UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

COACERVACIÓN COMPLEJA DE PECTINA DE BAJO METOXILO Y QUITOSANO: CARACTERIZACIÓN REOLÓGICA DE LOS COACERVADOS

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS EN
CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA

UNIVERSIDAD AUTONOMA CHAPINGO MÉXICO
DIRECCION GENERAL ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES

PRESENTA:

BENITEZ ESPINOSA ROSA MARIA

DICIEMBRE 2011

Chapingo, Estado de México.

COACERVACIÓN COMPLEJA DE PECTINA DE BAJO METOXILO Y QUITOSANO: CARACTERIZACIÓN REOLÓGICA DE LOS COACERVADOS

Tesis realizada por Rosa María Benítez Espinosa bajo la dirección del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA

DIRECTOR: _____

DRA. CONSUELO SILVIA OLIVIA LOBATO CALLEROS

ASESOR: _____

DR. TEODORO ESPINOSA SOLARES

ASESOR: _____

DR. EDUARDO JAIME VERNON CARTER

CHAPINGO, EDO. DE MEX., DICIEMBRE DE 2011.

ii

DEDICATORIA

A todos mis seres queridos con amor y cariño

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el financiamiento para la realización de mis estudios de Posgrado.

A la Universidad Autónoma Chapingo y al Departamento de Ingeniería Agroindustrial por los recursos brindados para mi formación académica.

A la Dra. Consuelo Lobato Calleros por su apoyo en la dirección de este proyecto, por su apoyo y confianza.

Al Dr. Teodoro Espinosa Solares gracias por su tiempo y disponibilidad en este trabajo de tesis.

Al Dr. Jaime Vernon Carter por sus aportaciones y sugerencias a la realización de este trabajo.

Al Dr. Humberto Vásquez Torres por su ayuda y colaboración en este proyecto.

Gracias a todos los que contribuyeron de una u otra forma a la realización de este trabajo.

A todos mis compañeros de generación 2009-2011 por su amistad.

DATOS BIOGRÁFICOS

Rosa María Benítez Espinosa es Ingeniero Agroindustrial, egresada del Departamento de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Autónoma Chapingo.

A la fecha se ha desempeñado como docente en la Dirección General de Educación Tecnológica Agropecuaria, participando activamente en la impartición de materias relacionadas con la Carrera de Técnico Agropecuario y Técnico en Agroindustrias.

COACERVACIÓN COMPLEJA DE PECTINA DE BAJO METOXILO Y QUITOSANO: CARACTERIZACIÓN REOLÓGICA DE LOS COACERVADOS

COMPLEX COACERVATION BETWEEN LOW-METHOXYL PECTIN AND CHITOSAN: RHEOLOGICAL CHARACTERIZATION OF THE COACERVATES

Benítez-Espinosa Rosa María[1], Lobato-Calleros Consuelo[1]

RESUMEN

En este estudio se formaron complejos electrostáticos entre pectina de bajo metoxilo (PBM) y quitosano (QUI) usando una relación en peso de 2:1, respectivamente, y diferentes valores de pH de interacción (2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5 y 5.0). Los coacervados complejos resultantes se sometieron a barridos de amplitud y de frecuencia para caracterizar su comportamiento viscoelástico. Los resultados de Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR) mostraron que los coacervados se formaron a través de la interacción entre los grupos funcionales de ambas macromoléculas ($-NH_3^+$ y $-COO^-$). Los valores de rendimiento de coacervación compleja más elevados fueron obtenidos a valores de pH de 4.0, 4.5 y 5.0 (74.9, 79.6 y 70.7 %, respectivamente). El comportamiento reológico de los coacervados tuvo un carácter viscoelástico predominantemente elástico, independientemente del pH al cual se formaron, pero los valores más elevados de los módulos de almacenamiento (G') y de pérdida (G'') fueron exhibidos por los coacervados complejos formados a valores de pH de 4.0, 4.5 y 5.0.

Palabras clave: Coacervación, pectina de bajo metoxilo, quitosano, reología, FTIR.

ABSTRACT

In this study low-methoxyl pectin (PBM) and chitosan (QUI) electrostatic complexes were formed using a weight ratio of 2:1, respectively, and different interaction pH values (2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, and 5.0). The resulting complex coacervates were subjected to amplitude and frequency sweeps in order to characterize its viscoelastic behavior. Fourier Transformed Infrared Spectroscopy (FTIR) results showed that the coacervates were formed through the interaction of the functional groups of both macromolecules ($-NH_3^+$ and $-COO^-$).The highest complex coacervation yield values were obtained at pH values of 4.0, 4.5, and 5.0 (74.9, 79.6, and 70.7 %, respectively). The rheological behavior of the coacervates had a predominantly elastic viscoelastic character independently of the pH at which they were formed. The highest storage modulus (G') and loss modulus (G'') values were displayed by the coacervate complexes formed at pH values of 4.0, 4.5, and 5.0.

Keywords: Coacervation, low-methoxyl pectin, chitosan, reology, FTIR.

1 Programa en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria. Universidad Autónoma Chapingo. Km 38.5 Carretera México Texcoco, Chapingo, México. C.P. 56230.

CONTENIDO

DEDICATORIA……..……iii

AGRADECIMIENTOS……..……iv

DATOS BIOGRÁFICOS……..……v

RESUMEN……..…...vi

ABSTRACT……vi

LISTA DE CUADROS……...ix

LISTA DE FIGURAS……..x

LISTA DE ABREVIATURAS…….xii

1. INTRODUCCIÓN..... **1**

2. OBJETIVOS..... **4**

2.1 Objetivo general..... 4

2.2 Objetivos particulares 4

3. REVISIÓN DE LITERATURA **6**

3.1 Coacervación 6

3.2 Biopolímeros..... 11

3.2.1 Polisacáridos 12

3.2.2 Quitosano 13

3.2.3 Pectina..... 19

3.3 Potencial Z..... 22

3.4 Reología..... 24

3.5 Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier FTIR 26

4. MATERIALES Y MÉTODOS 29

4.1 Materiales 29

4.2 Determinación del punto de equivalencia de las dispersiones de los biopolímeros 29

4.3 Determinación del potencial zeta de las dispersiones de los polisacáridos 30

4.4 Evaluación de la formación de complejos pectina de bajo metoxilo-quitosano al variar el pH 31

4.5 Contenido de humedad y rendimiento de los coacervados complejos 32

4.6 Caracterización reológica de los coacervados complejos 33

4.7 Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR) 34

4.8 Análisis de datos 34

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 35

5.1 Puntos de equivalencia de las dispersiones de los biopolímeros 35

5.2 Valores de potencial zeta de las dispersiones de biopolímeros 37

5.3 Formación de coacervados complejos pectina de bajo metoxilo-quitosano 38

5.4 Rendimiento y contenido de humedad de los coacervados complejos 41

5.5 Comportamiento reológico de los coacervados complejos 42

5.5.1 Barrido de amplitud 42

5.5.2 Barrido de frecuencia 48

5.6 Espectroscopia Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR) 51

6. CONCLUSIONES 54

7. BIBLIOGRAFÍA 55

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Rendimiento y humedad del coacervado a diferentes valores de pH (medias ± DE, n = 9.0)…….42

Cuadro 2. Valores de los módulos de almacenamiento (G') y de pérdida (G'') y del factor de cedencia (Tan δ) de los coacervados complejos en la región viscoelástica lineal (medias ± DE, n= 9)…….46

Cuadro 3. Valores de los módulos de almacenamiento (G') y de pérdida (G'') de los coacervados complejos a 1 Hz de frecuencia (medias ± DE, n= 9)……...51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del quitosano……14

Figura 2. Ilustración esquemática de la versatilidad del quitosano……..17

Figura 3. Estructura primaria de homogalacturano……21

Figura 4. Curva de titulación de la dispersión de pectina de bajo metoxilo al 1 % p/p……36

Figura 5. Curva de titulación de la dispersión de quitosano al 0.5 % p/p……36

Figura 6. Variación del potencial Z de dispersiones de pectina y quitosano (1 % p/p) como función del pH……38

Figura 7. Absorbancia de la fase en equilibrio resultante de la interacción entre pectina de bajo metoxilo y quitosano al variar el pH……..……40

Figura 8. Fotografías de mezclas de pectina de bajo metoxilo y quitosano en una relación en peso 2:1, respectivamente, al variar el pH, después de haber sido sometidas a centrifugación……40

Figura 9. Variación del módulo de almacenamiento (G´) y del módulo de pérdida (G'') de los coacervados complejos como función de la deformación……43

Figura 10. Variación del factor de cedencia (tan δ) de los coacervados complejos como función de la deformación……..45

Figura 11. Variación del módulo de almacenamiento (G´) y del módulo de pérdida (G'') de los coacervados complejos como función de la frecuencia…..49

Figura 12. Espectro FTIR de PBM, QUI y $CC_{PBM-QUI}$ a diferentes valores de pH (2.5 a 5.0)……...53

LISTA DE ABREVIATURAS

PBM-pectina de bajo metoxilo

QUI-quitosano

$CC_{PBM-QUI}$ - coacervado complejo de pectina de bajo metoxilo y quitosano

$CC_{PBM-QU,\ 2.5}$ - coacervado complejo de pectina de bajo metoxilo y quitosano a pH 2.5

$CC_{PBM-QUI,\ 3.0}$ - coacervado complejo de pectina de bajo metoxilo y quitosano a pH 3.0

$CC_{PBM-QUI,\ 3.5}$ - coacervado complejo de pectina de bajo metoxilo y quitosano a pH 3.5

$CC_{PBM-QUI,\ 4.0}$ - coacervado complejo de pectina de bajo metoxilo y quitosano a pH 4.0

$CC_{PBM-QUI,\ 4.5}$ - coacervado complejo de pectina de bajo metoxilo y quitosano a pH 4.5

$CC_{PBM-QUI,\ 5.0}$ - coacervado complejo de pectina de bajo metoxilo y quitosano a pH 5.0

G´-módulo de almacenamiento

G´´-módulo de pérdida

FTIR- Espectroscopía Infrarrojo por Transformada de Fourier.

DE-desviación estándar

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años ha habido un creciente interés en el aprovechamiento de biopolímeros obtenibles a partir de materias primas agrícolas renovables y desperdicios del procesamiento de alimentos marinos, como las pectinas y el quitosano, respectivamente, con potencial para reemplazar polímeros sintéticos en la fabricación de biomateriales con propiedades funcionales novedosas para diversas aplicaciones (Farris *et al*., 2011). Entre estas últimas se encuentran el mejoramiento de la estabilidad fisicoquímica y microbiológica y de los atributos sensoriales de los alimentos, protección y liberación controlada de compuestos bioactivos, desarrollo de materiales de empaque y sustitutos de grasa para estructurar alimentos bajos en grasa, entre otros (Mohareb y Mittal, 2007; Patel y Velikov, 2011).

Para mejorar la funcionalidad de los biopolímeros se ha propuesto la formación de complejos macromoleculares vía interacciones electrostáticas biopolímero-biopolímero. Lo anterior, debido a que las propiedades de complejos binarios biopolímero-biopolímero (mecánicas, térmicas, físicas, etc.), en general, son mejores que las de los biopolímeros individuales o sus mezclas (Ye, 2008; Hoare y Kohane, 2008; Farris *et al*., 2011).

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 biopoliméricos a través de interacciones entre biopolímeros cargados opuestamente. Las fuerzas de repulsión netas entre los dos biopolímeros en solución, causa la separación espontánea de sus moléculas (Walstra, 2003); en contraste, las fuerzas de atracción entre dos biopolímeros pueden manifestarse en la formación de: (a) complejos solubles pequeños que se evidencian en la obtención de dispersiones turbias; (b) estructuras de gel débiles, si las interacciones son débiles y (c) sólidos precipitados o coacervados complejos, si las interacciones entre biopolímeros son fuertes (Walstra, 2003). Los coacervados complejos han sido reconocidos como un nuevo tipo de entidades coloidales; cuyas propiedades funcionales son mejores en general, que aquellas de los biopolímeros individuales. Entre las propiedades funcionales mejoradas que exhiben los coacervados, pueden citarse: solubilidad, actividad superficial, estabilidad conformacional, habilidad para formar geles, propiedades emulsificantes y propiedades espumantes (Ye, 2008).

Debido a que las interacciones moleculares entre biopolímeros ocurren en disolución, la formación de complejos e incompatibilidad termodinámica son influenciados por el pH y la fuerza iónica de la disolución, la conformación molecular, la densidad de carga y la concentración de ambos biopolímeros (Girard *et al*., 2004, Liu *et al*., 2010). La formación de complejos biopoliméricos entre dos biopolímeros poseyendo cargas opuestas, puede ser inducida a

concentraciones y relaciones en peso entre biopolímeros específicas, bajo condiciones determinadas de pH, fuerza iónica y temperatura (Espinosa-Andrews *et al*., 2007; Coelho *et al.*, 2011).

Los estudios realizados sobre complejos biopoliméricos, han considerado principalmente el efecto de parámetros de formación, como pH, fuerza iónica, densidad de carga o peso molecular de los biopolímeros, sobre la extensión de la separación de la fase coacervada; no obstante, existe escasa información sobre la influencia de estos parámetros sobre la estructura, la estabilidad y las propiedades (físicas, mecánicas, térmicas y funcionales) de los complejos biopoliméricos.

Con base en lo expuesto, los objetivos de este trabajo fueron: (a) determinar las condiciones de formación de coacervados complejos (CC) entre pectina de bajo metoxilo (PBM) y quitosano (QUI); (b) identificar las interacciones que ocurren entre las moléculas de PBM y QUI durante la formación de los $CC_{PBM-QUI}$ mediante Espectroscopía Infrarrojo por Transformada de Fourier y (c) caracterizar el comportamiento reológico dinámico de los $CC_{PBM-QUI}$ al variar el pH de formación.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

(a) Determinar las condiciones de formación de coacervados complejos (CC) entre pectina de bajo metoxilo (PBM) y quitosano (QUI); (b) identificar las interacciones que ocurren entre las moléculas de PBM y QUI durante la formación de los $CC_{PBM-QUI}$ mediante Espectroscopía Infrarrojo por Transformada de Fourier y (c) caracterizar el comportamiento reológico dinámico de los $CC_{PBM-QUI}$ al variar el pH de formación.

2.2 Objetivos particulares

- Determinar los valores de potencial zeta de dispersiones acuosas de QUI y PBM al variar el pH.

- Establecer el pH y la relación en peso entre PBM y QUI (P_{PBM}: P_{QUI}) para la formación de $CC_{PBM-QUI}$.

- Identificar las interacciones PBM-QUI que dan lugar a la formación de $CC_{PBM-QUI}$ mediante Espectroscopía Infrarrojo por Transformada de Fourier.

