UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

POSGRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA

ESTUDIO REOLÓGICO Y TEÓRICO DE LA INTERACCIÓN κ-CARRAGENINA Y Ca^{2+}

TESIS

Que como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS AGROALIMENTARIAS

Presenta:

BERNABÉ LAUREANO LÓPEZ

Bajo la supervisión de:

ARTEMIO PÉREZ LÓPEZ, DR.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO 1854 COORDINACIÓN GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO

APROBADA

DCA

Chapingo, Estado de México, 29 de abril de 2022

ESTUDIO REOLÓGICO Y TEÓRICO DE LA INTERACCIÓN κ-CARRAGENINA Y Ca^{2+}

Tesis realizada por **BERNABÉ LAUREANO LÓPEZ** bajo la supervisión del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS AGROALIMENTARIAS

DIRECTOR: _____
Dr. Artemio Pérez López

CO-DIRECTORA: _____
Dra. María del Carmen Núñez Santiago

ASESOR: _____
Dr. Teodoro Espinosa Solares

ASESORA: _____
Dra. María Inés Nicolás Vázquez

LECTOR EXTERNO: _____
Dr. Emmanuel Flores Huicochea

CONTENIDO

LISTA DE CUADROS vi
LISTA DE FIGURAS vii
DEDICATORIAS x
AGRADECIMIENTOS xi
DATOS BIOGRÁFICOS xiii
RESUMEN GENERAL xiv
GENERAL ABSTRACT xv
1. INTRODUCCIÓN GENERAL 1
1.1 Objetivo general 3
1.2 Objetivos específicos 3
1.3 Hipótesis 3
1.4 Organización de la tesis 4
1.5 Literatura citada 5
2. REVISIÓN DE LITERATURA 7
2.1 Carrageninas 7
2.2 κ-Carragenina 14
2.2.1 Conformación en solución 15
Propiedades en solución de carrageninas en estado desordenado 15
2.2.2 Conformaciones en estado ordenado 16
Conformaciones helicoidales en el estado sólido 16
Transiciones conformacionales en solución 18
Efecto de cationes 19
2.2.3 Agregación y gelificación 21
2.2.4 Gelificación con Ca^{2+} 22
2.2.5 Mecanismo de gelificación 25
2.2.6 Microestructura de geles de κ-carragenina inducida por Ca^{2+} 27
2.4 Literatura citada 31

3. APLICACIÓN DEL MÉTODO DE LA TANGENTE DE δ EN LA DETERMINACIÓN DE LA TEMPERATURA DE FUSIÓN DE GELES DE κ-CARRAGENINA EN PRESENCIA DE IONES CALCIO 41
3.1 Resumen 41
3.2 Introducción 43
3.3 Materiales y métodos 46
3.3.1 Reactivos 46
3.3.2 Preparación de la solución 46
3.3.3 Reología 47
3.3.4 Calorimetría de barrido diferencial (CDB) 48
3.3.5 Microscopía electrónica de barrido ambiental 48
3.4 Resultados 48
3.4.1 Rampa de temperatura 48
3.4.2 Fusión del gel 50
3.4.3 Análisis del método de la tangente de δ 51
3.4.4 El exponente de relajación de la ley de potencia 52
3.4.5 Calorimetría diferencial de barrido (CDB) 54
3.4.6 Microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM) 56
3.5 Conclusiones 57
3.6 Literatura citada 57
4. MODELADO ESTRUCTURAL Y COMPORTAMIENTO REOLÓGICO DE κ-CARRAGENINA EN PRESENCIA DE IONES CALCIO 61
4.1. Resumen 61
4.2 Introducción 63
4.3 Material y métodos 66
4.3.1 Material y preparación de las soluciones 66
4.3.2 Mediciones reológicas 66
4.3.3 Barridos de deformación 67
4.3.4 Barridos de temperatura 67
4.3.5 Barridos de frecuencia 67

4.3.6 Determinación de las temperaturas de transición sol–gel y gel–sol por el método de la tangente de δ 68
4.3.7 Modelado computacional de las interacciones κ-carragenina–Ca^{2+} . 68
4.4 Resultados 70
4.4.1 Efecto de los iones Ca^{2+} sobre las temperaturas de gelificación y fusión del gel de κ-carragenina 70
4.4.2 El Diagrama de Transición 72
4.4.3 Modelado computacional 74
Galactosa-sulfato/Anhidrogalactosa (gsag) 74
Galactosa-sulfato/Anhidrogalactosa/Ca^{2+} (gsag–Ca^{2+}) 74
Anhidrogalactosa/Galactosa-sulfato/anhidrogalactosa (gs2ag) 78
Galactosa-sulfato/2anhidrogalctosa/Ca^{2+} (gs2ag-Ca^{2+}) 78
Galactosa-sulfato/anhidrogalactosa/Galactosa-sulfato/anhidrogalactosa (2gs2ag) 80
Galactosa-sulfato/anhidrogalactosa/Galactosa-sulfato/anhidrogalactosa/Ca^{2+} (2gs2ag–Ca^{2+}) 80
Galactosa-sulfato/anhidrogalactosa/Galactosa-sulfato/anhidrogalactosa/2Ca^{2+} (2gs2ag-2Ca^{2+}) 81
Puentes de hidrógeno intra e intermoleculares del modelo de κ-carragenina gs2ag/gs2ag 82
4.5 Discusión 85
4.6 Conclusiones 86
4.7 Referencias 87
5. CONCLUSIONES GENERALES 93

LISTA DE CUADROS

		Página
Cuadro 1	Composición y localización de algas rojas que contienen carrageninas	8
Cuadro 2	Diversas aplicaciones de las carrageninas en alimentos y productos lácteos	11
Cuadro 3	Descripción general de las propiedades de los tres tipos de carrageninas industrialmente más importantes	13
Cuadro 4	Modelos conformacionales de κ-carragenina analizados a nivel TFD utilizando el funcional de densidad M06-2X	69
Cuadro 5	Efecto de la concentración de Ca^{2+} en las temperaturas de transición T_g, T_m, histéresis térmica (ΔT) y G' en 1% κ-carragenina	71
Cuadro 6	Energía electrónica y relativa para los modelos de galactosa-sulfato/anhidrogalactosa y galactosa-sulfato/anhidrogalactosa-Ca^{2+}	75
Cuadro 7	Energía electrónica y relativa para los modelos de Anhidrogalactosa/galactosa-sulfato/anhidro-galactosa (gs2ag), sola y con un ion Ca^{2+}	78
Cuadro 8	Energía electrónica y relativa para los modelos de 2(galactosa-4S)/2(3,6-anhidro-galactosa) sola, con uno y con dos iones Ca^{2+}	83

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1	(a) Imágenes representativas de algas marinas rojas. (b) Estructuras químicas idealizadas de κ-, ι- y λ-carrageninas	7
Figura 2	Algunas aplicaciones de las carrageninas en la industria alimentaria	10
Figura 3	Representación esquemática de la estructura química de la molécula de κ-carragenina con el bloque de construcción disacárido marcado, correspondiente a los dos residuos consecutivos de 3,6-anhidrogalactosa (3,6-AnGal) y galactopiranosa-4-sulfato(Gal4S)	15
Figura 4	Estructuras de doble hélice propuestas para (a) κ-carragenina y (b) ι-carragenina	17
Figura 5	Variación de G' con el cambio en la relación calcio:carragenina para concentraciones de 0.5 % (○) y 1.0 % (●) de κ-carragenina	25
Figura 6	Efecto de la fuerza iónica sobre la cantidad de histéresis térmica entre las curvas de enfriamiento y calentamiento obtenidas por calorimetría diferencial de barrido	27
Figura 7	Micrografías por microscopía electrónica de barrido de redes de κ-carragenina. (a) 0.5 %, proporción añadida de Ca^{2+} 1:1; (b) 0.5 %, proporción añadida de Ca^{2+} 4:1; (c) 1.0 %, proporción añadida de Ca^{2+} 1:1; (d) 1.0 %, proporción añadida de Ca^{2+} 2:1	29
Figura 8	Imágenes por CLSM a 20 °C de geles de ι– y κ-carragenina (10 g L^{-1}) a diferentes concentraciones de $CaCl_2$	30

Figura 9	Dependencia de G' (símbolos rellenos) y G'' (símbolos vacíos) sobre la temperatura. Velocidad de calentamiento de 1 °C min^{-1} para 1% κ-carragenina + 20 mM Ca^{2+}. (ω = 6.283 rad seg^{-1}, deformación = 1%). Los datos experimentales representan la media de tres réplicas ± el error estándar	49
Figura 10	Variación de G' (símbolos rellenos) y G'' (símbolos vacíos) con la frecuencia y la temperatura para 1% κ-carragenina + 20 mM Ca^{2+} a 51.0 °C (círculos), 52.6 °C (cuadros), 53.8 °C (triángulos), 55.0 °C (triángulos invertidos) y 56.0 °C (rombos). Los datos experimentales representan la media de tres réplicas ± el error estándar	50
Figura 11	Método de la tangente de δ para 1% κ-carragenina + 20 mM Ca^{2+} a diferentes frecuencias (rad/s). 25.1 (círculos), 31.6 (cuadros), 39.8 (triángulos), 50.1 (triángulos invertidos), 63.0 (rombos) y 79.4 (cruces). Los datos corresponden al espectro mecánico mostrado en la Figura 10	52
Figura 12	Variación del exponente de la ley de potencia con la temperatura para el sistema 1% κ-carragenina + 20 mM Ca^{2+}. n' (triángulos) y n'' (círculos). Las líneas que unen los puntos de datos experimentales se incluyen solo como una guía para localizar mejor la temperatura de transición gel–sol	53
Figura 13	Curva de calentamiento por CDB para 1% κ-carragenina + 20 mM Ca^{2+}. Velocidad de escaneo: 1 °C min^{-1}	55
Figura 14	Imagen por microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM) de 1% κ-carragenina + 20 mM Ca^{2+}	56
Figura 15	Diagrama de transición sol–gel para la forma de potasio de κ-carragenina con y sin $CaCl_2$ agregado. Las líneas continuas son regresiones de datos obtenidos por reometría durante el enfriamiento (C) y el calentamiento (H).	73
Figura 16	Estructuras más estables optimizadas por M062X/6-311G(d,p). a_1) fórmula estructural de gsag. Modelos computacionales: a_2) gsag-6, b) gsag-4-Ca^{2+}, c) gsag-5-Ca^{2+}, d) gsag-7-Ca^{2+} y e) gsag-8-Ca^{2+}	77

Figura 17 Estructuras más estables por M062X/6-311G(d,p) optimizadas. a_1) Fórmula estructural de gs2ag. Modelos computacionales: a_2) gs2ag y b) gs2ag-3-Ca^{2+}. Las longitudes de enlace están en Å. Los átomos de oxígeno se ilustran en color rojo y los átomos de Ca^{2+} están en verde 79

Figura 18 Estructuras más estables optimizadas por M062X/6-311G(d,p). a_1) Fórmula estructural de 2gs2ag. Modelos computacionales: a_2) 2gs2ag, b) 2gs2ag-5-Ca^{2+}, c) 2gs2ag-6-Ca^{2+} y d) 2gs2ag-4-2-Ca^{2+}. Las longitudes de enlace están dadas en Å. Los átomos de oxígeno se ilustran en color rojo y los átomos de Ca^{2+} están en verde 81

Figura 19 Enlace de hidrógeno intramolecular (*) y seis puentes de hidrógeno intermoleculares de gs2ag/gs2ag del modelo de κ-carragenina 82

Figura 20 Mapa de potencial electrostático en la superficie de la densidad electrónica, a nivel de M06-2X/6-311G(d,p), calculado en la superficie de isodensidad 0.0004 a.u; para el modelo molecular de κ-carragenina y el ion Ca^{2+}. a) ion calcio, b) aggs, c) gs2ag, d) 2ag2gs y e) gs2ag/gs2ag 85

DEDICATORIAS

A mi familia, ustedes representan todo para mí…

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi *alma mater*, la **Universidad Autónoma Chapingo**, al Departamento de Ingeniería Agroindustrial y al Programa de Posgrado en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria por alojarme nuevamente en esta experiencia académica.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) la beca otorgada para la realización de estudios de doctorado (CVU: 408887).

Agradezco a la Coordinación General de Estudios de Posgrado de la Universidad Autónoma Chapingo el apoyo económico para investigación de Tesis de Estudiantes de Posgrado. Los recursos fueron cabalmente aprovechados en la adquisición de reactivos y la realización de análisis de laboratorio para el desarrollo del trabajo. Asimismo, el apoyo para la participación en el IX Congreso Internacional y XXIII Congreso Nacional de Ciencias Agronómicas, que se llevó a cabo en modalidad virtual del 5 al 8 de octubre de 2021.

Agradezco al Centro de Desarrollo de Productos Bióticos (CEPROBI) del Instituto Politécnico Nacional por haberme brindado la oportunidad de realizar una estancia de investigación durante el periodo del 4 de febrero al 31 de agosto de 2020, bajo la asesoría y el acogimiento de la Dra. María del Carmen Núñez Santiago.

Agradezco el apoyo del M. en C. Daniel Tapia Mauri, jefe del Laboratorio de Microscopía Correlativa en el CEPROBI–IPN, por su ayuda en la generación de microfotografías de las redes de gel mediante Microscopía Electrónica de Barrido Ambiental (ESEM).

Agradezco el apoyo del Dr. Edilso Francisco Reguera Ruiz, jefe del Laboratorio de Biomateriales del Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada (CICATA–IPN Unidad Legaria) y del Dr. Benjamín Portales Martínez, Profesor-investigador en el Posgrado en Tecnología Avanzada del CICATA–IPN Unidad Legaria, por su amplia disponibilidad y facilidades otorgadas para las determinaciones de micro-Calorimetría Diferencial de Barrido (micro-DSC).

Mi más sincero agradecimiento al Dr. Artemio Pérez López y a la Dra. María del Carmen Núñez Santiago por su acertada Dirección y Co-dirección, respectivamente, pero también por su calidez humana y empatía.

Agradezco al Dr. Teodoro Espinosa Solares y a la Dra. María Inés Nicolás Vázquez, la asesoría y el tiempo dedicado para la realización de este trabajo. A la Dra. Diana Guerra Ramírez el apoyo incondicional que me brindó durante mis estudios de Doctorado.

A mis compañeros de generación, especialmente al M.I. Abraham J. Arzeta Ríos, por su valiosa ayuda y consejos prácticos para el trabajo de laboratorio.

DATOS BIOGRÁFICOS



Datos personales

Nombre:	Bernabé Laureano López
Fecha de nacimiento:	11 de junio de 1986
Lugar de nacimiento:	Xicotepec de Juárez, Puebla
No. de Cartilla militar:	D-1768221
CURP:	LALB860611HPLRPR04
Profesión:	Ingeniero Agroindustrial
Cédula profesional:	6860436

Desarrollo académico:

Licenciatura:	Ingeniería Agroindustrial - UACh
Maestría en Ciencias:	Ciencia y Tecnología Agroalimentaria – UACh
Cédula de Maestría:	10884772

RESUMEN GENERAL

Estudio reológico y teórico de la interacción κ-carragenina y Ca^{2+}

La κ-carragenina es un galactano sulfatado, extraído a partir de diferentes especies de algas marinas rojas, principalmente de *Kappaphycus alvarezii* y es conocida por formar geles con diferente firmeza y resistencia a la temperatura dependiendo de la presencia de iones específicos. El objetivo del estudio fue explorar la gelificación y fusión del sistema κ-carragenina–Ca^{2+} utilizando reometría de cizalla oscilatoria de baja amplitud y química computacional para representar el diagrama de transición sol–gel y explicar la manera en la que interactúan las moléculas de polímero con los iones Ca^{2+}. Se demostró la aplicabilidad e idoneidad del método de la tan de δ para determinar las temperaturas de gelificación (T_g) y fusión (T_m) precisas del sistema κ-carragenina–Ca^{2+}. Se utilizó una concentración fija de polímero (1% p/p) y fuerza iónica en el intervalo de 0 a 100 mM. El comienzo de la gelificación en el enfriamiento y la pérdida de estructura del gel en el calentamiento se desplazaron a temperaturas progresivamente más altas tras la adición gradual de $CaCl_2$, con histéresis térmica. Se graficó la concentración iónica total (C_T) *versus* el inverso de las temperaturas T_g y T_m en un diagrama de transición que define al menos dos transiciones conformacionales para κ-carragenina sola y en presencia de iones Ca^{2+}. Las pendientes de regresión para las curvas de enfriamiento y calentamiento del diagrama de transición resultaron ser diferentes entre sí, indicando un posible punto crítico para valores de C_T por debajo de 10 mmol/dm^3. El modelado por computadora a nivel teoría del funcional de la densidad (TFD) reveló que la κ-carragenina puede presentar puentes de hidrógeno intra e intermoleculares y coordinación con iones Ca^{2+}.

Palabras clave: κ-carragenina, diagrama de transición, modelado molecular

---

Tesis de Doctorado en Ciencias Agroalimentarias. Departamento de Ingeniería Agroindustrial, Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: M. en C. Bernabé Laureano López
Director de Tesis: Dr. Artemio Pérez López

GENERAL ABSTRACT

Rheological and theoretical study of the κ-carrageenan and Ca^{2+} interaction

κ-carrageenan is a sulfated galactan extracted from different species of red seaweeds, mainly of *Kappaphycus alvarezii* and it is well known for forming gels with different firmness and temperature resistance depending on the presence of specific ions. The aim of the study was to explore gelling and melting of the κ-carrageenan–Ca^{2+} system by using of low-amplitude oscillatory rheometry and computational chemistry to represent the sol–gel transition diagram and explain how the polymer chains and Ca^{2+} ions interact. The applicability and suitability of the tan δ method to determine the accurate gelling (T_g) and melting (T_m) temperatures of the κ-carrageenan–Ca^{2+} system was demonstrated. A fixed concentration of polymer (1% w/w) and ionic strength in the range 0 to 100 mM was used. The onset of gelation on cooling and loss of gel structure on heating moved to progressively higher temperatures on progressive addition of $CaCl_2$, with thermal hysteresis. The ionic total concentration (C_T) was plotted against the inverse of T_g and T_m in a transition diagram that exhibit, at least, two conformational transitions for κ-carrageenan single and in the presence of calcium ions. The regression slopes for cooling and heating curves of the transition diagram were different from each other, suggesting a possible critical point for C_T values below 10 mmol/dm^3. The computer modelling at the density functional theory (DFT) level revealed that κ-carrageenan can exhibit intra- and intermolecular hydrogen bonding and coordination with Ca^{2+} ions.

Key words: κ-carrageenan, transition diagram, molecular modeling

---

Doctoral thesis. Doctorado en Ciencias Agroalimentarias. Departamento de Ingeniería Agroindustrial, Universidad Autónoma Chapingo.
Author: M. en C. Bernabé Laureano López
Thesis director: Dr. Artemio Pérez López

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

Formular y diseñar sistemas alimentarios adecuados, estables y duraderos ha sido un reto constante para la industria alimentaria. Cuando se adicionan carrageninas en alimentos, éstas generalmente interactúan con otros constituyentes como azúcares, sales u otras moléculas presentes y, la combinación de los diferentes componentes provoca cambios en sus propiedades reológicas. El grado de modificación de dichas propiedades dependerá, entre otros factores, de la concentración de la carragenina adicionada, así como de la concentración y tipo de sal presente.

La κ-carragenina es conocida por formar geles termorreversibles en un medio acuoso, durante su enfriamiento, a la concentración adecuada de polímero (Anderson, Campbell, Harding, Rees, & Samuel, 1969; Rochas & Rinaudo, 1984). La interacción con cationes favorece el ordenamiento de las cadenas de polímero y, consecuentemente, la gelificación (Hermansson, Eriksson, & Jordansson, 1991; Morris, 1986; Morris, Rees, & Robinson, 1980). Aunque la κ-carragenina tiene diferentes afinidades por algunos iones; como regla general, una concentración de sal creciente mejora el módulo elástico de un gel de κ-carragenina, siempre que la concentración de sal añadida no sea demasiado grande (Chen, Liao, & Dunstan, 2002; Kara, Tamerler, Bermek, & Pekcan, 2003; Rochas, Rinaudo, & Landry, 1990). En el caso de los cationes de Ca^{2+}, la relación estequiométrica que proporciona los geles más fuertes es de un mol de calcio por cada grupo sulfato en el dímero estructural de κ-carragenina (Doyle, Giannouli, Philp, & Morris, 2002).

Los geles formados por el sistema κ-carragenina–Ca^{2+} son fuertes (Michel, Mestdagh, & Axelos, 1997), pero turbios (MacArtain, Jacquier, & Dawson, 2003;

Thrimawithana, Young, Dunstan, & Alany, 2010). Sin embargo, no presentan sinéresis (Bui, Nguyen, Renou, & Nicolai, 2019) y tienen temperaturas de fusión relativamente bajas (Liu & Li, 2016), lo que los hace de gran interés en aplicaciones alimentarias.

La caracterización reológica de un gel es de gran importancia ya que puede ayudar a establecer la relación entre sus constituyentes y estructura (Fischer, Pollard, Erni, Marti, & Padar, 2009); por esta razón, es importante determinar no solo la temperatura de gelificación (T_g) sino también la temperatura de fusión (T_m) para obtener un espectro completo del comportamiento del gel.

En un diagrama de transición sol–gel, se pueden representar los diferentes valores del logaritmo de la concentración iónica total (C_T) frente a las T_g y T_m, expresadas como el recíproco de la temperatura absoluta (T^{-1}) (Rochas & Rinaudo, 1980). El diagrama de transición describe el estado de las moléculas de κ-carragenina en solución acuosa mediante la relación $C_T = C_s + \bar{\gamma} C_p$, donde C_s es la concentración iónica de la sal, C_p es la concentración iónica del polisacárido y $\bar{\gamma}$ es el coeficiente de actividad promedio del catión (Núñez-Santiago, Tecante, Garnier, & Doublier, 2011). Para la sal de K^+ – κ–carragenina purificada (Rochas, 1982) y de una preparación comercial sin purificar (Núñez-Santiago & Tecante, 2007) en presencia de iones K^+, el diagrama de transición sol–gel es conocido; sin embargo, aún no ha sido especificado un diagrama de transición para κ-carragenina en solución acuosa y en presencia de iones de calcio.

Por tal motivo, obtener el diagrama de transición sol-gel de κ-carragenina en presencia de iones Ca^{2+} es indispensable para disponer de información que ayude a comprender la interacción entre estas moléculas y así mejorar su uso industrial.

Los objetivos del presente trabajo fueron:

1.1 Objetivo general

Explorar la gelificación y fusión del sistema κ-carragenina–Ca^{2+} utilizando reometría de cizalla oscilatoria de baja amplitud y química computacional para representar el diagrama de transición sol–gel y explicar la manera en la que interactúan las moléculas de polímero con los iones Ca^{2+}.

1.2 Objetivos específicos

- Determinar las temperaturas de gelificación y fusión mediante el método de la tan de δ para para obtener el perfil reológico completo del sistema κ-carragenina–Ca^{2+}
- Proponer el diagrama de transición sol-gel para la sal de K^+ de κ-carragenina mediante reometría, para establecer la relación entre la concentración iónica total (C_T) y los valores del inverso de las temperaturas absolutas T_g y T_m.
- Examinar las interacciones moleculares entre las cadenas de polímero y los cationes Ca^{2+} con base en metodologías de la química computacional para evaluar sus propiedades de coordinación en medio acuoso.

1.3 Hipótesis

De acuerdo con la revisión bibliográfica, los iones K^+ promueven la agregación de hélices adhiriéndose a la superficie de hélices individuales y suprimiendo la repulsión electrostática entre ellas; sin embargo, el Ca^{2+}, se une directamente entre las hélices. Se ha atribuido la fuerte disminución de los módulos, a concentraciones de Ca^{2+} por arriba de la concentración estequiométrica molar (12.5 mM de ca^{2+}), a la agregación excesiva de hélices (incipiente precipitación), causando el colapso parcial de la estructura de red. La hipótesis propuesta es que la adición de cationes Ca^{2+} a sistemas acuosos de κ-carragenina, modificará sus propiedades reológicas en relación con aquellas del polisacárido sin la adición de iones. Este comportamiento reológico, a la vez, estará influenciado por

las conformaciones que adopte la κ-carragenina como función de factores de su entorno, principalmente la concentración iónica total (C_T) y la temperatura.

1.4 Organización de la tesis

El documento está organizado en capítulos con formato de artículo. El capítulo 1, presenta una introducción general que proporciona, en breve, los tópicos que dan lugar al planteamiento del problema de investigación y la forma en cómo este problema fue atendido.

