia a pequeñas gotas de líquido, denominadas coacervados, de formación inducida mediante agitación (Mekhloufi y col. 2005).

Existen dos tipos de coacervación: la simple, que involucra en su sistema a un solo soluto coloidal al que se le agrega una sustancia altamente hidrofílica que provoca la formación de dos fases y que depende del grado de hidratación, una variable difícil de controlar. Ésta sólo se usa cuando se induce la formación de microcápsulas. El segundo tipo, la coacervación compleja, involucra a dos o más coloides en el sistema, estas interacciones dependen del pH, el cual debe ajustarse en un punto en el que se encuentren presentes los equivalentes de moléculas de cargas opuestas de los coloides, debido a la gran cantidad de enlaces salinos que se forman en ese punto (Espinosa-Andrews y col. 2007). Por lo tanto, es

requisito que las moléculas que forman parte de una coacervación compleja tengan cargas opuestas.

Este fenómeno fue descubierto por Tiebackx en 1911. Él observó que al mezclar goma arábiga y dispersiones de gelatina en solución de ácido acético se formaban opalescencias o precipitación. Si la separación de fases se lleva a cabo, la fuerza motriz para la descomposición implica el incremento de de energía libre interfacial, lo cual iguala el producto de la tensión interfacial y el área total interfacial asociada con la separación de fases (Scholten y col. 2002). La coacervación compleja es un caso especial de separación asociativa de fases (Mekhloufi y col., 2005). Este descubrimiento tuvo una relevancia histórica importante, debido a que se ha supuesto que han jugado un papel en la aparición de la vida en la tierra. Si se hace un inventario de los parámetros que se deben considerar para que ocurra una separación de fases determinada según el equilibrio, son:

- pH
- Fuerza iónica
- Relación entre biopolímeros
- Concentración total de biopolímeros
- Tamaño
- Forma
- Densidad de carga
- Flexibilidad de las macromoléculas

La percepción actual del mecanismo de coacervación compleja se esquematiza de la siguiente manera:

Las interacciones entre polímeros en general, inducen la formación entre complejos interpoliméricos solubles que interactúan para formar complejos insolubles que son electrostáticamente neutros. Entonces, los complejos insolubles se agregan y precipitan, formando una fase dispersa de coacervados complejos. Dichos coacervados, con el tiempo y la sedimentación, forman agregados y se precipitan para formar la fase coacervada (Mekhloufi y col. 2005).

En la actualidad, el conocimiento de la coacervación compleja se centra en las mezclas binarias de biopolímeros en una fase acuosa y, dado el carácter propositivo de la

presente investigación, se plantea una mezcla ternaria con el objetivo de mejorar las propiedades conocidas para coacervados.

Aplicaciones de coacervados y biopolímeros utilizados en la formación de complejos

El fenómeno de coacervación compleja se puede considerar en aplicaciones prácticas potenciales. La más común debido a su importancia industrial la formación de microcápsulas para la protección y liberación controlada de compuestos de alto valor agregado, debido a la gran capacidad para recubrir y a las propiedades viscoelásticas de éstos. Otra aplicación es la separación de proteínas, la cual resulta muy eficiente y barata, destaca su utilidad como ingrediente alimenticio (sustituto de grasa o análogo de la carne) y como biomaterial (películas comestibles y empaques) (Weinbreck y Wientjies. 2004). La primera aplicación de coacervados fue el sistema de goma arábica-gelatina para papel autocopia y la combinación de polianiones con gelatina se ha utilizado ampliamente. Últimamente se ha buscado sustituir a la gelatina en coacervados debido a cuestiones morales y de salud (de Kruif y col. 2004), pero existen varias alternativas, sean vegetales o sintéticas y la lista de aplicaciones prácticas de los coacervados crece junto con los materiales disponibles para formarlas, como se puede apreciar en la figura 1. El conocimiento del fenómeno de la coacervación se puede trasladar al entendimiento de sistemas biológicos. Un ejemplo destacado es la formación de complejo entre las histonas (proteínas de unión) y la hebra de ADN (cromatina). Si se toma en cuenta que la cromatina tiene en su estructura iones fosfato que le brindan un carácter ácido y que las histonas son un grupo de cinco proteínas pequeñas (entre 102 y 244 residuos de aminoácidos) de un carácter muy básico, debido a que son ricas en residuos de lisina y arginina (en el caso de la histona H1, el porcentaje molar de lisina es del 29.5% y de arginina de 1.3%) (Mathews y col. 2002).

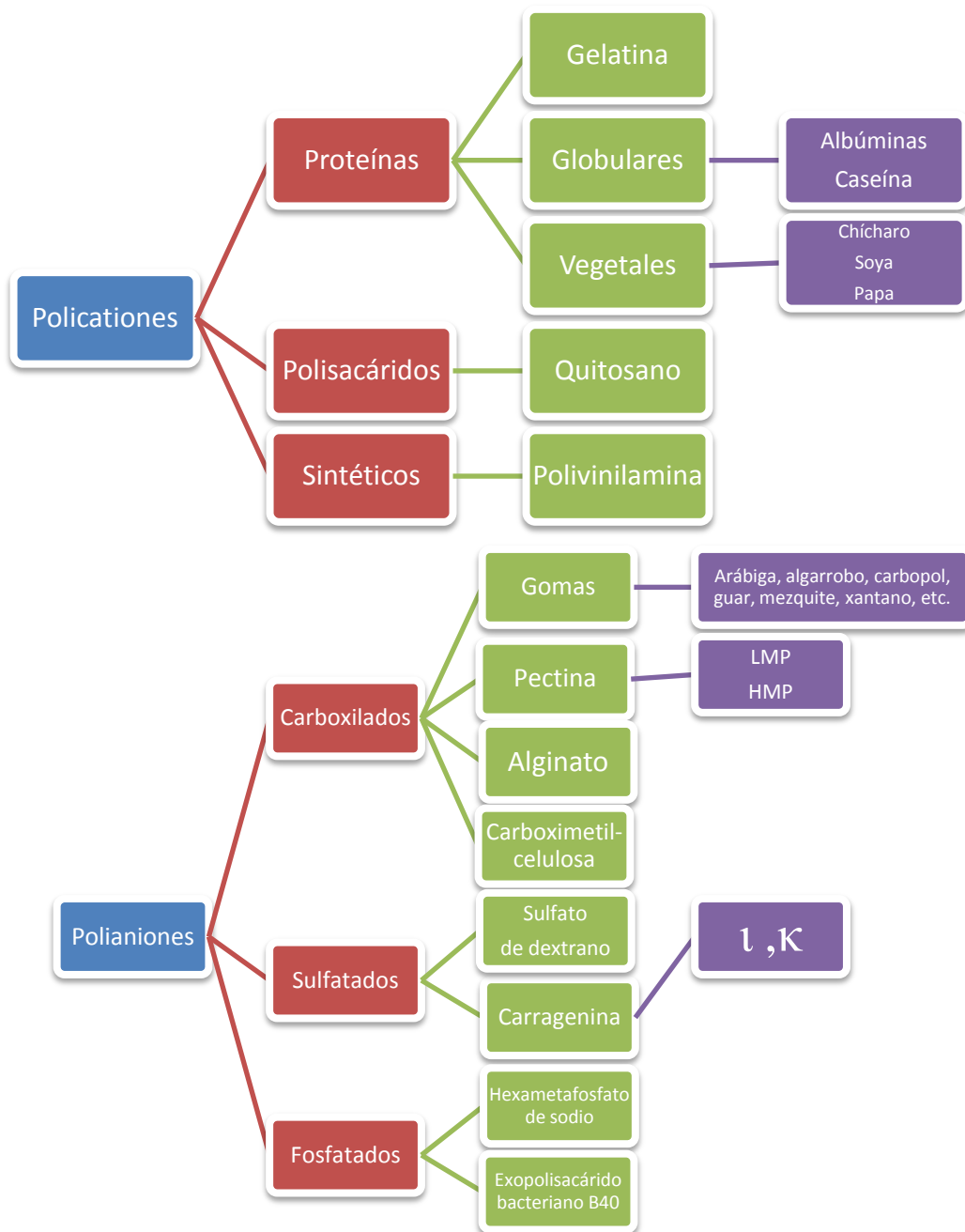


Figura 1. Polianiones y policationes más usados para formar coacervados (deKruif y col. 2004).

Bases moleculares de la conformación y de agregación en interacciones electrostáticas

Las interacciones electrostáticas juegan un papel muy importante en determinar la estructura molecular y la agregación de muchos biopolímeros. Las proteínas contienen distintos aminoácidos que pueden ionizarse para formar tanto iones positivos (arginina, lisina, histidina, prolina y el residuo terminal amino) como negativos (ácido aspártico, ácido glutámico y el grupo carboxilo terminal). El quitosano tiene grupos amino que le brindan un carácter básico. La carga neta de la molécula de un biopolímero depende del valor de pK de sus grupos ionizables y el pH de su entorno acuoso. Las interacciones electrostáticas de los biopolímeros son particularmente sensibles a los cambios de pH y no sólo a eso, sino a la concentración de iones en la fase acuosa debido a los efectos de cribado electrostático. Si un biopolímero contiene grupos con cargas similares, es más probable que adopte una estructura extendida debido a que esto aumenta la distancia promedio entre las cargas y así se evitan repulsiones desfavorables. En cambio, si contiene muchos grupos de cargas opuestas, entonces se plegará de tal manera que se favorezcan las interacciones entre los grupos. Tomando como ejemplo a las proteínas, éstas existen plegadas de una manera muy compacta al llegar a su punto isoeléctrico y, al variar el pH, adoptan una forma extendida. Las interacciones electrostáticas juegan un papel importante en determinar la agregación de las moléculas de un biopolímero en una solución (McClements 1999), por lo que una manera de poder saber el comportamiento de un biopolímero a diferentes condiciones de pH es mediante la determinación de potencial zeta.

Potencial Zeta

Cuando una superficie sólida está en contacto con una solución acuosa, la formación de una carga interfacial causa el rearrreglo de los iones libres locales en la solución para producir una región muy delgada de densidad de carga neta diferente de cero que está cercana a la interfase. El arreglo de cargas en la interfase sólido-líquido y el balance de los iones de carga contraria a la superficie sólida es lo que se refiere a la doble capa eléctrica. Existe una capa delgada de iones libres de carga contraria inmediatamente al lado de la partícula con carga superficial, llamada capa compacta (véase figura 2). Los iones en la capa

compacta están inmóviles debido a las atracciones electrostáticas tan fuertes. Los iones que están afuera de la capa compacta sí se pueden mover. Esta parte de la doble capa eléctrica se llama capa difusa. El potencial zeta (ζ) es el potencial electrostático que divide dicha doble capa y la capa difusa. El factor más importante que afecta el potencial zeta es el pH. Suponiendo que una partícula en suspensión tienen una carga negativa, si se agrega más álcali a la suspensión, entonces la molécula tenderá a adquirir una carga más negativa. En cambio, si se añade ácido a la solución entonces se alcanzará un punto en el que la carga se neutralizará (punto isoeléctrico) y si se sigue agregando el ácido entonces la carga será positiva. Cabe mencionar que es en el punto isoeléctrico en el que los sistemas coloidales son menos estables. Este parámetro es importante para varias aplicaciones, que incluye la estabilidad de emulsiones, caracterización de biopolímeros, transporte electrocinético de partículas, células sanguíneas, eficiencia de membranas, entre otras (Sze y col., 2003). Entender los distintos fenómenos coloidales e interfaciales asociados con estas aplicaciones requiere del conocimiento del potencial zeta, con la ayuda de la teoría cinética de Smoluchowski (1906), respecto al movimiento browniano de las moléculas en suspensión cuando interactúan con un campo eléctrico.

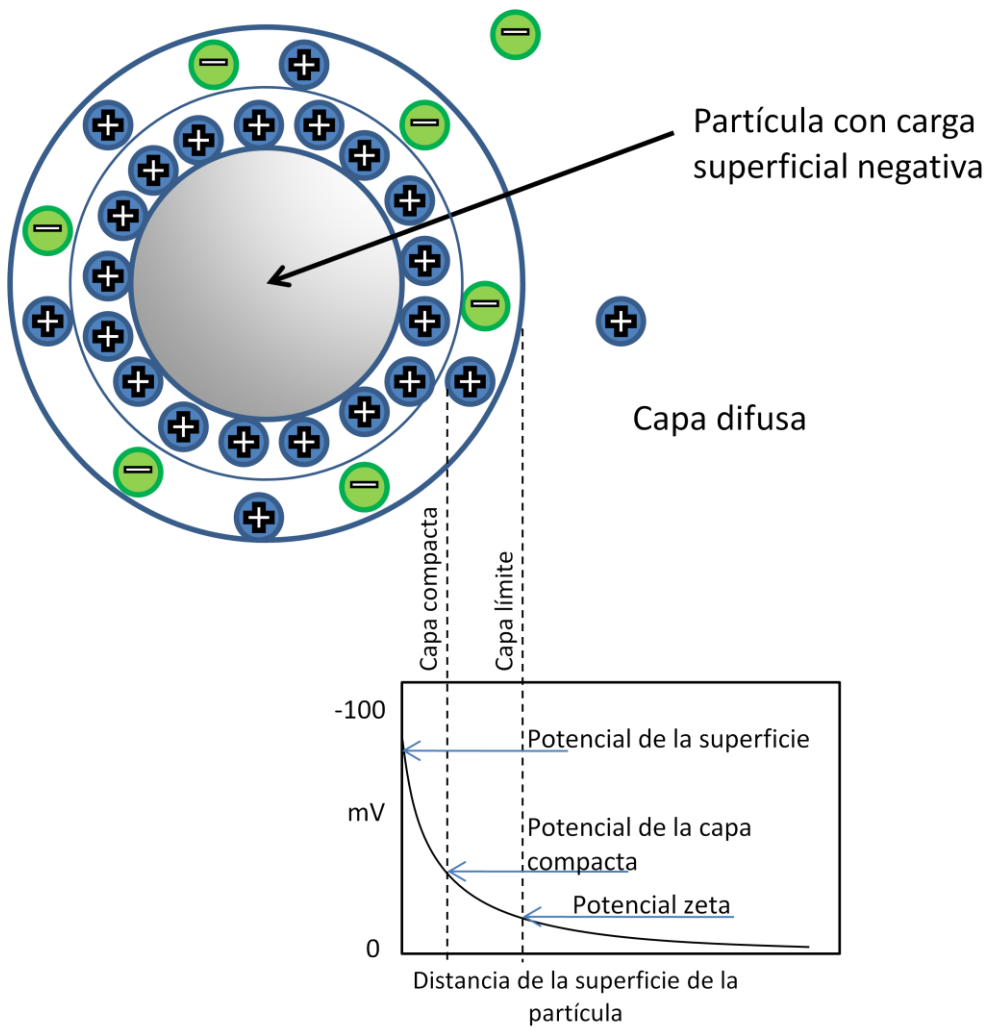


Figura 2. Representación esquemática del potencial zeta. (Extraído de "Zeta Potential: An introduction in 30 minutes" Malvern Instruments).

Entropía configuracional

Uno de los factores más importantes que determinan la conformación y agregación de las moléculas de biopolímeros es la entropía configuracional, a lo que los biopolímeros contribuyen local y no localmente. La entropía local se refiere al número de conformaciones que pueden adoptar los monómeros pertenecientes a la cadena enlazados uno tras otro. La formación de estructuras ordenadas, como las hélices y hojas, son desfavorables entrópicamente. La entropía no local se determina por la posible configuración que pueda adoptar la cadena completa. Así, los polímeros que son altamente flexibles de formación aleatoria, pueden tener una gran cantidad de conformaciones y eso repercute en una mayor entropía conformacional que los polímeros compactos globulares, los cuales tienen menores posibilidades de ocupar distintas conformaciones.

El traslapamiento estérico juega un papel importante en determinar la entropía no local, debido a que dos segmentos de una cadena polimérica no pueden ocupar el mismo lugar en el espacio y por lo tanto eso es desfavorable entrópicamente, a causa de las escasas posibilidades que tiene de adoptar alguna conformación.