- Determinar las propiedades reológicas de los $CC_{PBM-QUI}$ mediante pruebas oscilatorias.

3. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1 Coacervación

La coacervación se investigó por primera vez por Bungenberg de Jong y Kruyt en 1929 y fue clasificada en dos sistemas: coacervación simple y compleja. El término coacervación se deriva del latín “acervus” que significa “montón o cúmulo” y el prefijo “co” (junto), para indicar la reunión de partículas coloidales (Weinbreck *et al*., 2004; de Kruif *et al.*, 2004a). El trabajo pionero de los autores antes mencionados y otros, a mediados del siglo XX produjo una gran riqueza experimental en coacervación, es decir, la separación espontánea de fases líquido-líquido que ocurre a partir de soluciones que contienen polielectrolitos de carga opuesta. A pesar de esfuerzos considerables, no fue posible que éstas primeras realizaran una descripción molecular detallada de estos fluidos densos, ópticamente transparentes y muy viscosos. Los dos principales problemas que se enfrentaron fueron la mala caracterización de la naturaleza de los polielectrolitos utilizados y la confianza en lo que ahora se consideran métodos primitivos de investigación instrumental (Bohidar *et al.*, 2005).

Coacervación es definida por IUPAC como la separación de sistemas coloidales en dos fases líquidas. La coacervación compleja es esencialmente impulsada por las fuerzas de atracción de polímeros de carga opuesta. El coacervado existe en equilibrio con un sobrenadante diluido (Lee y Hong, 2009).

La coacervación simple ocurre cuando el sistema contiene solamente una sustancia coloidal como soluto, se produce cuando al sistema coloidal se le adicionan sustancias fuertemente hidrofílicas, lo que provoca la separación de dos fases, una que contiene una alta cantidad de la sustancia coloidal y otra conteniendo una muy baja cantidad de la sustancia coloidal (Kumar, 2006).

La coacervación compleja se produce en sistemas que contienen más de un coloide, está basada en la formación de un complejo (coacervado) entre polímeros cargados opuestamente, usualmente proteínas y polisacáridos. Si las condiciones requeridas se cumplen, el polisacárido y la proteína forman un complejo, el cual puede formar una película o recubrimiento alrededor del material objetivo que necesita ser encapsulado (Weinbreck *et al*., 2004a).

Por su parte, Fuguet *et al*. (2007) menciona que la coacervación compleja es un proceso de microencapsulación que ha sido extensamente utilizado para la encapsulación de ingredientes alimenticios y farmacéuticos en los últimos 50 años. La encapsulación de ingredientes químicamente inestables, la liberación controlada de sabores y el enmascaramiento de compuestos con olor o sabor desagradables, son las aplicaciones más comunes.

En una solución coloidal las cargas pueden orientarse formando puentes que dan origen a una disminución en la solubilidad del coloide; como consecuencia una parte del coloide puede ser separado en una nueva fase, convirtiendo al sistema en bifásico. La fase rica en coloide es un estado disperso que aparece como gotas de líquido amorfo, a las que se les denomina gotas de coacervado. La coacervación puede ser iniciada por diferentes formas: cambios de pH, temperatura o adición de una segunda sustancia como una sal iónica; este método es eficiente pero caro. Generalmente un cambio de pH, temperatura o fuerza iónica provoca una fase de separación o coacervación de la cobertura y atrapamiento del material activo disperso; finalmente la cobertura es solidificada por medios térmicos o entrecruzamiento. La fase de separación acuosa involucra el uso de materiales como grenetina o mezclas de grenetina y goma arábiga. Una coacervación simple se presenta cuando sólo la grenetina es inducida a formar microcápsulas. La coacervación compleja utiliza grenetina y un polímero de carga opuesta como goma arábiga (Yáñez *et al.*, 2002).

Las interacciones entre macromoléculas son variadas, éstas pueden ser: débiles o fuertes, específicas o no específicas, atractivas o repulsivas (Dickinson, 1993). Dichas interacciones son determinadas por las características fisicoquímicas de cada biopolímero (densidad de carga y masa molar), su concentración, relación y condiciones de disolución (pH, fuerza iónica y tipo de iones) (Mekhloufi *et al*., 2005; Schmitt *et al*., 2005; Xing *et al*., 2004). La interacción entre biopolímeros opuestamente cargados fue observada por Tieback en 1911, al mezclar una solución de gelatina y GA en ácido acético;

observó la opacidad o precipitación del sistema (Weinbreck *et* al., 2004b). Este fenómeno de separación de fases del sistema gelatina/GA fue definido como coacervación.

Los polielectrolitos son polímeros que desarrollan carga sustancial cuando se disuelven o “hinchan” en un disolvente altamente polar como el agua (Walstra, 2003). Los polisacáridos son biomacromoléculas polielectrolitos o poliiones, debido a las cargas que surgen en numerosos grupos funcionales ionizados localizados a lo largo de su estructura básica. Las proteínas por su parte, son conocidas como anfolitos, debido a que contienen simultáneamente cargas positivas y negativas en su estructura básica. La mayoría de los polisacáridos son polielectrolitos aniónicos, tales como la goma arábiga, la pectina, la goma de mezquite, la carragenina, etc. El quitosano es el único polisacárido catiónico pseudonatural (Rinaudo *et al*., 2005).

Cuando dos biopolímeros diferentes se mezclan pueden formar una sola fase o un sistema de dos fases en función de la naturaleza de los biopolímeros que participan, la composición de la solución y las condiciones ambientales. En un sistema de una fase, los dos biopolímeros pueden existir como moléculas individuales o como complejos solubles que se distribuyen uniformemente en todo el sistema. En un sistema de dos fases, la solución se separa en dos fases distintas que tienen composiciones biopoliméricas diferentes; esta separación puede ocurrir a través de dos mecanismos físico-químicos diferentes: separación asociativa y repulsiva (McClements, 2006).

En la separación asociativa, existe una atracción relativamente fuerte entre los dos diferentes tipos de biopolímeros que les lleve a asociarse o atraerse entre sí, el ejemplo más común es la atracción electrostática entre las moléculas con cargas eléctricas opuestas. El resultado es un sistema que consiste de dos fases: una rica en ambos biopolímeros y otra pobre en los dos biopolímeros. La fase rica en biopolímeros forma un coacervado o precipitado, dependiendo de la fuerza de atracción y la naturaleza de los polímeros involucrados (McClements, 2006).

En soluciones muy diluidas el sistema es estable pero al aumentar la concentración de los biopolímeros el sistema puede volverse inestable (dependiendo del tipo de interacción) y las mezclas de biopolímeros tienden a segregarse. Una mezcla de polisacáridos y proteínas también puede ser inestable cuando las interacciones asociativas se presenten, en este caso, ocurre la adsorción del polisacárido en la superficie de la proteína. Si la cantidad de polímero no es lo suficientemente grande para cubrir la proteína, el polisacárido puede adsorberse a más de una de las proteínas, provocando así la atracción entre dos o más partículas de proteína. Este proceso se llama también coacervación compleja. Los polisacáridos adsorbidos en las proteínas inducen la atracción entre las proteínas y partículas coloidales (de Kruif *et al*., 2001).

3.2 Biopolímeros

El término biopolímero incluye proteínas y polisacáridos. Ambas macromoléculas contribuyen a la estructura, textura y estabilidad de sistemas alimenticios (Dickinson, 2003). Las proteínas son polímeros de aminoácidos y los polisacáridos de monosacáridos. Las propiedades funcionales de los biopolímeros son determinadas por sus características moleculares, tales como su peso molecular, conformación, flexibilidad, polaridad e interacciones electrostáticas. Las características moleculares son determinadas por el tipo, número y secuencia de monómeros que forman la cadena polimérica. Los monómeros varían de acuerdo a su polaridad (iónica, bipolar, no-polar, anfifílica), dimensiones, interacciones, y grupos funcionales. Si un biopolímero contiene solamente un tipo de monómero, a éste se le conoce como homopolímero (por ejemplo, almidón o celulosa), pero si contiene más de un tipo de monómero, éste se conoce como heteropolímero (por ejemplo, la goma xantana, goma arabiga) (McClements, 1999).

Debido a su actividad superficial, las proteínas suelen ser los agentes emulsionantes de elección, especialmente para la formación de espumas y emulsiones aceite en agua (O/W), mientras que los polisacáridos son conocidos como agentes espesantes o gelificantes que modifican y controlan las propiedades de flujo. Dentro de los polisacáridos usados en alimentos se encuentran las gomas exudadas por diversas plantas y algunos biopolímeros modificados química y/o enzimáticamente a partir de la celulosa (Dickinson,

2003). En muchos sistemas alimenticios estos dos componentes se encuentran mezclados y bajo ciertas condiciones (p. ej. pH, concentración, proporción y fuerza iónica) pueden interactuar positivamente formando complejos biopoliméricos, los cuales han demostrado ser efectivos en la estabilización de emulsiones mediante mecanismos estéricos y electrostáticos (Benichou *et al.,* 2002).

Las proteínas y los polisacáridos tienen enlaces covalentes sencillos entre los monómeros, por lo que los biopolímeros pueden rotar. Debido a esto y al hecho de que contienen un gran número de monómeros (comúnmente entre 20 y 20000) pueden formar un gran número de configuraciones en solución. (Lehninger *et al.*, 1993; BeMiller y Whistler, 1996).

3.2.1 Polisacáridos

Los polisacáridos son los polímeros naturales más versátiles debido al amplio espectro de propiedades químicas, físicas y funcionales que confluyen en los organismos vivos, tales como conferir estructura, almacenar energía y otras funciones mucho más especializadas, tales como reconocimiento y adhesión en células eucariontes, señalización y activación de procesos de resistencia en plantas, formación de biopelículas en microorganismos, entre otras. A pesar del elevado tonelaje de polisacáridos que se utilizan como materias primas en las industrias de fibras, textil, papel y alimentos (p. ej. derivados de celulosa y almidones) hay cada vez mayor evidencia que sugiere que ciertas familias de

polisacáridos poseen propiedades funcionales tales que pueden ser explotadas en otros sectores industriales especializados como el biomédico, cosmético y farmacéutico. Es especialmente relevante que algunos de estos biopolímeros combinan propiedades fisicoquímicas como la capacidad de formar sistemas tipo hidrogeles, micro y nanopartículas, con propiedades biológicas como la bio y mucoadhesividad que en su conjunto los hacen particularmente atractivos en la ingeniería y diseño de materiales empleados en ciencias de la salud.

El uso de biopolímeros naturales para aplicaciones diversas en ciencias de la vida, tiene muchas ventajas, como la disponibilidad para agricultura renovable o recursos marinos alimenticos, biocompatibilidad, biodegradabilidad por lo que conduce a la seguridad ecológica y la posibilidad de preparar una variedad de derivados modificados química o enzimáticamente para aplicaciones específicas. Los polisacáridos como una clase de macromoléculas naturales, tienen la tendencia a ser extremadamente bioactivos y son generalmente derivados a partir de materias primas agrícolas (celulosa, almidón, pectina, etc.) o desechos de conchas de crustáceos (quitina y quitosano). En términos de disponibilidad la quitina está a la par de la celulosa, disponible en miles de toneladas (Prashanth y Tharanathan, 2007).

3.2.2 Quitosano

El quitosano se obtiene de fuentes naturales, como lo es el exoesqueleto de los insectos, crustáceos y hongos y se ha demostrado que son biocompatibles y

biodegradables. Los polímeros del quitosano son aminopolisacáridos derivados semi-sintéticamente, que tienen estructuras únicas, propiedades multidimensionales, funcionalidad altamente sofisticada y un amplio rango de aplicaciones en áreas biomédicas, industriales y otras. Se han convertido en una materia de interés, no sólo porque están hechos de fuentes renovables abundantes, sino porque son muy compatibles y biomateriales efectivos que son utilizados en muchas aplicaciones (Dash *et al.*, 2011; Prashanth y Tharanathan, 2007; Lee y Hong, 2009). El quitosano es un copolímero lineal de β-(1-4) unido a 2-acetamido-2-desoxi-β-D-glucopiranosa y 2-amino-2-desoxi-β-D-glicopiranosa (Figura 1). Ésta es obtenida por la N-desacetilación de la quitina, el cual es considerado como el segundo polisacárido más abundante del planeta (obtenido de crustáceos, insectos y ciertos hongos). El uso del quitosano en la industria de los alimentos es particularmente prometedora debido a su biocompatibilidad y su no toxicidad (Kim *et al.*, 2006; Dash *et al.*, 2011).

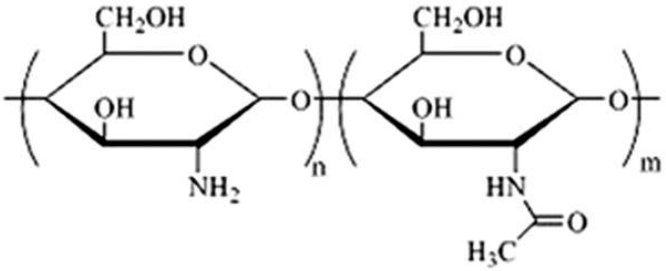


Figura 1. Estructura del quitosano. Fuente: Dash *et al.* (2011).

Debido a la escasa solubilidad de la quitina en soluciones acuosas y solventes orgánicos, no se le han encontrado aplicaciones prácticas, mientras que el quitosano como una variante artificial de la quitina es más adecuado para bioaplicaciones útiles (Dash *et al.*, 2011). El quitosano está cargado positivamente (carácter catiónico) en valores de pH ácidos, esto debido al residuo 2-amino-2-deoxy-β-D-glicopiranosa en su estructura y puede interactuar con proteínas cargadas negativamente (Prashanth y Tharanathan, 2007). Las propiedades del quitosano en solución dependen de su peso molecular, grado de acetilación, pH y fuerza iónica (Wei y Hudson, 1993; Claesson y Ninhami, 1992).