El capítulo 2, presenta una revisión de lo que, a la fecha, es conocido en relación con el proceso de gelificación de κ-carragenina inducida por cationes Ca^{2+}. Sin embargo, dado que los estudios disponibles en la literatura están mayormente enfocados en la gelificación de κ-carragenina inducida por iones K^+, se ha aprovechado para destacar las diferencias y/o similitudes del efecto del catión monovalente frente al de uno divalente. Consecuentemente, el desarrollo de esta investigación proporcionará información que permitirá explotar aún más la gama de aplicaciones prácticas del biopolímero.

El capítulo 3, atiende actividades de los objetivos particulares, especialmente la aplicación del método de la tan de δ para la determinación de la temperatura de fusión precisa del gel formado por 1% κ-carragenina en presencia de 20 mM de $CaCl_2$. Esta temperatura fue comparada con aquella obtenida mediante la técnica de calorimetría diferencial de barrido (DSC) y explorar la microestructura de los geles mediante microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM). De manera conjunta, este capítulo aporta amplios resultados para el alcance del objetivo general del trabajo.

El Capítulo 4 presenta el diagrama de transición sol–gel en presencia de iones Ca^{2+} así como el modelado computacional (a nivel TFD) para comprender las interacciones entre las cadenas de polímero y los cationes divalentes. Estos resultados contribuyen para comprender el mecanismo de gelificación de κ-carragenina en presencia de Ca^{2+}, que aún no está dilucidado por completo.

1.5 Literatura citada

Anderson, N. S., Campbell, J. W., Harding, M. M., Rees, D. A., & Samuel, J. W. B. (1969). X-ray diffraction studies of polysaccharide sulphates: Double helix models for κ- and ι-carrageenans. *Journal of Molecular Biology*, *45*(1), 85–97. https://doi.org/10.1016/0022-2836(69)90211-3

Bui, V. T. N. T., Nguyen, B. T., Renou, F., & Nicolai, T. (2019). Rheology and microstructure of mixtures of iota and kappa-carrageenan. *Food Hydrocolloids*, *89*, 180–187. https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2018.10.034

Chen, Y., Liao, M.-L., & Dunstan, D. E. (2002). The rheology of K^+–κ-carrageenan as a weak gel. *Carbohydrate Polymers*, *50*(2), 109–116. https://doi.org/10.1016/S0144-8617(02)00009-7

Doyle, J., Giannouli, P., Philp, K., & Morris, E. (2002). *Effect of K^+ and Ca^{2+} cations on gelation of κ-carrageenan*. In Gums and Stabilisers for the Food Industry (Vol. 11). https://doi.org/10.1039/9781847551016-00158

Fischer, P., Pollard, M., Erni, P., Marti, I., & Padar, S. (2009). Rheological approaches to food systems. *Comptes Rendus Physique*, *10*(8), 740–750. https://doi.org/10.1016/j.crhy.2009.10.016

Hermansson, A.-M., Eriksson, E., & Jordansson, E. (1991). Effects of potassium, sodium and calcium on the microstructure and rheological behaviour of kappa-carrageenan gels. *Carbohydrate Polymers*, *16*(3), 297–320. https://doi.org/10.1016/0144-8617(91)90115-S

Kara, S., Tamerler, C., Bermek, H., & Pekcan, Ö. (2003). Cation effects on sol–gel and gel–sol phase transitions of κ-carrageenan–water system. *International Journal of Biological Macromolecules*, *31*(4), 177–185. https://doi.org/10.1016/S0141-8130(02)00080-6

Liu, S., & Li, L. (2016). Thermoreversible gelation and scaling behavior of Ca^{2+}-induced κ-carrageenan hydrogels. *Food Hydrocolloids*, *61*, 793–800. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.07.003

MacArtain, P., Jacquier, J. C., & Dawson, K. A. (2003). Physical characteristics of calcium induced κ-carrageenan networks. *Carbohydrate Polymers*, *53*(4), 395–400. https://doi.org/10.1016/S0144-8617(03)00120-6

Michel, A.-S., Mestdagh, M.M., & Axelos, M.A.V. (1997). Physico-chemical properties of carrageenan gels in presence of various cations. *International Journal of Biological Macromolecules*, *21*(1–2), 195–200. https://doi.org/10.1016/S0141-8130(97)00061-5

Morris, E. R. (1986). Molecular Interactions in Polysaccharide Gelation. *British Polymer Journal*, *18*(1), 14–21. https://doi.org/10.1002/pi.4980180105

Morris, E. R., Rees, D. A., & Robinson, G. (1980). Cation-specific aggregation of carrageenan helices: Domain model of polymer gel structure. *Journal of Molecular Biology*, *138*(2), 349–362. https://doi.org/10.1016/0022-2836(80)90291-0

Núñez-Santiago, M. C., Tecante, A., Garnier, C., & Doublier, J. L. (2011). Rheology and microstructure of κ-carrageenan under different conformations induced by several concentrations of potassium ion. *Food Hydrocolloids*, *25*(1), 32–41. https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2010.05.003

Núñez-Santiago, M. C., & Tecante, A. (2007). Rheological and calorimetric study of the sol–gel transition of κ-carrageenan. *Carbohydrate Polymers*, *69*(4), 763–773. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.02.017

Rochas, C., Rinaudo, M., & Landry, S. (1990). Role of the molecular weight on the mechanical properties of kappa carrageenan gels. *Carbohydrate Polymers*, *12*(3), 255–266. https://doi.org/10.1016/0144-8617(90)90067-3

Rochas, C, & Rinaudo, M. (1980). Activity coefficients of counterions and conformation in kappa-carrageenan systems. *Biopolymers*, *19*(9), 1675–1687. https://doi.org/10.1002/bip.1980.360190911

Rochas, C, & Rinaudo, M. (1984). Mechanism of gel formation in κ-carrageenan. *Biopolymers*, *23*(4), 735–745. https://doi.org/10.1002/bip.360230412

Rochas, C. (1982). Étude de la transition sol-gel du kappa-carraghénane. Thèse Docteur, Institut National Polytechnique de Grenoble, France.

Thrimawithana, T. R., Young, S., Dunstan, D. E., & Alany, R. G. (2010). Texture and rheological characterization of kappa and iota carrageenan in the presence of counter ions. *Carbohydrate Polymers*, *82*(1), 69–77. https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2010.04.024

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Carrageninas

Carragenina es el nombre general para un grupo de polisacáridos sulfatados, de alto peso molecular, formados por unidades alternas de disacárido D-galactosa y 3, 6-anhidro-galactosa unidas por enlaces glicosídicos α-(1 → 3) y β-(1 → 4) (Black, Blakemore, Colquhoun & Dewar, 1965). Estos polisacáridos son extraídos a partir de algas marinas rojas de la familia Rhodophyceae (Figura 1), comúnmente a partir de géneros como *Eucheuma*, *Solieria*, *Crispus*, *Agardhiella*, *Chondrus*, *Hypnea*, *Sarconema*, *Iridaea* y *Gigartinastellate* (Campo, Kawano, Silva & Carvalho, 2009; Stanley, 1990).

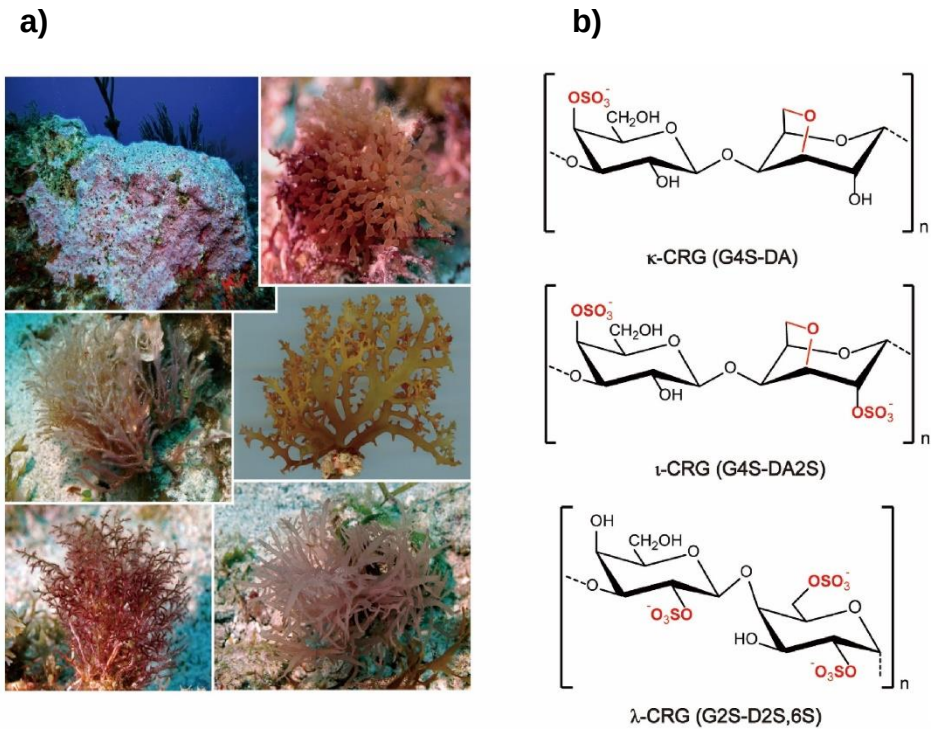


Figura 1. (a) Imágenes representativas de algas marinas rojas. (b) Estructuras químicas idealizadas de κ-, ι- y λ- carrageninas (Jiang, Zhang, Ni, & Shao, 2021).

Las carrageninas son producidas usando dos métodos de extracción, que dan como resultado el aislamiento de polvos semirrefinados o refinados (Rudolph, 2000). El Cuadro 1 lista las especies de algas que han sido cultivadas comercialmente para la producción de carragenina. Durante el proceso de extracción de carragenina semirrefinada, se hace reaccionar una solución de KOH con los ésteres de sulfato de los precursores de carrageninas (μ- y ν-) a temperatura alta, lo que resulta en un aumento de la estructura 3,6-anhidrogalactosa y, consecuentemente, la producción de κ– o ι– carragenina, respectivamente (Campo et al. 2009; Knutsen, Myslabodski, Larsen, & Usov, 1994).

Cuadro 1. Composición y localización de algas rojas que contienen carrageninas.

Especie	Localización	Tipo de carragenina
Eucheuma cottonii	Filipinas, Indonesia	κ
Eucheuma spinosum	Filipinas, Indonesia	ι
Chondrus crispus	Canadá, EUA, Francia	λ, κ
Chondrus ocellatus	Corea	λ, κ
Gigartina stellata	Francia, España	λ, κ
Gigartina acicularis	Francia, España, Portugal y Marruecos	λ
Gigartina pistillata	Francia, España, Portugal y Marruecos	λ
Gigartina canaliculata	México	λ, κ
Gigartina chamissoi	México	λ, κ
Gigartina rádula	Chile	λ, κ
Gigartina skottsbergii	Chile	λ, κ
Furcellaria fastigiata	Dinamarca, Canadá	λ, κ
Hypnea musciformis	Carolina del Norte, Brasil	κ

Fuente: Stanley, 1990.

El uso de las carrageninas se originó probablemente en Irlanda hace varios cientos de años donde la especie de alga roja *Chondrus crispus*, llamada ‘Irish

moss', fue usada como espesante en alimentos. Durante el siglo XIX, su uso llegó a ser más frecuente, principalmente debido a que se ocupaba para la clarificación industrial de cerveza y el apresto de telas, un tratamiento aplicado para proporcionar firmeza y lustre a los tejidos textiles. En la década de 1930, la producción de carragenina se había extendido a los Estados Unidos, pero no se produjo un verdadero auge hasta la segunda guerra mundial, cuando al verse impedidos la producción y el comercio de agar, se produjo como resultado un aumento en la producción de carragenina (Therkelsen, 1993).

Las carrageninas son utilizadas en gran variedad de aplicaciones tanto en productos alimenticios como en no alimenticios. En la industria alimentaria, las carrageninas han sido ampliamente utilizadas debido a sus excelentes propiedades físicas y funcionales, tales como su capacidad gelificante, estabilizante, emulsificante y espesante (Kozlowska, Pauter, & Sionkowska, 2018; Sason & Nussinovitch, 2018). Entre las diversas aplicaciones de las carrageninas en alimentos (Figura 2), es muy frecuente su uso para mejorar la calidad de postres lácteos, pudines y quesos (Zia et al., 2017). En productos cárnicos, contribuyen a la formación del gel y a la retención de agua (Trius, Sebranek & Lainer, 1996). En alimentos fritos, evitan la absorción excesiva de aceite durante los procesos de pre-fritura y fritura y, cuando se agregan a la masa junto con otros ingredientes, actúan como agentes de control de viscosidad, mejoran la adherencia, el control de la congelación y descongelación o ayudan a retener la frescura de los alimentos fritos o empanizados (Varela & Fiszman, 2011). Algunas otras aplicaciones de las carrageninas en alimentos y productos lácteos pueden observarse en el Cuadro 2.

Además de estas funciones, las carrageninas son empleadas en medicina experimental, formulaciones farmacéuticas, cosméticas y en numerosas aplicaciones industriales (Li, Ni, Shao, & Mao, 2014; Liu, Zhan, Wan, Wang, & Wang, 2015; Necas & Bartosikova, 2013).

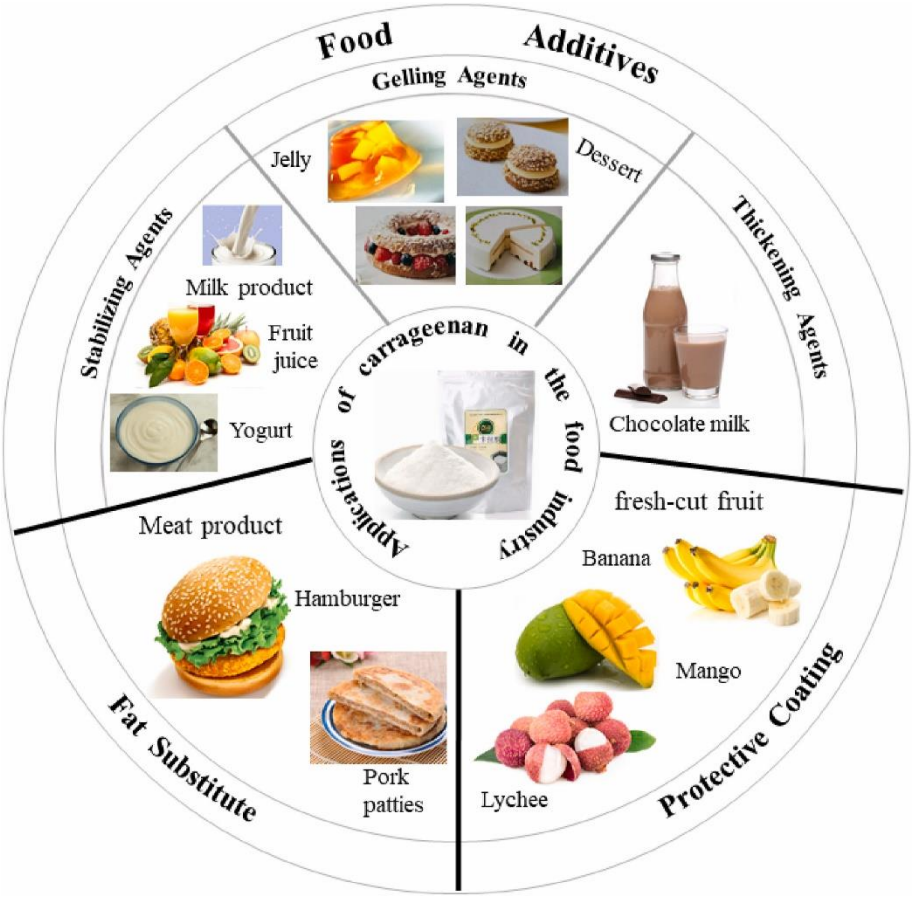


Figura 2. Algunas aplicaciones de las carrageninas en la industria alimentaria (Dong, Wei, & Xue, 2021).

Las carrageninas más comunes se identifican tradicionalmente por un prefijo griego y las tres comercialmente más importantes son: iota (ι)-, kappa (κ)- y lambda (λ)-carragenina (De Ruiter & Rudolph, 1997; Knutsen et al. 1994).

Además de estos tres tipos principales, otros dos, llamados Mu (μ) y Nu (ν) carrageninas se encuentran con frecuencia en muestras comerciales (van de Velde, Knutsen, Usov, Rollema & Cerezo, 2002). Estas últimas son precursores biológicos de κ- y ι-carragenina respectivamente, las cuales son formadas *in vivo* por la acción de una sulfohidrolasa (van de Velde, Peppelman, Rollema & Tromp, 2001).

Cuadro 2. Diversas aplicaciones de las carrageninas en alimentos y productos lácteos.

Producto alimenticio	**Propósito de añadir/efecto en el producto**	**Referencia**
Queso Cottage	Evitar la separación del suero	Makhal et al., 2013
Helado	Evitar la separación causada por la adición de gomas destinadas a controlar la textura y el crecimiento de los cristales de hielo, estabilizador y emulsionante	McHugh 2003
Cremas de café, leche evaporada y condensada	Prevenir la separación de la grasa	Stanley 1990; McHugh 2003
Crema batida	Mantener la luminosidad (brillo)	
Gelatinas bajas en calorías	Reemplazar la pectina y el azúcar con carragenina, ayudar a dar estructura	Uchiyama et al., 2018
Mezclas de bebidas (limonada en polvo, ponche de frutas, etc.)	Proporcionar textura cuando se reconstituyen en agua fría	McHugh 2003
Aderezos para ensaladas bajos en grasa (*i.e.* bajos en aceite)	Mantener en suspensión las hierbas y proporcionar consistencia más espesa	McHugh 2003
Mayonesa baja en grasa	Espesar y estabilizar	Featherstone 2016
Productos avícolas precocidos	Inyectado como salmuera para mejorar la textura, terneza y mantener la jugosidad	McHugh 2003
Alimentos enlatados para mascotas	Estabilización de grasas y espesamiento	Stanley 1990
Cerveza	Clarificación por precipitación con proteínas	Poreda et al., 2015
Flanes, natillas, rellenos de crema	Estabilizar, gelificar	Piculell 2006
Queso	Estabilizar, CRA, mejora capacidad de rebanado	Blaszak et al., 2018
Pescado	Mejora la capacidad de retención de agua	Sow et al. 2018
Leche saborizada y batidos	Mantiene el cacao u otros saborizantes en suspensión	Kumar 2003
Sorbete	Proporcionar textura suave (agente gelificante)	Bico et al., 2009
Carnes y aves procesadas bajas en grasa y sodio	Aumentar la absorción de salmuera, eliminar o disminuir la pérdida de cocción y mejorar la capacidad de corte	McHugh 2003
Frutas envasadas-mínimamente procesadas	Controlar/reducir la decoloración, mantener la textura	Plotto et al., 2006; Plotto et al., 2010

Fuente: Zia et al., 2017 con modificaciones.

Las propiedades químicas y funcionales de cada carragenina son diferentes debido al número y posición de grupos sulfato dentro de la unidad repetitiva de disacárido, así como en su contenido del anillo 3,6-anhidro-D-galactosa (Petrova et al., 2016; van de Velde, 2008); por ejemplo, κ- y ι-carragenina solo difieren en la presencia de un grupo sulfato adicional en el segundo carbono de la unidad de β-(1 → 4)-D-galactosa para la última. λ-carragenina, tiene el mayor contenido de sulfato y no presenta el anillo 3,6-anhidro-D-galactosa (Rees, 1963). Estas características estructurales permiten a κ- y ι-carragenina ser capaces de formar geles, en tanto que, λ-carragenina solo se distingue como un agente espesante (van de Velde et al., 2005). Todos los tipos de carrageninas son solubles en agua, λ-carragenina es soluble en agua fría, pero los geles formados por κ- y ι-carragenina requieren generalmente un ciclo de calentamiento-enfriamiento (e.g. 80 °C durante 30 min) para su solubilidad completa (Ikeda & Nishinari, 2001). Los contenidos de éster sulfato y 3,6-anhidrogalactosa de las carrageninas son aproximadamente 22 y 33% respectivamente para κ-carragenina y 32 y 26% respectivamente para ι-carragenina. λ-carragenina contiene aproximadamente 37% de éster sulfato, con poco o ningún contenido de 3,6-anhidrogalactosa.

Las carrageninas disponibles en el mercado se usan para obtener gran variedad de perfiles reológicos. Así, geles claros o turbios, rígidos o elásticos, duros o blandos, estables al calor o termorreversibles y susceptibles o no de experimentar sinéresis pueden ser formados (Imeson, 2009). El Cuadro 3, proporciona información más amplia sobre las propiedades principales de las carrageninas industrialmente más importantes.

Las carrageninas nativas son mezclas de diferentes polisacáridos sulfatados, por lo que su composición varía de una muestra a otra (Van de Velde, Pereira & Rollema, 2004). Las cadenas de este biopolímero no solo contienen galactosa y sulfato, sino también otros residuos de carbohidratos tales como xilosa, glucosa y ácidos urónicos (Van de Velde et al., 2002). Asimismo, minerales tales como amonio, calcio, magnesio, potasio y sodio también están presentes (Chan & Matanjun, 2017).

Cuadro 3. Descripción general de las propiedades de los tres tipos de carrageninas industrialmente más importantes.

	Lambda (λ)	Iota (ι)	Kappa(κ)
Solubilidad			
Agua caliente (80 °C)	Soluble	Soluble	Soluble
Agua fría (20 °C)	Todas las sales son solubles	Sal de Na^+ soluble	Sal de Na^+ soluble
Leche caliente (80 °C)	Soluble	Soluble	Soluble
Leche fría (20 °C)	Espesa	Insoluble	Insoluble
Soluciones de azúcar (50%)	Soluble	Insoluble	Soluble (caliente)
Soluciones salinas (10%)	Soluble (caliente)	Soluble (caliente)	Insoluble
Gelificación			
Efecto de cationes	No gelificante	Geles fuertes con Ca^{2+}	Geles fuertes con K^+
Textura del gel	No gelificante	Blanda, elástica	Firme, frágil (quebradiza)
Sinéresis	No gelificante	No	Si
Histéresis	No gelificante	5–10 °C	10–20 °C
Estabilidad de congelación-descongelación	Si	Si	No
Sinergia con goma de algarrobo	No	No	Si
Sinergia con glucomanano de Konjac	No	No	Si
Sinergia con almidón	No	Si	No
Reversibilidad por cizalla	Si	Si	No
Reactividad con proteínas	Fuerte interacción con proteínas en ácido		Específica con κ-caseína

Fuente: Imeson, 2009.

Por otra parte, como la mayoría de los polímeros de origen natural, las carrageninas son polidispersas; lo que significa que los extractos de carragenina comprenden una amplia gama de fracciones de peso molecular (Berth, Vukovic, & Lechner, 2008; Carraher, 2003). Esta polidispersidad ocurre naturalmente como parte del crecimiento de las algas marinas. Las algas no producen moléculas “instantáneas” grandes de pesos moleculares individuales, sino que generan moléculas de diferentes tamaños dependiendo de las necesidades de su crecimiento (McKim, Willoughby, Blakemore & Weiner, 2019). Así, dada la complejidad de su estructura y polidispersidad, resulta sumamente difícil caracterizar cuantitativamente a las carrageninas.

Actualmente, se utilizan técnicas de dispersión de luz y resonancia magnética nuclear para determinar la distribución del tamaño y estructura. Las investigaciones de la masa molar y tamaño de carrageninas empleando métodos de dispersión de luz, cromatografía de exclusión de tamaño y resonancia magnética nuclear han sido reportados por varios autores (Meunier, Nicolai & Durand, 2000; Meunier, Nicolai, Durand & Parker, 1999; Slootmaekers, Mandel & Reynaers, 1991; Ueda, Itoh, Matsuzaki, Ochiai & Imamura, 1998). Las carrageninas tienen un peso molecular promedio en el intervalo comprendido entre 104 y 106 g mol^{-1} (Lecacheux, Panaras, Brigand & Martin, 1985; Viebke, Borgström & Piculell, 1995; Webber, de Carvalho & Barreto, 2012).

Entre las carrageninas más utilizadas a nivel industrial, la κ-carragenina ha sido tradicionalmente la más popular, principalmente debido a sus propiedades físicas y texturales versátiles, lo que la hace atractiva para una amplia gama de aplicaciones (Geonzon et al., 2020). Por esta razón, la presente investigación estuvo encaminada al estudio de este biopolímero.