La energía libre asociada con entropía configuracional ($-T\Delta S$) aumenta cuando la temperatura se incrementa, lo que explica porqué las proteínas globulares se desenrollan a altas temperaturas. Una consecuencia importante de la entropía configuracional no local en la conformación de un biopolímero son enlaces covalentes cruzados entre diferentes segmentos de la molécula. Un ejemplo común son los enlaces disulfuro de las proteínas, los cuales restringen severamente el número de conformaciones que puede adoptar la molécula desenrollada y por lo tanto reduce la fuerza entrópica que favorece la conformación de espiral aleatorio (McClements 1999).

Conformación y agregación molecular

El biopolímero va a tender a existir en la forma que le permita tener la menor energía libre posible bajo las condiciones ambientales predominantes (pH, fuerza iónica, tipos de iones, temperatura y tipo de solvente). La energía libre de cada estado está influenciada por varios

tipos de interacciones moleculares y las contribuciones entrópicas mencionadas previamente. Así, pues, el cambio de energía libre que ocurre cuando una molécula de biopolímero cambia de un estado a otro se puede representar de la siguiente manera:

$$\Delta G_{\text{transición}} = \Delta G_{\text{VDW}} + \Delta G_{\text{H}} + \Delta G_{\text{P de H}} + \Delta G_{\text{E}} + \Delta G_{\text{IE}} - T\Delta S_{\text{EC}}$$

Donde VDW: Van der Waals, H: hidrofóbico, P de H: puentes de hidrógeno, E: estérico, IE: interacciones electrostáticas y ΔS_{EC} es el cambio de entropía configuracional. Para que ocurra una transición, el signo de $\Delta G_{\text{transición}}$ debe ser negativo, si no, no lo hará. Aquí se representa el hecho de que las fuerzas deben agruparse en las que favorecen y las que se oponen a la transición. Se debe tomar en cuenta que los elementos que se utilizan para estabilizar un alimento, bebida o forma farmacéutica se encuentran en un sistema que no está en equilibrio, así que los biopolímeros no se encontrarán en su estado de energía libre más bajo (el estado de equilibrio), se encontrarán con una barrera energética que les impedirá cambiar de conformación por un periodo de tiempo. Generalmente los biopolímeros se encuentran atrapados en un estado metaestable (cinéticamente estable), es decir, formando una sola fase en una solución o en una emulsión. Este estado les impide alcanzar su estado de equilibrio (McClements 1999).

Espesamiento y estabilización

Una de las principales utilidades de los coacervados en la preparación de soluciones es el aumento de viscosidad de fases acuosas. El incremento de la viscosidad modifica la textura y la sensación de alimentos y bebidas, así como una disminución de las posibilidades de que ocurra una sedimentación de las partículas. Aumentar la viscosidad depende del peso molecular de los biopolímeros, el grado de ramificación, conformación y flexibilidad. Las soluciones que contienen biopolímeros presentan usualmente un comportamiento pseudoplástico, en el que su viscosidad aparente disminuye con la aplicación de un esfuerzo de corte que aumenta gradualmente, debido a que las moléculas de biopolímeros se alinean con el campo de corte o a que las fuerzas de interacción se perturban con el esfuerzo aplicado. Aunque también podrían presentar un carácter tixotrópico, en el que la viscosidad disminuye con el tiempo cuando se aplica un esfuerzo de corte constante. En ambos casos

puede ser reversible, parcialmente reversible o irreversible (McClements 1999). Es por eso que resulta importante evaluar las propiedades reológicas de los coacervados obtenidos.

Reología de complejos

Por definición, la reología es la ciencia que estudia la deformación y el flujo de la materia. Esta ciencia creció gracias a los estudios hechos en polímeros sintéticos y sus soluciones en diferentes solventes debido a las aplicaciones que éstos tienen en nuestra vida cotidiana. Entonces, los materiales de origen biológico brindan una oportunidad para el estudio de la reología y los estudios al respecto son muy amplios.

Los materiales usados en la industria alimentaria se pueden clasificar de diferentes maneras, incluyendo los sólidos, geles, líquidos homogéneos, suspensiones de sólidos en líquidos y emulsiones. Los materiales fluidos son los que toman la forma del recipiente que lo contiene, pero no lo retiene. Los materiales fluidos que contienen una cantidad considerable de sólidos disueltos de alto peso molecular o sólidos exhiben un comportamiento no newtoniano. Muchos materiales no newtonianos también exhiben propiedades viscosas y elásticas a la vez, conocidas como comportamiento viscoelástico. Los materiales fluidos con un contenido grande de compuestos de bajo peso molecular (v.g. azúcares) y con un contenido no significativo de polímeros y sólidos insolubles se puede esperar que exhiba un comportamiento newtoniano (explicado más adelante). Con una pequeña cantidad de polímero disuelto (~1%) puede incrementar sustancialmente la viscosidad e incluso alterar las características de flujo, del comportamiento newtoniano al no newtoniano de una dispersión acuosa (Rao, 1999).

El resultado de la coacervación requiere ser evaluado en sus propiedades reológicas, ya que de ello depende la utilidad que puedan tener en el diseño de formulaciones en el que se vea implícito el uso de coacervados complejos.

Cuando se le aplica fuerza a un material puede provocar que se deforme o que fluya. Las características de la deformación y el flujo dependen de las propiedades fisicoquímicas de la materia. Muchas pruebas reológicas implican la aplicación de una fuerza a un material y la medición del flujo resultante o el cambio de forma.

Las mediciones reológicas son usadas también por los científicos como herramientas analíticas que permiten elucidar la organización estructural y las interacciones de los componentes de las formulaciones, por ejemplo: las determinaciones de viscosidad contra tasa de corte se pueden usar para obtener información respecto a la fuerza de las interacciones coloidales entre los componentes.

Generalmente, en el caso de los alimentos, son materiales de una composición y estructura compleja de biopolímeros que pueden exhibir un amplio rango de diferentes comportamientos reológicos, que van de los fluidos de baja viscosidad (como la leche y los jugos de frutas) hasta los sólidos (como la margarina refrigerada o la mantequilla). Los científicos dedicados a la investigación en alimentos están motivados a desarrollar teorías que puedan ser utilizadas para describir y predecir el comportamiento de las interacciones entre solutos y experimentar técnicas para caracterizar estas propiedades. A pesar de la diversidad de las emulsiones alimenticias, es posible caracterizar muchas de sus propiedades reológicas en términos de unos cuantos modelos simples: el sólido ideal, el líquido ideal y el plástico ideal. Otros sistemas más complejos pueden describirse mediante la combinación de dos o más de estos modelos simples (McClements 1999).

Líquidos

Los líquidos presentan un amplio rango de propiedades reológicas. Algunos presentan bajas viscosidades y fluyen fácilmente, como la leche y otros son muy viscosos, como la mayonesa. A pesar de eso, es posible caracterizar sus propiedades reológicas al utilizar unos conceptos simples.

Líquido ideal

Se refiere al líquido newtoniano, al referirse a Isaac Newton, el científico que primero describió su comportamiento. Cuando se le aplica un esfuerzo de corte a un fluido, éste continúa fluyendo durante el tiempo que se aplica el esfuerzo. Una vez que se elimina el esfuerzo, no existe una recuperación elástica del material, es decir, no regresa a su forma original. La viscosidad de un líquido es una medida de la resistencia al flujo: mientras más alta sea la viscosidad, más grande es la resistencia. El concepto de viscosidad se puede entender si se considera a un líquido contenido entre dos platos paralelos. El plato del fondo está en reposo, mientras que el plato superior se mueve en dirección x con una velocidad constante (v). Se asume que el líquido entre los platos consiste en una serie de capas finas infinitesimales. Se asume que las capas de líquido que están en contacto directo con los platos del fondo y el superior están “pegadas” a éstos y su velocidad es v y 0 respectivamente (véase Figura 3). Las capas de líquido que se deslizan una encima de otra con rangos de velocidades que van de cero hasta v , el valor actual está dado entre $dy(dv/dy)$, donde dy es la distancia desde el plato del fondo y dv/dy es el gradiente de velocidad entre los platos. El esfuerzo de corte aplicado al fluido es igual a la fuerza de corte dividida entre el área sobre la cual actúa:

$$\tau = \frac{F}{A}$$

La tasa de corte está dada por el cambio en el desplazamiento de las capas por unidad de tiempo: $dy/dt=dv/dy$. En un líquido ideal, el esfuerzo de corte es proporcional a la tasa de corte:

$$\tau = \eta \dot{\gamma}$$

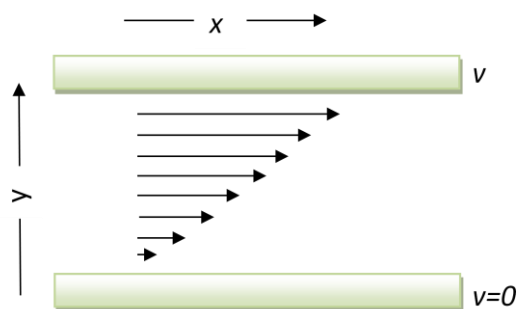


Figura 3. Diagrama de la relación entre la viscosidad del líquido y la fricción entre capas. Entre más grande es la fricción, mayor la viscosidad.

La tasa de deformación está dada por el cambio en el desplazamiento de las capas por unidad de tiempo $\frac{d\dot{\gamma}}{dt} = \frac{dv}{dy}$. Para un líquido ideal, el esfuerzo de corte es proporcional a la tasa de deformación, donde la constante de proporcionalidad se llama viscosidad. La viscosidad es el resultado de la fricción entre las capas de líquido en el momento en el que se mueven. Mientras más baja sea la viscosidad de un líquido, habrá menos resistencia entre las capas de un líquido y por lo tanto la fuerza que se requiere para mover el plato superior será muy baja o el plato se moverá más rápido al aplicársele cierta fuerza. Un fluido newtoniano debe ser incompresible (que su volumen no cambie cuando se le aplique una fuerza), isotrópico (sus propiedades son las mismas en todas direcciones) y sin estructura (homogéneo). Aunque muchos líquidos no cumplen estrictamente con estas características, pueden ser descritos como si fuesen newtonianos. Sin embargo, hay otros líquidos sin comportamiento lineal y no pueden ser descritos de esta manera.

El tipo de flujo descrito ocurre a bajas tasas de corte y se conoce como flujo laminar, debido a que el líquido viaja en un patrón laminar bien definido. A mayores tasas de corte, se forman remolinos y el patrón de flujo se vuelve más complejo. Este tipo de flujo se conoce como turbulento y se traduce en dificultades para describir matemáticamente el esfuerzo de corte y la tasa de deformación. Es por esta razón que los instrumentos que miden la viscosidad de los líquidos se han diseñado para evitar el flujo turbulento (McClements 1999).

Viscosidad newtoniana y no newtoniana

Si se observa la siguiente ecuación:

$$\sigma = \eta \dot{\gamma}$$

Que describiéndola a grandes rasgos asume que la fuerza σ (o resistencia) es proporcional a la velocidad $\dot{\gamma}$ (del movimiento). El coeficiente de proporcionalidad, η , se conoce como viscosidad. Esta ecuación describe la relación entre el esfuerzo de corte σ , y la tasa de corte $\dot{\gamma}$, entonces llevan a cabo mediciones a diferentes valores de σ ó $\dot{\gamma}$, la relación σ - $\dot{\gamma}$ debe ser constante debido a que la viscosidad es la propiedad de los líquidos. Los líquidos que tienen viscosidad constante para cualquier valor de $\dot{\gamma}$ se llaman líquidos newtonianos y su viscosidad se llama viscosidad newtoniana. En muchos casos reales, la relación σ - $\dot{\gamma}$ no es constante y es conocida como aparente (o no newtoniana) y también se usa el símbolo η . La dependencia de la viscosidad aparente hacia el esfuerzo de corte o tasa de corte se conoce como curva de flujo. La viscosidad aparente disminuye en muchas aplicaciones, es importante saber cómo es que la viscosidad aparente cambia cuando las tasas o esfuerzos de corte cambian en un intervalo amplio. Para que se perciba de una manera más clara el cambio se usan escalas logarítmicas.

El comportamiento no newtoniano de los líquidos fue observado por primera vez por Ostwald en dispersiones coloidales y se entiende que los cambios de la estructura de un coloide son resultado de la deformación. Algunos autores consideran a la relación σ - $\dot{\gamma}$ como viscosidad estructural, que puede estar relacionado o no con la ruptura de la “estructura” de líquido que fluye (Ya Malkin, 1994).

Materiales Viscoelásticos

En general, la viscoelasticidad es la combinación (o superposición) de propiedades características de los líquidos (pérdidas disipativas viscosas) y sólidos (almacenamiento de energía elástica). Por lo tanto, una definición generalizada de los materiales viscoelásticos incluye dos componentes: potencial elástico, representado como G' y la intensidad de pérdidas disipativas, representado como G'' . Sin embargo, estos dos valores pertenecen a dimensiones distintas. Las principales constantes que caracterizan a los materiales (es decir,

viscosidad y módulo de elasticidad) son valores de una dimensión distinta también. Esta aproximación destinada a combinar características elásticas y viscosas de un material para describir sus propiedades viscoelásticas está sujeta a una discusión especial debido a que deriva en varios modelos que describen a un cuerpo viscoelástico. (Ya Malkin, 1994)

Muchas sustancias no son ni líquidos puros ni sólidos puros, pero tienen propiedades reológicas parcialmente viscosas y parcialmente elásticas. Los materiales plásticos presentan un comportamiento elástico debajo de cierto valor de esfuerzo y comportamiento viscoso encima de este valor. De otra manera, los materiales viscoelásticos presentan comportamiento viscoso y elástico simultáneamente. En un sólido elástico ideal, toda la energía mecánica que se aplica al material se almacena en los enlaces que se deforman y regresa como energía mecánica una vez que la fuerza se remueve, es decir, no hay pérdida de energía mecánica. De otra manera, en un líquido ideal toda la energía mecánica que se aplica se disipa debido a la fricción (se convierte en calor). En un material viscoelástico parte de la energía se conserva y la otra se disipa. Es por esta razón que cuando se le aplica una fuerza a un material viscoelástico éste no adopta instantáneamente su nueva forma ni regresa instantáneamente a su estado original, tal como lo haría un material elástico, incluso este material podría quedar deformado de manera permanente una vez que deja de recibir fuerza. Se usan dos tipos de pruebas experimentales para caracterizar las propiedades de los materiales viscoelásticos: las que se basan en mediciones de estados transitorios y mediciones dinámicas.