3.2.2.1 Estructura, origen y propiedades fisicoquímicas del quitosano

La molécula de quitosano es un copolímero compuesto de N-acetil-D-glucosamina y D-glucosamina, unidades disponibles en diferentes grados dependiendo de las fracciones acetiladas. Se trata de un polímero policatiónico que tiene un grupo amino y dos grupos hidroxilo en la repetición de residuos glucosídicos. La cadena de hidratos de carbono es muy similar a la de la celulosa, la cual consiste de β-1,4 unido a D-glucosamina con grado variable de N-acetilación, excepto que el grupo acetil amino sustituye al grupo hidroxilo en la posición del carbono 2. Por lo tanto, el quitosano es un copolímero compuesto de N-acetil-2-amino-2-desoxi-D-glucopiranosa y 2-amino-2-desoxi-D-glucopiranosa, donde los dos tipos de unidades de repetición, están unidos por enlaces glicosídicos (1→4)-β. Después de purificarlo, el quitosano tiene una

estructura rígida cristalina, a través de enlaces inter e intra moleculares. Dash *et al.* (2011) y No *et al.* (2007), mencionan que la fuente de quitosano es un polímero de ocurrencia natural, la quitina, la cual es el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza, después de la celulosa que es el más abundante. La quitina es encontrada en el exoesqueleto de crustáceos, insectos y algunos hongos. Las principales fuentes comerciales de quitina son los residuos de las conchas de los camarones, langostas, cangrejos, entre otros. En el mundo varios millones de toneladas de quitina se cosechan anualmente y, por lo tanto, este biopolímero representa una alternativa, y una fuente económica y fácilmente disponible. El quitosano es obtenido por la des-acetilación termoquímica de la quitina en presencia de álcali y naturalmente sólo se da en presencia de ciertos hongos (*Mucoraceae*). Varios métodos alcalinos han sido propuestos, la mayoría de ellos involucran la hidrólisis de la posición acética, utilizando soluciones de hidróxido de potasio o hidróxido de sodio, así como una mezcla de hidracina y sulfato de hidracina. El tratamiento de la quitina con una solución acuosa de NaOH (p/v) al 40-45% a 90-120° C de 4-5 horas resulta en una N-des acetilación de la quitina. Las condiciones utilizadas para la des acetilación, determina el peso molecular y el grado de des acetilación (Dash *et al.*, 2011).

Los grupos amino primarios activos en la molécula, han sido reactivados para proporcionar sitios para una variedad de grupos laterales adjuntos empleando condiciones de reacción moderadas. A un bajo pH (menos de 6), los grupos amino son protonados otorgándole un comportamiento policatiónico al

quitosano. A un alto pH (por encima de 6.5), las aminas del quitosano son desprotonadas y reactivadas (Figura 2). La fácil derivatización, hace al quitosano un candidato ideal para biofabricación. Además de las características particulares del quitosano como ser catiónico, hemostático e insoluble a altos pH´s, puede ser revertido por la sulfatación de la amina lo cual hace a la molécula aniónica y soluble en agua, con la introducción de propiedades anticoagulantes. Los grupos laterales adjuntos en el quitosano, proporcionan materiales versátiles con funcionalidad específica, alterar las propiedades biológicas o modificar propiedades físicas (Dash *et al.*, 2011).

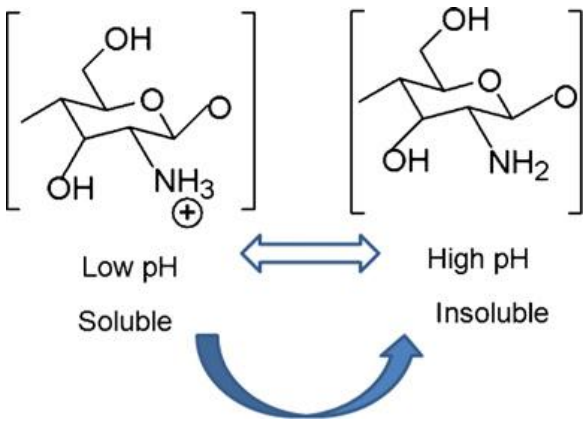


Figura 2. Ilustración esquemática de la versatilidad del quitosano. Fuente: Dash *et al.* (2011).

El tipo de quitosano, con las principales diferencias estructurales, ha sido representada por las proporciones relativas de los residuos de N-acetil-D-glucosamina y D-glucosamina, proporcionando cambios estructurales específicos. Esta diferencia en la estructura da lugar al incremento de varios lotes de quitosano que son distinguidos con base en su grado de des

acetilación y su peso molecular, los cuáles afectan directamente las propiedades biológicas y químicas del polímero. El quitosano comercial como el que se vende en Sigma Aldrich, está disponible en dos grados: de bajo y de alto peso molecular, el primero de ellos, se caracteriza por tener un peso molecular entre 20 k Da y 190k Da con grado de des acetilación menor al 75 %; mientras que el quitosano de alto peso molecular es generalmente caracterizado por un peso molecular que comprende de los 190 kDa a 375 kDa con un grado de des acetilación mayor al 75 % (Dash *et al.*, 2011).

Como se mencionó anteriormente, la quitina es insoluble en la mayoría de solventes orgánicos y se puede disolver fácilmente en soluciones acidificadas diluidas, a un pH menor a 6.0 debido a la cuaternización de los grupos amino que tienen un valor de pKa de 6.3 haciendo al quitosano un polielectrolito catiónico hidrosoluble. La presencia de grupos amino, indica que el pH altera sustancialmente el estado de carga y las propiedades del quitosano. A bajo pH, estas aminas son protonadas y se cargan positivamente haciendo al quitosano un polioelectrolito catiónico hidrosoluble. Por otro lado, cuando el pH se incrementa por encima de 6, las aminas del quitosano son desprotonadas y el polímero pierde su carga y se vuelve insoluble. La transición soluble-insoluble se produce en su valor de pKa alrededor de un pH entre 6.0 y 6.5. Como el valor pKa es altamente dependiente del grado de N-des acetilación, la solubilidad del quitosano es dependiente del grado de des acetilación y del método de des acetilación usado. Aparte del grado de des acetilación, el peso

molecular es también un parámetro importante que afecta significativamente la solubilidad y otras propiedades (Dash *et al.*, 2011).

3.2.3 Pectina

La pectina es estructuralmente y funcionalmente el polisacárido más complejo en paredes celulares de plantas y en una dieta occidental normal, 4-5 g de pectina son consumidos por día (Mohnen, 2008; Willats *et al*., 2006). La pectina tiene funciones en el crecimiento de la planta, morfología, desarrollo y defensa de la planta y también sirve como polímero gelificante y espesante en diversos alimentos y productos especiales incluyendo películas comestibles y biodegradables, adhesivos, sustitutos de papel, espumas, plastificantes y tienen efectos positivos en la salud humana y múltiples usos biomédicos (Mohnen, 2008).

En la industria alimentaria específicamente, la pectina es utilizada como se mencionó anteriormente por sus propiedades gelificantes en la elaboración de mermeladas, jaleas, productos de confitería y rellenos de repostería, el otro uso principal de la pectina es para la estabilización de bebidas lácteas fermentadas y yogures, en todas las áreas de aplicación la estructura fina de la pectina, afecta profundamente su funcionalidad. Esto se refleja en el hecho de que aunque la mayoría de los tejidos vegetales contienen pectina, la producción comercial se basa casi por completo en sólo unas pocas fuentes que tienen las propiedades necesarias. En la actualidad, la piel de cítricos y la pulpa de

manzana son las principales fuentes de pectina extraída, mientras que otras fuentes potencialmente valiosas, permanecen en gran parte sin utilizar debido a ciertas propiedades estructurales indeseables (Willats *et al*., 2006).

Pectina es una familia de polisacáridos complejos que contienen residuos de 1,4 ligado a α-D-ácido galactosilurónico incluyendo los polisacáridos pécticos (homogalacturona, ramnogalacturona I y las galacturonas sustituidas ramnogalacturona II (RG-II) y xilogalacturona (XGA)) que han sido aislados de paredes celulares primarias y caracterizados estructuralmente. La biosíntesis de la pectina, se estima que requiere por lo menos 67 transferasas incluyendo glicosil, metil y acetiltransferasas (Mohnen, 2008; Ridley *et* al., 2001). El ácido galacturónico comprende aproximadamente el 70 % de la pectina y todos los polisacáridos pécticos contienen ácido galacturónico ligado a la posición O-1 y O-4.

3.2.3.1 Estructura de la pectina

El término pectina describe a una familia formada por oligosacáridos y polisacáridos, extremadamente diversos en su estructura. La estructura de la pectina está compuesta por cadenas de ácido galacturónico (GalA) y contienen también pequeñas cantidades de restos de β-L-ramnosa y otras unidades neutras (galactosa, arabinosa, xilosa). Los residuos de ácido α-D-galacturónico con la conformación 4C1, están unidos por enlaces (1→4) formando la cadena principal (Ridley *et al*., 2001; Willats *et al*., 2006; Pelloux *et al*., 2007; Lutz *et al*.,

2009). El polisacárido péctico más abundante es Homogalacturano (HG), representa aproximadamente el 65% de la pectina, es un homopolímero de cadena lineal de residuos de 1,4-ligado a α-D-ácido galactopiranosilurónico (Gal*p*A) en donde algunos de los grupos carboxilo son metil esterificados (Figura 3). Homogalacturanos, pueden ser parcialmente O-acetilados en C2 o C3 dependiendo de la planta de origen.

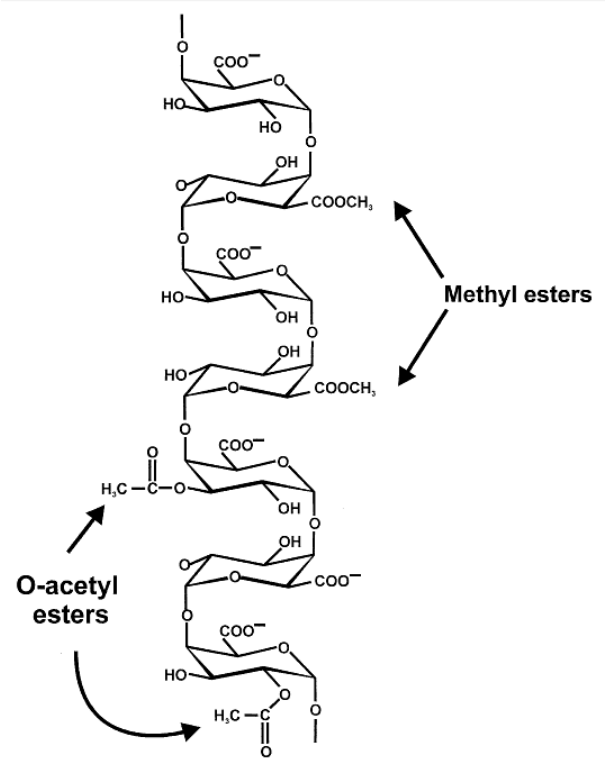


Figura 3. Estructura primaria de homogalacturano. Fuente: Ridley *et al.*, 2001.

Otro polisacárido péctico es Ramnogalacturano I (RG-I), se trata de una familia de polisacáridos pécticos que representa del 20-35 % de la pectina y Ramnogalacturano II (RG-II) que es una estructura completa, la cual representa un 10 % de la pectina (Mohnen, 2008).

La polidispersidad de la pectina es debida a factores intrínsecos como la carga promedio, distribución de carga, peso molecular promedio y distribución del peso molecular, número y tamaño de las cadenas laterales de azúcar neutral. Muchos estudios han explorado la influencia de la estructura de la pectina y las condiciones de solución en sus propiedades, principalmente en sus propiedades gelificantes. El peso molecular de la pectina, el grado de acetilación y el grado de metielesterificación son los principales factores que dictan las propiedades de gelificación y el mecanismo de acción de las pectinas. La pectina de alto metoxilo con más del 50 % de grupos carboxílicos esterificados, forman geles principalmente por interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno a pH menor a 3.5 y en presencia de más de 55 % de azúcar. La pectina de bajo metoxilo, con menos del 50 % de grupos carboxílicos esterificados forma geles en presencia de iones Ca^{2+}. La distribución de carga, es decir, la distribución de los grupos metoxilo fue principalmente estudiado en relación a la formación de geles en presencia de Ca^{2+} (Lutz *et al*., 2009).

3.3 Potencial Z

El potencial Z es una medida de la magnitud de la repulsión o atracción entre partículas, por lo que su medición es una herramienta importante para el conocimiento sobre los mecanismos de dispersión y atracción de partículas coloidales (Erickson *et al*., 2000). Es una propiedad física, la cual es exhibida por una partícula en suspensión. Esto puede ser utilizado para optimizar las formulaciones de suspensiones y emulsiones. El conocimiento del potencial Z

puede reducir el tiempo necesario para producir formulaciones de prueba. También puede ser útil en la predicción de estabilidad a largo plazo. Es una técnica usada para medir el movimiento de las partículas cargadas bajo un campo eléctrico que utiliza el tan conocido efecto Doppler. La luz difundida por una partícula en movimiento experimenta un cambio de frecuencia. Como la frecuencia de la luz es tan alta (1014Hz), el cambio de frecuencia sólo se puede medir por una mezcla de ópticas o por una técnica de interferometría. Uno de estos rayos debe pasar a través de una partícula en dispersión (se le llama haz difractado). El otro rayo (se le llama haz de referencia) puede bien pasar a través de la muestra o bien puede ser conducido alrededor de la célula. Lo importante es que los dos haces se deben comparar en un punto después de que el haz difractado haya pasado a través de la muestra. Comparando la diferencia de frecuencia (por ejemplo, con un cambio Doppler) entre la luz difundida y la luz incidente (haz de referencia), se puede determinar la movilidad de las partículas, gracias a la influencia del campo eléctrico que se aplica (Malvern Instruments, 2011).

La magnitud del potencial Z proporciona información sobre la estabilidad del sistema coloidal. Si todas las partículas en suspensión tienen un potencial Z elevado, positivo o negativo, entonces tenderán a repelerse unas de otras y no habrá tendencia a su agregación. Por el contrario, si las partículas tienen valores de potencial Z bajos, no habrá fuerzas que prevengan la agregación de las partículas y su floculación. En medio acuoso, el pH de la muestra es uno de los más importantes factores que afectan su potencial Z. Si a una partícula en

suspensión que presenta un potencial Z, se le añade más álcali, las partículas tenderán a adquirir mayor carga negativa. Si por el contrario, se añade ácido a esta suspensión se alcanzará un punto en el que la carga será neutralizada. La adición de más ácido causará una carga positiva. La curva pH contra potencial Z, será positiva a bajo pH o negativa a alto pH. Puede haber un punto donde la gráfica pase a través de un potencial Z igual a cero. Este punto es llamado el punto isoeléctrico; normalmente es el punto en el que el sistema coloidal es menos estable (Malvern Instruments, 2011).

3.4 Reología

El término Reología proviene del griego "*rheos",* flujo y "logos", ciencia o palabra. La Reología es aplicada a todos los materiales, desde gases hasta sólidos (Salazar, 1993, citado por Sandoval, 2010). Reología es el estudio de la deformación y flujo de la materia. La ciencia de la Reología creció considerablemente debido a trabajos de investigación realizados en polímeros sintéticos y sus soluciones en diferentes solventes, que a su vez, era necesario debido a los múltiples usos de los polímeros ("plásticos") en aplicaciones industriales y cotidianas. Sin embrago, debido a la naturaleza biológica de los alimentos, la Reología de alimentos ofrece oportunidades únicas de estudio y existe una gran cantidad de literatura en este campo. Las propiedades reológicas se basan en el flujo y las respuestas de deformación de los alimentos cuando se someten a estrés (Rao, 1999).