2.2 κ-Carragenina

La κ-carragenina está compuesta por unidades repetitivas alternas de α(1→3)-D-galactosa-4-SO_3^- y β(1→4)-3,6-anhidro-D-galactosa (Figura 3), con una carga negativa por unidad repetitiva de disacárido (Azevedo, Torres, Sousa-Pinto &

Hilliou, 2015; O'Neill, 1955), lo que la identifica como un polielectrolito y la hace sensible a interacciones iónicas con cationes y aniones (MacArtain, Jacquier & Dawson, 2003; Takemasa & Nishinari, 2004). Usualmente, la κ-carragenina comercial contiene aproximadamente 25% de éster sulfato y 34% de 3,6-anhidro-α-D-galactosa (Zia et al., 2017).

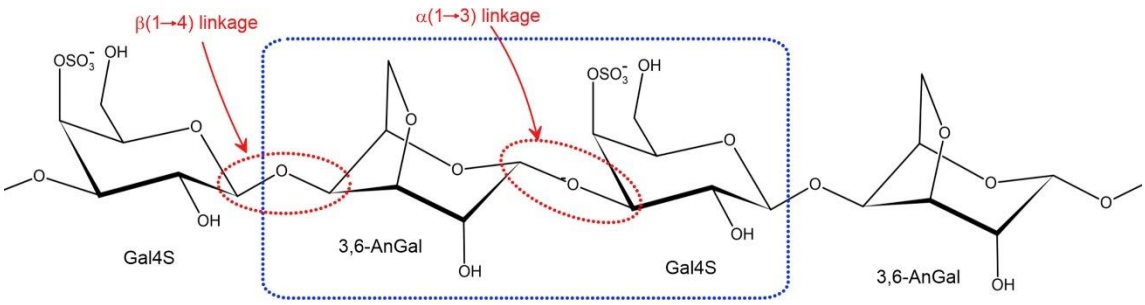


Figura 3. Representación esquemática de la estructura química de la molécula de κ-carragenina con el bloque de construcción disacárido marcado, correspondiente a los dos residuos consecutivos de 3,6-anhidrogalactosa (3,6-AnGal) y galactopiranosa-4-sulfato(Gal4S) (Michna, Płaziński, Lupa, Wasilewska & Adamczyk, 2021).

2.2.1 Conformación en solución

Propiedades en solución de carrageninas en estado desordenado

Vreeman et al., (1980) realizaron estudios sobre la viscosidad intrínseca y la estimación de la conformación molecular de κ-carragenina de diferentes pesos moleculares y con diferentes fuerzas iónicas. Los investigadores determinaron un valor de $a = 0.86$ para la relación de Mark-Houwink: $[\eta] = K \cdot M_w^a$, observado para κ-carragenina en NaCl 0.1M, con lo que mostraron evidencia de que el polímero, en solución acuosa, es una hebra aleatoria, expandida y de flexibilidad variable. Esta expansión se debe a las diversas interacciones existentes entre las cadenas del polímero y su medio circundante, las cuales son predominantemente electrostáticas (Vreeman, Snoeren & Payens, 1980). La flexibilidad de las hebras, que está determinada por la estructura primaria y secundaria del polielectrolito, puede ser medida por la flexibilidad del parámetro B (Morris, Rees, Welsh, Dunfield & Whittington, 1978; Smidsrød & Haug, 1971). El parámetro B es

determinado a través de mediciones de viscosidad intrínseca en soluciones salinas y es una medida de la disponibilidad del polímero cargado para responder a la creciente fuerza iónica de la solución. Una respuesta fuerte indica que el creciente barrido de carga de los sitios iónicos hace que la cadena de polímero se enrolle debido a la disminución de la repulsión electrostática intracadena; es decir, la cadena debe estar flexible. La flexibilidad de las moléculas de carragenina en forma de hebra aleatoria incrementa con el aumento del contenido de unidades 3,6-anhidro-D-galactopiranosa. La conformación de κ-carragenina en solución no solo depende de la concentración, sino también de la temperatura y la fuerza iónica que gobiernan el comportamiento de las cadenas poliméricas (Smidsrød & Grasdalen, 1984).

2.2.2 Conformaciones en estado ordenado

Conformaciones helicoidales en el estado sólido

Los estudios de difracción de rayos X en muestras de fibras orientadas han demostrado que las moléculas de ι-carragenina y κ-carragenina forman hélices ordenadas en estado sólido (Anderson, Campbell, Harding, Rees, & Samuel, 1969; Arnott, Scott, Rees, & McNab, 1974; Janaswamy & Chandrasekaran, 2001; Millane, Chandrasekaran, Arnott, & Dea, 1988). Las hebras de κ-carragenina son menos orientadas y cristalinas que las de sales de ι-carragenina. Sin embargo, como la forma iota, la κ-carragenina adopta la conformación de doble hélice. Como se muestra en la Figura 4, las fibras preparadas a partir de la sal de potasio de κ-carragenina están menos orientadas y son menos cristalinas que las de ι-carragenina. El patrón de difracción exhibe solo intensidades continuas en las líneas de capa, lo que indica que no hay organización lateral de las moléculas de polímero en la fibra (Chandrasekaran, 1998). Consecuentemente, la evidencia de una estructura helicoidal particular es menos directa en este caso. Los intentos de Millane et al., (1988) de refinar varios modelos estereoquímicamente plausibles para ajustar los datos de difracción de rayos X para κ-carragenina llevaron a la conclusión de que todos, excepto unos cuantos modelos de doble hélice, podían excluirse.

a) **b)**

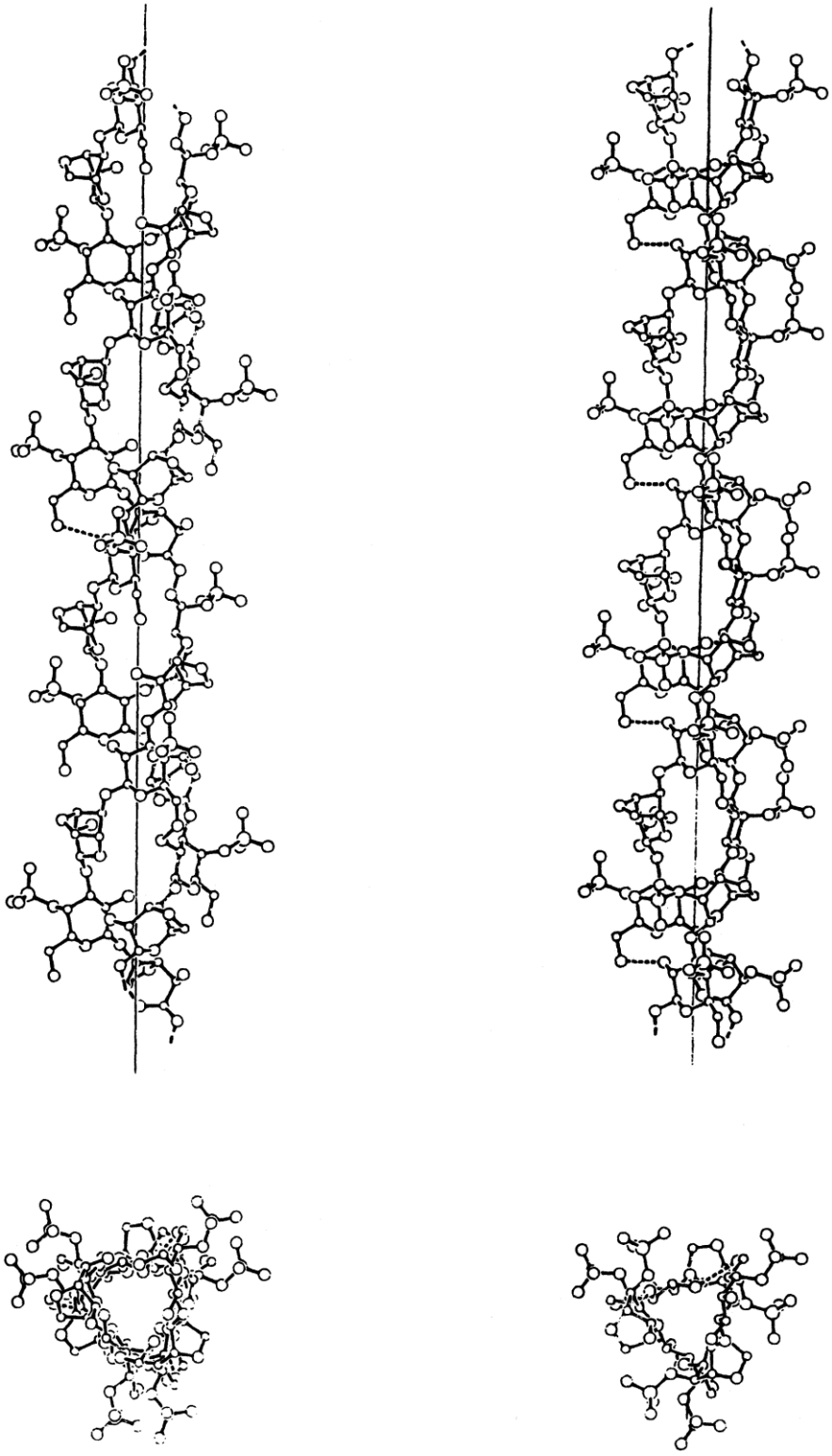


Figura 4. Estructuras de doble hélice propuestas para (a) κ-carragenina y (b) ι-carragenina (Millane, Chandrasekaran, Arnott, & Dea, 1988).

Entre los modelos que se descartaron se encontraban modelos de hélice simple, mezclas estadísticas de hélices simples y dobles hélices, y dímeros formados por asociación de cadenas coaxiales sin enlazar. Se encontró que el mejor modelo de κ-carragenina ordenada (Figura 4a) era una doble hélice paralela con una separación de 2.5 nm, bastante similar a la hélice de ι-carragenina (Figura 4b), pero en la que las dos cadenas están compensadas por una rotación de 28° y una traslación de 0.1 nm desde el arreglo medio escalonado. Sin embargo, un modelo paralelo muy similar y dos modelos antiparalelos también fueron compatibles con los datos, aunque se consideró que eran menos convincentes, en general, en el refinamiento.

El modelo más favorecido conserva solo uno de los dos puentes de hidrógeno intermoleculares por disacárido que se encontraron en la hélice de ι-carragenina. Millane et. al. (1988), encontraron que la κ-carragenina evidentemente no adopta una conformación medio escalonada, similar a la de ι-carragenina, a pesar del hecho de que la última conformación sería estereoquímicamente aceptable y contendría dos enlaces de hidrógeno intermoleculares por disacárido.

Transiciones conformacionales en solución

Desde las primeras investigaciones realizadas por Rees y colaboradores (1969), diversos estudios han confirmado que la gelificación de carrageninas está acompañada por un cambio en la rotación óptica. Posteriormente, Rees et al., (1970) demostraron que los valores obtenidos mediante rotación óptica monocromática para ι-carragenina, se correspondían estrechamente con los calculados para una hebra aleatoria y para una conformación de doble hélice, como lo habían demostrado los estudios de difracción de rayos X (Anderson, Campbell, Harding, Rees & Samuel, 1969; Schafer & Stevens, 1996). Desde hace varias décadas, se ha obtenido más evidencia experimental de la transición conformacional en solución con ayuda de técnicas espectroscópicas como la resonancia magnética nuclear (RMN) de protón ^{1}H, RMN de ^{13}C (Bryce, McKinnon, Morris, Rees & Thom, 1974; Rochas, Rinaudo & Vincendon, 1980;

Ablett, Clark & Rees, 1982) y mediante una variedad de otros métodos, como la dispersión de luz (Hjerde, Smidsrød, Stokke & Christensen, 1998; Slootmaekers, De Jonghe, Reynaers, Varkevisser & van Treslong, 1988; Viebke et al., 1995), osmometría (Jones, Staples & Penman, 1973), viscosidad intrínseca (Smidsrød & Grasdalen, 1984), calorimetría (Morris, Rees, Norton & Goodall, 1980; Rochas, 1985; Rochas & Mazet, 1984; Rochas & Rinaudo, 1982; Viebke, Borgström, Carlsson, Piculell & Williams, 1998), coeficiente de actividad del contraión (Rochas & Rinaudo, 1980) y conductividad (Takemasa, Chiba & Date, 2002).

La formación de hélices es más comúnmente monitoreada empleando mediciones de rotación óptica. Los cationes que proveen la neutralización de la carga de los grupos sulfato, tienen habilidades bastante diferentes para estabilizar la doble hélice. Los iones K^+ tienen excelentes propiedades estabilizantes de las dobles hélices mientras que iones como Na^+ y aún más el Li^+, inhiben la formación de estructuras helicoidales (Morris, Rees & Robinson, 1980; Rochas & Rinaudo, 1984). Los cationes divalentes como Ca^{2+}, Mg^{2+} y Sr^{2+} también pueden promover la gelificación, aunque de forma inespecífica (Rochas & Rinaudo, 1980).

Efecto de cationes

Una de las características más importantes de las carrageninas es la sensibilidad de casi todas sus propiedades a la presencia de iones. Los efectos de diferentes cationes sobre la transición conformacional de κ-carragenina han sido estudiados (Rochas & Rinaudo, 1980; Snoeren & Payens, 1976; Viebke et al., 1998). Las investigaciones realizadas por Rochas y Rinaudo (1980), parecen indicar que los cationes estudiados podrían ser divididos en tres categorías con respecto a su eficiencia para promover la agregación de hélices: los cationes monovalentes "específicos" (NH_4^+, K^+, Cs^+ y Rb^+), los cationes divalentes (Mg^{2+}, Ca^{2+}, Sr^{2+}, Ba^{2+}, Co^{2+} y Zn^{2+}) y los cationes monovalentes "no específicos" (Li^+, Na^+ y $(CH_3)_4N^+$). Los iones específicos promueven en diversos grados la agregación de estructuras helicoidales y, consecuentemente, la gelificación de κ-carragenina.

Un ejemplo particularmente conocido, es el efecto de los iones potasio sobre las propiedades de κ-carragenina. En esta revisión, se hizo énfasis en los conocimientos que existen sobre el sistema κ-carragenina en presencia de iones divalentes calcio; sin embargo, en diversos aspectos, el sistema κ-carragenina–K^+ ha sido considerado como referente para caracterizar nuestro sistema de estudio.

La transición desorden–orden y subsecuente agregación están influenciadas por la composición iónica del ambiente acuoso (Grasdalen & Smidsrød, 1981; Morris et al., 1980; Rochas & Rinaudo, 1980; Rochas et al., 1980). En presencia de iones de sodio o calcio, la agregación de hélices de κ-carragenina es limitada en comparación con la agregación en un ambiente con iones potasio (Hermansson, 1989; Turquois, Rochas, Taravel, Doublier & Axelos, 1995). Como ejemplo, una transición hebra-hélice a 20 °C podría requerir alrededor de 7 mM de iones K^+, pero tanto como 200-250 mM de iones Na^+ (Hermansson, Eriksson & Jordansson, 1991). No solo la cantidad o la valencia sino también las diferencias en sensibilidad a la sal de los contraiones presentes en el sistema son importantes.

En comparación con cationes monovalentes, se han realizado pocos estudios sobre el efecto de los cationes divalentes para inducir la formación de hélices de κ-carragenina. Rochas y Rinaudo (1980) descubrieron que había solo una ligera dependencia de la naturaleza de los contraiones divalentes en relación con la temperatura del punto medio de transición para la fusión de las hélices de κ-carragenina. Con base en sus resultados, podrían requerirse 20 - 30 mM Ca^{2+} para una transición hebra-hélice a 20 °C para una concentración de 1% (p/p) de la sal de sodio de κ-carragenina.

No solo los cationes, sino también los aniones afectan la transición conformacional de la κ-carragenina (Ciancia, Milas & Rinaudo, 1997; Norton, Morris & Rees, 1984). Austen et al., (1988) encontraron que los aniones estabilizan la conformación ordenada en el orden $I^- > Br^- > NO_3^- > Cl^- > F^-$. Se ha mencionado que las interacciones mediante las que ciertos aniones permiten la estabilización de hélices podrían ser causadas por la unión de estos aniones a

las hélices de κ-carragenina (Record, Anderson, & Lohman, 1978; Schellman, 1975). La evidencia de tal unión fue también obtenida por Grasdalen y Smidsrød, (1981), y más tarde por Zhang y Furó (1993), a partir de los índices de relajación por RMN de iones yoduro en soluciones de κ-carragenina, los cuales muestran un aumento sustancial en la formación de hélices.

2.2.3 Agregación y gelificación

Diversas investigaciones, han establecido que el ordenamiento conformacional de las carrageninas es una condición necesaria para la gelificación (Meunier et al., 1999; van de Velde et al., 2002). Una evidencia de la agregación de hélices de carragenina es una histéresis térmica en la transición conformacional. Hasta ahora, diversos estudios han demostrado que la agregación de hélices de carragenina es promovida por el incremento en la concentración de sal. Sin embargo, en condiciones similares de fuerza iónica, los cationes específicos son claramente mucho más efectivos que los cationes no específicos para promover la agregación de hélices. Además, se han identificado diversas propiedades moleculares de las carrageninas que son de gran importancia, incluido el peso molecular (Rochas, Rinaudo, & Landry, 1990; Smidsrød & Grasdalen, 1984), la estructura química (Azevedo et al., 2015) y la forma iónica. Esto significa que la fuente de las algas, el tratamiento químico y los métodos de purificación son importantes. Asimismo, la historia térmica de la muestra (incluido el procedimiento de disolución, la velocidad de enfriamiento y el tiempo de curado del gel) es también importante. Otros indicios de agregación incluyen el inicio de turbidez y observaciones de birrefringencia de geles de κ-carragenina. Se ha obtenido evidencia más directa de κ-carragenina en condiciones de agregación mediante técnicas de dispersión de luz, microscopía electrónica y microscopía de fuerza atómica (Morris, et al., 1980; Meunier et al., 1999; Snoeren y Payens, 1976).

Varios autores han estudiado el efecto de la adición de iones sobre la reología de la κ-carragenina. La gelificación puede ser inducida con cationes monovalentes específicos, así como con ‘no específicos’, pero los cationes

específicos generalmente forman geles mucho más fuertes en condiciones comparables de fuerza iónica (Morris, Rees, & Robinson, 1980; Morris & Chilvers, 1983; Watase & Nishinari, 1982; Watase & Nishinari, 1981).

2.2.4 Gelificación con Ca^{2+}

Los primeros estudios acerca de la interacción de iones divalentes con κ-carragenina fueron reportados por (Rochas & Rinaudo, 1980), quienes encontraron que la dependencia de la temperatura de fusión sobre la naturaleza de contraiones divalentes es leve y en el orden siguiente: $Ba^{2+} > Ca^{2+} > Sr^{2+} > Mg^{2+} > Zn^{2+} > Co^{2+}$. De acuerdo con sus resultados, se requieren 20 - 30 mM de Ca^{2+} para conseguir la transición hebra-hélice a 20°C. Además, proponen que el mecanismo conformacional es seguramente muy diferente al de los contraiones monovalentes, para el que establecen un mecanismo de dimerización de cadena para la conformación ordenada (asumida como hélice).

Después, Morris y Chilvers (1983) encontraron que, en formas de κ-carragenina pura (libre de sal), el calcio dio lugar a geles más fuertes a aquellos inducidos por potasio o sodio, mientras que lo opuesto fue encontrado por Watase y Nishinari (1981); sin embargo, los resultados fueron obtenidos bajo diferentes condiciones experimentales. Por otra parte, Hermansson et al. (1991) realizaron un estudio sobre los efectos de cationes y mezclas de cationes sobre la gelificación de κ-carragenina y encontraron que el sistema κ-carragenina–Ca^{2+} formó geles relativamente débiles y en un limitado intervalo de concentraciones de calcio. Estos geles, presentaron una red entramada, muy fina y sin alguna de las hebras gruesas observadas mediante microscopía electrónica en las formas de sodio-κ-carragenina o potasio-κ-carragenina.

Las muestras de geles preparadas con 2.16 % κ-carragenina bajo la forma de sal de sodio, evaluadas mediante reometría por Michel et. al. (1997) determinaron que el módulo elástico (G') a 20 °C varió en la forma $Na^{+} < Cu^{2+} \approx Ca^{2+} < K^{+}$. En esta investigación se destacó el hallazgo de que, más allá de una concentración umbral, los valores de G' no fueron influenciados ni por la concentración de sal añadida, ni por el tipo de catión. Además, en el caso de los cationes divalentes

(Cu^{2+} y Ca^{2+}), encontraron que los geles presentaron turbidez por encima de una relativamente baja (≈ 0.02 M) concentración de sal en el intervalo completo de concentraciones de polímero estudiadas (0.5 a 2.16 %), independientemente de si la concentración de polímero fue lo suficientemente alta para formar un gel, o no.

En otro estudio conducido por Lai, Wong y Lii (2000), la efectividad del aumento de las temperaturas de gelificación y fusión de los geles formados a concentraciones de polímero en el intervalo de 0.5 a 3.0 % y sal añadida de 0.001 a 3.0 M siguieron la secuencia de $Na^{+} < Ca^{2+} < K^{+}$. Los autores reportaron la disminución de la fuerza de gel en muestras preparadas a 1.5 % de polímero por encima de una concentración de calcio que varía de 0.1 a 0.5 M. Se sugirió que esta disminución se debe a sinéresis. Es importante destacar que Lai et al. (2000) emplearon para su trabajo κ-carragenina obtenida comercialmente en forma de sal de K^{+} sin purificar.

Takemasa, Chiba y Date (2001) condujeron un estudio comparativo de la gelificación de κ-carragenina en sus formas de K^{+}, Na^{+}, Ca^{2+} y Cs^{+} a concentración fija de 2 %. Sus resultados mostraron que la forma de calcio formó el gel más turbio y con el módulo elástico más alto, aun cuando su temperatura de gelificación fue relativamente baja (~ 10 °C).

Como regla general, una concentración de sal creciente mejora el módulo elástico de un gel de κ-carragenina, siempre que la concentración de sal añadida no sea demasiado grande (Chen, Liao, & Dunstan, 2002; Kara, Tamerler, Bermek, & Pekcan, 2003; Rochas et al., 1990).

Los estudios realizados por Doyle et. al. (2002), exploraron el efecto de la adición progresiva de cationes K^{+} y Ca^{2+} a soluciones de κ-carragenina en forma de sal de Na^{+}. Los autores realizaron un estudio comparativo de la fuerza de gel determinada como el módulo de Young (E) a partir de pruebas de compresión en soluciones de 1.0% (p/p) κ-carragenina en un intervalo amplio de concentraciones de K^{+} y Ca^{2+} (5 a 500 mM). Sus resultados demostraron que la adición progresiva de KCl a soluciones de κ-carragenina causó un aumento

progresivo en el módulo de Young de los geles resultantes, hasta la más alta concentración de K^+ a la que las muestras podían ser preparadas (500 mM). Para el Ca^{2+}, por el contrario, los módulos mostraron un aumento inicial con el incremento en la concentración del catión, pero luego una disminución drástica con la adición progresiva de $CaCl_2$, después de la concentración estequiométrica (12.5 mM de Ca^{2+}) (Doyle, Giannouli, Philp, & Morris, 2002).

La unidad repetitiva de disacárido de κ-carragenina en la forma de sal de Na^+ tiene una masa molecular de 408 Da (Rinaudo, Karimian, & Milas, 1979). Dado que cada unidad contiene un grupo sulfato, la concentración de sulfato en las soluciones al 1.0% (p/p) de κ-carragenina con las que trabajaron Doyle et al. (2002) fue ~25 mM. El balance de carga con iones Ca^{2+} fue alcanzado a una concentración de ~12.5 mM, que está cerca de la concentración que mostró la máxima fuerza de gel, sugiriendo la posibilidad de la unión estequiométrica de los iones de Ca^{2+} a las hélices de κ-carragenina.

Los aportes de MacArtain et al. (2003) estuvieron orientados hacia la determinación de una concentración óptima de contraiones en geles de κ-carragenina inducidos por calcio a bajas concentraciones de polímero (0.5 y 1.0 %). Los autores encontraron que la adición de bajas concentraciones de cationes Ca^{2+} (aproximada a una relación molar estequiométrica de iones calcio a grupos sulfato) pueden promover la agregación de hélices, donde G' aumenta con el incremento de la concentración de cationes calcio (Figura 5). Sin embargo, una alta concentración de cationes permitió la disminución de G' significativamente, asociada con un marcado aumento en la turbidez de los geles.