Pruebas oscilatorias dinámicas

La reometría oscilatoria de pequeña amplitud permite determinar las propiedades viscoelásticas de los materiales, se usa con frecuencia para comprender los procesos de gelación y la estructura de los materiales porque dichas pruebas satisfacen las siguientes condiciones: (1) no son destructivas y no interfieren con la formación de geles o reblandecimiento de la estructura, (2) el tiempo de las mediciones es corto comparado con el de gelación o de reblandecimiento de la estructura y (3) los resultados se expresan en términos fundamentales y se pueden relacionar directamente con la estructura de la red. En estos ensayos, la muestra se coloca entre geometrías (por ejemplo: plato y cono) cuya

temperatura puede ser controlada: una de ellas oscila a una frecuencia fija. La deformación sinusoidal causa un grado de cizallamiento en ella y la señal de respuesta que se obtiene es diferente en fase y amplitud. En este caso, la determinación de los módulos G' y G'' está en función del ángulo de desfase del esfuerzo y la deformación aplicadas armónicamente. Como se observa en la figura 4, si ambos parámetros son aplicados y ocurre un desfase mayor a 90° , entonces se trata de un líquido. Si no ocurre desfase, entonces se trata de un sólido elástico. Por lo tanto, el ángulo de desfase de un material viscoelástico va a estar acotado entre 0 y 90° .

$$G' = G^* \cos \delta$$

$$G'' = G^* \sin \delta$$

Siendo G^* una relación entre la amplitud del esfuerzo y la amplitud de la deformación. (Rao, 1999)

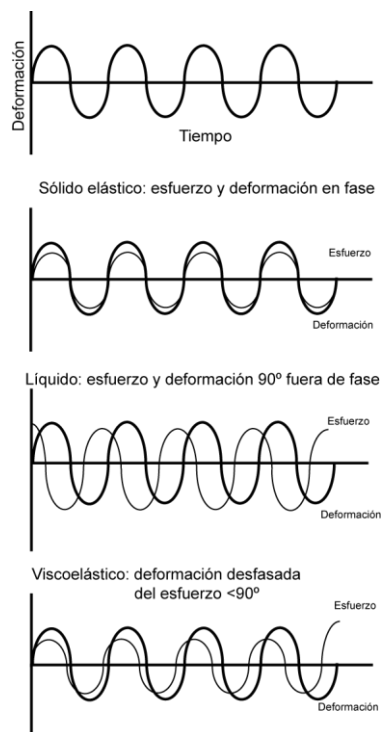


Figura 4. Respuesta del esfuerzo y deformación de un líquido newtoniano y un sólido perfectamente elástico sometidos a pruebas dinámicas armónicas (Rao, 1999)

Las pruebas de oscilación realizadas en este trabajo consisten en análisis de deformación en un intervalo determinado con una frecuencia fija y análisis de frecuencia en un intervalo determinado con un porcentaje de deformación fijo. Se comienza con un barrido de deformación y durante dicho experimento se observan distintos comportamientos en la muestra, como se observa en la gráfica A de la figura 5. A valores bajos de deformación, se observa inestabilidad, debida a la histéresis provocada por el rearrreglo molecular. Posteriormente se encuentra la región viscoelástica lineal, un intervalo de deformación en que la magnitud de los módulos permanece constante, independiente del esfuerzo aplicado debido a la máxima interacción entre los componentes del material (Weinbreck y col. 2004). Posteriormente ocurre un decaimiento en los valores de los módulos, debido al desarreglo de la estructura sometida a la deformación. En el caso de la gráfica B, se muestra un análisis de frecuencia en un intervalo dado, en el que la máxima interacción entre los materiales de la muestra ocurre en el punto donde ambos módulos intersectan, el valor fijo de deformación en un barrido de frecuencia se conoce a partir de un barrido de deformación, donde se encuentra la región viscoelástica lineal, que es la región en la que los módulos no dependen de la deformación (Pal, 2005). Estos parámetros son descritos por este tipo de pruebas oscilatorias.

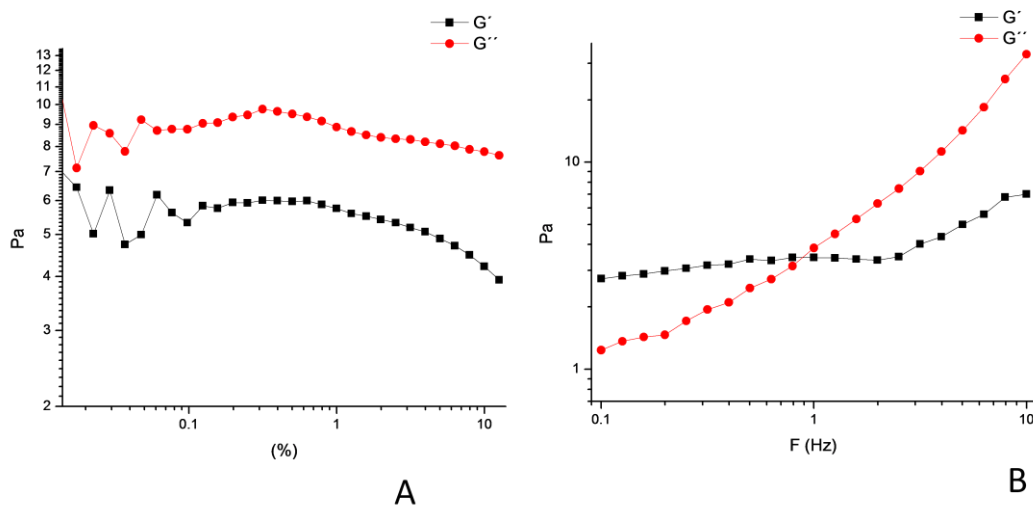


Figura 5. Ejemplo de pruebas de oscilación, siendo A) la correspondiente a un barrido de deformación y B) un barrido de frecuencia

Flujo y modelos funcionales para las propiedades reológicas de fluidos

Un modelo que describe el flujo de un material es una ecuación matemática que resulta ser una manera muy conveniente de representar los datos obtenidos. Además de la conveniencia matemática que implica, también es importante cuantificar cómo es que las magnitudes de los parámetros del modelo resultan afectadas por las variables de estado, como la temperatura y el efecto de la estructura/composición (por ejemplo, la concentración de sólidos) del material y establecer relaciones ampliamente aplicables que pueden ser llamados modelos funcionales. Por conveniencia, estos modelos de flujo pueden ser divididos según el comportamiento de los materiales: independientes o dependientes del tiempo. En el caso de los modelos independientes del tiempo, encontramos el modelo de Newton, Ellis, Sisko, Cross, Carreau, Ley de Potencia, Bingham, Herschel-Bulkley, Casson, Mizrahi and Berk, modelo generalizado de Ofoli, Vocadlo y muchos más, para distintas aplicaciones. En el caso de los modelos para comportamiento dependiente del tiempo, se encuentran: Weltman, Tiu and Boger, entre otros (Rao, 1999).

Relaciones entre la viscosidad aparente y la tasa de corte de los materiales reoadelgazantes

Cuando las concentraciones de biopolímeros son lo suficientemente altas, la mayoría de las dispersiones de biopolímeros (también llamados hidrocoloides) presentan una respuesta viscosa similar de tres estados cuando se someten a esfuerzos a tasas de corte acotadas en intervalo amplio. A bajas tasas de corte, presentan propiedades newtonianas con una viscosidad constante (η_0) sobre un rango limitado de corte, lo cual es seguido por un intervalo de reoadelgazamiento en el que la viscosidad de la solución disminuye de acuerdo con la relación de la ley de potencia —el recíproco de la tasa de corte al cual la transición de comportamiento Newtoniano a pseudoplástico ocurre es el tiempo característico o la constante de tiempo— y a altas tasas de corte muestra una tasa de corte limitante y constante infinita (η_∞). Las tres regiones se piensa que se refieren al rearrreglo en la

conformación de las moléculas de los biopolímeros de la dispersión debido al corte al que ha sido sometido (Véase figura 6) (Rao, 1999).

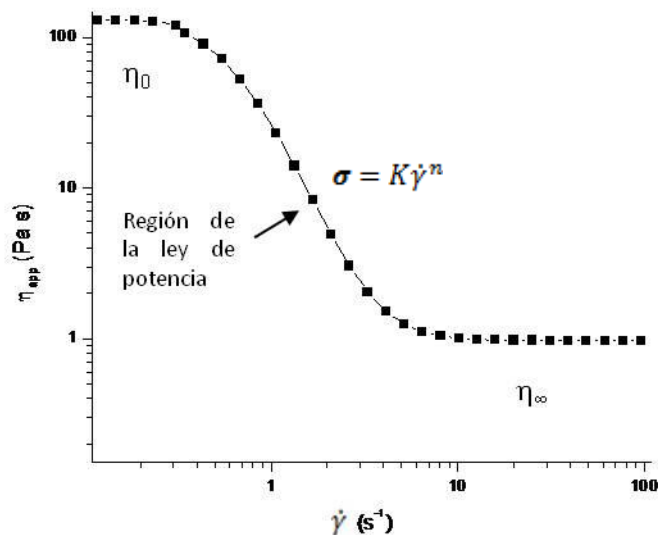


Figura 6. Curva de flujo en función de la tasa de corte con viscosidad aparente como variable dependiente para materiales reodelgazantes, identificando tres regiones separadas: una región de viscosidad constante cero a bajas tasas de corte, una región de la ley de potencia a tasa de corte intermedias y una región de viscosidad constante infinita a altas tasas de corte (Rao, 1999).

Modelamiento matemático de curvas de flujo

La viscosidad aparente (η_{app}) de la solución se puede relacionar con la tasa de corte ($\dot{\gamma}$) usando la ecuación de Carreau,

$$\bar{\eta}_{app} = \eta_{\infty} + \frac{\eta_0 - \eta_{\infty}}{(1 + (\lambda_c \dot{\gamma})^2)^N}$$

en la que λ_c es una constante de tiempo relacionada con los tiempos de relajación de los polímeros y N es el exponente adimensional. Debido a que las magnitudes de η_{∞} de las dispersiones de alimentos con concentraciones de interés práctico se encuentran usualmente en bajas magnitudes, son difíciles de determinar experimentalmente. Por lo

tanto, para evitar errores consecuentes en la estimación de otros parámetros reológicos, hay ecuaciones en las que se ha prescindido de la η_{∞} . Este modelo describe muy bien la dependencia al corte de soluciones acuosas de pectina de alto metoxilo, goma de algarrobo, goma de mezquite y otras (Rao, 1999).

Medición de propiedades reológicas

Estas pruebas pueden aplicarse a diversos materiales: sólidos, líquidos, plásticos y viscoelásticos. El tipo de instrumento y método que deben de utilizarse en una situación en particular dependen de las características fisicoquímicas de la muestra, así como de la información que se requiere. Existen viscosímetros capilares (para líquidos newtonianos), viscosímetros mecánicos y reómetros dinámicos.

Recordando que para poder medir los esfuerzos de corte se requieren dos platos paralelos (uno estático con temperatura controlada y otro en movimiento) entre los cuales se contiene la muestra, es importante mencionar que dependiendo del material se usarán distintas geometrías del plato que está en movimiento (véase Figura 7), las cuales son:

- a) **Cilindros concéntricos:** válido para líquidos no newtonianos, medición de viscoelasticidad de semisólidos y elasticidad de sólidos. La muestra se coloca en el espacio reducido que hay entre dos cilindros concéntricos. El cilindro interno gira a un torque constante (fuerza angular) y se mide la deformación resultante (desviación angular) o tasa de deformación (velocidad a la cual rota el cilindro), dependiendo de que si se está analizando una muestra predominantemente sólida o líquida (en algunos equipos, el cilindro externo es el que rota y es al interno al que se le mide el torque). Para sólidos, la desviación angular del cilindro interno a partir de su estado de reposo es una indicación de su elasticidad: mientras más grande sea la desviación, el valor del módulo G' será más bajo. Para un líquido, la viscosidad a la que rota el cilindro interno a partir del reposo depende de la viscosidad del fluido contenido entre los platos: mientras más rápido gire al aplicar un torque dado, la

viscosidad del líquido analizado será menor. El torque se puede variar de una manera controlada para que el módulo elástico o la viscosidad (aparente) se puedan medir en función del esfuerzo de corte.

- b) **Plato y cono:** válido para analizar materiales no ideales. Es el mismo diseño que la geometría de los platos paralelos, excepto que el plato superior es un cono. El cono tiene un pequeño ángulo que se ha considerado en el diseño para asegurar que se aplique un esfuerzo de corte uniforme sobre toda la muestra.
- c) **Platos paralelos:** válido para analizar muestras cuyas propiedades reológicas sean dependientes del esfuerzo de corte, por lo que no es válido para analizar líquidos o sólidos no ideales. La muestra se coloca entre los platos paralelos, el plato inferior permanece estático mientras que el superior rota. Se le aplica un torque constante al plato superior y se mide la deformación o tasa de deformación, dependiendo si la muestra es predominantemente sólida o líquida. El problema con este arreglo de platos es que la fuerza de deformación varía a lo largo de la muestra (la fuerza de deformación al centro de la muestra es menor que a los lados, es por eso que se aplican las condiciones antes mencionadas para analizar este tipo de muestras.

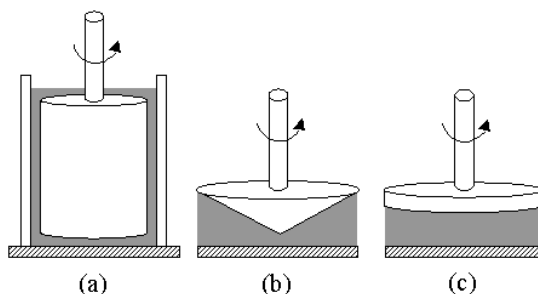


Figura 7. Arreglo de geometrías de los platos del reómetro dinámico a) Cilindros concéntricos; b) Plato y cono; c) Platos paralelos.

Cualquiera de estos arreglos se puede usar para hacer mediciones de viscosidad simple, al medir la variación de esfuerzo de corte respecto a la tasa de corte. Los reómetros rotacionales permiten hacer pruebas reológicas dinámicas o de estado transitorio. Generalmente las pruebas reológicas que se hacen son las que dependen de la temperatura y del tiempo.

Existen ciertas fuentes posibles de error experimental asociadas con las mediciones efectuadas en estos equipos:

1. El espacio entre los platos debe de ser al menos 20 veces mayor que el diámetro de las partículas de la muestra, para poder garantizar homogeneidad y dicho espacio debe ser lo suficientemente estrecho para poder garantizar que el esfuerzo de corte se aplique uniformemente.
2. Deslizamiento a través de la pared: fenómeno que ocurre tanto en viscosímetros como en reómetros y que hay que tomar en cuenta para evitar errores experimentales. Se asume como cierto el hecho de que un líquido se mueve a la misma velocidad que los cilindros o platos con los que tiene contacto. Esta suposición es válida para líquidos simples debido a que las moléculas, al ser tan pequeñas, se atorán en las irregularidades del cilindro y éstas son arrastradas al ocurrir movimiento. Cuando existen emulsiones, las partículas no pueden ser arrastradas por las irregularidades del cilindro y lo que ocurre es una separación de fases la superficie del cilindro, en la que la fase continua actúa como lubricante y provoca que haya deslizamiento. Este error se ha disminuido al controlar la rugosidad de los cilindros.
3. Dependencia de las propiedades reológicas de una muestra a su historia térmica y de esfuerzo de corte: este factor debe controlarse para obtener resultados reproducibles. Por ejemplo, la viscosidad de ciertos materiales disminuye considerablemente al someterse a esfuerzos de corte debido a la perturbación de las partículas que formaban complejos o agregados y requieren que transcurra cierto tiempo para volver a su estado basal de viscosidad.
4. Muchas emulsiones son susceptibles de formar sedimentación o crema durante el transcurso de los experimentos y eso debe evitarse si se quieren resultados precisos (McClements 1999).

Biopolímeros polianiónicos y policatiónicos

Goma de Mezquite

El árbol de mezquite (*Prosopis spp.*) se encuentra en el desierto mexicano al norte del país y al sur de los Estados Unidos. Dicho árbol es reconocido por los habitantes de esas regiones como fuente de madera y carbón, fuente alimenticia humana y animal, néctar para apicultura, sombra, entre otros. Su papel ecológico es, al ser una leguminosa, es la de la fijación del nitrógeno y el mejoramiento de su entorno se debe a la capacidad que tiene de mejorar los suelos y favorecer el crecimiento de vegetación circundante. La goma de mezquite es un exudado formado por distintos polisacáridos que el árbol excreta como respuesta a varios factores bióticos y abióticos como son el daño mecánico, estrés hídrico y como respuesta a la temperatura extrema. La goma de mezquite es la polisal neutra de un polisacárido complejo de carácter ácido compuesto por un núcleo de residuos de β -D-Galactosa, que comprende un esqueleto con enlaces (1,3) y ramas con enlaces (1,6) que soportan L-arabinosa (en forma piranosa y furanosa), L-ramnosa, β -D-glucuronato y 4-O-metil β -D-glucuronato como azúcar sencillo u oligosacárido de cadena lateral (Orozco-Villafuerte y col. 2003). Ésta contiene incluso una pequeña cantidad de proteína (0.7-5.8%), la cual es el centro de la estructura y la responsable de sus propiedades emulsificantes. Se ha considerado a la goma de mezquite como un buen encapsulante de aceites y se reconoce el efecto sinérgico que ocurre al estar en la misma solución con goma arábiga (Román-Guerrero y col. 2009).