Los estudios reológicos tratan acerca de las propiedades de la materia para determinar su comportamiento, es decir su reacción a la deformación y al flujo. La Reología se interesa en los materiales, la deformación de la cual resulta en la superposición de los efectos viscosos y elásticos. La Reología estudia los materiales con cambio en la estructura bajo la influencia de una fuerza aplicada (Malkin e Isayev, 2006).

En la práctica, toda prueba reológica se lleva a cabo mediante la aplicación de una fuerza a la muestra bajo estudio y la medición de la magnitud de su deformación o, equivalentemente, aplicar una deformación y medir la resistencia que presenta. Las relaciones entre el esfuerzo y la deformación que resultan de dichas pruebas se denominan ecuaciones constitutivas (ecuaciones reológicas de estado). El análisis de las propiedades mecánicas del material se basa en determinados modelos idealizados, cuyo comportamiento se describe por un número reducido de parámetros (en los casos más simples, por un solo parámetro) y en la mayoría de las ocasiones, se limitan a la utilización del estado de esfuerzo simple de corte y de velocidades de deformación pequeñas. Su estudio es esencial en muchas industrias, incluyendo las de plásticos, pinturas, alimentación, tintas de impresión, detergentes o aceites lubricantes, entre otras (Salazar, 1993, citado por Sandoval, 2010).

3.5 Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier FTIR

Es el método preferido de la espectroscopía de infrarrojos, en ésta, la radiación infrarroja es pasada a través de una muestra, parte de la radiación infrarroja es absorbida por la muestra y otra pasa a través de ella (transmitida). El espectro resultante representa la absorción y transmisión molecular, creando una huella molecular de la muestra. Tal como una huella digital, dos estructuras moleculares únicas no pueden producir el mismo espectro infrarrojo. Esto hace que la espectroscopía infrarroja sea de utilidad para varios análisis. FTIR puede proveer información útil, por ejemplo, puede identificar materiales desconocidos, puede determinar la calidad o consistencia de una muestra, también puede determinar la cantidad de componentes en una mezcla (Thermo Nicolet, 2001).

La espectroscopía FTIR es una técnica analítica emergente, la cual presenta una buena sensibilidad y una gran simplicidad en la preparación de muestras. El espectro infrarrojo de algún componente es conocido para expresar una "huella digital" única y esta característica permite a la espectroscopía infrarroja ser utilizada en la clasificación de diferentes muestras o identificación de muestras desconocidas. FTIR ha sido utilizado para clasificar componentes de interés en química de alimentos. Técnicas analíticas multivariadas utilizando datos FTIR han demostrado ser muy útiles en muchas aplicaciones debido a su capacidad en el logro de la resolución del espectro de señales FTIR (De Luca *et al*., 2011).

Metodológicamente el método espectroscópico FTIR emplea radiación infrarroja para irradiar la muestra. Conforme a la composición química de la muestra, la radiación es absorbida y resulta en un espectro específico. En moléculas simples, las bandas de absorción del espectro FTIR pueden ser asignadas a enlaces químicos específicos, mientras que en muestras biológicas complejas, las bandas de absorción de muchos enlaces químicos se traslapan, dando lugar a picos de absorción más amplios, por lo que la asignación a determinados enlaces moleculares es provisional. Todo espectro de una muestra, representa la composición química individual, es muy específico, por lo tanto puede utilizarse como una huella espectral. La medición de espectros FTIR se realiza fácilmente con la ayuda del dispositivo de reflexión total atenuada (ATR) por sus siglas en inglés. La muestra se coloca en la parte superior del cristal ATR que consiste en selenio de zinc cubierto con diamante. En el cristal ATR, el haz infrarrojo es totalmente reflejado en la interfase entre la muestra y el cristal ATR. En la interfase, la radiación penetra aproximadamente de 1-2 µm dentro de la muestra y es de este modo atenuada. El espectro FTIR es calculado del haz atenuado (Naumann *et al*., 2010).

La deficiencia de métodos estándar como cromatografía, espectroscopía de masas, espectroscopía ESR y termoluminiscencia, ha estimulado la aplicación de otros métodos como la espectroscopía FTIR en la detección y caracterización de irradiación en alimentos. Utilizando esta técnica espectroscópica vibracional, ha sido posible la investigación de cambios químicos, la investigación de algunos parámetros de calidad como la

identificación de componentes químicos y su clasificación así como análisis de discriminación de ingredientes alimenticios (Dogan *et al*., 2007).

Sin embargo, un número muy limitado de estudios FTIR están disponibles en la literatura sobre el efecto de las radiaciones ionizantes en las propiedades composicionales y estructurales de diferentes constituyentes alimenticios (como lípidos y proteínas). La ventaja de la espectroscopía FTIR es que puede ser aplicada a alimentos en diferentes formas como: deshidratados, líquidos, sólidos y frescos entre otros. Además es una técnica rápida y sensible, la cual es fácil de realizar y proporciona un método de medición precisa que no requiere calibración externa. Con la espectroscopia FTIR, es posible monitorear cambios en la estructura y propiedades de biomoléculas como DNA, RNA, proteínas, carbohidratos, lípidos en tejidos biológicos y células, simultáneamente (Dogan *et al*., 2007).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Materiales

Para la preparación de los coacervados complejos se utilizó pectina de bajo metoxilo (PBM, Grinsted ® Pectin LC 710, grado de esterificación 48 %, Danisco México, S.A. de C.V., México, D.F.) y quitosano (QUI, grado de desacetilación mayor al 75 % y elevado peso molecular, Sigma-Aldrich Química, S.A. de C.V., Toluca, Edo. Méx., México). Otros reactivos utilizados fueron disoluciones valoradas de NaOH y HCl 0.1 N, ácido acético glacial (J.T. Baker, Xalostoc, Edo. de México).

4.2 Determinación del punto de equivalencia de las dispersiones de los biopolímeros

Se preparó una dispersión de PBM 1 % (p/p), a temperatura ambiente (22 ± 3 °C), aplicando agitación magnética (Thermolyne conarec 2, Barnspead/Thermolyne, Dubuque, IO, EUA) durante 3 h. Una dispersión de quitosano 0.5 % (p/p) se preparó en ácido acético al 3 % p/p a temperatura ambiente, aplicando agitación durante 3 h. Las dispersiones de QUI (pH = 1.62) y PBM (pH = 3.54) se refrigeraron (4 ± 1°C) durante 24 h para lograr hidratación

completa. Las titulaciones se llevaron a cabo adicionando alícuotas de 0.1 mL de NaOH 0.1 N a 40 mL de cada dispersión (25 ± 1°C); un tiempo de 60 s transcurrió entre dos adiciones consecutivas para asegurar que la reacción alcanzara el equilibrio. Los valores de pH se determinaron después de cada adición de alícuota de NaOH con un potenciómetro (Hanna Instruments®, HI98240; pH/°C R-4-45 FC231D; Padova, Italia). El punto de equivalencia de las dispersiones de PBM y QUI se determinó a partir de las curvas potenciométricas de titulación y a partir de estos valores se estableció la relación en peso P_{PBM}: P_{QUI} que permitiera la interacción estequiométrica entre sus moléculas.

4.3 Determinación del potencial zeta de las dispersiones de los polisacáridos

Dispersiones de PBM y QUI al 1 % p/p, preparadas por el procedimiento descrito, y filtradas a través de membranas de nylon con tamaño de poro de 0.45 μm (Thomas Scientific, NJ, EUA), se utilizaron para determinar el potencial zeta de los biopolímeros al variar el pH de 2 a 7, empleando un equipo Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Worcestershire, RU). El pH de las dispersiones de PBM y QUI se ajustó mediante la adición de HCl 0.1 N y/o NaOH 0.1 N. A partir de las gráficas de valores de potencial zeta contra pH obtenidas se determinó el rango de valores de pH en el cual las moléculas de PBM y QUI presentaron las mayores diferencias estequiométricas en sus cargas electrostáticas de signo opuesto. Los valores de potencial zeta

constituyen un criterio para la selección del valor de pH al cual potencialmente existirá mayor interacción entre moléculas de biopolímeros para la formación de coacervados complejos estables (Espinosa-Andrews *et al*., 2007).

4.4 Evaluación de la formación de complejos pectina de bajo metoxilo-quitosano al variar el pH

El efecto del pH sobre la coacervación compleja entre PBM y QUI se evaluó modificando el procedimiento descrito por Devi y Maji (2010) como sigue:

(i) Dispersiones de PBM y QUI al 0.5 % p/p se ajustaron por separado a valores de pH de 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5 y 5.0, mediante el uso de HCl y NaOH 0.1 N, para preparar los CC codificados como: $CC_{PBM\text{-}QUI,\ 2.5}$, $CC_{PBM\text{-}QUI,\ 3.0}$, $CC_{PBM\text{-}QUI,\ 3.5}$, $CC_{PBM\text{-}QUI,\ 4.0}$, $CC_{PBM\text{-}QUI,\ 4.5}$ y $CC_{PBM\text{-}QUI,\ 5.0}$, respectivamente.

(ii) Dispersiones a cada valor de pH se mezclaron en una relación P_{PBM}: P_{QUI} igual a 2:1, conservando en todos los casos una concentración de biopolímeros total de 0.5 % p/p. Las mezclas se agitaron a temperatura ambiente usando un homogenizador (Ultra-Turrax® T 50 Basic IKA®-WERKE Works Inc., Wilmington, NC, EUA) operado a 5 200 rpm durante 10 min y se refrigeraron por 48 h a 5 °C para permitir la precipitación completa de los $CC_{PBM\text{-}QUI}$.

(iii) Las mezclas se centrifugaron (Hermle Z323 k, Hermle Labortechnik, Alemania) a 2 500 rpm por 30 min para separar los $CC_{PBM-QUI}$ insolubles de los complejos solubles o biopolímeros sin reaccionar presentes en el sobrenadante.

(iv) La absorbancia del sobrenadante se midió a 400 nm empleando un espectrofotómetro UV (Spectronics Genesys 5 UV/Vis, Spectronic Unicam, Rochester, NY, EUA). A esta longitud de onda los complejos solubles PBM-QUI mostraron mayor absorbancia que las dispersiones individuales de los biopolímeros. Mezclas de los biopolímeros se prepararon por triplicado y las mediciones de absorbancia de los sobrenadantes también se efectuaron por triplicado. El pH óptimo al cual la coacervación compleja entre PBM y QUI ocurre será aquél en el que el sobrenadante presente la menor absorbancia, debido a la separación de fases completa.

Cada una de las variaciones de $CC_{PBM-QUI}$ se preparó por triplicado, aplicando un diseño experimental completamente al azar.

4.5 Contenido de humedad y rendimiento de los coacervados complejos

El rendimiento de los $CC_{PBM-QUI}$ al variar el pH de formación, se determinó separando la fase coacervada de la fase en equilibrio mediante centrifugación a 5 000 rpm (Centrífuga Modelo PR-J, DAMON/IEC DIV. IEC, Damon Corp., MA, EUA) y posterior decantación. Los $CC_{PBM-QUI}$ preparados por triplicado, se secaron a 40 °C en una estufa para secado (Memmert, Wisconsin Oven

Distributors, Inc., WI, EUA) hasta peso constante. El rendimiento de los $CC_{PBM-QUI}$ se calculó usando la siguiente ecuación:

$$\%\ Rendimiento\ del\ coacervado = \left(\frac{m_i}{m_0}\right) * 100$$

Donde:

m_0, peso inicial de PBM + QUI

m_i, peso del $CC_{PBM-QUI}$ deshidratado (Espinosa *et al*., 2007).

4.6 Caracterización reológica de los coacervados complejos

Los $CC_{PBM-QUI}$ húmedos, después de un día de preparados, se sometieron a pruebas oscilatorias dinámicas en un reómetro Physica MCR 301 Dynamic Shear Rheometer (Anton Para Messtechnik, Stuttgart, Alemania), acoplado con una geometría cono-plato, de 50 mm de diámetro y un ángulo de 1° (CP50-1-SN5550); la distancia cono-plato se fijó en 0.051 mm. Muestras de $CC_{PBM-QUI}$ de aproximadamente 1.5 g se colocaron cuidadosamente en el plato a una temperatura de 5 °C y se sometieron a barridos de amplitud a 1 Hz de frecuencia, variando el porcentaje de deformación de 0.01 a 100, para caracterizar su región de comportamiento viscoelástico lineal (RVL). Posteriormente, muestras de 1.5 g de $CC_{PBM-QUI}$ se sometieron a barridos de frecuencia aplicando una deformación de 0.08 % (correspondiente a la RVL) y variando la frecuencia de 0.1 a 50 Hz, a 5 °C. Los valores de los módulos de

almacenamiento (G') y de pérdida (G''), así como los del factor de cedencia (tan δ = G''/G') de los $CC_{PBM-QUI}$, se obtuvieron mediante el software RheoPlus/32 V2.62 del equipo. Todas las mediciones se llevaron a cabo por triplicado.

4.7 Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

Se obtuvieron espectros FTIR tanto de muestras de los $CC_{PBM-QUI}$ secos, como de QUI y PBM en polvo, empleando un espectrofotómetro FT-IR GX System (Perkin–Elmer, Shelton, CT, EUA) acoplado con un accesorio de Reflexión Total Atenuada (ATR) DuraSample II. Los espectros fueron un promedio de 32 exploraciones de 4 000 a 600 cm^{-1} a una resolución de 4 cm^{-1}. Estas pruebas se realizaron por triplicado.

4.8 Análisis de datos

Los datos de rendimiento y contenido de humedad de los coacervados, así como aquellos correspondientes a sus propiedades reológicas se sometieron a análisis de varianza de clasificación simple, y en casos pertinentes a pruebas de Tukey de comparación de medias. La significancia establecida fue P = 0.05. El análisis de datos se realizó mediante el paquete estadístico Statgraphics Plus software (Statistical Graphics Corp., Manugistics, Inc., Cambridge, MA).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Puntos de equivalencia de las dispersiones de los biopolímeros

Se determinó el punto de equivalencia de las dispersiones de los biopolímeros a partir de sus curvas de titulación con NaOH 0.1 N (Figuras 4 y 5) y subsecuentemente se precisaron los miliequivalentes de NaOH, los cuales corresponden a los miliequivalentes de iones carboxilato ($-COO^-$) de la PBM e iones de amonio ($-NH_3^+$) del QUI. El número de miliequivalentes de iones carboxilato de PBM (1 % p/p) fue de 0.36 y aquellos de QUI (0.5 % p/p) de 0.65. Con base en estos datos, se estableció una relación en peso P_{PBM}: P_{QUI} igual a 4:1 como la adecuada para la preparación de $CC_{PBM-QUI}$. La neutralización de igual número de cargas electrostáticas de signo opuesto de moléculas de biopolímeros origina su neutralización mutua y la consecuente formación de CC (Espinosa *et al*., 2010).