Recientemente, Liu y Li (2016) realizaron un estudio sistemático de la gelificación termorreversible de κ-carragenina inducida por cationes de calcio (Ca^{2+}). Sus resultados experimentales obtenidos por micro calorimetría diferencial de barrido y reometría indicaron que la presencia de iones Ca^{2+} cambió las temperaturas de gelificación y fusión de los geles a valores más altos, indicando que la adición de iones Ca^{2+} facilita la transición sol-gel (transición hebra-hélice). G' (a 20 °C) aumentó con el aumento de la concentración del ion Ca^{2+}, sugiriendo que la

presencia de iones Ca^{2+} no solo facilita la transición hebra-hélice sino también promueve el desarrollo de la red del gel. El incremento en la concentración de iones también permitió el aumento de la histéresis térmica (ΔT).

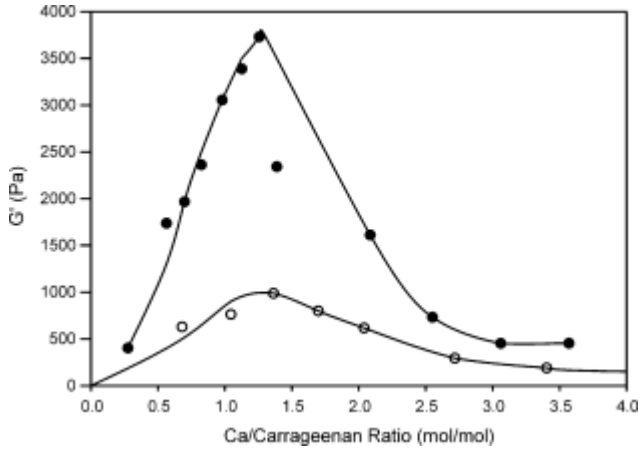


Figura 5. Variación de G' con el cambio en la relación calcio:carragenina para concentraciones de 0.5 % (○) y 10 % (●) de κ-carragenina (MacArtain et al., 2003).

La reversibilidad térmica de la formación y fusión de los geles fue examinada a fondo mediante tres ciclos completos a velocidad de enfriamiento y calentamiento fija de 1 °C min^{-1}. Cada ciclo térmico fue programado desde 80 hasta 10 °C en el enfriamiento y 10 a 80 °C en el calentamiento. Sin embargo, no está especificada la razón por la que los autores trabajaron con bajas concentraciones de iones Ca^{2+} (0.1, 0.2 y 0.4 mM).

2.2.5 Mecanismo de gelificación

El mecanismo de gelificación para κ-carragenina en presencia de iones K^+ ha sido estudiado desde hace ya varias décadas. El modelo de doble hélice originalmente propuesto por Anderson et al. (1969) y más tarde modificado por Morris, Rees, & Robinson (1980), también conocido como "modelo de dominio" es generalmente aceptado. A temperatura alta, la κ-carragenina se presenta como una hebra aleatoria (random coil). Al enfriarse, ocurre un mecanismo de transición sol-gel en dos etapas en el que hay una transición hebra-hélice seguida de agregación de estructuras helicoidales y formación de red (Mangione,

Giacomazza, Bulone, Martorana, & San Biagio, 2003; Morris et al., 1980; Núñez-Santiago, Tecante, Garnier, & Doublier, 2011; Rochas & Rinaudo, 1984).

Para κ-carragenina en presencia de iones Ca^{2+}, el mecanismo de gelificación aún no ha sido especificado. Sin embargo, los estudios más recientes muestran un creciente interés por elucidar la interacción de los cationes Ca^{2+} con las cadenas de polímero durante el proceso de gelificación termorreversible.

Es bien sabido que la gelificación de κ-carragenina en solución acuosa involucra la transición conformacional hebra-hélice seguida de la agregación de hélices y, consecuentemente, a la formación de una red de gel (Hermansson, 1989; Hermansson et al. 1991; Meunier et al., 1999). Los trabajos realizados por Liu y Li (2016) mostraron evidencia de que, al aumentar la concentración de iones Ca^{2+}, se inducen más hélices de κ-carragenina para que se 'orienten' y luego participen en la agregación; lo que conduce a incrementos tanto en número como en tamaño de los agregados. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Doyle et al. (2002), quienes observaron que para K^+ y Ca^{2+}, las curvas de calentamiento y enfriamiento son aproximadamente paralelas, pero la separación entre ellas (el grado de histéresis térmica) es mayor para Ca^{2+} que para K^+, sugiriendo que los cationes divalentes son más efectivos para promover la agregación de hélices de κ-carragenina. Adicionalmente, dado que los cationes Ca^{2+} dieron la fuerza de gel máxima alrededor de su equivalencia estequiométrica, la interpretación más probable es que actúan mediante un puente directo entre hélices adyacentes, en un mecanismo un tanto análogo al modelo de "caja de huevo" (Grant, Morris, Rees, Smith, & Thom, 1973) propuesto para la gelificación de alginato o pectina de bajo metoxilo inducida por iones Ca^{2+}.

En un estudio reciente realizado por Evageliou, Ryan, y Morris (2019), se encontró que los valores de temperatura del pico máximo en los escaneos de enfriamiento y calentamiento obtenidos mediante calorimetría diferencial de barrido (0.5 °C min^{-1}) incrementaron progresivamente con el aumento en la concentración de sal, siguiendo el orden $Na^+ < Ca^{2+} < K^+$, pero la mayor histéresis térmica fue vista con Ca^{2+} (Figura 6). La interpretación propuesta es que los

cationes Ca^{2+} “cementan” las hélices de carragenina al unirse directamente entre ellas, lo que proporciona mayor estabilidad térmica y, por tanto, mayor histéresis que los cationes K^+, que actúan indirectamente por supresión de cargas.

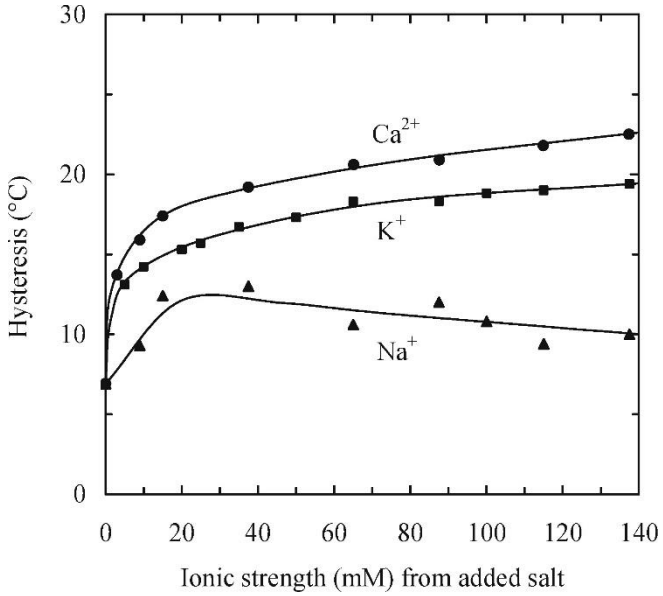


Figura 6. Efecto de la fuerza iónica sobre la cantidad de histéresis térmica entre las curvas de enfriamiento y calentamiento obtenidas por calorimetría diferencial de barrido (Evageliou et al., 2019).

La κ-carragenina usada por Evageliou et al. (2019) fue en forma de sal de Na^+, para evitar complicaciones de los sitios de unión de contraiones a la cadena de polímero, y fue estudiada a una concentración fija de 1% (p/p). Los cationes Na^+, K^+ y Ca^{2+} fueron añadidos como sales cloruro.

Con base en todos estos aportes, puede corroborarse que la κ-carragenina en presencia de cationes calcio, puede formar geles termorreversibles con la mayor fuerza de gel en la equivalencia estequiométrica de un Ca^{2+} por grupo sulfato del polímero y que, los iones calcio, se unen ‘entre’ las dobles hélices, más que a hélices individuales.

2.2.6 Microestructura de geles de κ-carragenina inducida por Ca^{2+}

La función de muchos biopolímeros alimentarios, como la κ-carragenina, es formar estructuras supramoleculares que por sí mismas determinan una serie de propiedades características del producto alimenticio final, tales como textura,

propiedades de difusión, propiedades de retención de agua y estabilidad interfacial. La microestructura de geles de κ-carragenina inducida por Ca^{2+} ha sido estudiado por técnicas como la microscopía electrónica de barrido (Hermansson et al., 1991; MacArtain et al., 2003; Thrimawithana, Young, Dunstan, & Alany, 2010), microscopía de fuerza atómica (Schefer, Adamcik, Diener, & Mezzenga, 2015; Schefer, Adamcik, & Mezzenga, 2014), microscopía de barrido confocal láser (Bui, Nguyen, Nicolai, & Renou, 2019a; Bui, Nguyen, Renou, & Nicolai, 2019b), entre otras.

MacArtain et al. (2003) han investigado la microestructura de geles formados con diferentes proporciones de calcio a κ-carragenina. Ellos usaron la técnica que denominaron “mica-sandwich” en la preparación de sus muestras, ya que, combinada con una congelación rápida, no requiere la adición de glicerol u otros aditivos (Hermansson & Langton, 1994). Esto es importante, dado que se ha demostrado que el glicerol tiene un efecto significativo sobre la gelificación de κ-carragenina (Gekko, Mugishima, & Koga, 1987; Nishinari & Watase, 1987).

La muestra preparada con 0.5 % polímero, en proporción 1:1 calcio a κ-carragenina (Figura 7a), mostró una red fina dentro de los poros más grandes. Los tamaños de poro resultantes son pequeños. Este esquema se refleja a concentraciones de polímero por arriba de 1.0 % (Figura 7c). En proporciones más altas de calcio a κ-carragenina, una red con hebras más gruesas y poros más anchos corresponde a geles débiles y turbios. La red a una relación calcio:κ-carragenina de 4:1 (Figura 7b) con 0.5 %, tiene hebras visibles y bastante definidas en comparación con las hebras finas observadas en la muestra con relación de calcio baja. La proporción de calcio de 2:1 a concentración de polímero de 1.0 % mostrada en la Figura 7d nuevamente exhibe poros grandes comparada con la red óptima mostrada en la Figura 7c. La formación de hebras más gruesas y la consecuente naturaleza más abierta de la red a concentraciones más altas de contraiones respaldan la opinión de que los cationes añadidos se suman a la agregación localizada de las hebras.

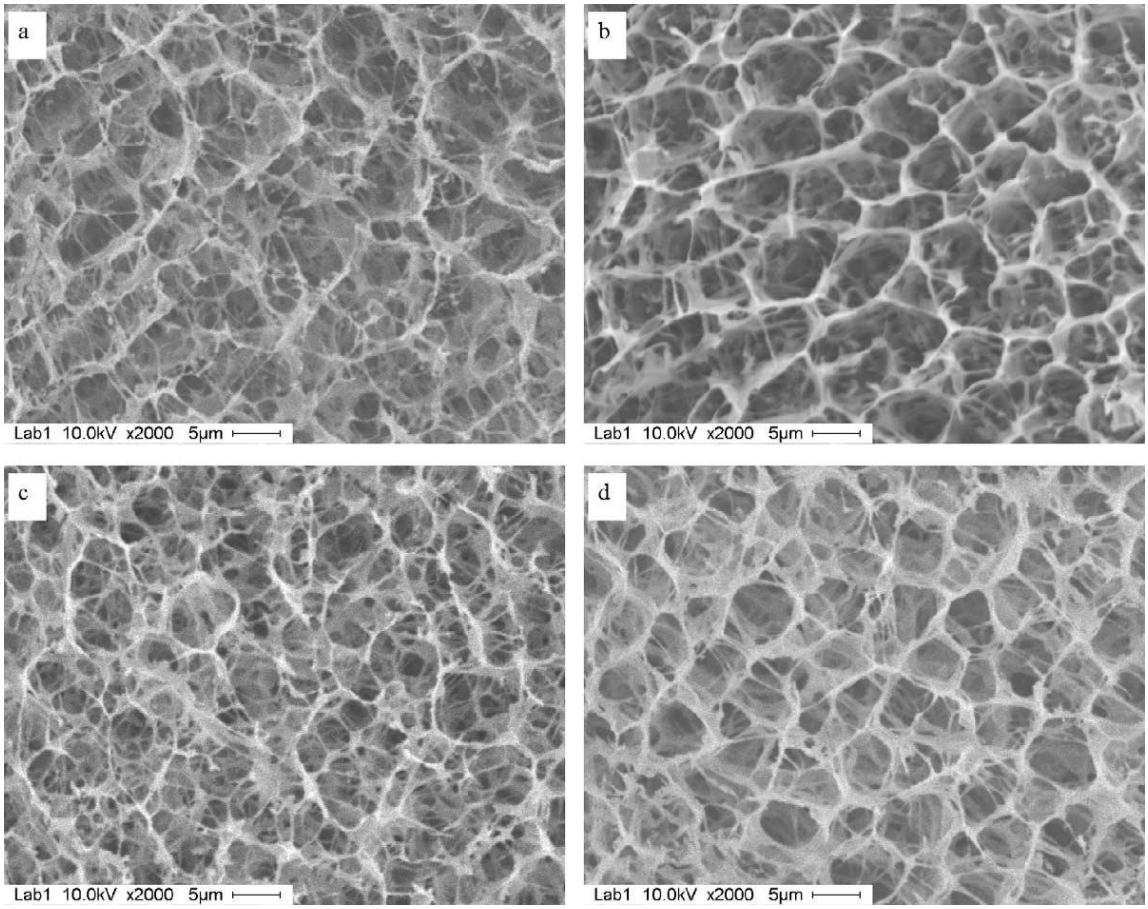


Figura 7. Micrografías por microscopía electrónica de barrido de redes de κ-carragenina: (a) 0.5 %, proporción añadida de Ca^{2+} 1:1; (b) 0.5 %, proporción añadida de Ca^{2+} 4:1; (c) 1.0 %, proporción añadida de Ca^{2+} 1:1; (d) 1.0 %, proporción añadida de Ca^{2+} 2:1. (MacArtain et al., 2003).

La misma técnica de preparación de la muestra para el análisis de la microestructura fue utilizada por Thrimawithana et al. (2010), aunque sus observaciones para el catión Ca^{2+} fueron evaluadas en ι-carragenina. Sobre la microestructura de los geles, concluyeron que el aumento de la concentración de contraiones más allá de un umbral tuvo un impacto negativo.

Por otra parte, Bui, Nguyen, Renou, y Nicolai (2019b) observaron mediante microscopía confocal de barrido láser (CLSM) la microestructura de geles de ι– y κ-carragenina (1.0 %) sin adición de sales y en presencia de $CaCl_2$ (Figura 8). La presencia de más $CaCl_2$ permitió la formación de geles de κ-carragenina más heterogéneos, pero las concentraciones de sal añadida comprendieron un intervalo pequeño (0 – 70 mM) y, por tanto, una corta separación entre ellas. Los

geles de ι-carragenina se mantuvieron homogéneos en las escalas de longitud accesibles a CLSM (> 100 nm), excepto a la más alta concentración de $CaCl_2$ donde una estructura débil puede ser observada.

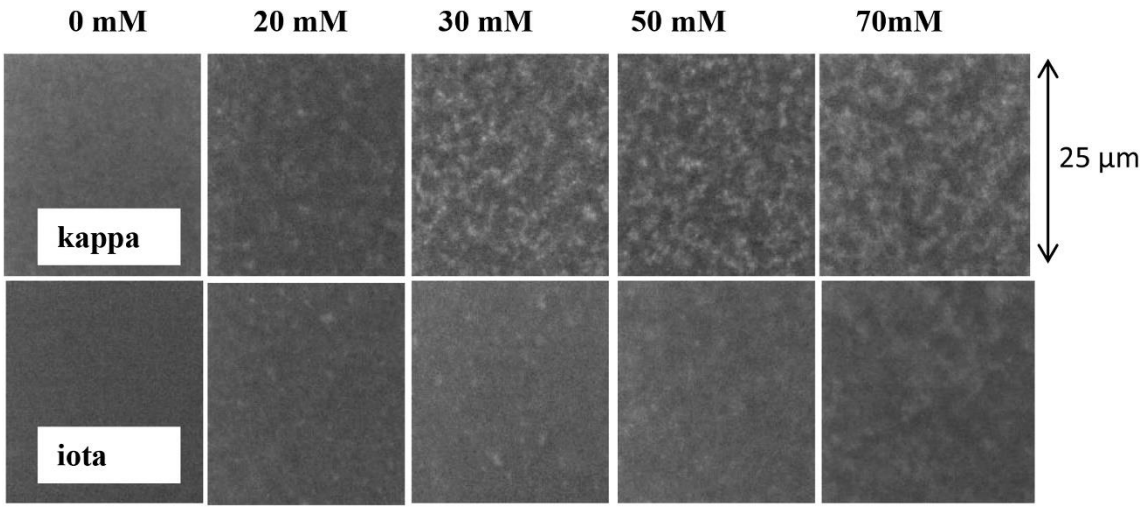


Figura 8. Imágenes por CLSM a 20 °C de geles de ι– y κ-carragenina (1.0 %) a diferentes concentraciones de $CaCl_2$ (Bui, Nguyen, Renou, & Nicolai, 2019b).

Los autores concluyeron que la red del gel de κ-carragenina fue siempre más heterogénea que la del gel de ι-carragenina, pero menos en mezclas formadas con 1.0 % de cada tipo de polímero que en los sistemas individuales. Además, los geles de ι– y κ-carragenina mezcladas no mostraron separación de fases durante la gelificación.

2.4 Literatura citada

Ablett, S., Clark, A. H., & Rees, D. A. (1982). Assessment of the flexibilities of carbohydrate polymers by proton-NMR relaxation and line shape analysis. *Macromolecules, 15*(2), 597–602. https://doi.org/10.1021/ma00230a075

Anderson, N. S., Campbell, J. W., Harding, M. M., Rees, D. A., & Samuel, J. W. B. (1969). X-ray diffraction studies of polysaccharide sulphates: Double helix models for κ- and ι-carrageenans. *Journal of Molecular Biology, 45*(1), 85–97. https://doi.org/10.1016/0022-2836(69)90211-3

Arnott, S., Scott, W. E., Rees, D. A., & McNab, C. G. A. (1974). ι-Carrageenan: Molecular structure and packing of polysaccharide double helices in oriented fibres of divalent cation salts. *Journal of Molecular Biology, 90*(2), 253–267. https://doi.org/10.1016/0022-2836(74)90371-4

Austen, K. R. J., Goodall, D. M., & Norton, I. T. (1988). Anion effects on equilibria and kinetics of the disorder–order transition of κ-carrageenan. *Biopolymers, 27*(1), 139–155. https://doi.org/10.1002/bip.360270111

Azevedo, G., Torres, M. D., Sousa-Pinto, I., & Hilliou, L. (2015). Effect of pre-extraction alkali treatment on the chemical structure and gelling properties of extracted hybrid carrageenan from *Chondrus crispus* and *Ahnfeltiopsis devoniensis*. *Food Hydrocolloids, 50*, 150–158. https://dx.doi.org /10.1016/j.foodhyd.2015.03.029

Berth, G., Vukovic, J., & Lechner, M. D. (2008). Physicochemical characterization of carrageenans—A critical reinvestigation. *Journal of Applied Polymer Science, 110*(6), 3508–3524. https://doi.org/10.1002/app.28937

Black, W. A. P., Blakemore, W. R., Colquhoun, J. A., & Dewar, E. T. (1965). The evaluation of some red marine algae as a source of carrageenan and of its κ- and λ-components. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 16*(10), 573–585. https://doi.org/10.1002/jsfa.2740161001

Bryce, T. A., McKinnon, A. A., Morris, E. R., Rees, D. A., & Thom, D. (1974). Chain conformations in the sol–gel transitions for poly-saccharide systems, and their characterization by spectroscopic methods. *Faraday Discussions of the Chemical Society, 57*, 221–229. https://doi.org/10.1039/DC9745700221

Bui, V. T. N. T., Nguyen, B. T., Nicolai, T., & Renou, F. (2019a). Mixed iota and kappa carrageenan gels in the presence of both calcium and potassium ions. *Carbohydrate Polymers, 223*, 115107. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115107

Bui, V. T. N. T., Nguyen, B. T., Renou, F., & Nicolai, T. (2019b). Rheology and microstructure of mixtures of iota and kappa-carrageenan. *Food Hydrocolloids, 89*, 180–187. https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2018.10.034

Campo, V. L., Kawano, D. F., Silva, D. B. da, & Carvalho, I. (2009). Carrageenans: Biological properties, chemical modifications and structural analysis – A review. *Carbohydrate Polymers, 77*(2), 167–180. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.01.020

Carraher, C. E. (2003). Molecular Weight of Polymers. In CRC Press (Ed.), *Polymer Chemistry* (Sixth Edit, p. 960). Boca Raton, Florida: Marcel Dekker, Inc.

Chan, P. T., & Matanjun, P. (2017). Chemical composition and physicochemical properties of tropical red seaweed, *Gracilaria changii*. *Food Chemistry, 221*, 302–310. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.10.066

Chandrasekaran, R. (1998). X-Ray Diffraction of Food Polysaccharides. In S. L. B. T.-A. in F. and N. R. Taylor (Ed.) (Vol. 42, pp. 131-210. Academic Press. https://doi.org/10.1016/S1043-4526(08)60095-9

Chen, Y., Liao, M.-L., & Dunstan, D. E. (2002). The rheology of K^+–κ-carrageenan as a weak gel. *Carbohydrate Polymers, 50*(2), 109–116. https://doi.org/10.1016/S0144-8617(02)00009-7

Ciancia, M., Milas, M., & Rinaudo, M. (1997). On the specific role of coions and counterions on κ-carrageenan conformation. *International Journal of Biological Macromolecules, 20*(1), 35–41. https://doi.org/10.1016/S0141-8130(97)01149-5

De Ruiter, G. A., & Rudolph, B. (1997). Carrageenan biotechnology. *Trends in Food Science & Technology, 8*(12), 389–395. https://doi.org/10.1016/S0924-2244(97)01091-1

Dong, Y., Wei, Z., & Xue, C. (2021). Recent advances in carrageenan-based delivery systems for bioactive ingredients: A review. *Trends in Food Science & Technology, 112*, 348–361. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.04.012

Doyle, J., Giannouli, P., Philp, K., & Morris, E. (2002). *Effect of K^+ and Ca^{2+} cations on gelation of κ-carrageenan. Gums and Stabilizers for the Food Industry* (Vol. 11). https://doi.org/10.1039/9781847551016-00158

Evageliou, V. I., Ryan, P. M., & Morris, E. R. (2019). Effect of monovalent cations on calcium-induced assemblies of kappa carrageenan. *Food Hydrocolloids, 86*, 141–145. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.03.018

Gekko, K., Mugishima, H., & Koga, S. (1987). Effects of sugars and polyols on the sol-gel transition of κ-carrageenan: calorimetric study. *International Journal of Biological Macromolecules, 9*(3), 146–152. https://doi.org/10.1016/0141-8130(87)90042-0

Geonzon, L. C., Zhuang, X., Santoya, A. M., Bacabac, R. G., Xie, J., & Matsukawa, S. (2020). Gelation mechanism and network structure of mixed kappa carrageenan/lambda carrageenan gels studied by macroscopic and microscopic observation methods. *Food Hydrocolloids, 105*, 105759. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105759

Grant, G. T., Morris, E. R., Rees, D. A., Smith, P. J. C., & Thom, D. (1973). Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model. *FEBS Letters, 32*, 195–198. https://doi.org/10.1016/0014-5793(73)80770-7

Grasdalen, H., & Smidsrød, O. (1981). Iodide-Specific Formation of κ-Carrageenan Single Helices. ^{127}I NMR Spectroscopic Evidence for Selective Site Binding of Iodide Anions in the Ordered Conformation. *Macromolecules, 14*(6), 1842–1845. https://doi.org/10.1021/ma50007a051

Hermansson, A.-M., Eriksson, E., & Jordansson, E. (1991). Effects of potassium, sodium and calcium on the microstructure and rheological behaviour of kappa-carrageenan gels. *Carbohydrate Polymers, 16*(3), 297–320. https://doi.org/10.1016/0144-8617(91)90115-S

Hermansson, Anne-Marie. (1989). Rheological and microstructural evidence for transient states during gelation of kappa-carrageenan in the presence of potassium. *Carbohydrate Polymers, 10*(3), 163–181. https://doi.org/10.1016/0144-8617(89)90009-X

Hermansson, Anne-Marie, & Langton, M. (1994). Electron Microscopy - Physical Techniques for the Study of Food Biopolymers. In S. B. Ross-Murphy (Ed.) (pp. 277–341). Boston, MA: Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2101-3_6

Hjerde, T., Smidsrød, O., Stokke, B. T., & Christensen, B. E. (1998). Acid Hydrolysis of κ- and ι-Carrageenan in the Disordered and Ordered Conformations: Characterization of Partially Hydrolyzed Samples and Single-Stranded Oligomers Released from the Ordered Structures. *Macromolecules, 31*(6), 1842–1851. https://doi.org/10.1021/ma9711506

Ikeda, S., & Nishinari, K. (2001). "Weak Gel"-Type Rheological Properties of Aqueous Dispersions of Nonaggregated κ-Carrageenan Helices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49*(9), 4436–4441. https://doi.org/10.1021/jf0103065

Imeson, A. P. (2009). Carrageenan, furcelleran and other seaweed-derived products. In G. O. Phillips & P. A. Williams (Eds.), *Handbook of Hydrocolloids* (2nd ed., pp. 164–185). Cambridge, UK: Woodhead Publishing.