Goma arábiga

La goma arábiga es un exudado seco y comestible de las hojas y ramas de las especies *Acacia senegal* y *A. seyal*, rico en fibra soluble no viscosa. La goma de estos árboles, debido a que se considera inocua y con propiedades funcionales, tiene usos industriales como estabilizante, agente espesante y emulsificante esencialmente en la industria alimentaria, pero también es ampliamente usada en la industria textil, farmacéutica, alfarera, litográfica y cosmética. La goma arábiga es un polisacárido de cadena ramificada, de carácter neutro o ligeramente ácido, hallado como sal de calcio, magnesio o potasio. El

esqueleto consiste en unidades de β -D-Galactopiranosil unidas por enlaces 1,3. Las cadenas laterales están compuestas por unidades de β -D-Galactopiranosil unidas por enlaces 1,6 a la cadena principal del biopolímero. Tanto la cadenas laterales y la principal contienen unidades de α -L-arabinofuranosil, α -L-ramnopiranosil, β -D-glucopiranosil y 4-O-metil- β -D-glucopiranosil. Estas dos generalmente se encuentran como unidades terminales. La composición de esta goma se ha reportado de la siguiente manera: 39-42% de galactosa, 24-27% de arbinosa, 12-16% de ramnosa, 15-16% de ácido glucurónico, 1.5-2.6% proteína, 0.22-0.23% de nitrógeno y 12.5-16% de humedad (Badreldin y col. 2009). Una descripción detallada del contenido de aminácidos en la goma de mezquite y la goma arábica se puede consultar en la tabla 1. Debido a sus propiedades funcionales, se ha elegido a la goma arábica como un material adecuado para la encapsulación de lípidos debido a sus eficientes características emulsificantes y la estabilidad que le brinda a los aceites contra la oxidación. Sin embargo, la escasa provisión y los altos costos de la goma arábica han provocado que los industriales busquen alternativas (Pérez-Alonso y col, 2003).

Tabla 1. Composición de aminoácidos de exudados de árboles de las especies *Prosopis laevigata* (goma de mezquite) y *Acacia senegal* (goma arábica) (Residuos por cada 1000 residuos) (Anderson y col. 1985).

Aminoácidos	Goma de Mezquite	Goma arábica
Alanina	35	28
Arginina	16	5
Ácido aspártico	50	50
Cistina	3	0
Ácido glutámico	26	29
Glicina	33	41
Histidina	35	44
Hidroxiprolina	376	328
Isoleucina	20	12

Leucina	35	67
Lisina	23	23
Metionina	2	1
Fenilalanina	12	22
Prolina	79	88
Serina	113	136
Treonina	49	76
Tirosina	32	10
Valina	61	36

Aislado de proteína de suero de leche

La leche bovina es un sistema muy complejo que contiene aproximadamente un 3.5% p/p de proteína. Ésta se divide en dos fracciones principales basadas en su solubilidad. Las caseínas, que representan cerca del 80% del nitrógeno de la leche y el 20% restante que es soluble en el suero corresponde a un 15% de proteínas y el remanente son compuestos nitrogenados no proteicos (Véase tabla 2) (Philips y Williams, 2000).

Tabla 2. Intervalos de concentración de las proteínas del suero, basadas en la totalidad de proteínas presentes en la leche (Philips y Williams, 2000)

Proteínas del suero de leche	Concentración g/l proteína total
β-lactoglobulina	2-4
α- lactoalbúmina	0.7-1.5
Inmunoglobulinas	0.6-1.0
Albúmina bovina sérica	0.1-0.4
Peptonas de proteosa	0.6-1.8

La proteína del suero de leche es una colección de proteínas globulares que pueden ser aisladas físicamente del suero de la leche, subproducto de procesos industriales de productos como el queso. Desde el punto de vista químico es una mezcla de proteínas solubles en agua en sus formas nativas independientemente del pH de la solución. La fracción de proteína de suero es altamente heterogénea y eso incluye las proteínas principales del suero (véase tabla 3): β -lactoglobulina, α -lactoalbúmina, albúmina sérica, inmunoglobulinas, peptonas derivadas de la β -caseína, numerosas proteínas menores incluyendo la lactoperoxidasa, la lactotransferrina y varias enzimas. La β -lactoglobulina monomérica contiene dos entrecruzamientos disulfuro intramoleculares y un grupo SH libre.

Se conocen numerosas variantes genéticas de ella, una de ellas está glicosilada. La α -lactoalbúmina monomérica es una metaloproteína de calcio que tiene cuatro entrecruzamientos disulfuro intermoleculares y existe en diversas variantes intermoleculares que tienen otro tipo de formas glicosiladas menores. Las variaciones genéticas presentes en la leche, así como la variabilidad en el grado de glicosilación son los factores que afectan el comportamiento funcional de las leches durante el proceso. Las inmunoglobulinas son proteínas contenidas en las secreciones mamarias que protegen a los mamíferos de las infecciones. Ha habido interés en utilizarlas como suplemento en la alimentación de los rumiantes (Philips y Williams, 2000).

Tabla 3. Características fisicoquímicas de las proteínas del suero (Philips y Williams, 2000)

Proteína	Número de residuos	Punto isoeléctrico	Peso molecular (kDa)	Número de prolinas	Residuos de media cistina
β-lactoglobulina	162	5.2	18	8	5
α-lactoalbúmina	123	4.2-4.5	14	2	8
Albumina bovina sérica	582	5.3	66	28	35
Inmunoglobulinas	Variable		150-900		
Peptonas	Variable		4.1-40.8		

A valores de pH más bajos que el punto isoeléctrico (\sim pH4.6), las proteínas de suero tienen una carga positiva y se comportan como cationes, mientras que a valores de pH encima del punto isoeléctrico tiene una carga neta negativa y se comportan como aniones permitiendo el fraccionamiento mediante procesos de intercambio iónico.

La proteína del suero de la leche puede diferir en concentración según el proceso o elaboración que haya tenido, por regla general existen tres tipos de proteínas solubles en el mercado: en polvo (*Whey powder*, suele contener aprox. un 30%), concentrado (WPC, de un

30% hasta un 85%) y aislado (WPI, alcanza un 90% aproximadamente) (Philips y Williams, 2000).

Quitosano

Bajo ciertas condiciones la quitina y el quitosano pueden dar lugar a hidrogeles que retienen gran cantidad de agua. La formación del gel se promueve también mediante agentes entrecruzantes o solventes orgánicos, particularmente para derivados del quitosano. Los geles que se producen de manera física y química pueden ser térmicamente reversibles o irreversibles.

La quitina y el quitosano no están presentes en los tejidos humanos, pero la acetilglucosamina y la quitobiosa se puede encontrar en glucoproteínas y en glucosaminoglucanos. Debido a que el quitosano es biodegradable, no tóxico, no inmunogénico y biocompatible con los tejidos animales, se ha hecho mucha investigación para su uso en aplicaciones médicas como la liberación de fármacos, piel artificial y anticoagulantes de sangre.

La quitina es el aminopolisacárido más abundante en la tierra, es el material de soporte de crustáceos e insectos, que consiste en monómeros de 2-acetamido-2-desoxi- β -D-glucosa a través de enlaces β (1 \rightarrow 4). Es un material blanco, rígido e inelástico. El quitosano es una amina alifática primaria, derivado *N*-desacetilado de la quitina, aunque esta desacetilación nunca se lleva a cabo por completo. El quitosano que puede ser protonada por ácidos, el pK de la amina del quitosano es de 6.3. No se ha definido una nomenclatura precisa con respecto al grado de desacetilación que se puede alcanzar entre la quitina y el quitosano. Las estructuras de la celulosa, la quitina y el quitosano se representan en la Figura 8.

Estos biopolímeros son de interés comercial debido a su alto porcentaje de nitrógeno (6.89%), comparado con la celulosa sustituida sintéticamente (1.25%). Esta cuestión vuelve a la quitina un buen agente quelante. La ventaja de considerar al quitosano como un material funcional son sus propiedades de biocompatibilidad, biodegradabilidad, inocuidad, propiedades de adsorción, bacteriostáticas, etcétera.

La quitina se obtiene fácilmente a partir exoesqueleto de cangrejo, camarón y micelio fungal. Las dos primeras están asociadas a los desperdicios de la industria alimentaria y el micelio está relacionado con los procesos de fermentación que dan como resultado complejos de quitosano y glucano, como los que producen ácido cítrico a partir de *Aspergillus niger*, *Mucor rouxii*, y *Streptomyces spp.* Se requiere un tratamiento mediante álcalis para remover la proteína y desacetilar simultáneamente. Dependiendo de la concentración del álcali, también se pueden remover algunos glucanos. El resultado es quitina con un 70% de desacetilación al tratarse en una solución de hidróxido de sodio al 40% a 120°C por 1 a 3 horas.

En la actualidad se pretende eliminar la hidrólisis alcalina con enzimas de actividad glucanasa y desacetilasa. Muchos de los polisacáridos de origen natural (celulosa, dextranos, pectina, ácido algínico, agar, agarosa, goma de mezquite, goma arábica, carrageninas, entre otros) son neutros o de carácter ácido en su estado nativo, siendo que la quitina y el quitosano, junto con ciertas proteínas, ejemplo de polisacáridos altamente básicos. Entre sus propiedades únicas, se encuentra la formación de polioxisales, capacidad para producir películas, quelar iones metálicos y con características ópticas estructurales. . La quitina es altamente hidrofóbica, insoluble en agua y en la mayoría de los solventes orgánicos. Es soluble en hexafluoroisopropanol, hexafluoroacetona y cloroalcoholes en conjugación con soluciones acuosas de ácidos minerales. El quitosano es soluble en soluciones diluidas de ácidos, como el acético y clorhídrico (Ravi-Kumar. 2000). Su uso como excipiente en la industria farmacéutica incluye funciones como agente desintegrante de tabletas, para mejorar la disolución de las sustancias activas, para liberación controlada de formas farmacéuticas sólidas, formación de microcápsulas y con una actividad promotora de la absorción transmucosal (Illum,1998).

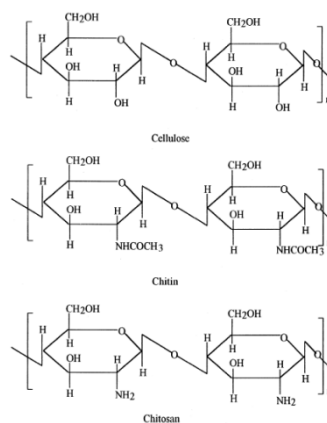


Figura 8. Estructura de la celulosa, la quitina y el quitosano

Justificación

La necesidad de nuevos materiales para la industria alimentaria aumenta, debido a que se necesita mejorar las características sensoriales de los productos y aumentar la vida de anaquel al estabilizarlos de una manera más adecuada.

Tomando en cuenta que los coacervados resultan ser un material potencial para su aplicación en la industria, este estudio se enfocará en su caracterización, con el fin de que contribuyan a ampliar la gama de aditivos alimentarios que resulten inocuos y que se obtengan de manera fácil.

Si se observa el hecho de que los usos reportados para los coacervados son principalmente para la fabricación de microcápsulas para contener compuestos de alto valor agregado, que necesitan ser protegidos y que en ocasiones se requiere determinar la manera en la que se liberan los compuestos de interés (Benichou y col. 2007; Turgeon y col. 2007; Zheng Kong y col. 2009). También el hecho de que el único sistema ternario que se ha reportado es el de los polianiones hidroxipropil metil celulosa (HPMC), carboximetil celulosa sódica (NaCMC) y el tensoactivo dodecil sulfato de sodio (SDS) (Katona y col. 2010), aunado a que los esfuerzos se han concentrado en comprender las interacciones entre los componentes de los coacervados desde un punto de vista fisicoquímico (Santinath-Singh y col. 2007; Ganzevles y col. 2006; Aberkane y col. 2010).

Si se toma en cuenta que se ha reportado que mezclas entre goma arábica y goma de mezquite mejoran la estabilidad de las emulsiones debido a la sinergia que forman entre ellas (Vernon-Carter y col. 1996), la intención de este trabajo es evaluar el efecto de dicha

sinergia en la formación electrostática de complejos biopoliméricos insolubles y su repercusión en la estructura de los materiales obtenidos.

Hipótesis

Los coacervados obtenidos a partir de mezclas ternarias de biopolímeros presentan diferentes características que los coacervados obtenidos a partir de mezclas binarias debidas a las interacciones favorables que ocurren entre sus componentes, las cuales influyen en su comportamiento reológico.

Objetivo General

Obtener y caracterizar coacervados complejos obtenidos de mezclas binarias y ternarias de biopolímeros aniónicos [Goma arábica (GA), goma de mezquite (GM)] y catiónicos [quitosano (Q), aislado de proteína de suero de leche (WPI)] a partir de su naturaleza química y sus propiedades reológicas.

Objetivos Particulares

1. Determinar el rango de valores de pH de las dispersiones de quitosano (Q), aislado de proteína de suero de leche (WPI), Goma de mezquite (GM) y goma arábica (GA) en el cual los valores de potencial zeta resulten óptimos para que ocurra una atracción de moléculas mediante fuerzas electrostáticas.
2. Determinar condiciones óptimas para la interacción entre biopolímeros de cargas opuestas basándose en los grupos funcionales ionizables que componen su estructura y a las mezclas de biopolímeros aniónicos.
3. Caracterizar reológicamente coacervados binarios y ternarios con quitosano y WPI como policationes y mezclas de goma arábica y goma de mezquite en distintas proporciones, mediante pruebas de flujo y oscilación.

Materiales y métodos

Materiales

Goma arábica (GA) en lágrimas y sin purificar fue adquirida en Industrias Ragar, S.A. de C.V. (México) y la goma de mezquite (GM) en lágrimas sin purificar fue obtenida de árboles silvestres en el estado de San Luis Potosí (México); quitosano de exoesqueleto de camarón (Q) de peso molecular medio y 75% de grado de desacetilación fue adquirido en Sigma Aldrich Química, S.A. de C.V. (Sigma Aldrich, Islandia). El aislado de proteína de suero de leche marca Bipro con un contenido proteico del 90% (Davisco, Estados Unidos) fue donado por la Universidad Iberoamericana, A.C. Ácido clorhídrico (HCl) grado analítico e hidróxido de sodio (NaOH) en hojuelas grado analítico marca JT. Baker (Xalostoc, México) fueron adquiridos en El Crisol, S.A. de C.V. Se utilizó agua de ultra alta pureza con una resistividad de 18.2 M Ω -cm.

Preparación de soluciones

Soluciones stock. La goma arábica (GA), y la goma de mezquite (GM) fueron disueltas en agua desionizada para preparar una solución 20% p/p y purificadas de acuerdo con el método de Vernon-Carter y col. (1996). Ambas soluciones de goma requirieron purificarse debido a la alta cantidad de impurezas contenidas en las lágrimas de goma dada su procedencia silvestre. Se disolvió quitosano (Q) en una solución 0.1N de ácido clorhídrico, para obtener una solución stock 1% p/p. Por último, se disolvió aislado de proteína de suero de leche (WPI) en agua desionizada para obtener una solución al 10% p/p.

Ventana de interacción de los biopolímeros en función del pH

Se evaluaron las condiciones en las que ocurre una estequiometría entre los valores de potencial zeta de los biopolímeros polianiónicos (soluciones al 5% p/p) y policatiónicos (solución 0.5% p/p de quitosano y 5% p/p de WPI) que forman parte de los coacervados, esto fue a valores de pH entre 3 y 5.5 con intervalos de 0.5.

Se utilizó un equipo marca Malvern modelo Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments. Worchestershire, Reino Unido) con una celda de vidrio marca Daigger (Daigger, Alemania) de 12.5 x 12.5 x 45mm y un electrodo sumergible tipo Dip Cell marca Malvern (Malvern Instruments. Worchestershire, Reino Unido).

Puntos de equivalencia de las dispersiones de biopolímeros: para realizar estas pruebas se utilizó un potenciómetro marca Hanna modelo HI 2550 (Hanna Instruments, Rumania) con un electrodo Hanna modelo HI 1131 (Hanna Instruments, Alemania).

Las soluciones utilizadas Q al 1% p/p en solución de HCl 0.1N, WPI al 10% p/p; para polianiones en mezclas binarias GM, GA y ternarias GM+GA en solución al 20% en agua desionizada.

Para determinar el punto de equivalencia o isoelectrico de los biopolímeros se realizaron curvas de titulación con una solución valorada de NaOH al 0.1N de 30g de solución, tanto de polianiones al 20%, como de la solución de quitosano al 1% y de la solución de WPI al 10% mediante la derivada numérica del pH como función del volumen de NaOH ($\frac{\Delta pH}{\Delta V}$), las relaciones estequiométricas son un cociente del número de equivalentes por gramo del polianión y el número de equivalentes por gramo de polianión.