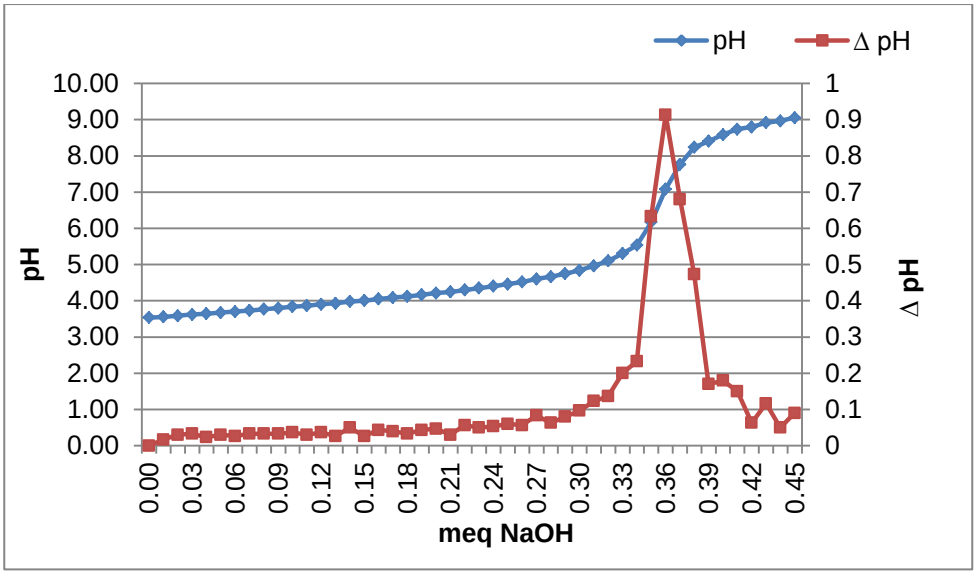


Figura 4. Curva de titulación de la dispersión de pectina de bajo metoxilo al 1 % p/p.

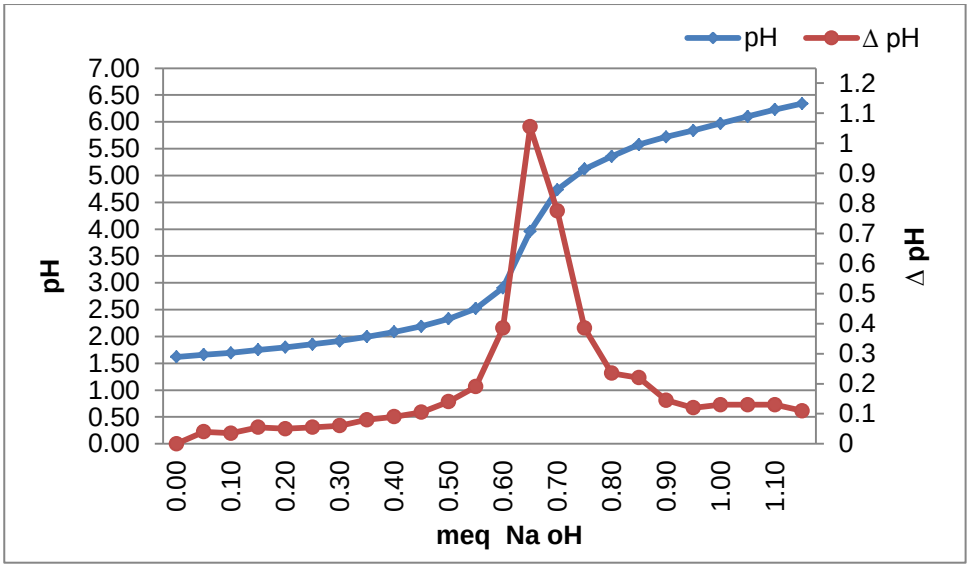


Figura 5. Curva de titulación de la dispersión de quitosano al 0.5 % p/p.

5.2 Valores de potencial zeta de las dispersiones de biopolímeros

En términos generales los valores de potencial Z de PBM y QUI disminuyeron conforme incrementó el pH (Figura 6); de esta manera, el potencial Z de la PBM disminuyó de -5.52 a -53.05 mV cuando se varió el pH de 2.0 a 7.0; mientras que el potencial Z de QUI disminuyó de 40.7 a 0.02 mV en el mismo rango de pH. Aumentos en los valores de pH de las dispersiones de PBM estuvieron asociados con incrementos en la formación de iones carboxilato ($–COO^-$) a partir de grupos carboxílicos (-COOH), reflejándose ello en valores negativos de mayor magnitud de potencial Z. Para el caso del QUI, aumentos en los valores de pH estuvieron relacionados con la neutralización de iones amonio ($-NH_3^+$) a iones amina ($-NH_2$), y en consecuencia con la disminución de la magnitud de los valores positivos de potencial Z.

En la Figura 6 se observa que el rango de pH en el cual las moléculas de PBM y QUI exhibieron cargas electrostáticas de signo contrario comparables en magnitud, estuvo comprendido entre los valores de 3.0 a 4.0, siendo el valor de 3.5 aquel en el que las cargas de ambos biopolímeros presentaron una relación estequiométrica más equilibrada.

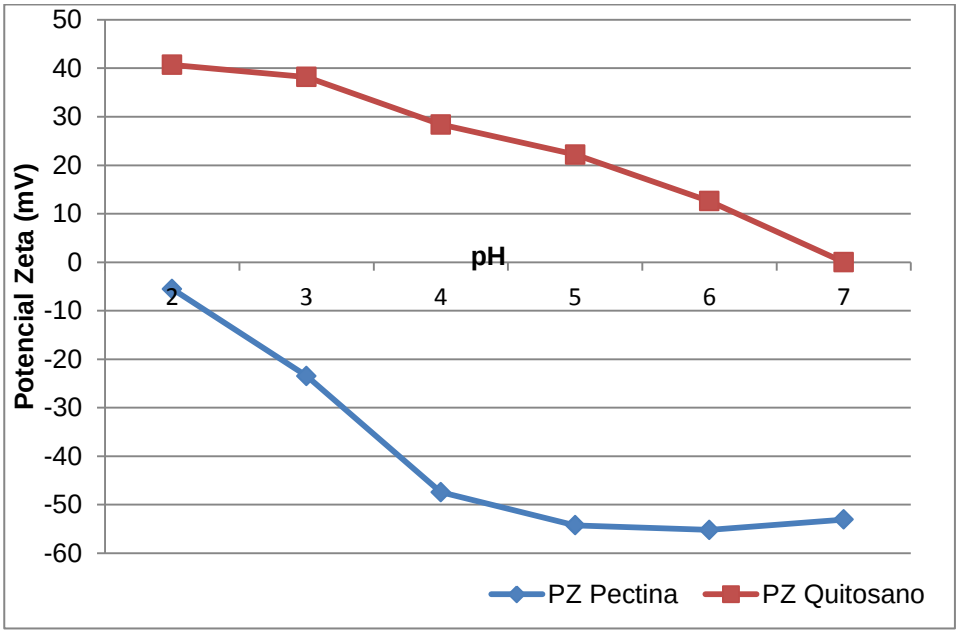


Figura 6. Variación del potencial Z de dispersiones de pectina y quitosano (1 % p/p) como función del pH.

5.3 Formación de coacervados complejos pectina de bajo metoxilo-quitosano

Se consideró que un valor de pH de 3.5, teóricamente establecido como el de máxima interacción entre PBM y QUI, representaría la formación de CC con aplicación reducida en la gran mayoría de los sistemas alimenticios; presentando en general estos últimos valores de pH mayores a 4.0. Así, con la finalidad de mover el rango de pH de formación de $CC_{PBM-QUI}$ hacia valores más elevados, se modificó la relación P_{PBM}: P_{QUI} de 4:1 a 2:1. Se ha informado que reducciones en la magnitud de la relación en peso biopolímero aniónico/biopolímero catiónico resultan en aumentos en los valores de pH de formación de CC entre sus moléculas (Wang *et al*., 2007).

La valoración de la formación de complejos entre PBM y QUI usando una relación P_{PBM}: P_{QUI} de 2:1 a diferentes valores de pH (2.5 a 5.0), mostró un perfil de % de absorbancia contra pH (Figura 7) caracterizado por tres regiones: (a) una región a valores de pH entre 2.5 a 3.0, en la que las lecturas de absorbancia fueron las más elevadas, como resultado de la formación de complejos PBM-QUI parcialmente solubles (Figura 8) mediante el enlace de moléculas de QUI con moléculas de PBM; (b) una región a valores de $3.0 < pH < 4.0$ en la que las lecturas de absorbancia disminuyeron pronunciadamente, como consecuencia del aumento considerable en la formación de $CC_{PBM-QUI}$ insolubles a través de incrementos en la neutralización de las cargas electrostáticas de ambos biopolímeros y (c) una región a valores de pH de 4 a 5.0, en la que las lecturas de absorbancia fueron las más bajas, sobre todo en el intervalo de pH 4.0 a 4.5, correspondiendo a la máxima separación de fases y formación de $CC_{PBM-QUI}$.

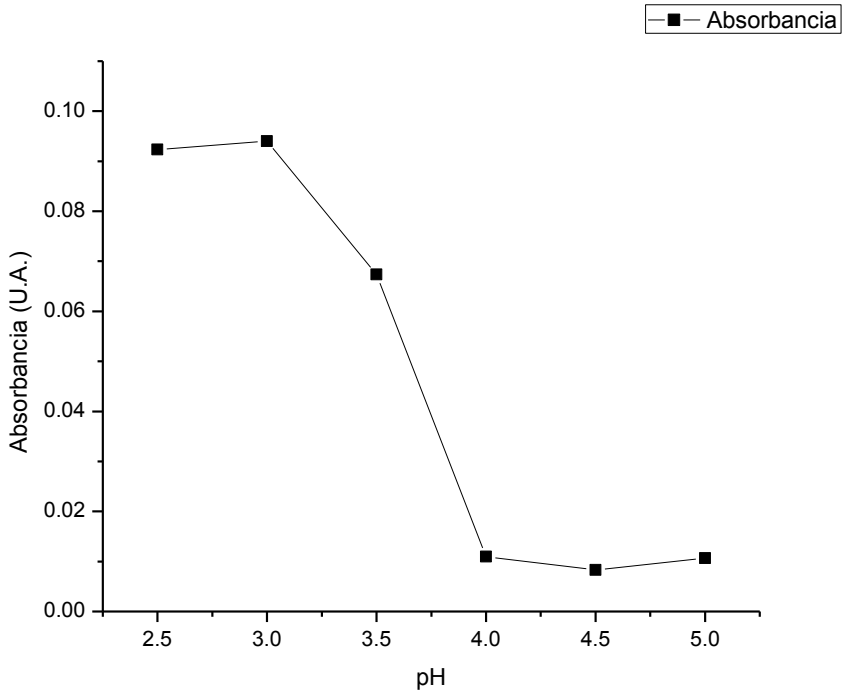


Figura 7. Absorbancia de la fase en equilibrio resultante de la interacción entre pectina de bajo metoxilo y quitosano al variar el pH.

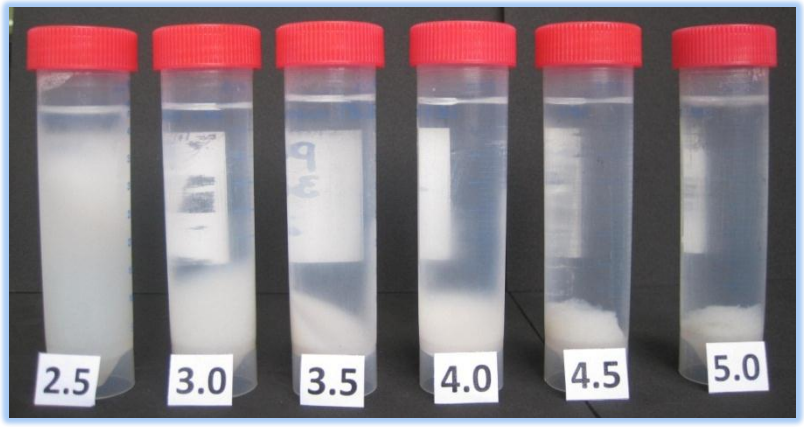


Figura 8. Fotografías de mezclas de pectina de bajo metoxilo y quitosano en una relación en peso 2:1, respectivamente, al variar el pH, después de haber sido sometidas a centrifugación.

5.4 Rendimiento y contenido de humedad de los coacervados complejos

Los resultados de absorbancia fueron acordes a los datos de rendimiento y contenido de humedad (Cuadro 1) obtenidos en los $CC_{PBM\text{-}QUI}$ al variar el pH de interacción de los biopolímeros. En general los $CC_{PBM\text{-}QUI,\ 2.5}$, $CC_{PBM\text{-}QUI,\ 3.0}$ y $CC_{PBM\text{-}QUI,\ 3.5}$ formados a valores de pH de 2.5, 3.0 y 3.5, respectivamente, presentaron los rendimientos más bajos y los contenidos de humedad más elevados (Cuadro 1). A partir de las características de los $CC_{PBM\text{-}QUI,\ 2.5}$, $CC_{PBM\text{-}QUI,\ 3.0}$ y $CC_{PBM\text{-}QUI,\ 3.5}$ puede inferirse que la interacción de las moléculas de PBM y QUI a valores de pH en el rango de 2 a 3.5, no involucraron una neutralización importante de sus cargas electrostáticas, manteniendo los complejos formados un carácter parcialmente soluble (Figura 8) relacionado con elevada capacidad ligante de agua y bajos rendimientos de complejos insolubles. En contraste, los complejos $CC_{PBM\text{-}QUI,\ 4.0}$, $CC_{PBM\text{-}QUI,\ 4.5}$ y $CC_{PBM\text{-}QUI,\ 5.0}$, formados a valores de pH de 4.0, 4.5 y 5.0, respectivamente tendieron a mostrar mayores rendimientos y menores contenidos de humedad que aquellos obtenidos a valores de pH de 2.5 a 3.5, como resultado de una mayor extensión de agregación y neutralización de las carga electrostática negativa de los grupos carboxilato de la pectina mediante grupos amonio del QUI cargados positivamente. De Moura *et al*., (2009) y Chen *et al*. (2010) informaron que además de interacciones iónicas entre grupos amonio y grupos carboxilato de quitosano y pectina, respectivamente, existen otros tipos de interacciones que se pueden presentar, tales como enlaces por puente de hidrógeno y enlaces covalentes.