Janaswamy, S., & Chandrasekaran, R. (2001). Three-dimensional structure of the sodium salt of iota-carrageenan. *Carbohydrate Research, 335*(3), 181–194. https://doi.org/10.1016/S0008-6215(01)00219-1

Jiang, J.-L., Zhang, W.-Z., Ni, W.-X., & Shao, J.-W. (2021). Insight on structure-property relationships of carrageenan from marine red algal: A review. *Carbohydrate Polymers, 257*, 117642. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.117642

Jones, R. A., Staples, E. J., & Penman, A. (1973). A study of the helix–coil transition of ι-carrageenan segments by light scattering and membrane osmometry. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, (12), 1608–1612. https://doi.org/10.1039/P29730001608

Kara, S., Tamerler, C., Bermek, H., & Pekcan, Ö. (2003). Cation effects on sol–gel and gel–sol phase transitions of κ-carrageenan–water system. *International Journal of Biological Macromolecules, 31*(4), 177–185. https://doi.org/10.1016/S0141-8130(02)00080-6

Knutsen, S. H., Myslabodski, D. E., Larsen, B., & Usov, A. I. (1994). A Modified System of Nomenclature for Red Algal Galactans, *Botanica Marina, 37*(2), 163–170. https://doi.org/doi:10.1515/botm.1994.37.2.163

Kozlowska, J., Pauter, K., & Sionkowska, A. (2018). Carrageenan-based hydrogels: Effect of sorbitol and glycerin on the stability, swelling and mechanical properties. *Polymer Testing, 67*, 7–11. https://doi.org/10.1016/J.POLYMERTESTING.2018.02.016

Lai, V. M. F., Wong, P. A.-L., & Lii, C.-Y. (2000). Effects of Cation Properties on Sol-gel Transition and Gel Properties of κ-carrageenan. *Journal of Food Science, 65*(8), 1332–1337. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2000.tb10607.x

Lecacheux, D., Panaras, R., Brigand, G., & Martin, G. (1985). Molecular weight distribution of carrageenans by size exclusion chromatography and low angle laser light scattering. *Carbohydrate Polymers, 5*(6), 423–440. https://doi.org/10.1016/0144-8617(85)90003-7

Li, L., Ni, R., Shao, Y., & Mao, S. (2014). Carrageenan and its applications in drug delivery. *Carbohydrate Polymers, 103*, 1–11. https://doi.org/ 10.1016/j.carbpol.2013.12.008

Liu, J., Zhan, X., Wan, J., Wang, Y., & Wang, C. (2015). Review for carrageenan-based pharmaceutical biomaterials: Favourable physical features *versus* adverse biological effects. *Carbohydrate Polymers, 121*, 27–36. https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2014.11.063

Liu, S., & Li, L. (2016). Thermoreversible gelation and scaling behavior of Ca^{2+}–induced κ-carrageenan hydrogels. *Food Hydrocolloids, 61*, 793–800. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.07.003

MacArtain, P., Jacquier, J. C., & Dawson, K. A. (2003). Physical characteristics of calcium induced κ-carrageenan networks. *Carbohydrate Polymers, 53*(4), 395–400. https://doi.org/10.1016/S0144-8617(03)00120-6

Mangione, M. R., Giacomazza, D., Bulone, D., Martorana, V., & San Biagio, P. L. (2003). Thermoreversible gelation of κ-Carrageenan: relation between conformational transition and aggregation. *Biophysical Chemistry, 104*(1), 95–105. https://doi.org/10.1016/S0301-4622(02)00341-1

McKim, J. M., Willoughby, J. A., Blakemore, W. R., & Weiner, M. L. (2019). Clarifying the confusion between poligeenan, degraded carrageenan, and carrageenan: A review of the chemistry, nomenclature, and *in vivo* toxicology by the oral route. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 59*(19), 3054–3073. https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1481822

Meunier, V., Nicolai, T., & Durand, D. (2000). Structure and Kinetics of Aggregating κ-Carrageenan Studied by Light Scattering. *Macromolecules, 33*(7), 2497–2504. https://doi.org/10.1021/ma991433t

Meunier, V., Nicolai, T., Durand, D., & Parker, A. (1999). Light Scattering and Viscoelasticity of Aggregating and Gelling κ-Carrageenan. *Macromolecules, 32*(8), 2610–2616. https://doi.org/10.1021/ma981319v

Michel, A.-S., Mestdagh, M. M., & Axelos, M. A. V. (1997). Physico-chemical properties of carrageenan gels in presence of various cations. *International Journal of Biological Macromolecules, 21*(1), 195-200. https://doi.org/10.1016/S0141-8130(97)00061-5

Michna, A., Płaziński, W., Lupa, D., Wasilewska, M., & Adamczyk, Z. (2021). Carrageenan molecule conformations and electrokinetic properties in electrolyte solutions: Modeling and experimental measurements. *Food Hydrocolloids, 121*, 107033. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107033

Millane, R. P., Chandrasekaran, R., Arnott, S., & Dea, I. C. M. (1988). The molecular structure of kappa-carrageenan and comparison with iota-carrageenan. *Carbohydrate Research, 182*, 1–17. https://doi.org/10.1016/0008-6215(88)84087-4

Morris, E. R., Rees, D. A., Norton, I. T., & Goodall, D. M. (1980). Calorimetric and chiroptical evidence of aggregate-driven helix formation in carrageenan systems. *Carbohydrate Research, 80*(2), 317–323. https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)84870-3

Morris, E. R., Rees, D. A., & Robinson, G. (1980). Cation-specific aggregation of carrageenan helices: Domain model of polymer gel structure. *Journal of Molecular Biology, 138*(2), 349–362. https://doi.org/10.1016/0022-2836(80)90291-0

Morris, E. R., Rees, D. A., Welsh, E. J., Dunfield, L. G., & Whittington, S. G. (1978). Relation between primary structure and chain flexibility of random coil polysaccharides: calculation and experiment for a range of model carrageenans. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, (8), 793–800. https://doi.org/10.1039/P29780000793

Morris, V. J., & Chilvers, G. R. (1983). Rheological studies of specific cation forms of kappa carrageenan gels. *Carbohydrate Polymers, 3*(2), 129–141. https://doi.org/10.1016/0144-8617(83)90003-6

Necas, J. & Bartosikova, L. (2013). Carrageenan: a review. *Veterinarni Medicina, 58*,(4): 187–205.

Nishinari, K., & Watase, M. (1987). Effects of Polyhydric Alcohols on Thermal and Rheological Properties of Polysaccharide Gels. *Agricultural and Biological Chemistry, 51*(12), 3231–3238. https://doi.org/10.1080/00021369.1987.10868569

Norton, I. T., Morris, E. R., & Rees, D. A. (1984). Lyotropic effects of simple anions on the conformation and interactions of kappa-carrageenan. *Carbohydrate Research, 134*(1), 89–101. https://doi.org/10.1016/0008-6215(84)85025-9

Núñez-Santiago, M. C., Tecante, A., Garnier, C., & Doublier, J. L. (2011). Rheology and microstructure of κ-carrageenan under different conformations induced by several concentrations of potassium ion. *Food Hydrocolloids, 25*(1), 32–41. https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2010.05.003

O'Neill, A. N. (1955). 3,6-Anhydro-D-galactose as a Constituent of κ-Carrageenin. *Journal of the American Chemical Society, 77*(10), 2837–2839. https://doi.org/10.1021/ja01615a050

Petrova, V. A., Orekhov, A. S., Chernyakov, D. D., Baklagina, Y. G., Romanov, D. P., Kononova, S. V, … Skorik, Y. A. (2016). Preparation and analysis of multilayer composites based on polyelectrolyte complexes. *Crystallography Reports, 61*(6), 945–953. https://doi.org/10.1134/S1063774516060110

Record, M. T., Anderson, C. F., & Lohman, T. M. (1978). Thermodynamic analysis of ion effects on the binding and conformational equilibria of proteins and nucleic acids: the roles of ion association or release, screening, and ion effects on water activity. *Quarterly Reviews of Biophysics, 11*(2), 103–178. https://doi.org/DOI: 10.1017/s003358350000202x

Rees, D. A. (1963). The carrageenan system of polysaccharides. Part I. The relation between the κ- and λ-components. *Journal of the Chemical Society*, 1821–1832. https://doi.org/10.1039/JR9630001821

Rees, D. A., Scott, W. E., & Williamson, F. B. (1970). Correlation of Optical Activity with Polysaccharide Conformation. *Nature, 227*(5256), 390–392. https://doi.org/10.1038/227390a0

Rees, D. A., Steele, I. W., & Williamson, F. B. (1969). Conformational analysis of polysaccharides. III. The relation between stereochemistry and properties of some natural polysaccharide sulfates (1). *Journal of Polymer Science Part C: Polymer Symposia, 28*(1), 261–276. https://doi.org/10.1002/polc.5070280121

Rinaudo, M., Karimian, A., & Milas, M. (1979). Polyelectrolyte behavior of carrageenans in aqueous solutions. *Biopolymers, 18*(7), 1673–1683. https://doi.org/10.1002/bip.1979.360180707

Rochas, C., Rinaudo, M., & Landry, S. (1990). Role of the molecular weight on the mechanical properties of kappa carrageenan gels. *Carbohydrate Polymers, 12*(3), 255–266. https://doi.org/10.1016/0144-8617(90)90067-3

Rochas, C. (1985). Conformational transition of kappa-carrageenan. *Journal of Thermal Analysis, 30*(6), 1375–1380. https://doi.org/10.1007/BF01914309

Rochas, C. & Rinaudo, M. (1980). Activity coefficients of counterions and conformation in kappa-carrageenan systems. *Biopolymers, 19*(9), 1675–1687. https://doi.org/10.1002/bip.1980.360190911

Rochas, C. & Rinaudo, M. (1984). Mechanism of gel formation in κ-carrageenan. *Biopolymers, 23*(4), 735–745. https://doi.org/10.1002/bip.360230412

Rochas, C. & Mazet, J. (1984). The conformational transition of κ-carrageenan using microcalorimetry. *Biopolymers, 23*(12), 2825–2833. https://doi.org/10.1002/bip.360231209

Rochas, C. & Rinaudo, M. (1982). Calorimetric determination of the conformational transition of kappa carrageenan. *Carbohydrate Research, 105*(2), 227–236. https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)84970-8

Rochas, C., Rinaudo, M., & Vincendon, M. (1980). Structural and conformational investigation of carrageenans. *Biopolymers, 19*(12), 2165–2175. https://doi.org/10.1002/bip.1980.360191203

Rudolph, B. (2000). Seaweed product: red algae of economic significance. In R. E. Martin, E. P. Carter, G. J. Flick, & L. M. Davis (Eds.), *Marine and Freshwater Products Handbook* (pp. 515–529). Lancaster: Technomic Publishing Company Inc.

Sason, G., & Nussinovitch, A. (2018). Characterization of κ-carrageenan gels immersed in ethanol solutions. *Food Hydrocolloids, 79*, 136–144. https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2017.12.025

Schafer, S. E., & Stevens, E. S. (1996). The optical rotation of ordered carrageenans. *Carbohydrate Polymers, 31*(1), 19–22. https://doi.org/ 10.1016/S0144-8617(96)00110-5

Schefer, L., Adamcik, J., Diener, M., & Mezzenga, R. (2015). Supramolecular chiral self-assembly and supercoiling behavior of carrageenans at varying salt conditions. *Nanoscale, 7*(39), 16182–16188. https://doi.org/10.1039/C5NR04525H

Schefer, L., Adamcik, J., & Mezzenga, R. (2014). Unravelling Secondary Structure Changes on Individual Anionic Polysaccharide Chains by Atomic Force Microscopy. *Angewandte Chemie International Edition, 53*(21), 5376–5379. https://doi.org/10.1002/anie.201402855

Schellman, J. A. (1975). Macromolecular binding. *Biopolymers, 14*(5), 999–1018. https://doi.org/10.1002/bip.1975.360140509

Slootmaekers, D., De Jonghe, C., Reynaers, H., Varkevisser, F. A., & van Treslong, C. J. B. (1988). Static light scattering from κ-carrageenan solutions. *International Journal of Biological Macromolecules, 10*(3), 160–168. https://doi.org/10.1016/0141-8130(88)90043-8

Slootmaekers, D., Mandel, M., & Reynaers, H. (1991). Dynamic light scattering by κ- and λ-carrageenan solutions. *International Journal of Biological Macromolecules, 13*(1), 17–25. https://doi.org/10.1016/0141-8130(91)90005-F

Smidsrød, O., & Grasdalen, H. (1984). Conformations of κ-carrageenan in solution. In C. J. Bird & M. A. Ragan (Eds.), *Eleventh International Seaweed Symposium* (pp. 178–186). Trondheim: Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-009-6560-7_30

Smidsrød, O., & Grasdalen, H. (1984). Polyelectrolytes from seaweeds. *Hydrobiologia, 116*(1), 19–28. https://doi.org/10.1007/BF00027634

Smidsrød, O., & Haug, A. (1971). Estimation of the relative stiffness of the molecular chain in polyelectrolytes from measurements of viscosity at different ionic strengths. *Biopolymers, 10*(7), 1213–1227. https://doi.org /10.1002/bip.360100711

Snoeren, T. H. M., & Payens, T. A. J. (1976). On the sol-gel transition in solutions of Kappa-carrageenan. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 437*(1), 264–272. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0304-4165(76)90369-X

Stanley, N. F. (1990). Carrageenans. In P. Harris (Ed.), *Food Gels* (pp. 79–119). Dordrecht: Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-009-0755-3_3

Takemasa, M., Chiba, A., & Date, M. (2001). Gelation Mechanism of κ- and ι-Carrageenan Investigated by Correlation between the Strain−Optical Coefficient and the Dynamic Shear Modulus. *Macromolecules, 34*(21), 7427–7434. https://doi.org/10.1021/ma0102924

Takemasa, M., Chiba, A., & Date, M. (2002). Counterion Dynamics of κ- and ι-Carrageenan Aqueous Solutions Investigated by the Dielectric Properties. *Macromolecules, 35*(14), 5595–5600. https://doi.org/10.1021/ma020206f

Takemasa, M., & Nishinari, K. (2004). The effect of the linear charge density of carrageenan on the ion binding investigated by differential scanning calorimetry, dc conductivity, and kHz dielectric relaxation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 38*(3), 231–240. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2004.02.025

Therkelsen, G. H. (1993). Carrageenan. In J. N. Bemiller & R. L. Whistler (Eds.), *Industrial Gums: Polysaccharides and Their Derivatives* (Third Edit, pp. 145–180). Academic Press. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-08-092654-4.50011-5

Thrimawithana, T. R., Young, S., Dunstan, D. E., & Alany, R. G. (2010). Texture and rheological characterization of kappa and iota carrageenan in the presence of counter ions. *Carbohydrate Polymers, 82*(1), 69–77. https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2010.04.024

Trius, A., Sebranek, J. G., & Lanier, T. (1996). Carrageenans and their use in meat products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 36*(1–2), 69–85. https://doi.org/10.1080/10408399609527719

Turquois, T., Rochas, C., Taravel, F.-R., Doublier, J. L., & Axelos, M.-A.-V. (1995). Small-angle X-ray scattering of κ-carrageenan based systems: Sols, gels, and blends with carob galactomannan. *Biopolymers, 36*(5), 559–567. https://doi.org/10.1002/bip.360360502

Uchiyama, H., Nogami, S., Katayama, K., Hayashi, K., Kadota, K., & Tozuka, Y. (2018). Jelly containing composite based on α-glucosyl stevia and polyvinylpyrrolidone: Improved dissolution property of curcumin. *European Journal of Pharmaceutical Sciences, 117*, 48–54. https://doi.org/ 10.1016/j.ejps.2018.02.011

Ueda, K., Itoh, M., Matsuzaki, Y., Ochiai, H., & Imamura, A. (1998). Observation of the Molecular Weight Change during the Helix−Coil Transition of κ-Carrageenan Measured by the SEC−LALLS Method. *Macromolecules, 31*(3), 675–680. https://doi.org/10.1021/ma970846w

van de Velde, F., Knutsen, S. H., Usov, A. I., Rollema, H. S., & Cerezo, A. S. (2002). ^{1}H and ^{13}C high resolution NMR spectroscopy of carrageenans: application in research and industry. *Trends in Food Science & Technology, 13*(3), 73–92. https://doi.org/10.1016/S0924-2244(02)00066-3

van de Velde, Fred. (2008). Structure and function of hybrid carrageenans. *Food Hydrocolloids, 22*(5), 727–734. https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2007.05.013

van de Velde, Fred, Antipova, A. S., Rollema, H. S., Burova, T. V, Grinberg, N. V, Pereira, L., … Grinberg, V. Y. (2005). The structure of κ/ι-hybrid carrageenans II. Coil–helix transition as a function of chain composition. *Carbohydrate Research, 340*(6), 1113–1129. https://doi.org/10.1016/j.carres.2005.02.015

van de Velde, Fred, Peppelman, H. A., Rollema, H. S., & Tromp, R. H. (2001). On the structure of κ/ι-hybrid carrageenans. *Carbohydrate Research, 331*(3), 271–283. https://doi.org/10.1016/S0008-6215(01)00054-4

van de Velde, Fred, Pereira, L., & Rollema, H. S. (2004). The revised NMR chemical shift data of carrageenans. *Carbohydrate Research, 339*(13), 2309–2313. https://doi.org/10.1016/j.carres.2004.07.015

Varela, P., & Fiszman, S. M. (2011). Hydrocolloids in fried foods. A review. *Food Hydrocolloids, 25*(8), 1801–1812. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.01.016

Viebke, C., Borgström, J., Carlsson, I., Piculell, L., & Williams, P. (1998). A Differential Scanning Calorimetry Study of κ-Carrageenan in the NaCl/NaI/CsI/CsCl Systems and Analysis by Poisson−Boltzmann Calculations. *Macromolecules, 31*(6), 1833–1841. https://doi.org/10.1021/ma971066q

Viebke, C., Borgström, J., & Piculell, L. (1995). Characterization of kappa- and iota-carrageenan coils and helices by MALLS/GPC. *Carbohydrate Polymers, 27*(2), 145–154. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0144-8617(95)00017-2

Vreeman, H. J., Snoeren, T. H. M., & Payens, T. A. J. (1980). Physicochemical investigation of κ-carrageenan in the random state. *Biopolymers, 19*(7), 1357–1374. https://doi.org/10.1002/bip.1980.360190711

Watase, M., & Nishinari, K. (1981). Effect of alkali metal ions on the rheological properties of κ-carrageenan and agarose gels. *Journal of Texture Studies, 12*(4), 427–445. https://doi.org/10.1111/j.1745-4603.1981.tb00259.x

Watase, M., & Nishinari, K. (1982). The rheological study of the interaction between alkali metal ions and kappa-carrageenan gels. *Colloid and Polymer Science, 260*(10), 971–975. https://doi.org/10.1007/BF01413132

Webber, V., de Carvalho, S. M., & Barreto, P. L. M. (2012). Molecular and rheological characterization of carrageenan solutions extracted from *Kappaphycus alvarezii*. *Carbohydrate Polymers, 90*(4), 1744–1749. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.07.063

Zhang, W., & Furó, I. (1993). 127I-NMR Studies of Anion Binding to κ-Carrageenan. *Biopolymers, 33*(11), 1709–1714. https://doi.org/10.1002/bip.360331108

Zia, K. M., Tabasum, S., Nasif, M., Sultan, N., Aslam, N., Noreen, A., & Zuber, M. (2017). A review on synthesis, properties and applications of natural polymer based carrageenan blends and composites. *International Journal of Biological Macromolecules, 96*, 282–301. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.11.095

3. APLICACIÓN DEL MÉTODO DE LA TANGENTE DE δ EN LA DETERMINACIÓN DE LA TEMPERATURA DE FUSIÓN DE GELES DE κ-CARRAGENINA EN PRESENCIA DE IONES CALCIO

3.1 Resumen

El objetivo del presente estudio fue investigar la aplicabilidad e idoneidad del método de la tangente de δ para determinar la temperatura de fusión precisa ($T_{m,a}$) para el gel de 1% κ-carragenina en presencia de 20 mM Ca^{2+} durante el calentamiento. La temperatura de fusión se midió usando reometría de cizalla oscilatoria dinámica. Se utilizó el criterio de Winter–Chambon (tan δ se vuelve independiente de la frecuencia) para superar la dependencia de la frecuencia sobre la temperatura de fusión que presenta el método reológico convencional de barrido de temperatura. La tarea principal fue realizar los barridos de frecuencia cerca del cruce del módulo de almacenamiento G'(ω) y el módulo de pérdida G''(ω) durante el calentamiento, observado en un procedimiento reológico de rampa de temperatura. El punto de cruce de G'(ω) y G''(ω) durante el procedimiento de rampa de temperatura en el calentamiento ocurrió a $T_{c\text{-}o}$ = 54.2 °C ± 1.07 °C. El método de la tangente de δ estableció que la $T_{m,\,a}$ para el sistema 1% κ-carragenina con 20 mM de Ca^{2+} fue 55.0 °C. En el punto de fusión, el exponente de relajación de la ley de potencia obtenido 'n' fue constante (n = 0.87 ± 0.01) e independiente de la temperatura. El método de la tangente de δ fue fácil de usar y factible de aplicar para determinar el punto de fusión de un gel a base de biopolímero.

Palabras clave: κ-carragenina, transición sol-gel, punto de fusión

Tesis de Doctorado en Ciencias Agroalimentarias, Programa de Posgrado en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, Universidad Autónoma Chapingo
Autor: M. en C. Bernabé Laureano López
Director de Tesis: Dr. Artemio Pérez López

APPLICATION OF THE TAN δ METHOD IN THE DETERMINATION OF THE MELTING TEMPERATURE OF κ-CARRAGEENAN GELS IN THE PRESENCE OF CALCIUM IONS

Abstract

The objective of the present study was to investigate the applicability and suitability of the tan δ method to determine an accurate melting temperature for an 1% (w/w) κ-carrageenan gel in the presence of 20 mM Ca^{2+} during heating. Melting temperature was measured using dynamic oscillatory shear rheometry. Winter–Chambon criterion (tan δ becomes independent of frequency) was used to avoid the frequency dependence on the melting temperature that conventional temperature sweep rheological method exhibits. The main task was to perform frequency sweeps near the crossover of the storage modulus G'(ω) and loss modulus G''(ω) during heating in a temperature sweep. The crossover point temperature ($T_{c\text{-}o}$) of G'(ω) and G''(ω) during the temperature sweep procedure in heating occurred at $T_{c\text{-}o}$ = 54.2 ± 1.07 °C. The tan δ method established that $T_{m,\,a}$ for 1% κ-carrageenan with a 20 mM Ca^{2+} system was 55.0 °C. At the melting point, the power-law relaxation exponent *n* obtained was a constant (n = 0.87 ± 0.01) and independent of temperature. The tan δ method was easy to use and feasible to apply to determine the melting point of a biopolymer-based gel.

Key words: κ-carrageenan; gel-sol transition; melting point, physical gels

---

Doctoral thesis. Doctorado en Ciencias Agroalimentarias. Departamento de Ingeniería Agroindustrial, Universidad Autónoma Chapingo.