Formación de coacervados. Basándose en los datos obtenidos previamente, se prepararon mezclas binarias Q:GM Q:GA, WPI:GM, WPI:GA y ternarias Q:GA+GM, WPI:GA+GM en tres niveles (75% GM-25%GA, 50%GM-50%GA y 25%GM-75%GA), se puede ver con más claridad en la tabla 4. La concentración total de biopolímeros de las mezclas se enlista en la tabla 5. Posteriormente dichas mezclas fueron ajustadas al pH óptimo obtenido en la ventana de interacción con soluciones de NaOH y HCl 0.1 N preparadas con agua desionizada a temperatura ambiente. Las soluciones se dejaron reposar en recipientes con tapa en el refrigerador por 24 h a 4°C hasta alcanzar una fase en equilibrio.

Tabla 4. Proporciones de gomas usadas en las mezclas binarias y ternarias de polianiones con quitosano y WPI como polianión

	Polianiones: goma de mezquite (GM) y goma arábica (GA)	Polianiones
Binaria	100% GM-0%GA	Quitosano (Q) ó
	75% GM-25%GA	
Ternarias	50%GM-50%GA	

	25%GM-75%GA	Aislado de proteína de suero de leche (WPI)
Binaria	0% GM-100%GA	

Tabla 5. Concentración total de biopolímeros en las soluciones utilizadas para formar complejos insolubles (%p/p).

Tratamientos	Quitosano	WPI
100%GM-0%GA	6.43	14.6
75%GM-25%GA	7.73	13.81
50%GM-50%GA	7.18	14.1
25%GM-75%GA	7.04	13.81
0%GM-100%GA	6.91	13.81

Cálculo del rendimiento de la coacervación.

Los coacervados, obtenidos mediante las metodologías previamente descritas, con recipientes de peso conocido y constante, fueron preparados por triplicado, decantados y se determinó su peso con una balanza electrónica marca Ohaus modelo Brainweigh B500 (Ohaus, Estados Unidos). Posteriormente se sometieron a un secado en una estufa con control electrónico de temperatura marca Felisa modelo FE (México) a una temperatura constante de 30°C por 48 h. Al final el rendimiento fue calculado de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$R = \frac{m_f}{m_0} \times 100$$

donde m_0 representa el peso inicial de la fase coacervada decantada y m_f el peso de la fase coacervada después del proceso de secado.

Reología. Después de la obtención de coacervados, éstos fueron decantados en todos los tratamientos binarios y ternarios de quitosano y WPI, excepto los tratamientos binarios GM:WPI y GA:WPI, los cuales fueron centrifugados a 6000 RPM a 10°C por 10 min en una centrífuga marca Hermle modelo Z323K (Hermle, Alemania).

Una vez decantados y después de centrifugar y decantar los otros, fueron secados en una estufa con control electrónico de temperatura marca Felisa modelo FE (Felisa, México) a una temperatura constante de 30°C por 48 h. Una vez secos fueron rehidratados en una proporción de agua-coacervado de 3:1, con agua desionizada ajustada al pH óptimo según las ventanas de interacción. Se dejaron reposar para una mejor hidratación por un lapso de una hora en un desecador al vacío, enseguida fueron agitados y se llevaron al reposo por una hora más. Posteriormente se realizaron las pruebas reológicas.

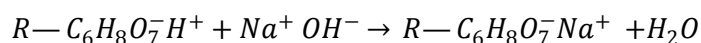
Los parámetros reológicos que fueron determinados a los coacervados consisten en: pruebas de oscilación a una frecuencia constante de 1 Hz en un intervalo de deformación de 6×10^{-3} a 100 % para coacervados de WPI, intervalo de deformación entre 4×10^{-3} y 100% para coacervados de quitosano. Pruebas de frecuencia en un intervalo de 0.01 a 100 Hz para coacervados de quitosano y de 0.1 a 100 Hz para coacervados de WPI, con una amplitud de 1%. Las pruebas de flujo se determinaron realizando pruebas en un intervalo de tasa de corte de 5×10^{-4} a 120 s^{-1} en el caso de los coacervados de quitosano y de 3×10^{-4} a 1100 s^{-1} para coacervados de WPI. Dichas pruebas se ajustaron al modelo de Carreau (1972) para materiales reoadelgazantes, para todos los tratamientos.

Todas las pruebas se realizaron en un reómetro rotacional marca Malvern modelo Kinexus (Malvern Instruments, Worchestershire, Reino Unido) con una geometría de plato de 55mm de diámetro con trampa para solventes y cono de 40mm de diámetro con un ángulo de 4°, 0.15mm de espacio entre geometrías y temperatura controlada de 25°C. Se colocó agua destilada en la trampa de solventes de la geometría inferior. Previo a las mediciones, después de que las muestras fueron colocadas en el reómetro, se dejaron reposar por 5 min para favorecer el equilibrio en su estructura y en la temperatura.

Resultados

Puntos de Equivalencia

Las dispersiones de biopolímeros fueron sometidas a una titulación potenciométrica y el valor inicial de pH para cada una se muestra en la tabla 6. En el caso de los biopolímeros aniónicos, se usó la solución valorada de NaOH para obtener su punto de equivalencia dado el carácter de ácido débil de las gomas en solución (Orozco-Villafuerte y col. 2003; Badreldin, 2009), el ion hidróxido reaccionará con los protones disociados por el polianión y el ion sodio reaccionará con los grupos carboxilo de las moléculas de glucuronato, como se observa en la siguiente ecuación:



El pH inicial de esas dispersiones está acotado en el intervalo de pH 3-4 y el punto de equivalencia se encuentra en el intervalo de pH 7-8, de acuerdo con la serie de figuras 22 a la 26 del anexo 2.

Para poder determinar la cantidad de grupos funcionales que pueden reaccionar en la solución de biopolímeros, se realizó una relación de los miliequivalentes necesarios para titular una porción másica de biopolímeros en solución.

Se anexan las curvas de titulación, en las figuras 22 a la 28 que se encuentran en el anexo 2, en las que se ha determinado que para alcanzar la equivalencia en las mezclas de gomas se necesitan aproximadamente entre 9 y 10 ml de una solución valorada de NaOH 0.1N, para el quitosano 28.5 ml de NaOH sin restar los equivalentes del ácido usado para disolverlo y para el WPI 18.5ml. En este caso se ha determinado, cuantitativamente de acuerdo con la tabla 7, los equivalentes necesarios para cada mezcla de biopolímeros.

Cabe destacar que las relaciones más bajas son las del coacervado binario de GM:Q/WPI con 3:1 y 5:1 respectivamente y el ternario 50%GM-50%GA:Q/WPI con 3.6:1 y 5:1 respectivamente, las cuales sugieren que ambas mezclas binarias y ternarias tienen más polianiones para reaccionar. Con esos equivalentes obtenidos, se determinó una relación estequiométrica para polielectrolitos de cargas opuestas que se muestran en la tabla 8, necesarios para la formación de los coacervados.

Tabla 6. pH inicial de las dispersiones de biopolímeros

Solución	pH
GM	3.73
75%GM-25%GA	3.54
50%GM-50%GA	3.42
25%GM-75%GA	3.58
GA	3.57
Q	4.99
WPI	2.98

Tabla 7. Miliequivalentes por gramo de biopolímero, tanto para dispersiones de polianiones en singular o en mezcla y para policationes.

Biopolímero	mEq/g
GM	0.0873
GA	0.0629
75% GM - 25% GA	0.0629
50% GM - 50% GA	0.0707
25% GM – 75% GA	0.0628
Q	0.3140
WPI	0.2515

Tabla 8. Relaciones estequiométricas para las mezclas de biopolímeros de carga negativa con los biopolímeros de carga positiva.

	WPI	Quitosano
GM →	3:1	5:1
75%GM-25%GA	4:1	6:1
50%GM-50%GA	3.6:1	5:1
25%GM-25%GA	4:1	6:1
GA	4:1	6:1

Ventana de interacción

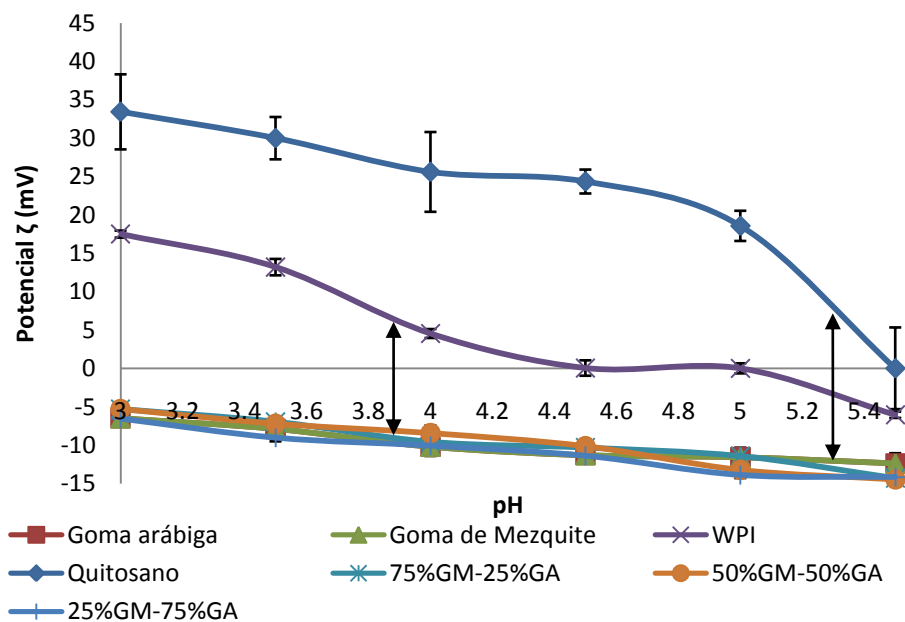


Figura 9. Ventana de interacción para biopolímeros de carga negativa (GM y GA) y biopolímeros de carga positiva (Q y WPI). Las región de estequiometría de cargas para GM+GA-WPI es de pH 3.8 y la región para GM+GA-Q es de pH 5.3.

La importancia de obtener información acerca de las cargas parciales de los biopolímeros en un intervalo de pH dado radica en poder determinar el punto en el que ocurre una equivalencia en el valor de las cargas opuestas de los biopolímeros que participan en la coacervación. Se necesita que los biopolímeros que participan en la formación de este tipo de complejos sean electrostáticamente neutros para que sean insolubles, por lo que una manera precisa de determinarlo es mediante el parámetro de potencial zeta, que se entiende de esta manera: la capa de líquido que rodea la partícula con una carga dada existe en dos etapas: una región interna donde los iones están unidos de manera muy fuerte a la partícula y una región externa donde hay iones que están asociados de una manera menos rigurosa (difusa).

Dentro de la región difusa hay un límite imaginario en el que los iones y las partículas forman una entidad estable. Cuando una partícula se mueve (por ejemplo, debido a la gravedad) los iones dentro del límite imaginario se mueven también. Los iones que se encuentran más allá de ese límite se quedan en la fase continua de la solución. El potencial en dicho límite hipotético (superficie de cizallamiento hidrodinámico) se le conoce como potencial zeta (Hunter y col. 1988).

En el caso de la figura 9, se busca un valor de pH en el que ocurra una interacción adecuada entre los polianiones que son la goma de mezquite, goma arábica y sus respectivas mezclas con los policationes que son el quitosano y la proteína de suero de leche. Los iones agregados a las soluciones de biopolímeros para ajustar el pH van a interactuar de tal manera que van a influir en el valor de potencial zeta, por lo que, basados en los datos obtenidos. Se ha determinado que para los coacervados binarios de mezclas de gomas y proteína el pH óptimo es de 3.9, con un potencial zeta de 8 y -8 mV respectivamente, mientras que para los coacervados binarios y ternarios con las mismas condiciones de mezclas de goma pero con quitosano como polication, el pH óptimo para obtener una neutralidad de cargas es 5.3 con un potencial zeta de 10 y -10 mV respectivamente.

Rendimiento de coacervación

En la figura 10 se muestra el rendimiento de la formación de coacervados para tratamientos con quitosano como policación y en la figura 11 es el rendimiento para tratamientos con WPI como policación. Se puede observar el hecho de que los rendimientos más altos son los que se relacionan con los coacervados binarios con goma de mezquite en ambos politaciones (superiores al 70%), seguidos por el tratamiento binario de goma arábica para ambos politaciones (cerca al 50% en quitosano y superior al 50% en WPI).

Los demás tratamientos ternarios tienen un comportamiento similar, superior al 40% con los de quitosano y superiores al 60% con los de WPI. El tratamiento con el rendimiento más bajo es el coacervado ternario 75%GM-25%GA tanto para quitosano (30%) como para WPI (40%). Los rendimientos no son tan altos para algunos de los tratamientos evaluados como se han encontrado reportados en la literatura, con valores superiores al 80% (Devi y col. 2010; Alavi Talahab y col. 2010; Jiménez-Alvarado y col. 2009) cuyo caso es el del coacervado binario GM:WPI. Algunas cuestiones favorables o desfavorables respecto a la interacción de los componentes de los coacervados se pueden explicar con respecto al comportamiento polielectrolítico de las macromoléculas en solución. Al estar muy diluida la solución, las macromoléculas iónicas tienden a cambiar su estructura para replegarse al no haber manera de que sus grupos funcionales con carga interactúen. En cambio, si se tiene una solución concentrada, en el comportamiento de los poliones se tiende a una estructura recta y rígida que expone a los grupos funcionales debido a la repulsión entre las cargas (Pasika, 1977; Tolstoguzov, 2003).

En el momento en el que se favorece la interacción de polímeros de cargas opuestas, la conformación de dichos polímeros cambia de tal manera que la interacción de sus grupos funcionales sea la más adecuada. Al cambiar la conformación, se ocultarán grupos en la matriz de los coacervados, lo que logrará que no sean disponibles para interactuar con otros, limitando de cierta manera el concepto de equivalentes para formar las relaciones estequiométricas, si se toma en cuenta que el ion hidróxido tiene mucha más probabilidad de interactuar con los grupos funcionales de biomoléculas de este tipo. Incluso una diferencia notable entre la goma de mezquite y la goma arábica es el peso molecular, siendo mayor en la de mezquite (~2,120,000 Da) que en la arábica ($\leq 1,000,000$ Da) (Vernon-Carter y col. 2006; Jimenez-Alvarado y col. 2009). Dicha diferencia sugiere una posibilidad mayor en la goma arábica para interactuar iónicamente con los politaciones que la goma de mezquite,

aunque la goma de mezquite tiene la posibilidad de interactuar de maneras no iónicas debido a su tamaño y sus monómeros.

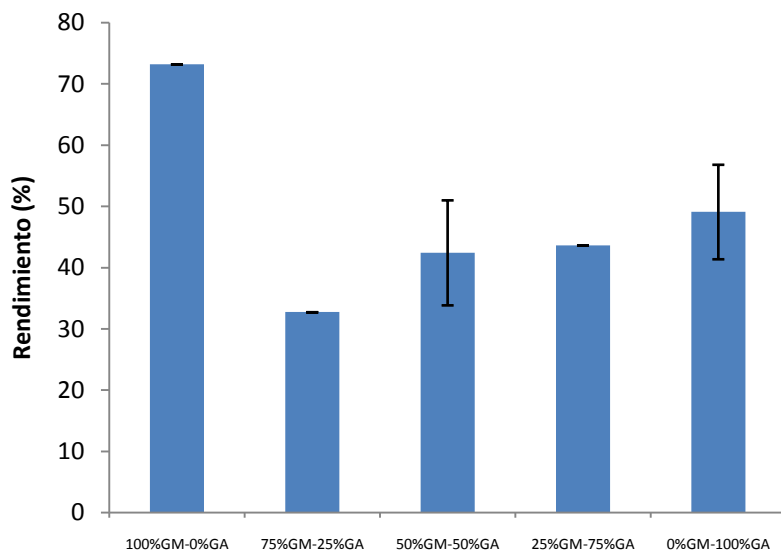


Figura 10. Rendimiento de coacervación en tratamientos binarios y ternarios con quitosano como policación

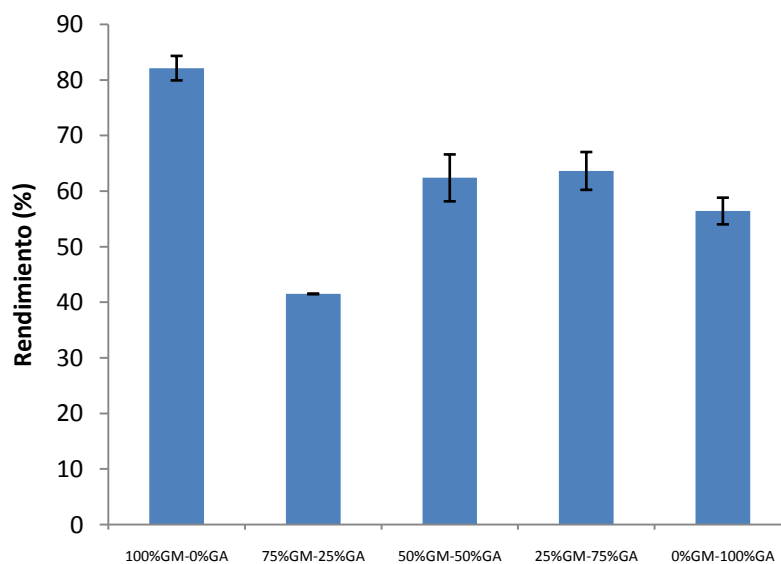


Figura 11. Rendimiento de coacervación para tratamientos binarios y ternarios con WPI como policación.