Cuadro 1. Rendimiento y humedad del coacervado a diferentes valores de pH (medias ± DE, n = 9.0).

Código de coacervado complejo	**Rendimiento de coacervación (%)**	**Humedad (%)**
$CC_{PBM\text{-}QUI,\ 2.5}$	60.8 ± 2.6^{a}	98.9 ± 0.1^{e}
$CC_{PBM\text{-}QUI,\ 3.0}$	65.7 ± 0.8^{ab}	98.2 ± 0.1^{d}
$CC_{PBM\text{-}QUI,\ 3.5}$	67.5 ± 1.8^{b}	96.6 ± 0.1^{c}
$CC_{PBM\text{-}QUI,\ 4.0}$	74.9 ± 1.3^{cd}	95.2 ± 0.1^{b}
$CC_{PBM\text{-}QUI,\ 4.5}$	79.6 ± 6.1^{d}	94.4 ± 0.1^{a}
$CC_{PBM\text{-}QUI,\ 5.0}$	70.7 ± 0.1^{bc}	95.0 ± 0.3^{b}

^{a,b,c,d}: superíndices distintos en una misma columna indican que las medias difieren significativamente (P = 0.05).

5.5 Comportamiento reológico de los coacervados complejos

5.5.1 Barrido de amplitud

Los $CC_{PBM\text{-}QUI}$ son materiales viscoelásticos, por lo que sus propiedades reológicas se pueden describir mediante los parámetros módulo de almacenamiento (G'), el cual es una medida de su naturaleza elástica y módulo de pérdida (G''), el cual es una medida de su naturaleza viscosa (Lobato-

Calleros *et al.*, 2009). Los barridos de amplitud (Figura 9) mostraron diferencias en el comportamiento reológico de los $CC_{PBM-QUI}$ como resultado de variaciones en el valor de pH al cual se formaron.

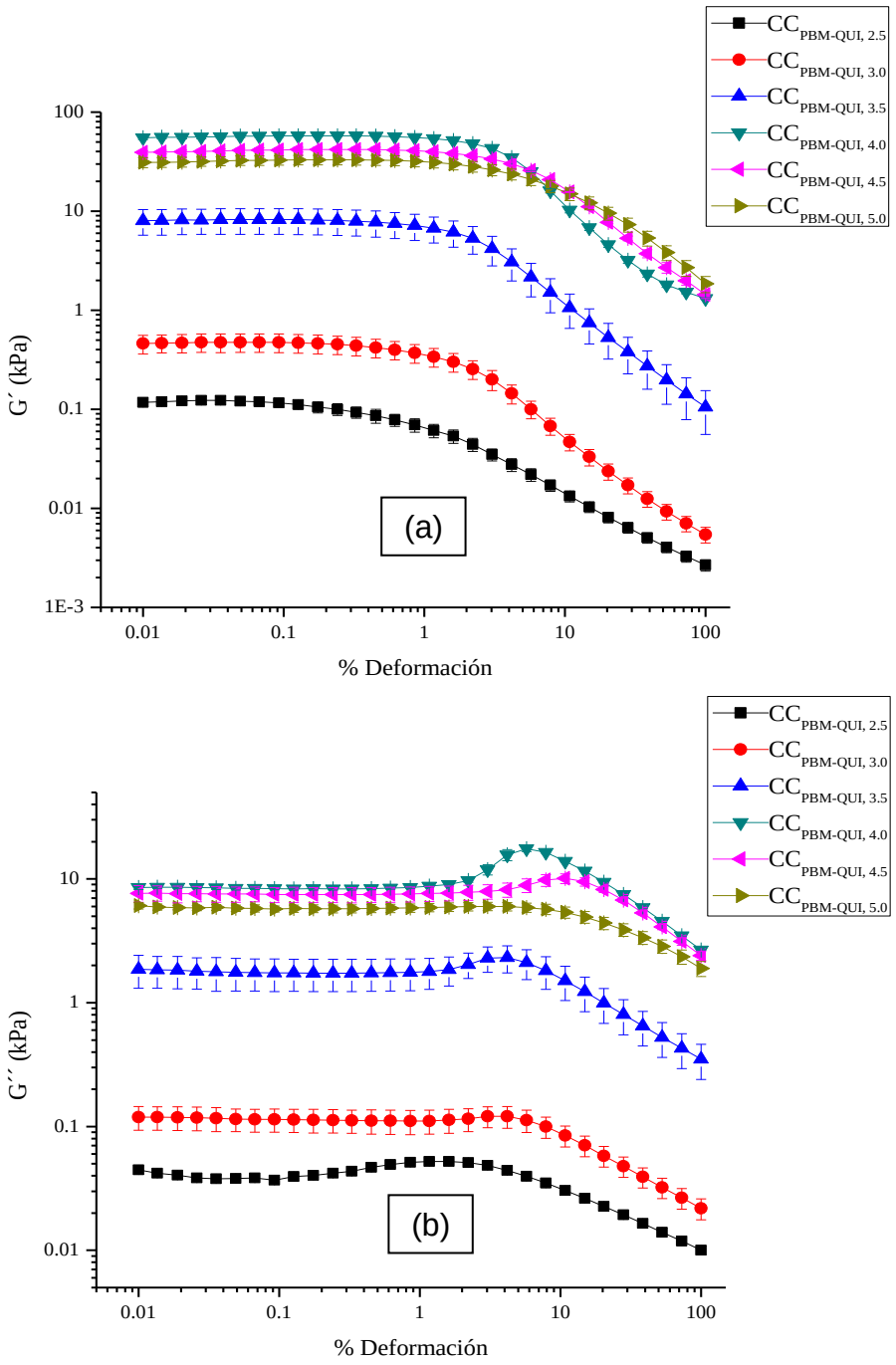


Figura 9. Variación del módulo de almacenamiento (G´) y del módulo de pérdida (G'') de los coacervados complejos como función de la deformación.

Todos los $CC_{PBM\text{-}QUI}$ mostraron perfiles de G' similares, caracterizados por una región lineal a valores bajos de % de deformación en la que los valores de G' se mantuvieron prácticamente constantes, seguida de una región no lineal a porcentajes de deformación mayores, en la cual los valores de G' sufrieron disminuciones pronunciadas. La inflexión descendente de las curvas de G' indican la ruptura de la estructura de los $CC_{PBM\text{-}QUI}$ y la cantidad de deformación que su estructura puede soportar antes de su ruptura es evidenciada por cambios en el punto de inflexión (Lobato-Calleros *et al*., 2009). En ese sentido, los datos de G' (Figura 9a) indicaron que el máximo % de deformación al cual los $CC_{PBM\text{-}QUI}$ exhibieron comportamiento viscoelástico lineal dependió del valor de pH al cual se formaron, variando de la siguiente manera: $CC_{PBM\text{-}QUI,\ 2.5}$ (0.09 %) < $CC_{PBM\text{-}QUI,\ 3.0}$ (0.13 %) < $CC_{PBM\text{-}QUI,\ 3.5}$ (0.17 %) < $CC_{PBM\text{-}QUI,\ 4.0}$ (0.24) < $CC_{PBM\text{-}QUI,\ 5.0}$ (0.28) < $CC_{PBM\text{-}QUI,\ 4.5}$ (0.36) a 1 Hz de frecuencia. Estos resultados indican que aumentos en el valor de pH en el rango de 2.5 a 4.5 promovieron la formación de estructuras de coacervados complejos que soportaron porcentajes de deformación crecientes antes de la ruptura de su estructura; mientras que la estructura del $CC_{PBM\text{-}QUI,\ 5.0}$ formada a pH igual a 5.0 presentó mayor susceptibilidad a la ruptura que aquella originada a pH de 4.5.

Los $CC_{PBM\text{-}QUI}$ mostraron valores de G' en la RVL (Cuadro 2) que variaron significativamente en su magnitud en el siguiente orden: $CC_{PBM\text{-}QUI,\ 2.5} = CC_{PBM\text{-}QUI,\ 3.0} < CC_{PBM\text{-}QUI,\ 3.5} < CC_{PBM\text{-}QUI,\ 5.0} < CC_{PBM\text{-}QUI,\ 4.5} < CC_{PBM\text{-}QUI,\ 4.0}$. La variación en los valores de G'' de los $CC_{PBM\text{-}QUI}$ en la RVL (Cuadro 2) fue similar a la

exhibida por los valores de G'. La variación de los valores de G' y G'' de los $CC_{PBM\text{-}QUI}$ como función del pH, indicaron que un valor de pH igual a 4.0 originó la estructura con mayor carácter viscoelástico; en contraste valores de pH de 2.5 y 3.0 rindieron las estructuras con menor carácter viscoelástico.

A pesar de las diferencias entre los valores de sus módulos G' y G'', todos los $CC_{PBM\text{-}QUI}$ presentaron comportamiento viscoelástico predominantemente elástico, evidenciado por los valores de Tan δ correspondientes a la RVL, los cuales variaron de 0.14 ($CC_{PBM\text{-}QUI,\ 4.0}$) a 0.32 ($CC_{PBM\text{-}QUI,\ 2.5}$) (Figura 10, Cuadro 2).

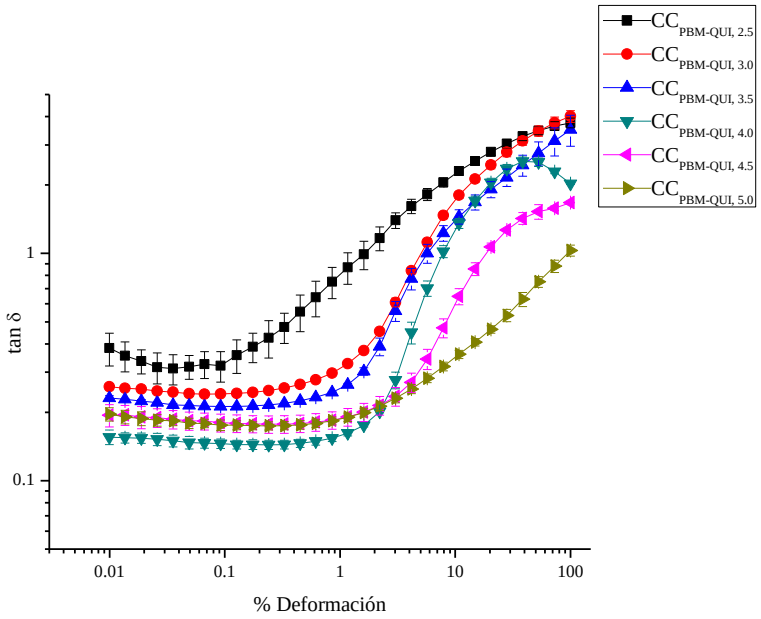


Figura 10. Variación del factor de cedencia (tan δ) de los coacervados complejos como función de la deformación.

Cuadro 2. Valores de los módulos de almacenamiento (G') y de pérdida (G'') y del factor de cedencia (Tan δ) de los coacervados complejos en la región viscoelástica lineal (medias $\pm$ DE, n= 9).

$CC_{PBM-QUI}$	G' (kPa)	G'' (kPa)	Tan δ
$CC_{PBM-QUI, 2.5}$	0.12 ± 0.1^{a}	0.04 ± 0.0^{a}	0.32 ± 0.1^{d}
$CC_{PBM-QUI, 3.0}$	0.47 ± 0.1^{a}	0.11 ± 0.0^{a}	0.24 ± 0.0^{c}
$CC_{PBM-QUI, 3.5}$	8.1 ± 2.4^{b}	1.7 ± 0.5^{b}	0.21 ± 0.0^{bc}
$CC_{PBM-QUI, 4.0}$	57.6 ± 1.2^{e}	8.3 ± 0.2^{e}	0.14 ± 0.0^{a}
$CC_{PBM-QUI, 4.5}$	40.3 ± 2.1^{d}	6.8 ± 1.0^{d}	0.17 ± 0.0^{ab}
$CC_{PBM-QUI, 5.0}$	33.0 ± 3.7^{c}	5.8 ± 0.4^{c}	0.17 ± 0.0^{ab}

^{a,b,c,d,e}: superíndices distintos en una misma columna indican que las medias difieren significativamente (P = 0.05).

Las diferencias observadas en el comportamiento reológico de los $CC_{PBM-QUI}$ pueden ser explicadas en términos de variaciones en la extensión de las interacciones y neutralización de las moléculas de PBM y QUI al cambiar el pH. Se ha informado que la neutralización mutua de las cadenas de biopolímeros cargados opuestamente, reduce la carga neta y la hidrofilicidad de las zonas de unión y promueve la conformación compacta del complejo, con las zonas de unión orientadas hacia su interior hidrofóbico (Tolstoguzov, 2003; de Kruif *et al*., 2004). En este sentido, a mayor extensión de interacciones electrostáticas tomando lugar entre las moléculas de PBM y QUI, mayor será la compactación y el carácter viscoelástico de las estructuras de los complejos biopoliméricos formados. Así, puede inferirse que valores de pH de 4.0 a 5.0, siendo más pronunciado el efecto del valor de pH de 4.5, favorecieron la interacción y

neutralización de las moléculas de PBM y QUI; mientras que valores de pH de 2.5 a 3.5 limitaron dicha interacción intermolecular.

En la región viscoelástica no lineal los valores de G' de los $CC_{PBM-QUI}$ disminuyeron pronunciadamente; mientras que aquellos de G'' mostraron una inflexión hacia valores más elevados, seguida de una disminución pronunciada en sus magnitudes al aumentar el % de deformación (Figura 9). El comportamiento de G' y G'' en esta región es conocido como "weak strain overshoot" o exceso de deformación débil. Este comportamiento es característico de asociaciones intermoleculares (principalmente por enlaces de hidrógeno e interacciones electrostáticas) entre polielectrolitos con estructura extendida, existiendo repulsión electrostática entre grupos cargados presentes en cadenas laterales (Hyun *et al*., 2002). A partir de la variación de los módulos G' y G'' de los $CC_{PBM-QUI}$ descrita, puede inferirse que la estructura de los $CC_{PBM-QUI}$ resistió un cierto límite de % de deformación, donde G'' aumenta; pero a deformaciones mayores su estructura comenzó a destruirse, alinieándose los elementos resultantes con el campo de flujo, disminuyendo así los valores de G''. El % de deformación al cual los $CC_{PBM-QUI}$ sufrieron la ruptura de su estructura convirtiéndose en materiales predominantemente viscosos (Tan $\geq$ 1.0), dependió del valor de pH al cual se formaron, variando de la siguiente manera: $CC_{PBM-QUI,\ 2.5}$ (2.2 %) < $CC_{PBM-QUI,\ 3.0}$ (5.7 %) = $CC_{PBM-QUI,\ 3.5}$ (5.7 %) < $CC_{PBM-QUI,\ 4.0}$ (7.1 %) < $CC_{PBM-QUI,\ 4.5}$ (19.5 %) < $CC_{PBM-QUI,\ 5.0}$ (98.9 %).