Author: M. en C. Bernabé Laureano López
Thesis director: Dr. Artemio Pérez López

3.2 Introducción

La amplia variedad de aplicaciones que han sido encontradas para geles a base de biopolímeros ha atraído la atención de muchos investigadores. Para la industria alimentaria, debido a la gran cantidad de alimentos ya conocidos y a que cada día se inventan nuevos en forma de gel, existe la necesidad de comprender y predecir el comportamiento de estos sistemas. Las temperaturas de gelificación y fusión son dos propiedades esenciales en el procesamiento de geles alimentarios. Sin embargo, la mayoría de los estudios sobre geles físicos proporcionan solo información del comportamiento de gelificación. Es importante determinar no solo la temperatura de gelificación sino también la temperatura de fusión para obtener un espectro completo del comportamiento del gel. Un gel es un material blando, sólido o semejante a un sólido (Almdal, Dyre, Hvidt, & Kramer, 1993). La gelificación es el fenómeno que involucra la asociación o entrecruzamiento de las cadenas de polímero para formar una red tridimensional que atrapa o inmoviliza el agua dentro de ella para formar una estructura rígida (Banerjee y Bhattacharya, 2012). Ciertos biopolímeros son bien conocidos por formar geles en condiciones específicas y pueden estar implicados diversos tipos de mecanismos moleculares de entrecruzamiento (Clark & Ross-Murphy, 1987). Uno de estos biopolímeros es la κ-carragenina, que forma geles termorreversibles en solución acuosa cuando la temperatura disminuye a una concentración adecuada de polímero (Anderson, Campbell, Harding, Rees, & Samuel, 1969; Rochas & Rinaudo, 1984).

El mecanismo de gelificación de la κ-carragenina está bien aceptado como un proceso cooperativo en dos pasos, en el que primero, hebras aleatorias de polímero son convertidas en estructuras de doble hélice, seguido por agregación de las moléculas ordenadas para formar una red infinita (Rochas y Rinaudo, 1984). Se ha demostrado ampliamente que la interacción entre biopolímeros y contraiones específicos promueve el proceso de gelificación (Morris, Rees, y Robinson, 1980; Morris, 1986; Hermansson, Eriksson, & Jordansson, 1991). Sin embargo, se han realizado pocos estudios sobre el sistema κ-carragenina–Ca^{2+}

en comparación con el sistema κ-carragenina–K^+, principalmente porque existen diferencias importantes y bien conocidas en la sensibilidad a la sal, lo que da como resultado una gran variedad de perfiles reológicos. En la industria alimentaria, muchas de las aplicaciones de las aplicaciones de las carrageninas contienen leche o sus derivados como materia prima, la cual posee alto contenido de calcio (Walstra, Wouters y Geurts, 2006). Las carrageninas han sido usadas para mejorar la textura del queso cottage, para controlar la viscosidad y la textura de pudines y postres lácteos (Campo, Kawano, da Silva y Carvalho, 2009) y como sustitutos de grasa, especialmente en productos lácteos (Zia et al., 2017). Además, la κ-carragenina tiene efecto sinergístico con proteínas de la leche y algunos polisacáridos (Dong, Wei y Xue, 2021). Los estudios realizados por Rochas y Rinaudo (1980) parecen indicar que los cationes estudiados pueden dividirse en tres categorías en relación con su eficiencia para promover la agregación de hélices: los cationes monovalentes "específicos" (NH_4^+, K^+, Cs^+ y Rb^+), los cationes divalentes (Mg^{2+}, Ca^{2+}, Sr^{2+}, Ba^{2+}, Co^{2+} y Zn^{2+}) y, los cationes monovalentes "no específicos" (Li^+, Na^+ y $(CH_3)_4N^+$). Los iones monovalentes específicos son mucho más efectivos estabilizadores de las hélices incluso que los iones divalentes. Sin embargo, los cationes divalentes también pueden conducir a la gelificación (Morris 1986). Por el contrario, ni el litio ni el sodio mostraron una estructura de gel cohesiva (Morris et al., 1980).

Aunque se han utilizado varias técnicas para estudiar la gelificación y fusión de biopolímeros, la reología sigue siendo una herramienta sofisticada y poderosa para investigar algunas de las propiedades más importantes del gel (Yang, Yang, & Yang, 2018), como la transición sol-gel y el comportamiento viscoelástico. Además, debido a que los geles son materiales viscoelásticos, las pruebas reológicas dinámicas son muy adecuadas para examinar las propiedades del gel y la temperatura de transición sol-gel. La reología de biopolímeros se centra en dos tipos de técnicas reológicas: (1) cizallamiento oscilatorio de pequeña amplitud, una técnica reológica no destructiva en la que se cumple la linealidad entre el esfuerzo y la deformación; por lo que, los protocolos de análisis tienen una base teórica firme y se pueden implementar métodos de prueba adecuados

(Nishinari, 1997) y (2) cizalla oscilatoria de gran amplitud, que mide la respuesta "no lineal" del material (Ahmed, Ptaszek, & Basu, 2017). Se puede observar inicialmente una aproximación de las temperaturas de gelificación (T_g) y fusión (T_m) durante el enfriamiento y el calentamiento, respectivamente, utilizando el procedimiento reológico de rampa de temperatura en el punto de cruce entre G'(ω) y G''(ω). Sin embargo, es bien conocido que el punto de cruce de G'(ω) – G''(ω) es generalmente un evento dependiente de la frecuencia y, a menos que el sistema reactante esté balanceado estequiométricamente y a una temperatura mucho más alta que la temperatura de transición vítrea, el módulo de almacenamiento y el módulo de pérdida no convergen en el punto de gel (Winter & Chambon, 1986). Así, la validez de este criterio se restringe al grupo de polímeros formadores de red que exhiben relajación de la ley de potencia en la forma $G(t) = St^{-n}$ con un valor característico del exponente $n = 1/2$ (Winter, 1987). Para sistemas poliméricos que no pertenecen a este grupo, la transición sol-gel se puede detectar con mayor precisión en un experimento mecánico dinámico en el que la independencia de la frecuencia frente a la tangente de pérdidas (tan δ) determina el punto de gel preciso (Chambon & Winter, 1987). La relajación de la ley de potencia en el punto de gel parece ser una propiedad general de la gelificación química y física que involucra polímeros sintéticos o biopolímeros, respectivamente. Sin embargo, no es un parámetro general para la gelificación. Para algunos geles físicos, se encontró que el exponente crítico (n) depende de la concentración del polímero (Michon, Cuvelier, & Launay, 1993) y del historial térmico (Lopes da Silva & Gonçalves, 1994). El punto en el que un sistema en estado de sol pasa al estado de gel puede detectarse a partir de los datos de un barrido de frecuencia. En este trabajo, nos concentramos en la fusión del gel formado a partir de 1% κ-carragenina + 20 mM Ca^{2+} y hacemos uso de ensayos multifrecuencia para monitorear el comportamiento de la tan δ *versus* temperatura, para diferentes valores de frecuencia, en una sola prueba. Este método es conocido como el procedimiento de ángulo de fase crítico o simplemente como el 'método de la tangente de δ'. El método de la tangente de δ fue exitosamente usado en el estudio de la capacidad gelificante y las

propiedades reológicas de los polisacáridos de ocra mezclados con κ-carragenina por Chen et al., (2019) y en una investigación del efecto de la sacarosa añadida sobre el comportamiento reológico de geles ι-carragenina (Yang, Gao, & Yang, 2020). Sin embargo, no se ha reportado si se puede determinar de la misma manera la temperatura de fusión precisa ($T_{m,a}$) para un gel de κ-carragenina en presencia de iones Ca^{2+}. El objetivo del presente estudio fue investigar la aplicabilidad e idoneidad del método de la tangente de δ para determinar la temperatura de fusión precisa del gel de κ-carragenina en presencia de 20 mM de iones Ca^{2+} utilizando reometría de cizalla oscilatoria de pequeña amplitud.

3.3 Materiales y métodos

3.3.1 Reactivos

La κ-carragenina, extraída de *Eucheuma cottonii* (contenido de potasio, sodio, magnesio y calcio determinado por espectrometría de absorción atómica: 7.38%, 0.37%, 0.10% and 0.10%, respectivamente), fue adquirida de Sigma-Aldrich (Toluca, México) y usada sin purificación adicional. El cloruro de calcio ($CaCl_2$) fue grado ACS y obtenido de Meyer® (Ciudad de México, México). Se usó agua desionizada en todo momento. El aceite de parafina fue adquirido de Hycel (Guadalajara, México).

3.3.2 Preparación de la solución

La solución acuosa al 20 mM de $CaCl_2$ se preparó en presencia de agitación magnética continua y temperatura ambiente (25 ± 2 °C). Luego, la κ-carragenina fue incorporada lentamente a 70 °C bajo agitación magnética hasta su dispersión completa. La solución fue calentada a 80 °C durante 30 min y conservada a esta temperatura hasta su uso.

3.3.3 Reología

Las determinaciones reológicas fueron realizadas en un reómetro de esfuerzo controlado (DHR-3, TA Instruments, New Castle, USA) equipado con una geometría de acero inoxidable y placas paralelas de estría cruzada (40 mm de diámetro, gap = 1000 μm). Previo a la evaluación, el reómetro fue equilibrado a 80 °C usando el sistema de control de temperatura Peltier. A esta temperatura, la muestra previamente preparada fue transferida al reómetro. La placa superior de la geometría también se calentó, pero esta mediante el uso de una plancha (Thermo Fisher Scientific) monitoreada con termopares. Se utilizó aceite de parafina para evitar la evaporación de agua. Además, se verificó que la evaporación de agua no fue significativa al observar los cambios en G'(ω) y G''(ω) (frecuencia a 6.283 rad s^{-1} y deformación al 1%) a 80 °C durante 60 min (Liu, Huang, & Li, 2016). Se realizaron barridos de amplitud con deformación en el intervalo de 0.1 – 100% a frecuencia de 6.283 rad s^{-1} para determinar la zona de viscoelasticidad lineal de la muestra en los estados de sol y gel. Se realizaron rampas de temperatura de 80 hasta 20 °C a 1 °C min^{-1} para obtener un gel *in situ*. Después de 30 min a 20 °C, se realizó una rampa de temperatura con una velocidad de calentamiento de 1 °C min^{-1} a frecuencia angular constante de 6.283 rad s^{-1} y deformación fija de 1% desde 20 °C hasta 80 °C para estudiar la temperatura de fusión. Durante el calentamiento, se observó la evolución de G'(ω) y G''(ω) hasta que se alcanzó el punto de cruce de ambos módulos. En este estudio, el valor de temperatura en el que los módulos de almacenamiento y pérdidas se intersectan fue definido como $T_{c\text{-}o}$. Se ajustó la fuerza axial en el panel de control del gap para compensar los cambios de volumen de la muestra por efecto de la temperatura. En valores cercanos a esta temperatura, se realizaron barridos de frecuencia (0.1–100 rad s^{-1}) a una deformación fija de 1%. Una vez que los barridos de frecuencia fueron obtenidos, se aplicó el método de la tangente de δ para obtener $T_{m,\,a}$. El análisis del exponente de relajación de la ley de potencia también surge del espectro mecánico mediante un manejo diferente de los datos reológicos. Todas las mediciones reológicas se realizaron por triplicado.

3.3.4 Calorimetría de barrido diferencial (CDB)

La muestra de 1% κ-carragenina con 20 mM Ca^{2+} (~500 mg) fue colocada dentro de una charola porta muestra de acero inoxidable sellada herméticamente y pesada en una balanza analítica de precisión (Sartorius, Göttingen, Germany) ($\pm 1.0 \times 10^{-5}$ g). Se usó como referencia una charola de acero inoxidable, sellada, que contenía una solución al 20 mM de $CaCl_2$ (~500 mg). Se empleó la técnica DSC para obtener el flujo de calor (mW) *versus* curvas de temperatura en un calorímetro de barrido diferencial (Q20, TA Instruments, New Castle, USA). Las muestras se escanearon usando una rampa de calentamiento de 1 °C min^{-1} desde 10 °C hasta 80 °C. Se usó nitrógeno líquido como refrigerante.

3.3.5 Microscopía electrónica de barrido ambiental

Se colocó un gel sobre una placa de aluminio y se fijó con cinta conductora de carbono y se observó directamente en un microscopio de barrido ambiental (Carl Zeiss, EVO LS10, Germany) con voltaje de aceleración de 20 kV, presión de 100 Pa y temperatura de 10 °C. Se utilizó un detector de electrones retrodispersos y se obtuvieron micrografías en escala de grises. Estas se almacenaron en formato TIFF con resolución de 1024 x 768 pixeles.

3.4 Resultados

3.4.1 Rampa de temperatura

Por lo general, muchos investigadores utilizan el cruce de G'(ω) y G''(ω) como indicador del punto de gel. Este método tiene las ventajas de ser rápido y conveniente, pero no es válido en general, porque depende de la frecuencia oscilatoria de la prueba reológica dinámica. No obstante, cuando se pueden obtener datos aplicables, como en el caso del sistema κ-carragenina – Ca^{2+}, es probable que $T_{c\text{-}o}$ esté cerca de la temperatura de transición gel-sol durante la aplicación de un programa térmico de calentamiento. La Figura 9 muestra la

disminución de G'(ω) y G''(ω) con el aumento de la temperatura para 1% κ-carragenina + 20 mM Ca^{2+}. A medida que la temperatura aumentó aún más, la transición gel-sol se produjo junto con las intersecciones de G'(ω) y G''(ω). Según los resultados de este estudio, para 1% κ-carragenina + 20 mM Ca^{2+}, T_{c-o} fue 54.2 ± 1.07 °C. Lai et al. (2000) consideraron que la T_m del gel refleja la estabilidad térmica o la fuerza de unión de los sitios de unión de la red del hidrogel.

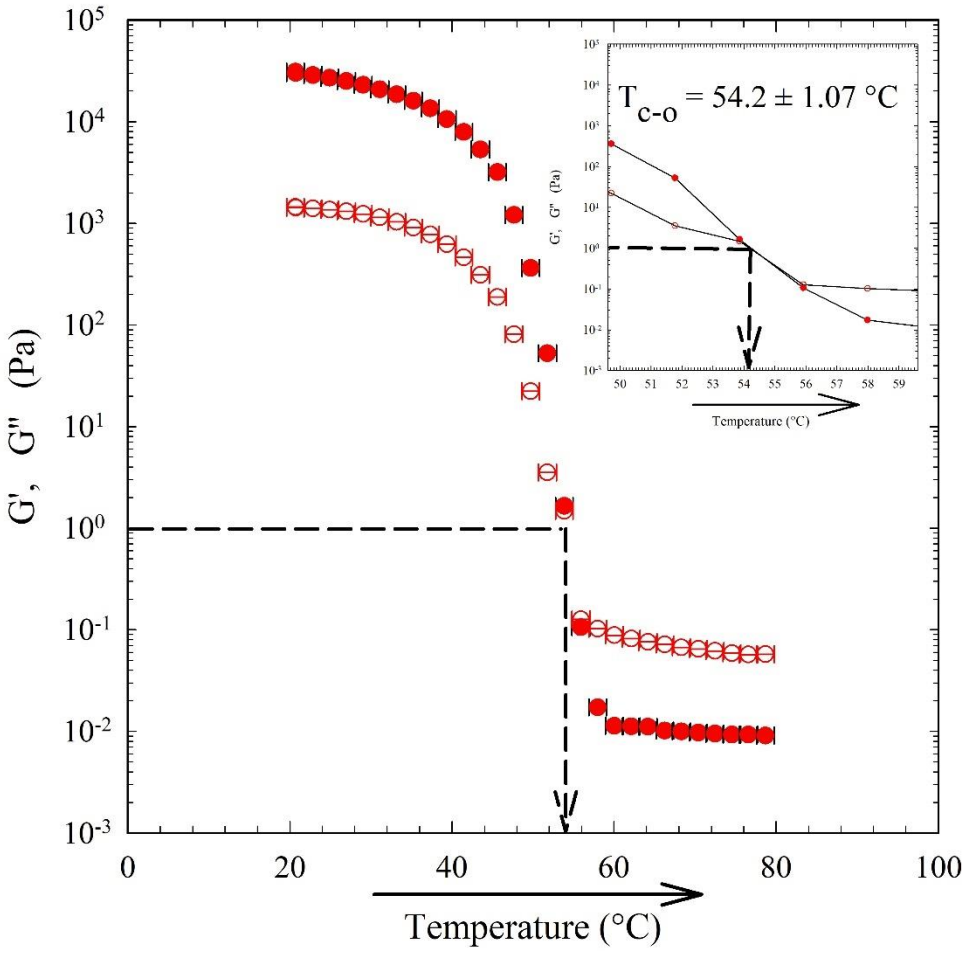


Figura 9. Dependencia de G' (símbolos rellenos) y G'' (símbolos vacíos) sobre la temperatura. Velocidad de calentamiento de 1 °C min^{-1} para 1% κ-carragenina + 20 mM Ca^{2+}. (ω = 6.283 rad seg^{-1}, deformación = 1%). Los datos experimentales representan la media de tres réplicas ± el error estándar.

En el presente estudio, la T_{c-o} fue obtenida durante el procedimiento de rampa de temperatura, pero cabe señalar que estos valores se obtuvieron bajo ciertos

parámetros (velocidad de calentamiento: 1 °C min^{-1} y ω: 6.283 rad s^{-1}). Como se mencionó anteriormente, diferentes autores han informado que la velocidad de enfriamiento o calentamiento y la frecuencia afectan los puntos de gelificación o fusión, respectivamente. Por tanto, hemos considerado la T_{c-o} solo como un valor de referencia antes de determinar la temperatura de fusión precisa ($T_{m,\ a}$) mediante el método de la tangente de δ.

3.4.2 Fusión del gel

La Figura 10 muestra la variación de G'(ω) y G''(ω) con la frecuencia y la temperatura para 1% κ-carragenina + 20 mM Ca^{2+}. Algunos rasgos característicos se pueden describir a partir del espectro mecánico.

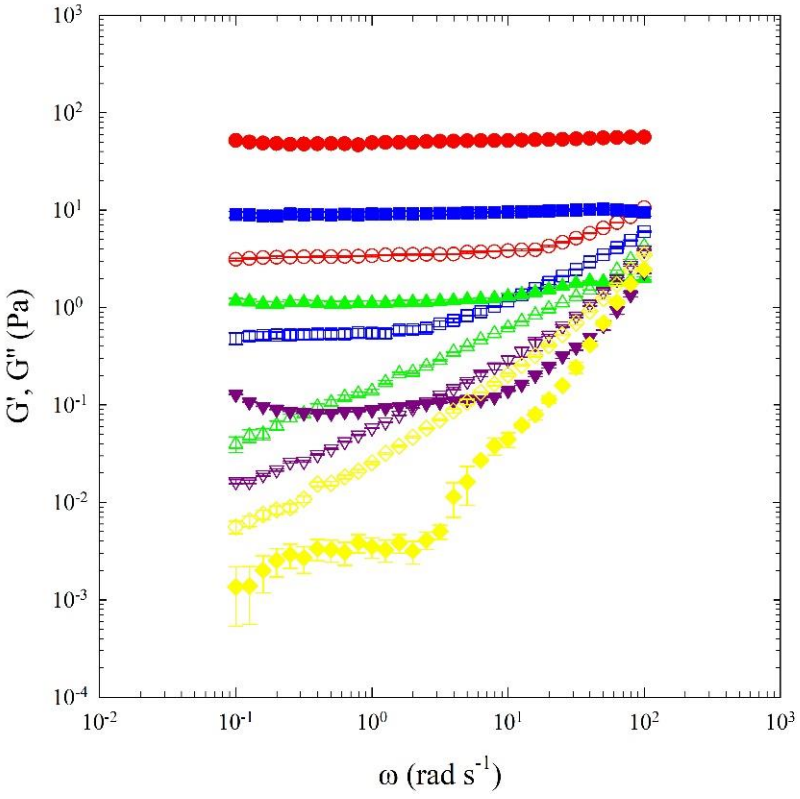


Figura 10. Variación de G' (símbolos rellenos) y G'' (símbolos vacíos) con la frecuencia y la temperatura para 1% κ-carragenina + 20 mM Ca^{2+} a 51.0 °C (círculos), 52.6 °C (cuadros), 53.8 °C (triángulos), 55.0 °C (triángulos invertidos) y 56.0 °C (rombos). Los datos experimentales representan la media de tres réplicas ± el error estándar.

A 51.0 y 52.6 °C, los valores de G'(ω) están separados por más de un ciclo logarítmico con G'(ω) > G''(ω), tan δ ≤ 0.12 en todo el intervalo de frecuencia para ambas temperaturas y se muestra un '*plateau*' elástico característico. Todas estas características denotan el comportamiento convencional de un gel (G'(ω) y G''(ω) independientes de la frecuencia y tan δ << 1). A 53.8 °C, se pudo observar un punto de cruce de los módulos en el tercer ciclo logarítmico del rango de frecuencia evaluado. En este caso, tan δ = 0.03 a 0.97. a 55.0 °C, a valores bajos de frecuencia G'(ω) > G''(ω), para ω = 3 rad s^{-1}, se observa un cruce de módulos y, por encima de este valor, G''(ω) > G'(ω) con tan δ ≈ 1. Finalmente, a 56.0 °C, el comportamiento reológico fue característico de una solución macromolecular con G''(ω) >> G'(ω) y ambos módulos dependientes de la frecuencia (Núñez-Santiago & Tecante 2007). A esta última temperatura evaluada, tan δ > 1 en todo el intervalo de frecuencia.

3.4.3 Análisis del método de la tangente de δ

Los criterios de Winter y Chambon se basan en el hecho de que, en un momento particular del proceso de gelificación o fusión, los módulos (G'(ω) y G''(ω) exhiben dependencia de la ley de potencia sobre la frecuencia. La $T_{m,\,a}$ se define como el punto en el que la tangente de δ es independiente de la frecuencia. La Figura 11 muestra las dependencias de la temperatura y la frecuencia de la tangente δ de para el espectro mecánico ilustrado en la Figura 10. Todas las curvas pasan por un punto en común a 55.0 °C. Así, para 1% κ-carragenina + 20 mM Ca^{2+}, $T_{m,\,a}$ = 55.0 °C, que corresponde a un valor de tan δ = 2.1. El método de la tangente de δ ya ha se ha utilizado con éxito en la investigación de propiedades críticas. Por ejemplo, se ha utilizado para determinar el punto de gelificación preciso en soluciones acuosas de κ-carragenina en presencia de hasta 30% en peso de sacarosa por Yang et al. (2018) y para determinar el punto crítico (concentración crítica) de geles de κ-carragenina a varias temperaturas por Liu, Chan, & Li, (2015). En este trabajo, el análisis del método de la tangente de δ también fue efectivo para el cálculo de la temperatura de fusión precisa, mostrando que durante la transición gel-sol, $T_{m,\,a}$ puede determinarse correctamente mediante el

punto de convergencia del log (tan δ) *versus* curvas de temperatura a una serie de frecuencias fijas.

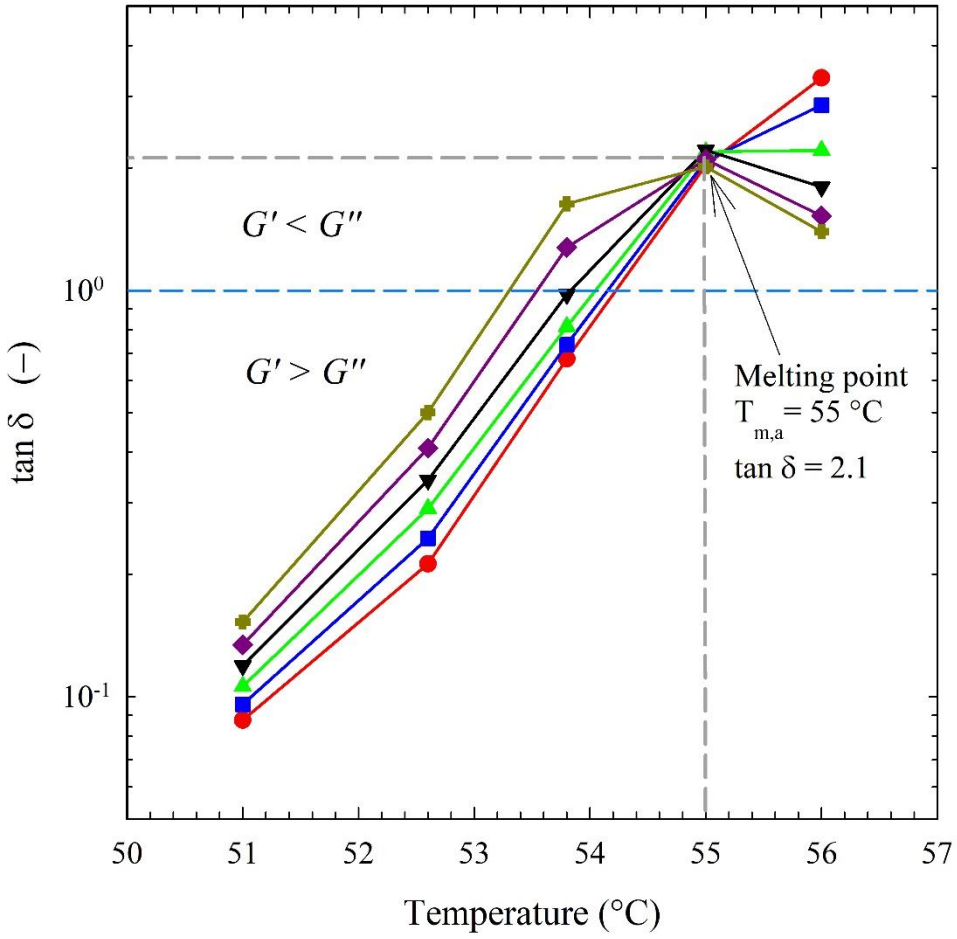


Figura 11. Método de la tangente de δ para 1% κ-carragenina + 20 mM Ca^{2+} a diferentes frecuencias (rad/s). 25.1 (círculos), 31.6 (cuadros), 39.8 (triángulos), 50.1 (triángulos invertidos), 63.0 (rombos) y 79.4 (cruces). Los datos corresponden al espectro mecánico mostrado en la Figura 10.