Análisis de la metodología de las pruebas reológicas de coacervados

Para el estudio reológico de todos los tratamientos de coacervados binarios y ternarios, se decidió estandarizar el contenido de humedad en las muestras analizadas, debido a que el grado de hidratación provoca problemas en la reproducibilidad de los experimentos de acuerdo con pruebas realizadas previamente. Por lo tanto, al secar los coacervados obtenidos y después hidratarlos en una proporción de humedad controlada se mejoran las condiciones en las que se llevan a cabo las mediciones reológicas.

En el caso de la centrifugación de las mezclas binarias de coacervados con WPI como polificación, fue realizada para favorecer la precipitación de los complejos debido al tiempo prolongado que se requiere (~10 días), a diferencia de las mezclas ternarias de polianiones y WPI que precipitaron en un lapso menor a 24 horas.

Existen factores en estas mezclas binarias que dificultan la agregación entre complejos formados. Están relacionadas con las interacciones iónicas, como la distribución no uniforme de las cargas en la proteína y la disminución de la movilidad de la molécula debida a la unión iónica (Turgeon y col. 2007). En ese aspecto, existe la posibilidad de que algunos grupos iónicos no puedan reaccionar debido al impedimento estérico de las cadenas poliméricas y que ese factor evite la insolubilidad de los complejos.

Existen otro tipo de interacciones no iónicas, como los puentes de hidrógeno que contribuyen a que el complejo interactúe con el agua y también se le pueden atribuir a esos factores la dificultad para la precipitación de dichos complejos binarios.

Reología de coacervados binarios y ternarios con quitosano como polificación

Teniendo las pruebas oscilatorias de los coacervados en la figura 12 y 13, en las que se exhibe el comportamiento de los módulos elásticos y viscosos de cada tratamiento, se puede observar tanto en tratamientos binarios como en ternarios la predominancia del carácter viscoso. Este efecto es debido a que las curvas que describen el módulo elástico presentan valores menores que las que describen el módulo viscoso en el momento que la estructura

se encuentra formada, descrita en la región viscoelástica lineal. En todos los tratamientos el valor del módulo elástico G' presenta una dependencia a la deformación mucho más grande que la que presenta el módulo viscoso G'' , como prueba de que su capacidad para disipar la energía aplicada es mayor que para almacenarla.

Para los tratamientos 100%GM-0%GA y 75%GM-25%GA dicha región viscoelástica lineal se encuentra entre 0.1 y 0.3 %. Para los demás tratamientos, que consisten en dos coacervados ternarios y uno binario con goma arábica como polianión, el comportamiento resulta similar entre ellos y la región viscoelástica lineal se encuentra entre 1 y 10% de deformación.

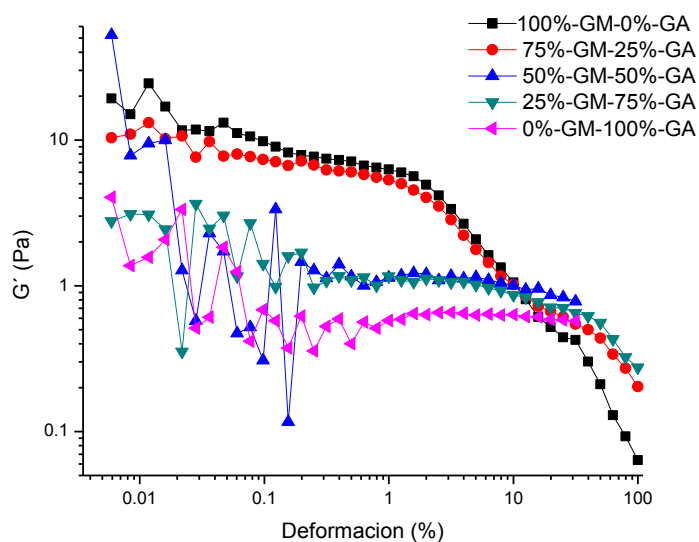


Figura 12. Módulo elástico o de almacenamiento en función de la deformación para coacervados binarios y ternarios con quitosano como policación.

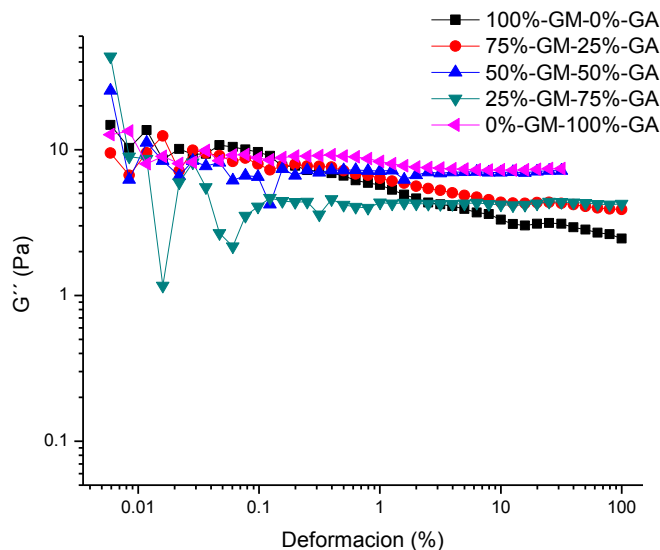


Figura 13. Módulo viscoso o de pérdida en función de la deformación para cocervados binarios y ternarios con quitosano como polielectrolito.

Para los cocervados binarios y ternarios con quitosano como polielectrolito, en el caso de los análisis de frecuencia descritos en las figuras 14 y 15, se ha determinado que el intervalo en el que se intersectan los módulos elásticos y viscosos de todos los tratamientos se encuentra entre 50 y 100 Hz. No existe una diferencia importante en los valores de los módulos elásticos y viscosos de los tratamientos. Sin embargo, tomando en cuenta que en esta prueba, también los valores del módulo viscoso en estos tratamientos son mayores a los del módulo elástico, corroborando la predominancia del carácter líquido. Se puede observar el hecho de que los valores del módulo elástico (G') presentan un cambio considerable, los cuales sugieren dependencia a la frecuencia. A los materiales con dichas características se les conoce como geles débiles, en los cuales ocurre un proceso de relajación del material cuando se somete a esfuerzos y deformaciones, debido a que las interacciones débiles entre las moléculas que los forman no pueden mantener su estructura original (Michon y col, 2004).

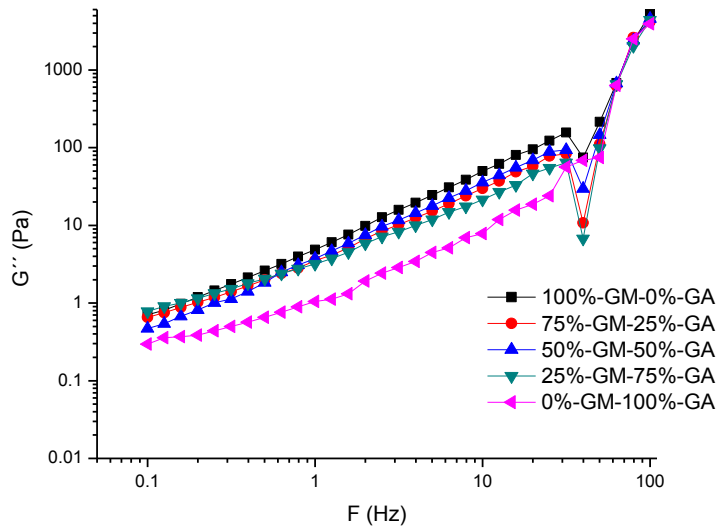


Figura 14. Módulo viscoso o de pérdida en función de la frecuencia para coacervados binarios y ternarios con quitosano como polición.

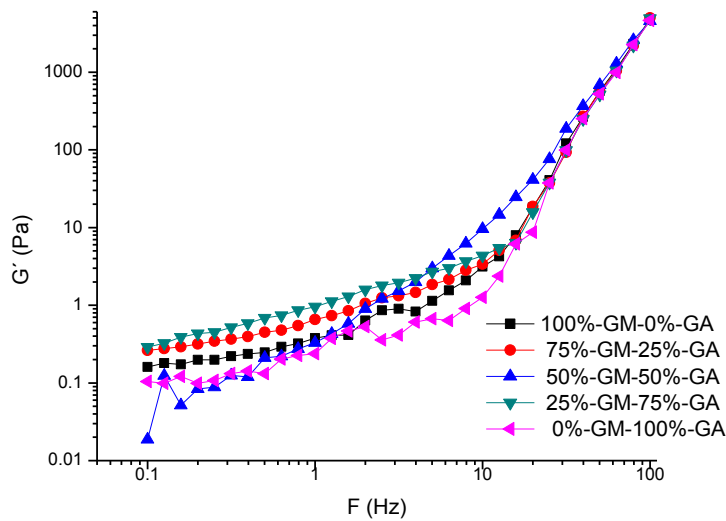


Figura 15. Módulo elástico o de almacenamiento en función de la frecuencia para coacervados binarios y ternarios con quitosano como polición.

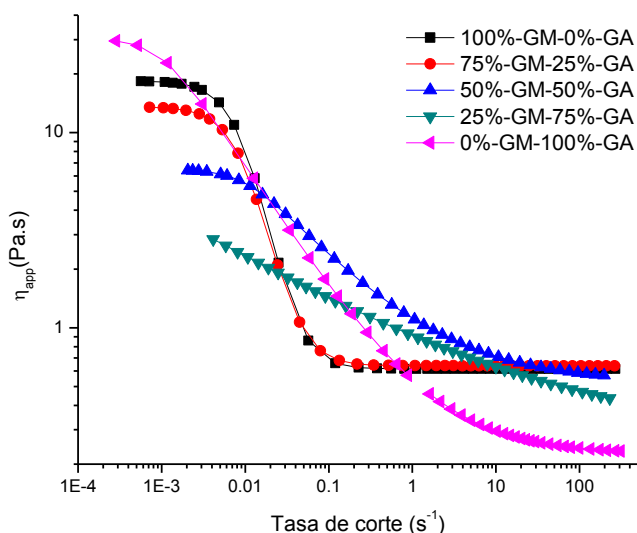


Figura 16. Curva de flujo para coacervados binarios y ternarios de mezclas de gomas con quitosano como policación

Tabla 9. Parámetros obtenidos del modelo de Carreau para coacervados binarios y ternarios con quitosano como policación

	100%GM- 0%GA	75%GM- 25%GA	50%GM- 50%GA	25%GM- 75%GA	0%GM- 100%GA
η_{∞}	0.615	0.639	0.527	0.4	0.210
η_0	18.413	13.549	6.476	4.160	31.211
λ_c	101.999	101.995	101.999	1212.994	4868.589
N	1.208	1.105	0.249	0.127	0.402
R²	0.976	0.963	0.993	0.987	0.999

Se puede apreciar en la figura 16 una colección de curvas que describen el comportamiento de los coacervados binarios y ternarios con quitosano como policación. Se observa similitud entre los tratamientos binarios y ternarios en el hecho que tienen comportamiento reoadelgazante, pero sin percibirse una ventaja de las mezclas ternarias sobre las binarias. Respecto a la viscosidad inicial (η_0), en la tabla 9 se observa que los valores resultan más altos en los coacervados binarios que en los ternarios, especialmente en el coacervado 0%GM-100%GA. Las curvas características de estos tratamientos presentan un coeficiente de correlación R^2 entre 0.963 y 0.999 respecto al ajuste al modelo de Carreau.

Dados los resultados reológicos de los tratamientos de quitosano como policación, no se observan efectos de la sinergia entre las gomas.

Reología de coacervados binarios y ternarios con WPI como policación

Para los tratamientos de mezclas de soluciones de gomas con WPI como policación, como se observa en las figuras 17 y 18, en las pruebas de deformación se observa que los coacervados binarios tienen un comportamiento distinto a los coacervados ternarios. Se observa el hecho de que el comportamiento entre coacervados ternarios es distinto a los coacervados binarios, hecho que sugiere una interacción muy estrecha entre los tres componentes. Dicha interacción implica una estructura más favorable del complejo no sólo para la separación de fases de los biopolímeros en solución, sino para el comportamiento reológico.

La región viscoelástica lineal de los tratamientos se encuentra en un intervalo de deformación entre 0.1 y 0.3%, en el caso de los tratamientos binarios dicha región termina en 0.2%, cuando ocurre el decaimiento del módulo elástico. Cabe mencionar el hecho de que los valores de los módulos elásticos (G') en los tratamientos binarios 100%GM-0%GA y 0%GM-100%GA son más altos que los correspondientes a los módulos viscosos (G''), implica un comportamiento más apegado a un sólido que a un líquido.

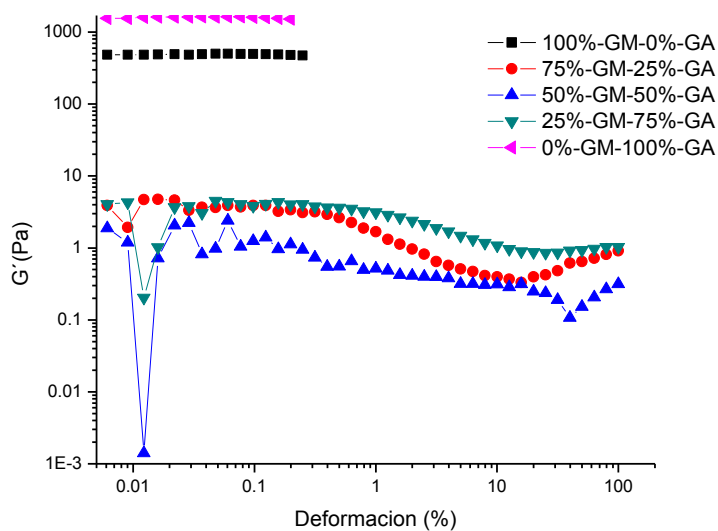


Figura 17. Módulo elástico o de almacenamiento en función de la deformación para coacervados binarios y ternarios con WPI como politación.

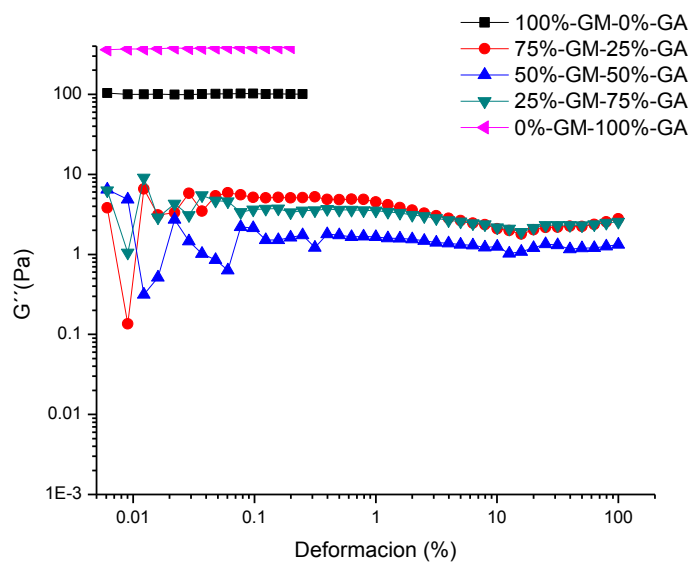


Figura 18. Módulo viscoso o de pérdida en función de la deformación para coacervados binarios y ternarios con WPI como politación.