5.5.2 Barrido de frecuencia

Los barridos de frecuencia indicaron una relativamente baja dependencia de los módulos G' y G'' de los de los $CC_{PBM-QUI}$ a los valores de frecuencia aplicados (Figura 11). Las diferencias entre los valores logarítmicos de G' de los $CC_{PBM-QUI}$ al variar la frecuencia de 10 Hz a 0.05 Hz fueron: $CC_{PBM-QUI,\ 5.0}$ (0.32) < $CC_{PBM-QUI,\ 4.0}$ (0.34) < $CC_{PBM-QUI,\ 4.5}$ (0.35) < $CC_{PBM-QUI,\ 3.5}$ (0.36) < $CC_{PBM-QUI,\ 2.5}$ (0.37) < $CC_{PBM-QUI,\ 3.0}$ (0.44). Y las diferencias entre los valores logarítmicos de G'' de los $CC_{PBM-QUI}$ al variar la frecuencia de 10 Hz a 0.05 Hz fueron: $CC_{PBM-QUI,\ 4.5}$ (0.01) < $CC_{PBM-QUI,\ 4.0}$ (0.08) = $CC_{PBM-QUI,\ 5.0}$ (0.09) < $CC_{PBM-QUI,\ 2.5}$ (0.16) < $CC_{PBM-QUI,\ 3.5}$ (0.20) < $CC_{PBM-QUI,\ 3.0}$ (0.26). Los datos expuestos muestran que en términos generales, la estructura de los $CC_{PBM-QUI}$ formados a valores de pH entre 2.5 y 3.5 fue más susceptible a variaciones en la frecuencia, que aquellas correspondientes a los $CC_{PBM-QUI}$ formados a valores de pH mayores y son acordes al comportamiento de los $CC_{PBM-QUI,}$ observado durante los barridos de amplitud.

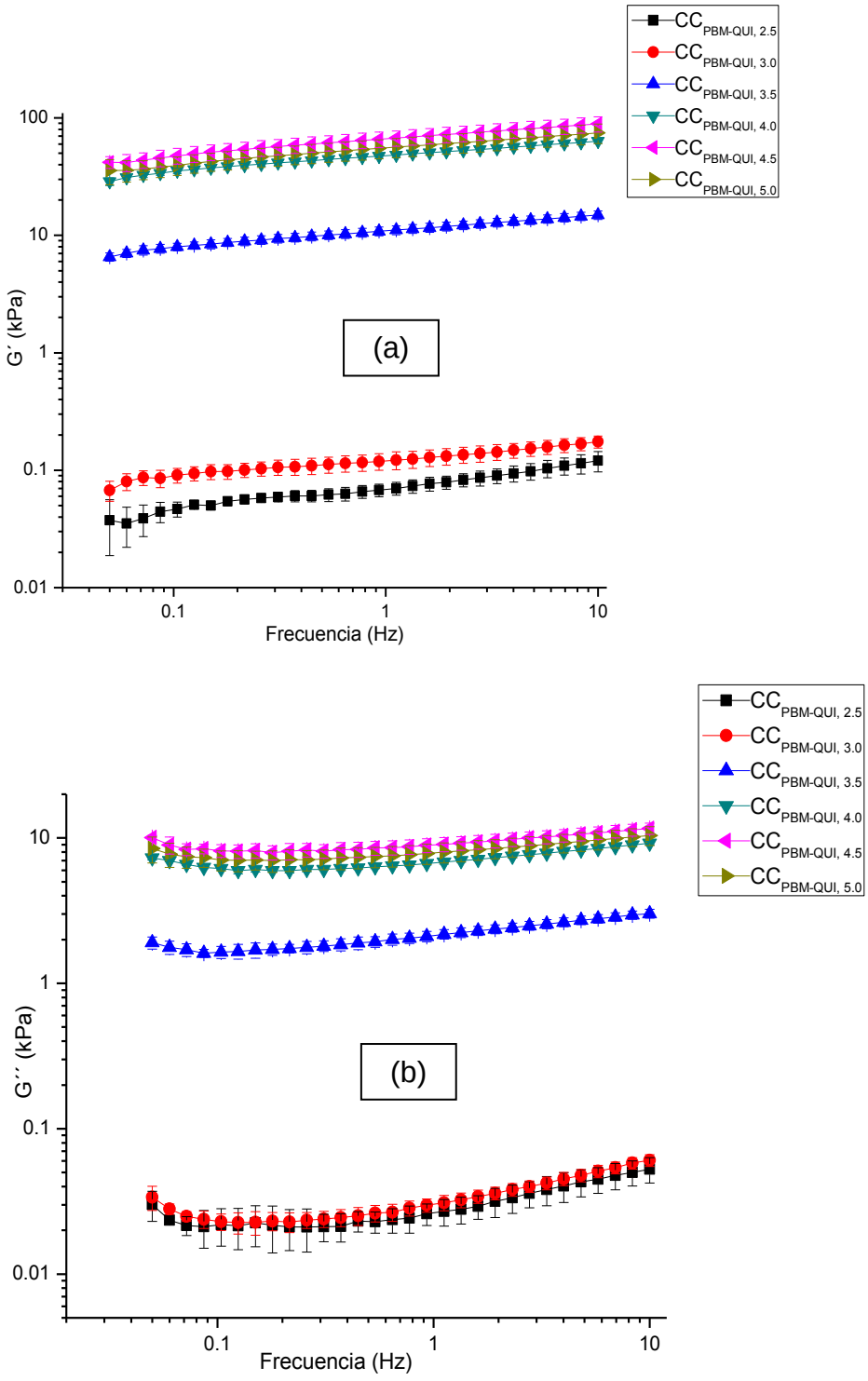


Figura 11. Variación del módulo de almacenamiento (G´) y del módulo de pérdida (G'') de los coacervados complejos como función de la frecuencia.

Todos los $CC_{PBM-QUI}$ presentaron comportamiento viscoelástico predominantemente elástico, al ser G' > G'' en todo el rango de frecuencia estudiado.

Con la finalidad de comparar el comportamiento de los $CC_{PBM-QUI}$ durante los barridos de frecuencia, se seleccionaron los valores de los módulos G' y G'' obtenidos a una frecuencia de 1 Hz (Cuadro 3), observándose que los $CC_{PBM-QUI}$ formados a valores de pH de 4.0 a 5.0 presentaron valores de G' y G'' significativamente mayores que aquellos correspondientes a los $CC_{PBM-QUI}$ obtenidos a valores de pH de 2.5 a 3.5. Estos resultados refuerzan la idea de que el número de cargas neutralizadas en PBM y QUI fue elevado a valores de pH entre 4.0 y 5.0, originándose así estructuras con relativamente alta resistencia a la deformación. La intensidad de las interacciones electrostáticas entre biopolímeros cargados opuestamente, puede ser controlada mediante variaciones en el pH (McClements, 2006; Singh *et al*., 2007).

Cuadro 3. Valores de los módulos de almacenamiento (G') y de pérdida (G'') de los coacervados complejos a 1 Hz de frecuencia (medias ± DE, n= 9).

Código del Coacervado	G´ (kPa)	G´´ (kPa)
$CC_{PBM\text{-}QUI,\ 2.5}$	0.07 ± 0.1^{a}	0.03 ± 0.0^{a}
$CC_{PBM\text{-}QUI,\ 3.0}$	0.12 ± 0.1^{a}	0.03 ± 0.0^{a}
$CC_{PBM\text{-}QUI,\ 3.5}$	10.83 ± 0.9^{a}	2.11 ± 0.17^{b}
$CC_{PBM\text{-}QUI,\ 4.0}$	47.37 ± 2.0^{b}	6.67 ± 0.2^{c}
$CC_{PBM\text{-}QUI,\ 4.5}$	65.97 ± 9.9^{c}	8.91 ± 1.0^{d}
$CC_{PBM\text{-}QUI,\ 5.0}$	55.07 ± 10.2^{bc}	7.84 ± 1.2^{cd}

^{a,b,c,d} superíndices distintos en una misma columna indican que las medias difieren significativamente (P = 0.05).

5.6 Espectroscopia Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR)

Con el objetivo de confirmar la interacción PBM-QUI, muestras de $CC_{PBM\text{-}QUI}$, PBM y QUI, fueron analizadas por Espectroscopía Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR), la cual es una técnica propuesta para investigar la interacción entre sustancias (Boonsongrit, *et al*., 2008). El espectro infrarrojo de una molécula es el resultado de transiciones entre dos diferentes niveles de energía vibracionales (Creswell *et al*., 1972). Los espectros de PBM, QUI y los $CC_{PBM\text{-}QUI}$ se muestran en la Figura 12. Los $CC_{PBM\text{-}QUI}$ fueron sometidos a previo secado para no tener interferencias debidas a absorción por el agua. Las frecuencias y la naturaleza de las bandas del espectro FTIR de PBM fueron típicas para este polisacárido; la banda ancha presente a 3237 cm^{-1} está

relacionada con grupos –OH, estas vibraciones extendidas ocurren dentro de un amplio intervalo de frecuencias que pueden ir desde 2500 cm^{-1} hasta 3750 cm^{-1} (McMurry, 2000; Gnanasambandam *et al*., 2000; Creswell *et al*., 1972) e indican varias características de un compuesto, que incluyen bandas extendidas de grupos hidroxilo libres. En el caso de la PBM la absorción en la región –OH se debe a los enlaces hidrógeno inter e intramoleculares del ácido galacturónico presente en el biopolímero. Otras bandas fueron observadas: 1736 cm^{-1} relacionada con grupos carbonilo esterificados (C=O) con una intensidad fuerte de los grupos carboxilo metoxilados; la banda 1595 cm^{-1} indica la presencia del ion carboxilato; aquella a 1372 cm^{-1} es referida a una absorción C-H; 1148 cm^{-1} y 1013 cm^{-1} pueden corresponder a una banda C=O extendida con una intensidad débil (Gnanasambandam *et al*., 2000).

El quitosano por su parte, mostró una banda a 3354 cm^{-1} relacionada con grupos –OH. A 2877 cm^{-1} se pudo notar la presencia de un pico que está relacionado con una vibración del enlace C-H; otra banda característica que puede observarse en el espectro es la que se dio a 1650 cm^{-1} debida a grupos C=O (Chen *et al*., 2010). Puede observarse también un pequeño pico alrededor de los 1590 cm^{-1} que puede ser atribuido al grupo amino de la glucosamina (Marudova *et al*., 2004). La vibración a 1376 cm^{-1} puede deberse a una flexión del enlace C-H (Creswell *et al*., 1972; Espinosa-Andrews *et al*., 2010). Por último la banda 1028 cm^{-1} puede ser atribuida a la estructura sacárida del quitosano (Boonsongrit *et al*., 2008).

Los $CC_{PBM-QUI}$, independientemente del valor de pH al que fueron formados, mostraron la misma tendencia en cuanto a las bandas de absorción. En todos ellos se mostró una primera banda de absorción comprendida entre 3298 cm^{-1} a pH 2.5, hasta 3329 cm^{-1} a pH 5.0 atribuidas a grupos –OH y $–NH_2$ (Espinosa-Andrews *et al*., 2010). Los grupos amino del quitosano pudieron interactuar iónicamente con los grupos carboxilo de la pectina, haciendo que los picos 1650 cm^{-1} (QUI) y 1595 cm^{-1} (PBM) se desplazaran entre 1620 cm^{-1} para pH 2.5, 1593 cm^{-1} a pH 3.0, 1590 cm^{-1} a pH 3.5 y pH 4.0, 1586 cm^{-1} y 1560 cm^{-1} a pH 5.0. Debido a la interacción, los grupos C=O sobre todo del quitosano y de la pectina, desaparecieron (Chen *et al*., 2010; Espinosa-Andrews *et al*., 2010; Marudova *et al*., 2004).

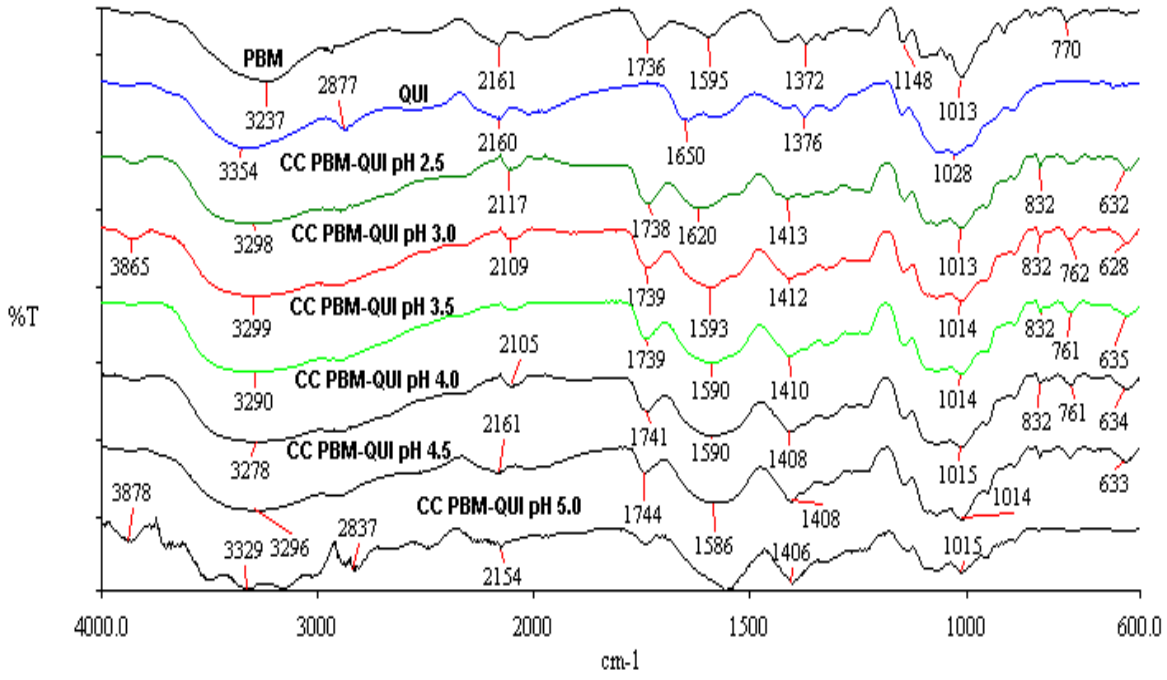


Figura 12. Espectros FTIR correspondientes a pectina de bajo metoxilo, quitosano y coacervados complejos formados a diferentes valores de pH.