3.4.4 El exponente de relajación de la ley de potencia

Dado que el módulo de almacenamiento G'(ω) y el módulo de pérdidas G''(ω) a bajas frecuencias puede ser expresado aproximadamente por las leyes de escalamiento $G'(\omega) \propto \omega^{n'}$ y $G''(\omega) \propto \omega^{n''}$, respectivamente, un cruce de n' = n'' = n podría considerarse como un indicador del punto de gelificación (Winter &

Chambon 1986; Chambon & Winter 1987). El exponente de la ley de potencia para G'(ω) y G''(ω), n = 0.87 ± 0.01 en el punto crítico (Figura 12), indica que a una temperatura de 55.7 °C, el sistema 1% κ-carragenina + 20 mM Ca^{2+} es viscoelástico con G''(ω) >> G'(ω) (tan δ = 2.1, G'' = 2.1G'). Este hallazgo implica que el comportamiento del gel corresponde a una relajación "auto-similar", ya que el exponente crítico es el mismo en cualquier escala de tiempo de observación dentro de la ventana de tiempo dada (Winter, 1994).

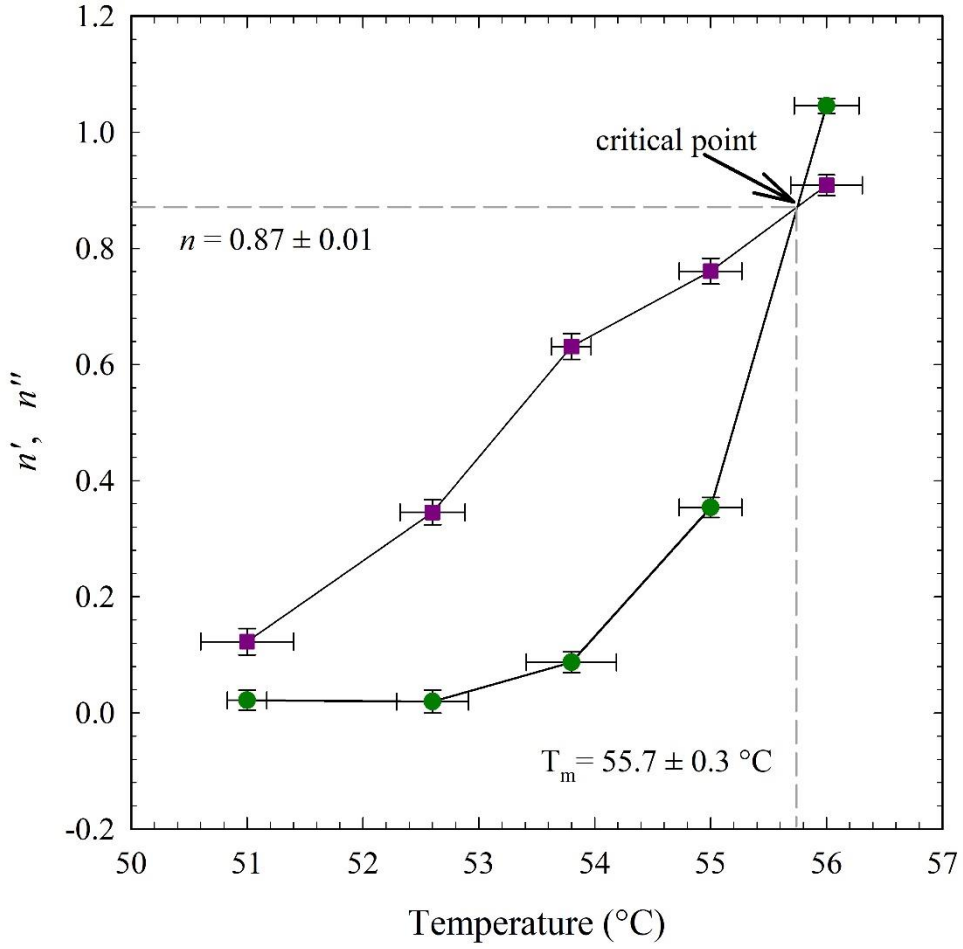


Figura 12. Variación del exponente de la ley de potencia con la temperatura para el sistema 1% κ-carragenina + 20 mM Ca^{2+}. n' (triángulos) y n'' (círculos). Las líneas que unen los puntos de datos experimentales se incluyen solo como una guía para localizar mejor la temperatura de transición gel–sol.

Nuestros datos también muestran que el exponente de relajación de la ley de potencia no es constante y, cerca de la transición gel-sol, aumentó rápidamente con la temperatura. Por ejemplo, fue de 0.02 a 51 °C hasta 1.04 a 56 °C. De manera similar, muchos estudios han mostrado valores relativamente altos de 'n' para geles físicos (Li & Aoki 1997; Schwittay, Mours, & Winter, 1995; Te Nijenhuis & Winter, 1989). La diferencia en los valores de temperatura entre el método de la tangente de δ y el método del exponente de la ley de potencia fue 1.2% para el sistema 1% κ-carragenina + 20 mM Ca^{2+}. Esta diferencia podría ser atribuida al hecho de que el exponente de la ley de potencia solo es independiente de la frecuencia en el punto de gel, donde la relajación auto-similar gobierna el comportamiento reológico. Por tanto, el método del exponente de la ley de potencia no garantiza la determinación de un punto de fusión preciso. En efecto, Núñez-Santiago y Tecante (2007) reportaron que el uso de este análisis de datos para obtener la T_g en sistemas κ-carragenina–K^+ fue difícil, principalmente porque el exponente crítico cambia radicalmente dentro de un intervalo de temperatura estrecho, lo que hace necesario un control estricto de la temperatura y un sistema en estudio en el que la gelificación se pueda detener a una temperatura determinada.

3.4.5 Calorimetría diferencial de barrido (CDB)

La Figura 13 muestra el termograma de calentamiento por CDB para 1% κ-carragenina + 20 mM Ca^{2+}, que se caracterizó por mostrar solo un pico endotérmico bien definido en el calentamiento. En general, se reconoce que aparece un pico endotérmico cuando un sistema cambia de un estado ordenado a un estado desordenado, como en la transición gel-sol de los geles a base de biopolímeros (Elkordy, 2013). Durante el calentamiento, los puentes de hidrógeno se rompen, las estructuras de doble hélice cambian su conformación, dando lugar a la fusión de los agregados y la red de gel se rompe. La ruptura del gel de carragenina se produce en un intervalo de temperatura, pero el pico endotérmico, localizado a la temperatura máxima, se consideró la temperatura de fusión (T_m). Nuestros resultados muestran que mediante la técnica de CDB, la temperatura

máxima fue ≈ 54.2 ± 0.5 °C y, la temperatura de fusión precisa, determinada por el método de la tangente de δ fue $T_{m,\,a}$ = 55 °C. Esta ligera diferencia podría deberse a que la CDB es una técnica basada en el análisis térmico, mientras que las propiedades reológicas se determinan midiendo la fuerza y la deformación en función del tiempo, proporcionando información cuantitativa sobre las propiedades mecánicas de un material (Tabilo-Munizaga & Barbosa-Cánovas 2005). Por tanto, no es de extrañar que estos valores difieran ligeramente en cantidad, aunque podrían servir para corroborar la aplicabilidad del método de la tangente de δ para determinar la $T_{m,\,a}$. En comparación, construir una estructura a menudo es un proceso mucho más lento. Durante el enfriamiento, la transición de hebra aleatoria a dobles hélices es extremadamente rápida (Norton, Goodall, Morris, & Rees, 1983), mientras que la posterior agregación de dobles hélices en pequeños dominios para formar una red tridimensional (Mangione, Giacomazza, Bulone, Martorana, & San Biagio, 2003) es más lenta. Los experimentos de curado de gel han revelado que la formación completa del gel es un evento dependiente del tiempo (Tecante & Núñez-Santiago, 2012).

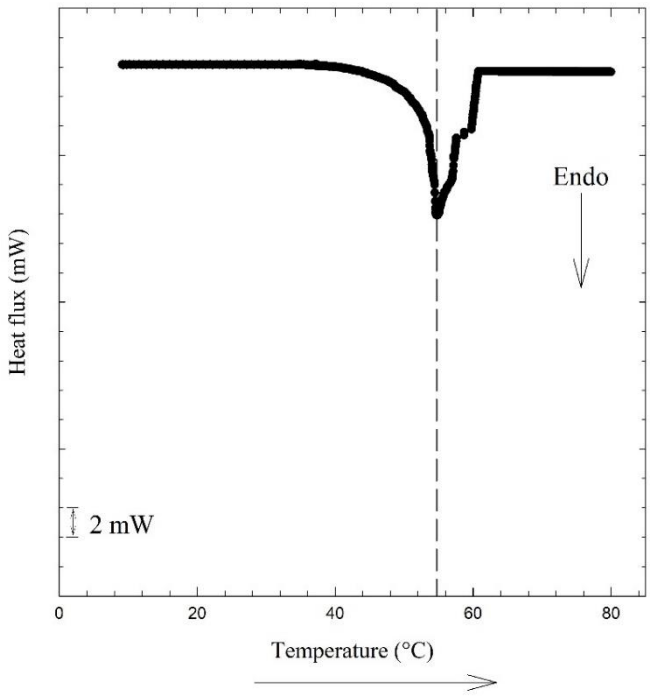


Figura 13. Curva de calentamiento por CDB para 1% κ-carragenina + 20 mM Ca^{2+}. Velocidad de escaneo: 1 °C min^{-1}.

3.4.6 Microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM)

En la Figura 14 se presenta una imagen microscópica del gel de κ-carragenina observada mediante microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM). La fotografía de ESEM proporcionó conocimiento visual acerca de cómo el Ca^{2+} afectó la microestructura del gel. En presencia de 20 mM de iones Ca^{2+}, el gel de 1% κ-carragenina presentó una microestructura homogénea con una fina red tridimensional, cuya forma laminar fue claramente discernible e interespaciada por huecos. Los resultados presentados aquí, son similares a aquellos encontrados por MacArtain, Jacquier, & Dawson, (2003) en redes de κ-carragenina inducidas por calcio. Los autores observaron una fina red dentro de poros más grandes en geles formados con 5 y 10 g L^{-1} de κ-carragenina a una relación molar estequiométrica de un calcio por cada grupo sulfato de κ-carragenina. En el presente trabajo, se utilizó ESEM para examinar la naturaleza de la red tridimensional del gel.

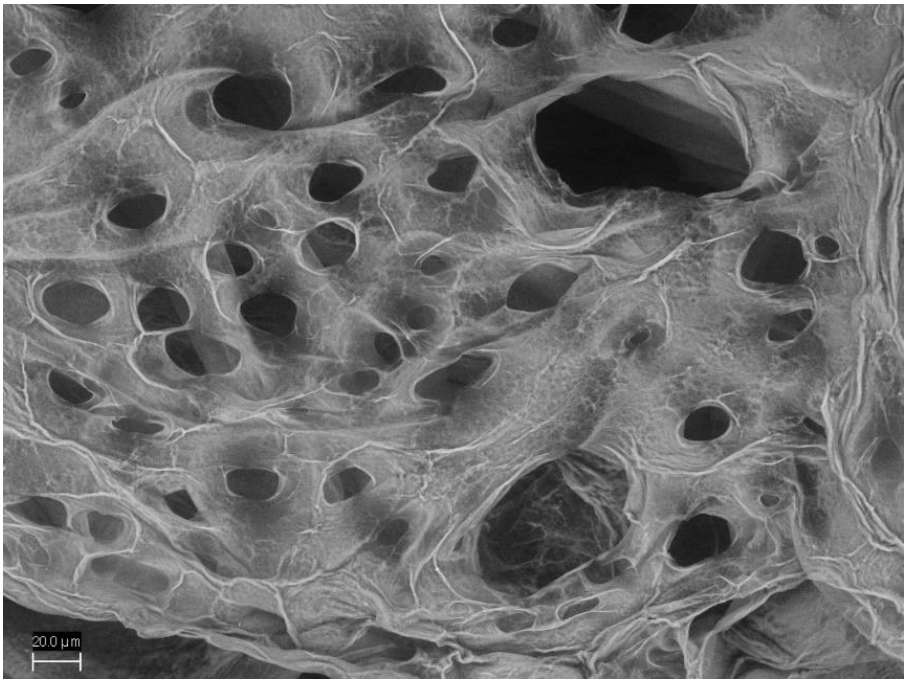


Figura 14. Imagen por microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM) de 1% κ-carragenina + 20 mM Ca^{2+}.

3.5 Conclusiones

Se determinó con éxito la temperatura de fusión precisa ($T_{m,\,a}$) del sistema κ-carragenina – Ca^{2+} mediante el método de la tangente de δ. Este método fue fácil de usar y factible de aplicar para determinar la temperatura de fusión del sistema κ-carragenina – calcio. Además, nuestros resultados muestran que le teoría del escalamiento puede describir con cierta precisión la temperatura de fusión durante la transición gel-sol. El análisis por micro-calorimetría diferencial de barrido permitió monitorear la transición orden-desorden del gel formado por 1% κ-carragenina + 20 mM Ca^{2+} y sus resultados fueron consistentes con aquellos obtenidos mediante el método de la tangente de δ. La microscopía electrónica de barrido ambiental demostró que, en el estado ordenado, se formó la red tridimensional que caracteriza a un gel.

3.6 Literatura citada

Ahmed, J., Ptaszek, P., & Basu, S. (2017). Chapter 1 - Food Rheology: Scientific Development and Importance to Food Industry. In J. Ahmed, P. Ptaszek, & S. B. T.-A. in F. R. and I. A. Basu (Eds.), *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition* (pp. 1–4). Woodhead Publishing. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100431-9.00001-2

Almdal, K., Dyre, J., Hvidt, S., & Kramer, O. (1993). Towards a phenomenological definition of the term 'gel.' *Polymer Gels and Networks, 1*(1), 5–17. https://doi.org/10.1016/0966-7822(93)90020-I

Anderson, N. S., Campbell, J. W., Harding, M. M., Rees, D. A., & Samuel, J. W. B. (1969). X-ray diffraction studies of polysaccharide sulphates: Double helix models for κ- and ι-carrageenans. *Journal of Molecular Biology, 45*(1), 85–97. https://doi.org/10.1016/0022-2836(69)90211-3

Banerjee, S., & Bhattacharya, S. (2012). Food Gels: Gelling Process and New Applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 52,*4: 334-346. https://doi.org/10.1080/10408398.2010.500234

Campo, V. L., Kawano, D. F., da Silva Jr., D. B. & Carvalho, I. (2009). Carrageenans: Biological properties, chemical modifications and structural analysis – A review. *Carbohydrate Polymers, 77*: 167-180. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.01.020

Chambon, F., & Winter, H. H. (1987). Linear Viscoelasticity at the Gel Point of a Crosslinking PDMS with Imbalanced Stoichiometry. *Journal of Rheology, 31*(8), 683–697. https://doi.org/10.1122/1.549955

Chen, J., Chen, W., Duan, F., Tang, Q., Li, X., Zeng, L., … Gao, H. (2019). The synergistic gelation of okra polysaccharides with kappa-carrageenan and its influence on gel rheology, texture behaviour and microstructures. *Food Hydrocolloids, 87*, 425–435. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.08.003

Clark, A. H., & Ross-Murphy, S. B. (1987). Structural and mechanical properties of biopolymer gels - Biopolymers (pp. 57–192). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

Dong, Y., Wei, Z. & Xue, C. (2021). Recent advances in carrageenan-based delivery systems for bioactive ingredients: A review. *Trends in Food Science and Technology, 112*:348-361. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.04.012

Elkordy, A. G. E.-A. A. (2013). Application of Differential Scanning Calorimetry to the Characterization of Biopolymers (p. Ch. 1). Rijeka: IntechOpen. https://doi.org/10.5772/53822

Hermansson, A.-M., Eriksson, E., & Jordansson, E. (1991). Effects of potassium, sodium and calcium on the microstructure and rheological behaviour of kappa-carrageenan gels. *Carbohydrate Polymers, 16*(3), 297–320. https://doi.org/10.1016/0144-8617(91)90115-S

Lai, V. M. F., Wong, P. A.-L., & Lii, C.-Y. (2000). Effects of Cation Properties on Sol-gel Transition and Gel Properties of κ-carrageenan. *Journal of Food Science, 65*(8), 1332–1337. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2000.tb10607.x

Li, L., & Aoki, Y. (1997). Rheological Images of Poly(vinyl chloride) Gels. 1. The Dependence of Sol−Gel Transition on Concentration. *Macromolecules, 30*(25), 7835–7841. https://doi.org/10.1021/ma971045w

Liu, S., Chan, W. L., & Li, L. (2015). Rheological Properties and Scaling Laws of κ-Carrageenan in Aqueous Solution. *Macromolecules, 48*(20), 7649–7657. https://doi.org/10.1021/acs.macromol.5b01922

Liu, S., Huang, S., & Li, L. (2016). Thermoreversible gelation and viscoelasticity of κ-carrageenan hydrogels. *Journal of Rheology, 60*(2), 203–214. https://doi.org/10.1122/1.4938525

Lopes da Silva, J. A., & Gonçalves, M. P. (1994). Rheological study into the ageing process of high methoxyl pectin/sucrose aqueous gels. *Carbohydrate Polymers, 24*(4), 235–245. https://doi.org/10.1016/0144-8617(94)90068-X

MacArtain, P., Jacquier, J. C., & Dawson, K. A. (2003). Physical characteristics of calcium induced κ-carrageenan networks. *Carbohydrate Polymers, 53*(4), 395–400. https://doi.org/10.1016/S0144-8617(03)00120-6

Mangione, M. R., Giacomazza, D., Bulone, D., Martorana, V., & San Biagio, P. L. (2003). Thermoreversible gelation of κ-Carrageenan: relation between conformational transition and aggregation. *Biophysical Chemistry, 104*(1), 95–105. https://doi.org/10.1016/S0301-4622(02)00341-1

Michon, C., Cuvelier, G., & Launay, B. (1993). Concentration dependence of the critical viscoelastic properties of gelatin at the gel point. *Rheologica Acta, 32*(1), 94–103. https://doi.org/10.1007/BF00396681

Morris, E. R. (1986). Molecular Interactions in Polysaccharide Gelation. *British Polymer Journal, 18*, 14-21. https://doi.org/10.1002/pi.4980180105

Morris, E. R., Rees, D. A., & Robinson, G. (1980). Cation-specific aggregation of carrageenan helices: Domain model of polymer gel structure. *Journal of Molecular Biology, 138*(2), 349–362. https://doi.org/10.1016/0022-2836(80)90291-0

Nishinari, K. (1997). Rheological and DSC study of sol-gel transition in aqueous dispersions of industrially important polymers and colloids. *Colloid and Polymer Science, 275*(12), 1093. https://doi.org/10.1007/s003960050189

Norton, I. T., Goodall, D. M., Morris, E. R., & Rees, D. A. (1983). Equilibrium and dynamic studies of the disorder–order transition of kappa carrageenan. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 1: Physical Chemistry in Condensed Phases, 79*(10), 2489–2500. https://doi.org/10.1039/F19837902489

Núñez-Santiago, M. C., & Tecante, A. (2007). Rheological and calorimetric study of the sol–gel transition of κ-carrageenan. *Carbohydrate Polymers, 69*(4), 763–773. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.02.017

Rochas, C., & Rinaudo, M. (1980). Activity coefficients of counterions and conformation in kappa-carrageenan systems. *Biopolymers, 19*(9), 1675–1687. https://doi.org/10.1002/bip.1980.360190911

Rochas, C., & Rinaudo, M. (1984). Mechanism of gel formation in κ-carrageenan. *Biopolymers, 23*(4), 735–745. https://doi.org/10.1002/bip.360230412

Schwittay, C., Mours, M., & Winter, H. H. (1995). Rheological expression of physical gelation in polymers. *Faraday Discussions, 101*, 93–104. https://doi.org/10.1039/FD9950100093

Tabilo-Munizaga, G., & Barbosa-Cánovas, G. V. (2005). Rheology for the food industry. *Journal of Food Engineering, 67*, 147–156. https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2004.05.062

Te Nijenhuis, K., & Winter, H. H. (1989). Mechanical properties at the gel point of a crystallizing poly(vinyl chloride) solution. *Macromolecules, 22*(1), 411–414. https://doi.org/10.1021/ma00191a074

Tecante, A. & Núñez-Santiago M. C. (2012). Solution Properties of κ-Carrageenan and Its Interaction with Other Polysaccharides in Aqueous Media. In J. De Vicente (Ed.) (p. Ch. 10). Rijeka: IntechOpen. https://doi.org/10.5772/36619

Walstra P, Wouters JTM, Geurts TJ (2006) Dairy science and technology. (2nd ed.) CRC Press, Boca Raton, FL, USA

Winter, H. H. (1987). Can the gel point of a cross-linking polymer be detected by the G′ – G″ crossover? *Polymer Engineering & Science, 27*(22), 1698–1702. https://doi.org/10.1002/pen.760272209

Winter, H. H. (1994). The occurrence of self-similar relaxation in polymers. *Journal of Non-Crystalline Solids*, *172–174*, 1158–1167. https://doi.org/10.1016/0022-3093(94)90638-6

Winter, H. H. & Chambon, F. (1986). Analysis of Linear Viscoelasticity of a Crosslinking Polymer at the Gel Point. *Journal of Rheology, 30*(2), 367–382. https://doi.org/10.1122/1.549853

Yang, D., Gao, S., & Yang, H. (2020). Effects of sucrose addition on the rheology and structure of iota-carrageenan. *Food Hydrocolloids, 99*, 105317. https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2019.105317

Yang, Z., Yang, H., & Yang, H. (2018). Effects of sucrose addition on the rheology and microstructure of κ-carrageenan gel. *Food Hydrocolloids, 75*, 164–173. https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2017.08.032

Zia, K. M., Tabasum, S., Nasif, M., Sultan, N., Aslam, N., Noreen, A. & Zuber, M. (2017). A review on synthesis, properties and applications of natural polymer based carrageenan blends and composites. *International Journal of Biological Macromolecules 96*: 282-301. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.11.095

4. MODELADO ESTRUCTURAL Y COMPORTAMIENTO REOLÓGICO DE κ-CARRAGENINA EN PRESENCIA DE IONES CALCIO

4.1. Resumen

El sistema polimérico entrecruzante κ-carragenina–Ca^{2+} experimenta transiciones de fase de líquido a sólido en un punto crítico, que se denomina transición sol-gel. El objetivo del estudio fue explorar la gelificación y fusión del sistema κ-carragenina–Ca^{2+} utilizando reometría de cizalla oscilatoria de baja amplitud y química computacional para representar el diagrama de transición sol–gel y explicar la manera en la que interactúan las moléculas de polímero con los iones Ca^{2+}. Se demostró la aplicabilidad e idoneidad del método de la tan de δ para determinar las temperaturas de gelificación (T_g) y fusión (T_m) precisas del sistema κ-carragenina–Ca^{2+} a concentración fija de polímero (1% p/p) y fuerza iónica en el intervalo de 0 a 100 mM. El comienzo de la gelificación durante el enfriamiento y la pérdida de estructura del gel durante el calentamiento se desplazaron a temperaturas progresivamente más altas con la adición gradual de $CaCl_2$, con histéresis térmica. Se graficó la concentración iónica total (C_T) *versus* el inverso de las temperaturas T_g y T_m en un diagrama de transición que define al menos dos transiciones conformacionales para κ-carragenina sola y en presencia de iones Ca^{2+}. Las pendientes de regresión para las curvas de enfriamiento y calentamiento del diagrama de transición resultaron ser diferentes entre sí, indicando un posible punto crítico para valores de C_T por debajo de 10 $mmol/dm^3$. El modelado por computadora a nivel teoría del funcional de la densidad (TFD) reveló que la κ-carragenina puede presentar puentes de hidrógeno intra e intermoleculares y coordinación con iones Ca^{2+}. La energía de interacción que pueden presentar confórmeros de dos modelos de κ-carragenina es localizado entre 6 y 11 kcal mol^{-1}. La coordinación entre el catión divalente y el polímero, así como las interacciones intra e inter moleculares de dos azúcares, puede ser uno de los factores por los que las cadenas de polisacáridos presentan asociación entre ellas.