En los análisis de frecuencia para coacervados binarios y ternarios con WPI como politación, descritos en las figuras 19 y 20, el punto de intersección se encuentra entre 50 y 100 Hz. En

este caso, también el módulo viscoso (G'') de estos tratamientos ternarios, comparado con los tratamientos de quitosano, tiene valores más altos que los del módulo elástico (G'), lo que resalta el hecho de sus características líquidas.

También se consideran geles débiles debido a que no pueden mantener su estructura al ser sometidos a deformaciones. La utilidad de dichos geles débiles reside en la capacidad de formar redes con la fuerza suficiente para prevenir la sedimentación de partículas sin bloquear el flujo del producto (Rao, 1999), en el caso de usarse como estabilizante en alguna dispersión tanto alimenticia, farmacéutica o de otro uso industrial.

En el caso de coacervados binarios, el valor del módulo elástico predomina sobre el valor del módulo viscoso, a diferencia de los demás tratamientos, hecho que se puede observar también en las pruebas de deformación.

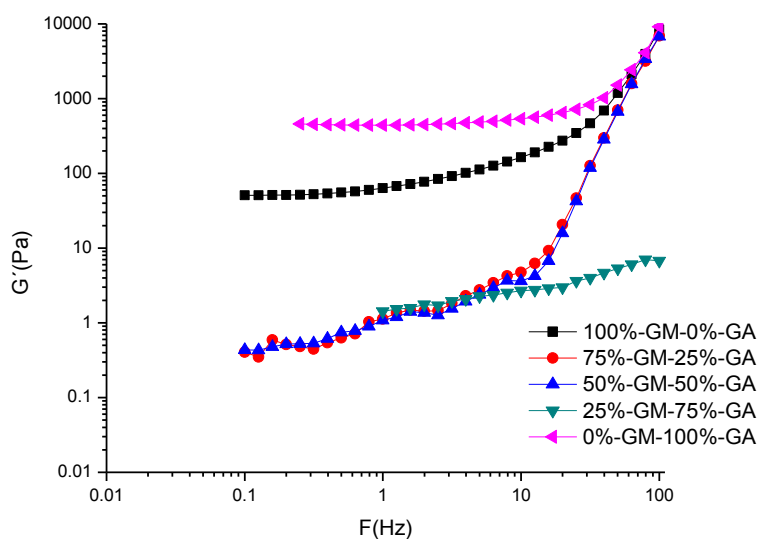


Figura 19. Módulo elástico o de almacenamiento en función de la frecuencia para coacervados binarios y ternarios con WPI como policación.

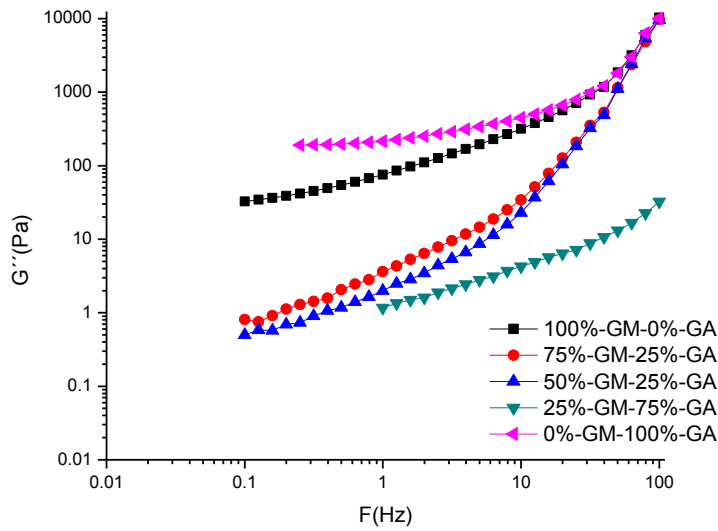


Figura 20 Módulo viscoso o de pérdida en función de la frecuencia para coacervados binarios y ternarios con quitosano como polificación.

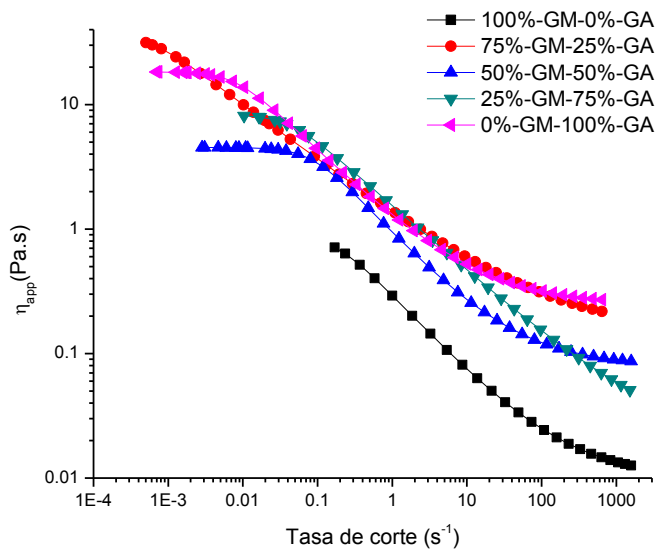


Figura 21. Curvas de flujo para coacervados binarios y ternarios de mezclas de gomas con WPI como polificación

Tabla 10. Parámetros obtenidos del modelo de Carreau para coacervados binarios y ternarios con WPI como policación

	100%GM- 0%GA	75%GM- 25%GA	50%GM- 50%GA	25%GM- 75%GA	0%GM- 100%GA
η_{∞}	0.01	0.150	0.080	0.0194	0.247
η_0	0.877	35.616	4.517	8.266	18.329
λ_c	5.705	1710.138	12.023	24.177	125.740
N	0.320	0.225	0.328	0.267	0.293
R²	0.999	0.996	0.973	0.988	0.966

En el caso de los coacervados binarios y ternarios con WPI como policación, se ha encontrado también un comportamiento reoadelgazante en todos los tratamientos (Véase la figura 21). Respecto al ajuste de los resultados al modelo de Carreau, el coeficiente de correlación R^2 de los tratamientos resulta alto, con valores de 0.966 a 0.999 de acuerdo con la tabla 10. En el caso del coacervado binario 100%GM-0%GA, su viscosidad inicial es más baja que en los demás tratamientos (0.877 Pa.s). No se observa evidencia de sinergia entre las mezclas de gomas, ya que el comportamiento reoadelgazante de los coacervados no difiere de manera importante en los tratamientos.

Una gran limitante que se ha encontrado en este trabajo respecto a los modelos matemáticos de ajuste de materiales reoadelgazantes, es la capacidad para poder describir el comportamiento del material a tasas de corte bajas. Este limitante es debida a que los datos obtenidos en la zona de tasa de corte en la que ocurre el rearrreglo molecular previo a la zona de viscosidad newtoniana, afectan considerablemente la explicabilidad del modelo matemático. Este efecto fue observado también por Weinbreck y Wientjes (2004).

Conclusiones

- Se encontraron las condiciones, tanto de pH óptimo como de las relaciones estequiométricas para que se lleve a cabo la coacervación compleja de tratamientos binarios y ternarios tanto de quitosano y WPI como policationes.
- El rendimiento de coacervación fue mayor con los tratamientos binarios de quitosano (74%) y de WPI (82%). El rendimiento más bajo fue el de los coacervados ternarios 75%GM-25%GA:Q (32%) y 75%GM-25%GA:WPI (40%), dichos valores se atribuyen a las interacciones de los biopolímeros en solución, a su conformación y a su peso molecular.
- Los coacervados binarios y ternarios de los tratamientos con quitosano como policación y los coacervados ternarios de WPI como policación presentaron características predominantemente viscosas y comportamiento de gel débil. Los coacervados binarios de WPI como policación presentaron características predominantemente elásticas y comportamiento de gel débil también.
- Todos los tratamientos presentaron un carácter reoadelgazante, ajustándose al modelo de Carreau con altos coeficientes de correlación.
- No se observa evidencia de sinergia entre GA y GM tanto en tratamientos binarios y ternarios de Quitosano y WPI como policación.

Perspectivas

- El fenómeno de la coacervación requiere de estudios de las interacciones entre biopolímeros mediante calorimetría de titulación isotérmica para obtener parámetros termodinámicos que describan mejor la formación de complejos.
- Por el costo bajo que representa utilizar WPI como materia prima, los coacervados obtenidos a partir de esta polimerización tienen potencial de utilizarse como estabilizantes y como matriz para contener compuestos de alto valor agregado en formulaciones alimenticias. Los coacervados con quitosano como polimerización pueden aplicarse como estabilizante y como matriz contenedora de compuestos de alto valor agregado en formulaciones para el cuidado de la salud.

Referencias

Aberkane, L. Jasniewski, J. Gaiani, C. Scher, J. Sanchez, C. "Thermodynamic characterization of acacia gum- β -Lactoglobulin complex coacervation" Langmuir **26** (15), 12523-12533

Alavi Talab, H. Ardjmand, M. Motallebi A.A. Pourgholan, R. (2010) "Optimization of morphology and geometry of encapsulated *Hyphophthalmichtys molitrix oil*" Iranian Journal of Fisheries Sciences **9**(2): 199-208

Ali, B.H. Ziada, A. Blunden, G (2009). "Biological effects of gum arabic: A review of some recent research" Food and Chemical Toxicology **47**(1): 1-8.

Anderson, D. Howlett, J. McNab, C. (1985) "The amino acid composition of gum exudates from *Prosopis* species" Phytochemistry, **24** (11): 2718-2720

Badreldin, H.A. (2009) "Biological effects of gum arabic: a review of some recent research" Food and Chemical Toxicology, **47**(1):1-8

Bungenberg de Jong, H.G. Kruyt, H.R. (1929) "Coacervation" (partial miscibility in colloid systems), Proc. K. Ned. Akad. Wet. **32**:849–856.

Benichou, A. Aserin, A. Garti, N. (2007) "W/O/W double emulsions stabilized with WPI-polysaccharide complexes" Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects **294**:20-32

Carreau, P.J. (1972) "Rheological equations from molecular network theories" Transactions of the society of Rheology **16**:99-127

de Kruif, C.G. Weinbreck, F. de Vries, R. (2004) "Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides" Current Opinion in Colloid & Interface Science, **9**(5) 340-349

Devi, N. Kumar Maji, T. (2010) "Genipin crosslinked microcapsules of gelatin A and k-carrageenan polyelectrolyte complex for encapsulation of Neem (*Azadirachta Indica A. Juss.*) seed oil" Polymer Bulletin **65**:347-362

Espinosa-Andrews, H. Báez-González, JG; Cruz-Sosa, F, Vernon-Carter, EJ (2007). "Gum Arabic-chitosan complex coacervation " Biomacromolecules **8**(4): 1313-1318.

Ganzevles, R.A. Zinoviadou, K. Vliet, T. Cohen-Stuart, M.A. de Jongh, H.J. (2006) "Modulating surface rheology by electrostatic protein/polysaccharide interactions" Langmuir **22**:10089-10096

Hunter, R.J. (1988) "Zeta potential in colloid Science: Principles and Applications", Academic Press, U.K.

Illum, L. (1998) "Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient" Pharmaceutical Research **15**(9):1326-1330

Jimenez-Alvarado, R. Beristain, C.I. Medina-Torres, L. Román-Guerrero, A. Vernon-Carter, E.J. (2009) "Ferrous bisglycinate content and release un W1/O/W2 multiple emulsions stabilized by protein-polysaccharide complexes" Food Hydrocolloids **23**(8): 2425-2433

Katona, J.M. Sovilj, V.J. Petrovic, L.B. and Mucic, N.Z. (2010) "Tensiometric investigation of the interaction and phase separation in a polymer mixture-ionic surfactant ternary system" Journal of Serbian Chemical Society **75**(6) 823-831

Malvern Instruments (2011) "Zeta potential: an introduction in 30 minutes. Technical note ". Worchestershire, Reino Unido. 1-6

Mathews, C.K. Van Holde, K.E. Ahern, K.G. (2003) "Bioquímica" Prentice Hall Press, Madrid, España 1213-1214

McClements, D. J. (1999). Food Emulsions: Principles, practice and techniques. Boca Raton, FL, CRC Press.

Mekhloufi, G., Sanchez, C, Renard, D, Guillemin, S (2005). "pH-induced structural transitions during complexation and coacervation of beta-lactoglobulin and acacia gum." Langmuir **21**(1): 386-394.

Michon, C. Chapuis, C. Langendorff, V. Boulenguer, P. Cuvelier, G. (2004) "Strain-hardening properties of physical weak gels of biopolymers" Food hydrocolloids **18**(6): 999-1005

Oliveira, A.C. Moretti, T.S. Boschini, C. Baliero, J.C.C. Freitas, L.A.P., Freitas, O. and Favaro-Trinidade, C.S. (2007) "Microencapsulation of *B. lactis* (BI 01) and *L. acidophilus* (LAC4) by complex coacervation followed by spouted-bed drying" Drying Technology, **25**(10): 1687-1693

Orozco-Villafuerte, J. Cruz-Sosa, F. Ponce-Alquicira, E. Vernon-Carter, E.J. (2003) "Mesquite gum: fractionation and characterization of the gum exuded from *Prosopis laevigata* obtained from plant tissue culture and from wild trees" Carbohydrate Polymers **54**(3): 327-333

Pal, R. (2005) "Rheology of high internal phase ratio emulsions" Food Hydrocolloids **20**:997-1005

Pasika, W.M. (1977) "Polysaccharide Electrolytes". *Extracellular microbial polysaccharides*, ACS Symposium Series, Washington, DC, **45**:128–159.

Pérez-Alonso, C. Baez.-Gonzalez, J. G. Beristain, C.I. Vernon-Carter, E.J. Vizcarra-Mendoza, M.G. (2003). "Estimation of the activation energy of carbohydrate polymers blends as selection criteria for their use as wall material for spray-dried microcapsules." Carbohydrate Polymers **53**:197–203.

Philips, G.O. Williams P.A. (2000) "Handbook of Hydrocolloids" Boca Raton, FL. CRC press, 189-217

Rao, M.A. "Rheology of Fluid and Semisolid Foods: Principles and Applications" Aspen Publishers, Inc. Maryland, 1999

Ravi-Kumar, M. N. V. (2000). "A review of chitin and chitosan applications." Reactive and Functional Polymers **46**(1): 1-27.

Román-Guerrero, A., Pérez-Orozco, J.P. Cruz-Sosa, F. Jiménez-Alvarado, R. Vernon-Carter, E.J. (2009). "Application and evaluation of mesquite gum and its fractions as interfacial film formers and emulsifiers of orange peel-oil." Food Hydrocolloids **23**(3): 708-713.

Santinath Singh, S. Bohidar, H.B. Bandyopadhyay (2007) "Study of gelatin-agar intermolecular aggregates in the supernatant of its coacervate" Colloids and Surfaces B: Biointerfaces **57** (2007) 29-36

Schmitt, C., & Turgeon, S. L. (2010). Protein/Polysaccharide complexes and coacervates in food systems. *Advances in colloid and Interface Science* En Prensa, disponible electrónicamente.

Scholten, E. T., R; Tromp, RH; Lekkerkerker, HNW. (2002). "Interfacial tension of a decomposed biopolymer mixture " Langmuir **18**(6): 2234-2238.

Semenova, M. G. (2007). "Thermodynamic analysis of the impact of molecular interactions on the functionality of food biopolymers in solution and in colloidal systems". Food Hydrocolloids, **21**: 23-45.