6. CONCLUSIONES

Se obtuvieron coacervados complejos entre pectina de bajo metoxilo y quitosano, cuando estos biopolímeros se mezclaron en una relación en peso 2:1, respectivamente, en un intervalo de pH de 2.5 a 5.0. Obteniéndose rendimientos de coacervación mayores a valores de pH de 4.0 a 5.0.

Los resultados FTIR confirmaron que la formación de los coacervados complejos se originó a través de interacciones electrostáticas entre los grupos $-NH_3^+$ del quitosano y los grupos $-COO^-$ de la pectina.

El comportamiento reológico de los coacervados fue predominantemente elástico, independientemente del pH al cual se formaron.

Los valores más elevados de los módulos viscoelásticos (de almacenamiento y de pérdida) fueron exhibidos por los coacervados complejos formados a valores de pH de 4.0 a 5.0.

7. BIBLIOGRAFÍA

BeMiller J.N. and Whistler R.L. (1996). Carbohydrates, in Food Chemistry. 3a. Edición. Fennema O.R., Ed., Marcel Dekker, Nueva York, EUA.

Benichou, A., Aserin, A., Garti, N. (2002). Double emulsions stabilized by new molecular recognition hybrids of natural polymers. Polymers for Advanced Technologies, 13: 1019-1031.

Bohidar, H., Dubin, P., Majhi, P., Tribet, C., Jaeger, W. (2005). Effects of Protein Polyelectrolyte Affinity and Polyelectrolyte Molecular Weight on Dynamic Properties of Bovine Serum Albumin-Poly(diallyldimethylammonium chloride) Coacervates. Biomacromolecules 6:1573-1585.

Boonsongrit, Y., Mueller, B., Mitrevej, A. (2008). Characterization of drug–chitosan interaction by 1H NMR, FTIR and isothermal titration calorimetry. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 69: 388–395.

Chen, P-H., Kuo, T-Y., Kuo, J-Y., Tseng, Y-P., Wang, D-M., Lai, J-Y., Hsieh, H-J. (2010). Novel chitosan–pectin composite membranes with enhanced strength, hydrophilicity and controllable disintegration. Carbohydrate Polymers 82:1236–1242.

Claesson, P. and Ninhami B. (1992). pH-Dependent Interactions Between Adsorbed Chitosan Layers . Langmuir 8: 1406-1412.

Coelho, S., Moreno-Flores, S., Toca-Herrera, J., Coelho, M., Carmo, M., Rocha, S. (2011). Nanostructure of polysacharide complexes. Journal of Colloid and Interface Science 363:450–455.

Creswell, C. Runquist, O. Campbell, M. (1972). Spectral Analysis of organic compounds: An introductory programmed text. Burgess Publishing Company. Minneapolis, U.S.A.

Dash, M., Chiellini, F., Ottenbrite, R., Chiellini, E. (2011). Chitosan: A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. Progress in Polymer Science: 981–1014.

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

Dickinson, E. (1993). Protein-Polysaccharide Interactions in Food Colloids. Protein- Polysaccharide Interactions in Food Colloids: Stability and Mechanical Properties. Editado por E. Dickinson y P. Walstra. Melksham, Wiltshire: Royal Society of Chemistry.

Dickinson, E. (2003). Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. *Food Hydrocolloids*, 17, 25-39.

de Kruif, C. G., Tuinier, R. (2001). Polysaccharide protein interactions. Food Hidrocolloids, 15, 555-563.

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

De Luca, M., Terouzi, W., Ioele, G., Kzaiber, F., Oussama, A., Oliverio, F., Tauler, R., Ragno, G. (2011). Derivative FTIR spectroscopy for cluster analysis and classification of morocco olive oils. Food Chemistry 124: 1113–1118.

De Moura, M., Aouada, F., Avena-Bustillos, R., McHugh, T., Krochta, J., Mattoso, L. (2009). Improved barrier and mechanical properties of novel hydroxypropyl methylcellulose edible films with chitosan/tripolyphosphate nanoparticles. Journal of Food Engineering 92: 448–453.

Dogan, A., Siyakus, G., Severcan, F. (2007). FTIR spectroscopic characterization of irradiated hazelnut (Corylus avellana L.). Food Chemistry 100: 1106–1114.

Erickson, D., Li, D., Werner, C. (2000). An Improved Method of Determining the ζ-Potential and Surface Conductance. Journal of Colloid and Interface Science 232: 186-197.

Espinosa-Andrews, H., Báez-González, J.G., Cruz-Sosa, F., Vernon-Carter, E.J. (2007). Gum Arabic-chitosan complex coacervation. Biomacromolecules 8: 1313-1318.

Espinosa-Andrews, H., Lobato-Calleros, C., Loaeza-Corte, J., Beristain, C., Rodriguez-Hueso, M., Vernon-Carter, E. (2008). Cuantificación de la composición de coacervados de goma arábiga-quitosano por HPLC. Revista Mexicana de Ingeniería Química. Vol. 7, No. 3: 293-298.

Espinosa-Andrews, H., Sandoval-Castilla, O., Vázquez-Torres, H., Vernon-Carter, E., Lobato-Calleros, C. (2010). Determination of the gum Arabic–chitosan interactions by Fourier Transform Infrared Spectroscopy and characterization of the microstructure and rheological features of their coacervates. Carbohydrate Polymers 79: 541–546.

Farris, S., Schaich, K. M., Liu, L., Cooke, P. H. Piergiovanni, L., Yam, K. L. (2011). Gelatin-pectin composite films from polyion-complex hydrogels. Food Hydrocolloids, 25: 61-70.

Fuguet, E., Platerink, C., Janssen, H. (2007). Analytical characterisation of glutardialdehyde cross-linking products in gelatine–gum arabic complex coacervates. Analytica Chimica Acta, 604:45–53.

Girard, M., Sanchez, C., Laneuville, S. I., Turgeon, S. K., Gauthier, S. F. (2004). Associative phase separation of β-lactoglobulin/pectin solutions: a kinetic study by small angle static light scattering. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 35: 15-22.

Gnanasambandam, R. Proctor, A. (2000). Determination of pectin degree of esterification by diffuse reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. Food Chemistry 68:327-332.

Hyun, K., Kim, S. H., Ahn, K. H., Lee, S. J. (2002). Large amplitude oscillatory shear as a way to classify the complex fluids. Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics, 107: 51–65.

Hoare, T. R., Kohane, D. S. (2008). Hydrogels in drug delivery: progress and challenges. Polymer, 49(8): 1993-2007.

Kim, K., Son, J., Kim, S., Weller, C., Hanna, M. (2006). Properties of Chitosan Films as a Function of pH and Solvent Type. Journal of Food Science 71: E119-E124.

Kumar, G. S. (2006). Functional coatings and microencapsulation: A general perspective in functional coatings by polymer microencapsulation (Kumar

G. S. Ed.), Pp. 1-28. Wiley-VCH Verlag GmbH and Co. KGaA, Weinheim, República Federal de Alemania.

Lee, A. y Hong, Y. (2009). Coacervate formation of α-lactalbumin–chitosan and β-lactoglobulin chitosan complexes. Food Research International 42:733–738.

Lehninger A.L., Nelson D.L. y Cox M.M. (1993). Principles of Biochemistry. 2a. Edición. Worth publishers. Nueva York, EUA.

Liu, S., Cao, Y., Ghosh, S., Rousseau, D., Low, N. H., Nickerson, M. T. (2010). Intermolecular interactions during complex coacervation of pea protein isolate and gum arabic. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58: 552-556.

Lobato-Calleros, C., Recillas-Mota, M. T., Espinosa-Solares, T., Alvarez-Ramirez, J., Vernon-Carter, E.J. (2009). Microstructural and rheological properties of low-fat stirred yoghurts made with skim milk and multiple emulsions. Journal of Texture Studies, 40: 657-675.

Lutz, R., Aserin, A., Wicker, L., Garti, N. (2009). Structure and physical properties of pectins with block-wise distribution of carboxylic acid groups. Food Hydrocolloids 23:786–794.

Malkin, A. e Isayev, A. (2006). Rheology: Concepts, Methods and Aplications. Toronto, Canada. ChemTec Publishing.

Malvern Instruments. (2011). Zeta potential: An introduction in 30 minutes. Technical Note. http://www.nbtc.cornell.edu/facilities/downloads/Zeta%20potential%20

%20An%20introduction%20in%2030%20minutes.pdf. Fecha de consulta: 4/11/11.

Marudova, M., McDougall, A., Ring, S. (2004). Pectin–chitosan interactions and gel formation. Carbohydrate Research 339:1933–1939.

McClements, D.J. (1999). *Food Emulsions.* Principies, Practice and Techniques*.* Boca Raton, Londres, Nueva York, Washinton, D.C.: CRC Press.

McClements, D.J., Guzey D. (2006). Formation, stability and properties of multilayer emulsions for application in the food industry. Advances in Colloid and Interface Science, 125-130:227-248.

McMurry, J. (2000). Fundamentals of Organic Chemistry. Quinta edición. Brooks/Cole. Thompson Learning. E.U.A. Págs: 1280.

Mekhloufi, G., Sanchez, C., Renard, D., Guillemin, S., Hardy, J. (2005). pH-Induced Structural Transitions during Complexation and Coacervation of β –Lactoglobulin and Acacia Gum. Langmuir 21(1): 386-394.

Mohareb, E., Mittal, G. S. (2007). Formulation and process conditions for biodegradable/edible soy-based packaging trays. Packaging Technology and Science, 20(1): 1-15.

Mohnen, D. (2008). Pectin structure and biosynthesis. Current Opinion in Plant Biology. Elsevier 11:266–277.

Naumann, A., Heine, G., Rauber, R. (2010). Efficient discrimination of oat and pea roots by cluster analysis of Fourier transform infrared (FTIR) spectra. Field Crops Research 119: 78–84.

No, H., Meyers, S., Prinyawiwatkul, W., Xu, Z. (2007). Applications of Chitosan for Improvement of Quality and Shelf Life of Foods: A Review. R: Concise Reviews/Hypotheses in Food Science. Journal of Food Science. Vol. 00: R1-R14.

Pelloux, J., Rustérucci, C., Mellerowicz, E. (2007). New insights into pectin methylesterase structure and function. Trends in Plant Science, 12:1360-1385.

Patel, A. R., Velikov, K.P. (2011). Colloidal delivery systems in foods: A general comparison with oral drug delivery. Lebensmittel Wissenschaft und Technologie, 44: 1958-1964.

Prashanth, H. y Tharanathan, R. N. (2007). Chitin/chitosan: Modifications and their unlimited application potential – An overview. Trends in Food Science and Technology 18: 117–131.

Rao, M. (1999). Rheology of fluid and semisolid foods :Principles and applications. Gaithersburg, Maryland. United States of America. Aspen Publishers, Inc.

Ridley, B., O´Neill, M., Mohnen, D. (2001). Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. Phytochemistry 57: 929–967.

Rinaudo, M., Auzely, R., Vallin, C., Mullagaliev, I. (2005) Specific interactiosns in modified chitosan systems. Biomacromolecules 6, 2396-2407.

Sandoval, S. E. (2010). Coacervación compleja con mezclas de tres polisacáridos (goma arábiga- goma de mezquite-quitosano). Trabajo de tesis. Maestría en Ciencias en Ingeniería Química. División de Ciencias

Básicas e Ingeniería. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. México, D.F.

Schmitt, C., da Silva, T., Bovay, C., Rami-Shojaei, C., Frossard, P., Kolodziejczyk, E., Leser, M. (2005). Effect of Time on the Interfacial and Foaming Properties of β- lactoglobulin/Acacia Gum electrostatic Complexes and Coacervates at pH 4.2. Langmuir 21:7786-7795.

Singh, S. S., Siddhanta, A. K., Meena, R., Prasad, K., Bandyopadhyay, S., Bohidar, H. B. (2007). Intermolecular complexation and phase separation in aqueous solutions of oppositely charged biopolymers. International Journal of Biological Macromolecules, 41: 185-192.

Thermo Nicolet Corporation. (2001). Introduction to Fourier Transform Infrared Spectrometry. www.mmrc.caltech.edu/**FTIR**/**FTIR**intro.pdfHYPERLINK "/search?hl=es&rlz=1W1SNNT_esMX392&biw=1280&bih=495&q=related:mmrc.caltech.edu/FTIR/FTIRintro.pdf+ftir&tbo=1&sa=X&ei=9xy3TtahL9GpsAKlooiFBA&sqi=2&ved=0CFgQHzAB"Similares. Fecha de consulta: 6/11/11.

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

Walstra, P. (2003). Physical chemistry of foods. Marcel Dekker, Inc. NY, EUA. pp. 179–187.

Wang, X., Lee, J., Wang, Y-W., Huang, Q. (2007). Composition and Rheological Properties of β-Lactoglobulin/Pectin Coacervates: Effects of Salt Concentration and Initial Protein/Polysaccharide Ratio.Biomacromolecules 8:992-997.

Wei, Y.C. y Hudson, S.M. (1993). Binding of Sodium Dodecyl Sulfate to a Polyelectrolyte Based on Chitosan. Macromolecules 26: 4151-4154.

Weinbreck, F., Minor, M., De Kruif, C. (2004a). Microencapsulation of oils using whey protein/gum arabic coacervates. Journal of Microencapsulation.Taylor and Francis Health Sciences. Vol. 21, No. 6, 667-679.

Weinbreck, F., Tromp, R., de Kruif, C. (2004b). Composition and Structure of Whey Protein Gum Arabic Coacervates. Biomacromolecules 5: 1437-1445.

Willats, W., Knox, J., Mikkelsen, D. (2006). Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. Trends in Food Science & Technology 17: 97–104.

Xing, F., Cheng, G., Yang, L. (2004). Microencapsulation of Capsaicin by the Complex Coacervation of Gelatin, Acacia and Tannins. Journal of Applied Polymer Science 91(4): 2669-2675.

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

Yáñez F. J., Salazar M. J., Chaires M. L., Jiménez, H. J., Márquez R. M., y Ramos R. E. (2002). Aplicaciones biotecnológicas de la microencapsulación. Avance y Perspectiva. Vol. 21: 313-319 Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del CINVESTAV.