Smoluchowski, M. (1906), "Zur kinetischen Theorie der Brownschen Molekularbewegung und der Suspensionen", Annalen der Physik **21**: 756–780

Steffe, J. (1996) "Rheological Methods in Food Process Engineering" Freeman Press, Michigan. 312-338

Sze, A. Erickson, D. Liqing, R. Li, D. (2003) "Zeta potential measurement using the Smoluchowski equation and the slope of the current-time relationship in electroosmotic flow" Journal of colloid and interface science **261**:402-410

Tiebackx, F. W. (1911). "Gleichzeitige Ausflockung zweier Kolloide" Colloid & Polymer Science **8**(4): 198-201.

Tolstoguzov, V. (2003). "Some thermodynamic considerations in food formulation" Food Hydrocolloids, **17**: 1–23.

Turgeon, S.L. Schmitt, C., Sanchez C. (1997) "Protein-Polysaccharide complexes and coacervates" Current Opinion in Colloid & Interface Science **12**:166-178

Vernon-Carter, E. J., Gómez, S. A., Beristain, C. I., Mosqueira, G., Pedroza-Islas, R., & Moreno-Terrazas, R. C. (1996). "Color degradation and coalescence kinetics of Aztec marigold oleoresin-in-water emulsions stabilized by mesquite or arabic gums and their blends." Journal of Texture Studies **27**: 625-641.

Weinbreck, F. Wientjies, R.H.W. (2004) "Rheological properties of whey protein/gum arabic coacervates" Journal of rheology **48**(6):1215-1228

Ya Malkin, A. (1994) "Rheology Fundamentals" ChemTec Publishing, p 63

Zheng-Kong, X. Xiangling, G. Zhu, X. (2009) "Spreadable dispersion of insect sex pheromone capsules, preparation, via complex coacervation and release control of encapsulated pheromone component molecule" Biomedical Microdevices **11**:275-285

Anexo 1. Unidades utilizadas para los parámetros reológicos básicos.

Parámetro	Unidades
Esfuerzo de corte (τ)	$\text{N} \cdot \text{m}^{-2} = \text{Pa}$
Tasa de corte ($\dot{\gamma}$)	s^{-1}
Viscosidad (η)	$1 \text{ Pa} \cdot \text{s} = 10 \text{ P}$
Módulo elástico (G')	Pa
Módulo viscoso (G'')	Pa
Ángulo de fase (δ)	rad

Anexo 2. Curvas de titulación para Biopolímeros polianiónicos y policatiónicos.

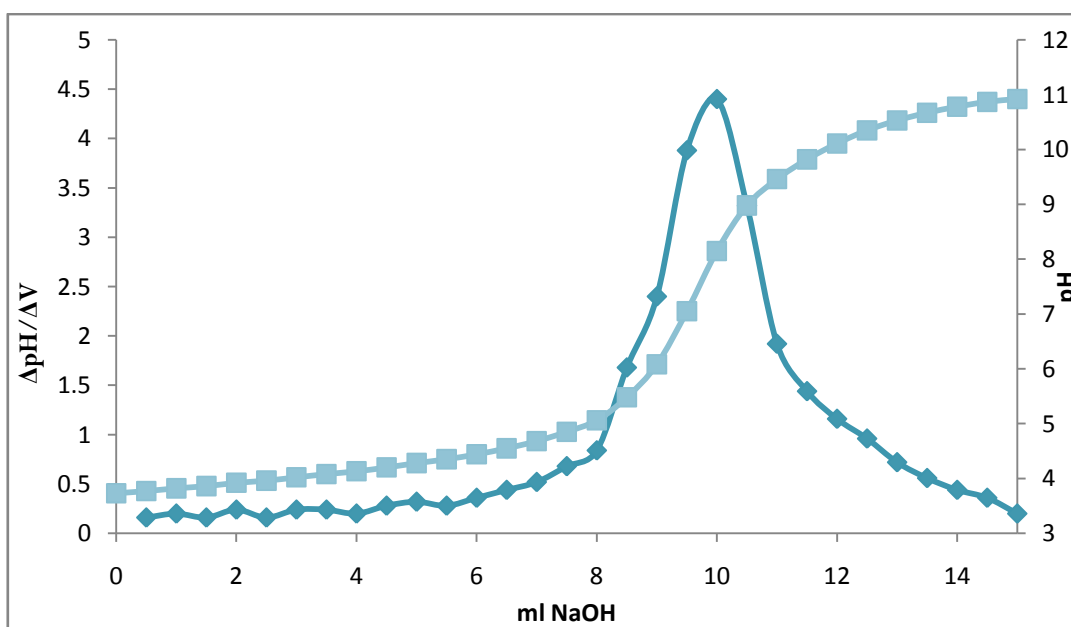


Figura 22. Curva de titulación y punto de equivalencia para la solución de goma de mezquite.

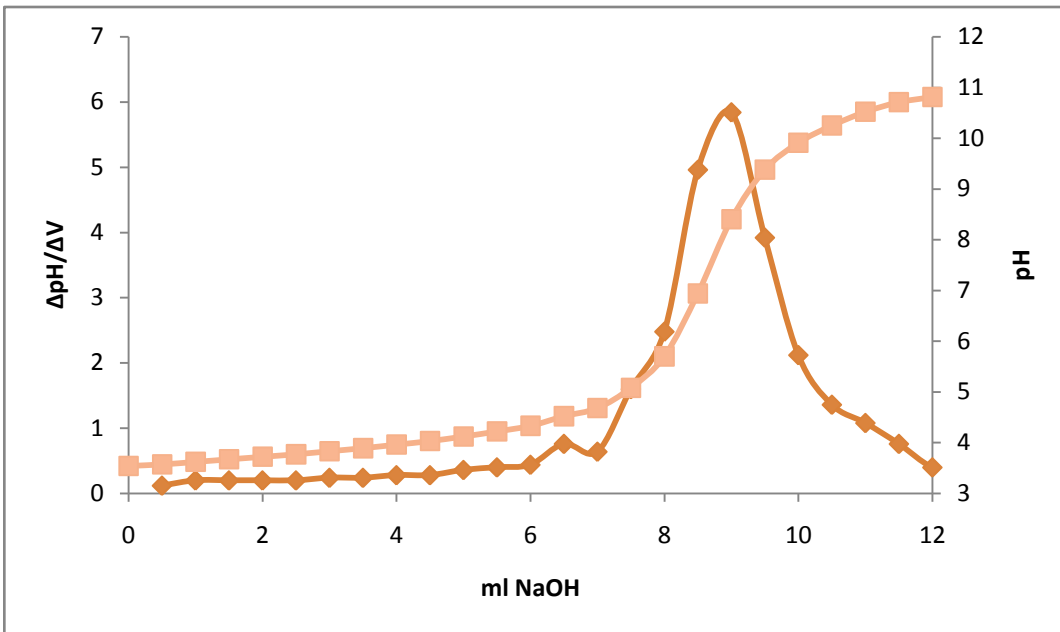


Figura 23. Curva de titulación y punto de equivalencia para la solución de goma arábica.

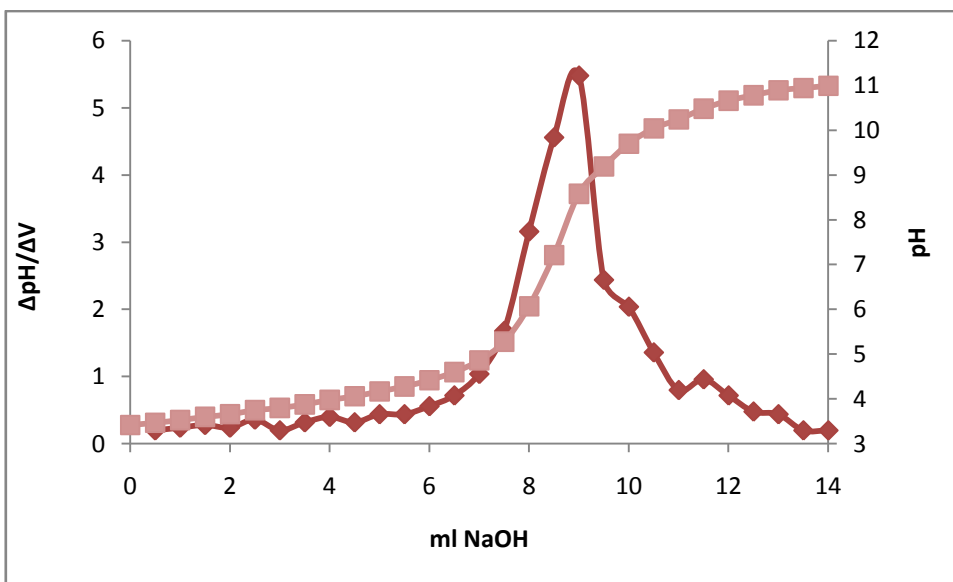


Figura 24. Curva de titulación y punto de equivalencia para la solución 75% GM-25% GA.

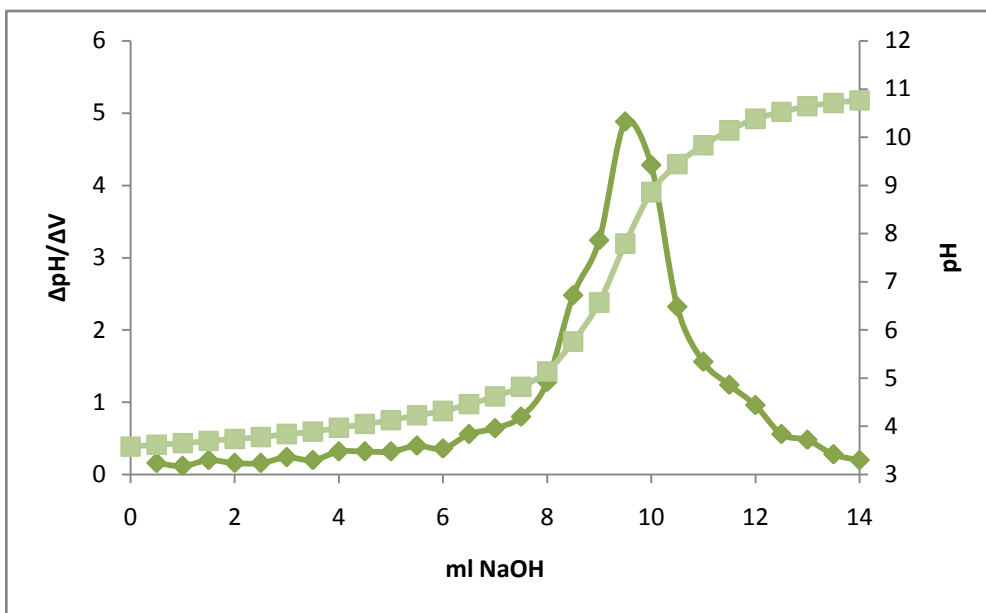


Figura 25. Curva de titulación y punto de equivalencia para la solución 50% GM-50%GA.

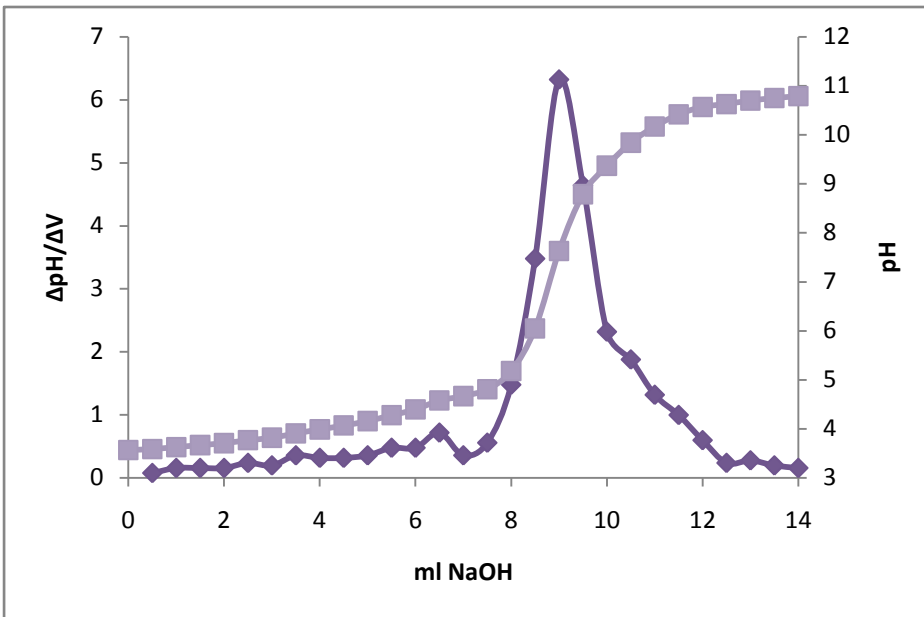


Figura 26. Curva de titulación y punto de equivalencia para la solución 25%GM-75%GA.

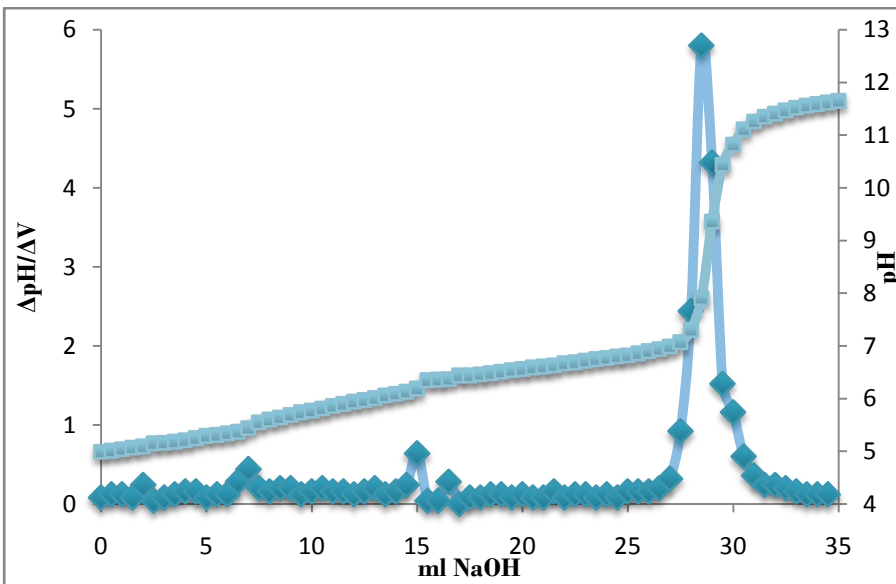


Figura 27. Curva de titulación y punto de equivalencia para la solución de quitosano.

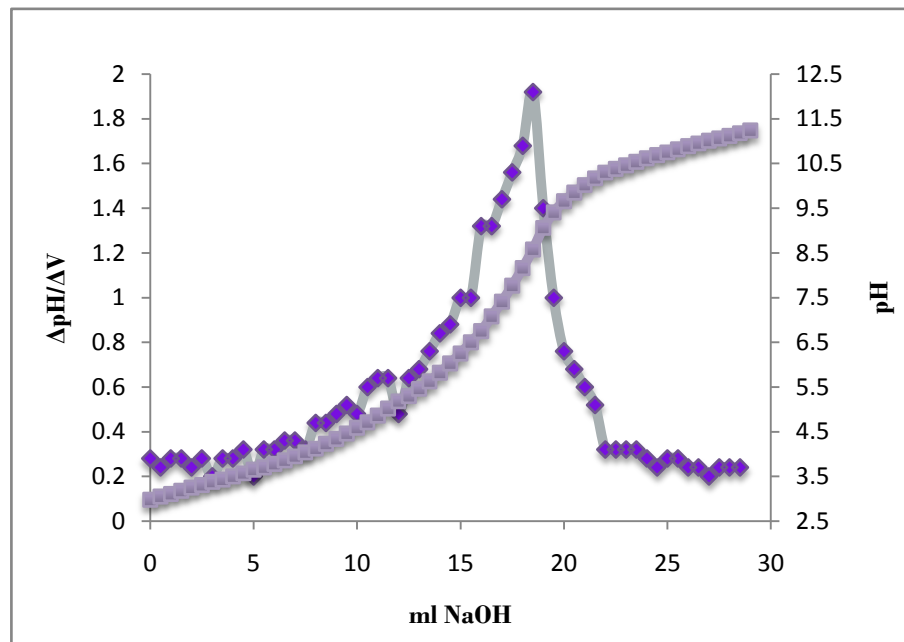


Figura 28. Curva de titulación y punto de equivalencia para la solución de aislado de proteína de suero de leche (WPI).