Palabras clave: κ-carragenina, diagrama de transición, geles físicos

Tesis de Doctorado en Ciencias Agroalimentarias. Departamento de Ingeniería Agroindustrial. Universidad Autónoma Chapingo.
Autor: M. en C. Bernabé Laureano López
Director de Tesis: Dr. Artemio Pérez López

STRUCTURAL MODELING AND RHEOLOGICAL BEHAVIOR OF κ-CARRAGEENAN IN THE PRESENCE OF CALCIUM IONS

Abstract

The κ-carrageenan–Ca^{2+} cross linking polymeric system undergoes phase transitions from liquid to solid at a critical point which is called the sol–gel transition. The aim of this study was to explore the gelling and melting of the κ-carrageenan–Ca^{2+} system using small amplitude oscillatory shear rheology and computational chemistry to represent the sol–gel transition diagram and explain how the polymer chains and Ca^{2+} ions interact. The applicability and suitability of the tan δ method to determine the accurate gelling (T_g) and melting (T_m) temperatures of the κ-carrageenan–Ca^{2+} system for a fixed polymer concentration (1% w/w) and ionic strength in the 0 – 100 mM range was demonstrated. Onset of gelation on cooling and loss gel structure on heating moved to progressively higher temperatures on progressive addition of $CaCl_2$, with thermal hysteresis between the sol–gel transitions. The ionic total concentration (C_T) was plotted against the inverse of T_g and T_m in a transition diagram that exhibit, at least, two conformational transitions for κ-carrageenan single and in the presence of calcium ions. The regression slopes for cooling and heating curves of the transition diagram were different from each other, suggesting a possible critical point for C_T values below 10 mmol/dm^3. Computer modeling at the density functional theory (DFT) level revealed that κ-carrageenan can exhibit intra- and intermolecular hydrogen bonding and coordination with Ca^{2+} ions. The interaction energies that can present conformers of two κ-carrageenan models were located between 6 and 11 kcal mol^{-1}. The coordination between the divalent cation and the polymer as well as the intra and intermolecular interactions of two sugars, may be one of the factors by which the polysaccharide chains present an association between them.

Key words: κ-carrageenan transition diagram, physical gels

Doctoral thesis. Doctorado en Ciencias Agroalimentarias. Departamento de Ingeniería Agroindustrial, Universidad Autónoma Chapingo.

Author: M. en C. Bernabé Laureano López
Thesis director: Dr. Artemio Pérez López

4.2 Introducción

La κ-carragenina es un galactano lineal, sulfatado, extraído a partir de diferentes especies de algas marinas rojas, principalmente de *Kappaphycus alvarezii*, mejor conocida como *Eucheuma cottonii* (Rhein-Knudsen, Ale, & Meyer, 2015). Químicamente, se encuentra constituida por una unidad de disacárido alterna de (1→3)-β-D-galactosa-4-SO_3^- y (1→4)-3,6-anhidro-α-D-galactosa (Rochas & Rinaudo, 1984), el grupo sulfato en el cuarto carbono del anillo de azúcar, le proporciona carácter aniónico. La κ-carragenina es soluble en agua caliente (entre 70-80 °C) y es capaz de formar un gel termorreversible al enfriarse o al aumentar la fuerza iónica (Smidsrød & Grasdalen, 1982; Morris, 1986; Rinaudo, 2008).

El mecanismo de gelificación de la κ-carragenina está bien aceptado como un proceso cooperativo de dos pasos en el que, primero, hebras aleatorias del polímero se convierten en estructuras de doble hélice (Anderson, Campbell, Harding, Rees, & Samuel, 1969) que posteriormente se agregan para formar una red tridimensional continua que da lugar a un gel (Morris, Rees, & Robinson, 1980; Rochas & Rinaudo, 1984). La transición de hebras aleatorias a dobles hélices ocurre cuando soluciones calientes de polímero en concentración suficiente son enfriadas; mientras que, una transición de dobles hélices a hebras aleatorias ocurre cuando los geles son calentados. La transición conformacional es, por tanto, termorreversible y las temperaturas de gelificación y fusión del gel dependen de la concentración del polisacárido y de la concentración y tipo de contraiones externos (Snoeren & Payens, 1976).

Es bien sabido que la unión de cationes favorece el ordenamiento de las cadenas y, consecuentemente, la gelificación (Morris, Rees, & Robinson 1980; Rochas & Rinaudo, 1980); sin embargo, la κ-carragenina tiene diferentes afinidades por algunos iones. Cationes como K^+, Rb^+ y Cs^+ mejoran la gelificación, pero otros como el Li^+ y el Na^+ tienen poco efecto (Takemasa, Chiba, & Date, 2001). Los cationes divalentes como Ca^{2+}, Mg^{2+} y Sr^{2+} también pueden promover la gelificación, aunque de forma inespecífica (Robal et al., 2017).

El sistema polimérico entrecruzante κ-carragenina–Ca^{2+} experimenta transiciones de fase de líquido a sólido y de sólido a líquido en puntos críticos que se denominan transición sol-gel y gel-sol, respectivamente. Las transiciones sol-gel y gel-sol están indicadas por las temperaturas de gelificación (T_g) y fusión (T_m). Se han utilizado diversos métodos para obtener las T_g y T_m de la κ-carragenina en solución acuosa, tales como transmisión de fotones (Kara, Arda, Kavzak, & Pekcan, 2006), micro calorimetría diferencial de barrido (Evageliou, Ryan & Morris, 2019; Liu & Li, 2016) y reometría (Hermansson, Eriksson y Jordansson, 1991; MacArtain, Jacquier y Dawson, 2003). Las pruebas reológicas de baja deformación tienen la capacidad de proporcionar resultados reproducibles sin alterar la estructura que se forma durante la gelificación y son relativamente fáciles de realizar (Nishinari, 2000). Recientemente, Laureano-López et al., (2022), demostraron la aplicabilidad e idoneidad del método de la tangente de δ para determinar la temperatura de fusión del gel de 1% κ-carragenina en presencia de 20 mM de $CaCl_2$; sin embargo, no solo las temperaturas de fusión sino también las temperaturas de gelificación han sido determinadas con precisión por este método (Liu & Li 2016; Yang, Yang, & Yang, 2018). Los diferentes valores de T_g y T_m se pueden representar en un gráfico de estas temperaturas características *versus* el recíproco de la temperatura absoluta (T^{-1}), como función de la concentración iónica total (C_T), en un diagrama de transición sol-gel (Rochas & Rinaudo, 1980). Para la sal de potasio de κ-carragenina purificada, el diagrama de transición sol-gel fue determinado por Rochas y Rinaudo (1982); sin embargo, no ha sido aún especificado para la forma más comercializada de κ-carragenina (como sal de K^+) en solución acuosa y en presencia de iones de calcio.

Los primeros estudios acerca de la interacción de iones divalentes con κ-carragenina fueron reportados por Rochas y Rinaudo (1980) quienes encontraron que, para la forma de sodio de κ-carragenina, la dependencia de la temperatura de fusión sobre la naturaleza de contraiones divalentes es leve y en el orden siguiente: $Ba^{2+} > Ca^{2+} > Sr^{2+} > Mg^{2+} > Zn^{2+} > Co^{2+}$. De acuerdo con sus resultados, se requieren 20-30 mM de Ca^{2+} para conseguir la transición hebra-

hélice a una concentración de polímero de 1% (p/p) y 20°C. Además, propusieron que el mecanismo conformacional es seguramente diferente al de los contraiones monovalentes, para el que establecieron un mecanismo de dimerización de cadena para la conformación ordenada (asumida como hélice). Hermansson et al. (1991), encontraron que las soluciones de κ-carragenina al 1% (p/p) en forma de sal de Ca^{2+} dieron lugar a geles débiles en el intervalo de fuerza iónica de 30-100 mM de Ca^{2+}. Doyle et. al. (2002), demostraron que la adición progresiva de $CaCl_2$ a soluciones de κ-carragenina provocó un aumento progresivo en el módulo de Young de los geles hasta alcanzar concentración de ~12.5 mM, que está cerca de la concentración que mostró la máxima fuerza de gel, sugiriendo la posibilidad de la unión estequiométrica de los iones de Ca^{2+} a las hélices de κ-carragenina. Para κ-carragenina en presencia de iones Ca^{2+}, el mecanismo de gelificación aún no ha sido especificado a detalle. Sin embargo, los estudios más recientes muestran un creciente interés por elucidar la interacción de los cationes Ca^{2+} con las cadenas de polímero durante el proceso de gelificación. A pesar de una gran cantidad de estudios, quedan algunas preguntas por resolver, tales como; si los iones Ca^{2+} se unen a las hélices de κ-carragenina en la misma forma como los iones de K^+ o lo hacen de manera diferente.

De la química cuántica a nivel de teoría del funcional de la densidad (TFD) se puede obtener información importante para describir las interacciones de un sistema. El uso de esta metodología teórica ha demostrado ser una herramienta útil para el modelado y representación de diversas propiedades moleculares, así como para la explicación de fenómenos químicos a nivel molecular. Los resultados de los parámetros estructurales y propiedades electrónicas de los sistemas químicos analizados a nivel teórico se relacionaron con aquellos determinados experimentalmente por reometría. El objetivo del presente estudio fue determinar las temperaturas de gelificación y fusión de κ-carragenina en presencia de iones Ca^{2+} (0-100 mM) a través de reometría oscilatoria de baja amplitud para proponer el diagrama de transición y la forma posible de interacción del Ca^{2+} con las cadenas del polímero. Consideramos que los resultados obtenidos contribuyen a entender el mecanismo de gelificación del sistema.

4.3 Material y métodos

4.3.1 Material y preparación de las soluciones

La κ-carragenina fue adquirida de Sigma-Aldrich (Toluca, México). La concentración de iones determinada por espectrometría de absorción atómica fue: 0.37% Na^{+}, 0.10% Mg^{2+}, 7.38% K^{+} y 0.10% Ca^{2+}, por lo que se considera que es una sal de potasio. El polímero se utilizó sin tratamiento adicional. El peso molecular determinado a partir de la viscosidad intrínseca en 0.1 mol dm^{-3} de NaCl + 0.005 mol dm^{-3} de EDTA fue 3.0×10^{5} g mol^{-1}. El cloruro de calcio ($CaCl_2$) fue grado reactivo y obtenido de Meyer® (Ciudad de México, México). Se utilizó agua desionizada en todo momento. El aceite de parafina fue adquirido de Hycel (Guadalajara, México).

Las soluciones acuosas de $CaCl_2$ con diversas concentraciones de Ca^{2+} (20, 40, 60, 80 y 100 mM) se prepararon con agitación magnética continua a temperatura ambiente (25 ± 2 °C) durante 30 min. Una masa fija de κ-carragenina (1 % p/p) fue añadida dentro de las soluciones de iones Ca^{2+}. Después, las soluciones fueron calentadas a 80 °C durante 2 h bajo agitación magnética en matraces erlenmeyer de 50 mL con tapón de rosca fenólico para evitar la evaporación del solvente.

4.3.2 Mediciones reológicas

Las mediciones de reología oscilatoria dinámica, incluidos los barridos de deformación, barridos de frecuencia y barridos de temperatura fueron llevados a cabo en un reómetro de esfuerzo controlado DHR-3 (TA Instruments, New Castle, EUA) equipado con geometría de placas paralelas (40 mm de diámetro y gap de 1000 μm) de estría cruzada. Antes de cada evaluación, la muestra se calentó hasta 80 °C y se mantuvo a esta temperatura durante 15 min para borrar la historia térmica del polímero. Posteriormente, se transfirió directamente a la placa inferior del reómetro, previamente equilibrado a 80 °C. Una vez colocada, se cubrió el perímetro de la muestra con aceite de parafina para evitar la evaporación del solvente. Durante las pruebas, la temperatura fue controlada

usando el sistema Peltier del reómetro. Todas las mediciones reológicas se realizaron por triplicado y se reportó el promedio ± la desviación estándar.

4.3.3 Barridos de deformación

Los barridos de deformación se llevaron a cabo para determinar la región viscoelástica lineal (RVL). La medición se llevó a cabo en el intervalo de deformación de 0.1 a 100% para las muestras a 80 °C y de 0.1 a 5% para muestras a 20 °C. En ambos casos, las pruebas se llevaron a cabo a frecuencia angular constante (ω) de 1 Hz (6.28 rad s^{-1}). Durante la prueba, los módulos de almacenamiento (G') y pérdida (G'') se midieron y registraron. Los límites de la RVL se determinaron identificando la primera deformación en la que las propiedades reológicas dinámicas (G' y G'') se desviaron en más del 3% de sus valores casi constantes (Rao, 2014). Una vez que la RVL fue establecida, se realizaron las siguientes pruebas.

4.3.4 Barridos de temperatura

Los barridos de temperatura se realizaron mediante rampas de enfriamiento (80 – 20 °C) y calentamiento (20 – 80 °C) para determinar la temperatura a la que el cruce de los módulos G' y G'' ocurre. Las velocidades de enfriamiento-calentamiento fueron de 1 °C min^{-1}, frecuencia angular (ω) constante de 1 Hz (6.28 rad s^{-1}) y deformación fija del 1%. Al ser dependientes de factores como la frecuencia angular (ω) y la velocidad de enfriamiento/calentamiento, los barridos de temperatura no indican con precisión las T_g y T_m; sin embargo, nos permiten obtener valores que están cerca de estas. Para superar las desventajas, en el presente estudio usamos el método de la tangente de δ como una alternativa adecuada y eficiente para la determinación de las T_g y T_m.

4.3.5 Barridos de frecuencia

Los barridos de frecuencia determinan el comportamiento de los módulos G' y G'' en función de la frecuencia a temperaturas fijas. En este estudio, los barridos de frecuencia fueron conducidos a diferentes temperaturas cercanas a las temperaturas del cruce de los módulos de almacenamiento (G') y pérdida (G'')

obtenidos durante los barridos de temperatura (durante el enfriamiento y calentamiento) para cada muestra evaluada. Las pruebas se realizaron dentro del intervalo de 0.1 a 100 rad s^{-1}, con amplitud oscilatoria de 1%. Las muestras fueron estabilizadas durante 10 min en cada una de las temperaturas a las que se realizó la medición.

4.3.6 Determinación de las temperaturas de transición sol–gel y gel–sol por el método de la tangente de δ

El método de la tangente de δ es un procedimiento útil para monitorear la evolución de la tangente de δ como función de la temperatura a diferentes frecuencias (ω) en una sola prueba. La intersección donde se cruzan las curvas, en un valor de temperatura específico corresponde al punto de gel. El método de la tangente de δ ha sido ya aplicado exitosamente en la determinación de propiedades críticas tales como concentración en el punto de gel (c_g) y tiempo de gel (t_g) de diversos polímeros (Cuvelier & Launay, 1990; Michon, Cuvelier, & Launay, 1993).

4.3.7 Modelado computacional de las interacciones κ-carragenina–Ca^{2+}

El estudio teórico de la κ-carragenina, coordinación con el ion calcio e interacciones intra e intermoleculares, se llevaron a cabo mediante técnicas de la química cuántica. El análisis conformacional para diferentes modelos de κ-carragenina, así como su interacción con el ion Ca^{2+} (Cuadro 4), se realizó a nivel mecánica molecular empleando el campo de fuerzas Merck (MMFF) implementado en el programa Spartan'06 (Deppmeiner et al., 2006). Los confórmeros de mínima energía, fueron considerados para la optimización de las geometrías y frecuencias vibracionales en fase gas (Makshakova, Faizullin, & Zuev, 2020) mediante cálculos de la teoría del funcional de la densidad (DFT) (Parr & Yang, 1989); particularmente, por el funcional M06-2X (Zhao & Truhlar, 2008), un funcional meta-GGA híbrido desarrollado para estudios de interacciones no covalentes, entre otras aplicaciones, tales como termoquímica, cinética termoquímica, los estados excitados y los elementos de transición. El conjunto de funciones base 6-311G (d,p) (Krishnan, Binkley, Seeger, & Pople,

1980) fue usado para representar a los orbitales moleculares. El análisis cuántico de la molécula de κ-carragenina y los iones Ca^{2+} se llevó a cabo usando el software Gaussian09 (Frisch et al., 2009). Se analizaron las energías relativas de estabilidad e interacción. Los parámetros estructurales fueron las longitudes de enlace. En relación con las propiedades electrónicas, se determinaron las cargas, orbitales moleculares y mapas de potencial electrostático. Se utilizó el esquema de análisis de población orbital natural (Reed, Weinstock, & Weinhold, 1985). El orbital ocupado de más alta energía (HOMO), el orbital molecular desocupado de más baja energía (LUMO) y la diferencia energética entre LUMO y HOMO, podrían indicar la reactividad (Zhang & Musgrave, 2007) entre el ion calcio y los modelos de κ-carragenina.

Cuadro 4. Modelos conformacionales de κ-carragenina analizados a nivel TFD utilizando el funcional de densidad M06-2X.

Estructura	**Abreviatura**
galactosa-sulfato/anhidrogalactosa	gsag
galactosa-sulfato/anhidrogalactosa/Ca^{2+}	gsag-Ca^{2+}
anhidrogalactosa/galactosa-sulfato/anhidrogalactosa	gs2ag
galactosa-sulfato/2anhidrogalactosa/Ca^{2+}	gs2ag-Ca^{2+}
galactosa-sulfato/anhidrogalactosa/galactosa-sulfato/anhidrogalactosa	2gs2ag
galactosa-sulfato/anhidrogalactosa/galactosa-sulfato/anhidrogalactosa/Ca^{2+}	2gs2ag-Ca^{2+}
galactosa-sulfato/anhidrogalactosa/galactosa-sulfato/anhidrogalactosa/2Ca^{2+}	2gs2ag-2Ca^{2+}

El potencial electrostático $V(r)$, ha surgido también como herramienta para estudiar el comportamiento molecular (Suresh, Koga, & Gadre, 2001). El análisis cuantitativo de $V(r)$, evalúa el potencial más negativo, que generalmente está asociado con los átomos más electronegativos (Murray, Peralta-Inga, & Politzer,

1999; Murray et al., 1998; Murray & Politzer, 1998). El potencial electrostático molecular (MESP), generado por una molécula, puede calcularse a partir de su densidad electrónica, $\rho(r)$; donde $V(r)$ se considera una propiedad física real (Murray, Brinck, Grice, & Politzer, 1992) cuantificada a partir de la distribución de carga y de la función de onda molecular (Marynick, 1998). Los números de coordinación del ion calcio en los diferentes sistemas químicos de κ-carragenina también fueron analizados mediante la metodología establecida.

4.4 Resultados

4.4.1 Efecto de los iones Ca^{2+} sobre las temperaturas de gelificación y fusión del gel de κ-carragenina

Las T_g y T_m, histéresis térmica (ΔT) y los valores del módulo de almacenamiento $G'_{20°C}$ para 1% (p/p) κ-carragenina y diferentes concentraciones de Ca^{2+} externo están presentadas en el Cuadro 5. Tanto las T_g como las T_m cambiaron a temperaturas más altas al aumentar la concentración de iones Ca^{2+}. El diferencial de temperaturas ($T_m - T_g$) es definido como 'histéresis térmica' (ΔT). Puede corroborarse que, ΔT no fue constante entre las diferentes formulaciones evaluadas; sin embargo, para concentraciones por arriba de 40 mM de Ca^{2+}, no hubo efecto significativo $(P \leq 0.05)$ sobre esta variable tras la adición progresiva de iones. La histéresis térmica en κ-carragenina está asociada con la agregación de dobles hélices (Morris et al. 1980; Rochas y Rinaudo, 1984). Nuestros datos indican que los cambios en la histéresis térmica, ΔT, para el sistema κ-carragenina–Ca^{2+} son considerables, aun cuando no hubo adición de sal externa. Para los geles de 1% (p/p) κ-carragenina en presencia de 20, 40, 60, 80 y 100 mM de Ca^{2+} los valores de G' disminuyen conforme aumenta la concentración de iones añadidos. Doyle et al. (2002) realizaron un estudio comparativo de la fuerza de gel determinada como el módulo de Young (E) a partir de pruebas de compresión en soluciones de 1.0% (p/p) κ-carragenina en su forma de sal Na^+ en un amplio intervalo de concentraciones de K^+ y Ca^{2+}. Sus resultados muestran que la adición progresiva de KCl a soluciones 1.0% (p/p) κ-carragenina causó un aumento progresivo en el módulo de Young de los geles resultantes, hasta la

más alta concentración de K^+ a la que las muestras podían ser preparadas (500 mM). Para el Ca^{2+}, por el contrario, los módulos mostraron un aumento inicial con el incremento en la concentración del catión, pero luego una disminución drástica con la adición progresiva de $CaCl_2$ (Doyle, Giannouli, Philp, & Morris, 2002). La unidad repetitiva de disacárido de κ-carragenina en la forma de sal de Na^+ tiene una masa molecular de 408 Da (Rinaudo, Karimian, & Milas, 1979). Dado que cada unidad contiene un grupo sulfato, la concentración de sulfato en las soluciones al 1.0% (p/p) con las que trabajaron Doyle et al., fue ~25 mM. El balance de carga con iones Ca^{2+} fue alcanzado a una concentración de ~12.5 mM, que está cerca de la concentración que mostró la máxima fuerza de gel, sugiriendo la posibilidad de la unión estequiométrica de los iones de Ca^{2+} a las hélices de κ-carragenina.

Cuadro 5. Efecto de la concentración de Ca^{2+} en las temperaturas de transición T_g, T_m, histéresis térmica (ΔT)* y $G'_{20\,°C}$ en 1% κ-carragenina.

κ-carragenina	Ca^{2+} (mM)	T_g (°C)	T_m (°C)	(ΔT) (°C)	$G'_{20°C}$ (Pa)
1.0	-	24.1	36.6	12.5[c]	12.3
1.0	20	29.3	59.0	29.7[b]	28 769.5
1.0	40	31.9	61.7	29.8[a]	25 242.3
1.0	60	33.5	63.6	30.1[a]	20 274.1
1.0	80	36.2	65.5	29.3[a]	16 179.9
1.0	100	40.6	69.1	28.5[a]	10 910.0

* Medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($P \leq 0.05$)

Por otra parte, los estudios de Liu y Li (2016) acerca del efecto de los cationes Ca^{2+} sobre las propiedades de gelificación de soluciones al 2% κ-carragenina, demostraron que el polímero es extremadamente sensitivo al catión divalente. Sus resultados mostraron un incremento en la histéresis térmica dentro del intervalo evaluado ($0 - 0.4$ mM), pero no observaron la disminución de la fuerza de gel con la adición progresiva de la concentración de Ca^{2+}, probablemente debido a que las concentraciones de sal externa adicionadas no alcanzan la concentración estequiométrica.

4.4.2 El Diagrama de Transición

El diagrama de transición sol-gel describe el estado de las moléculas de κ-carragenina en solución acuosa mediante la relación $C_T = C_S + \bar{\gamma} C_P$, donde C_T es la concentración iónica total, C_S es la concentración iónica debida a la sal (contenida en el polisacárido + sal añadida), C_P es la concentración iónica del polisacárido y $\bar{\gamma}$ es el coeficiente de actividad promedio del catión (Núñez-Santiago, Tecante, Garnier, & Doublier, 2011). El valor de $\bar{\gamma}$ es particular de cada contraión. Pass, Phillips y Wedlock (1977) encontraron que el coeficiente de actividad del contraion calcio para κ-carragenina en solución acuosa depende del grado de sustitución y, por tanto, de la carga del polianión. De acuerdo con sus resultados experimentales, para una concentración de polímero de 2.45 $\frac{eq}{kg} \times 10^2$ (que corresponde a 1% κ-carragenina), el coeficiente de actividad del contraion calcio $\bar{\gamma}_{Ca^{2+}} = 0.26$. En el diagrama de transición sol–gel los valores del inverso de las temperaturas de gelificación (T_g) y fusión (T_m), determinados por el método de la tangente de δ, están graficados contra el logaritmo de C_T (Figura 15). La concentración iónica total C_T, se calculó de acuerdo con Rochas y Rinaudo (1980) considerando la fuerza iónica generada por la solución de $CaCl_2$ añadida en lugar de la concentración de contraión añadido. El diagrama de transición muestra que T_g^{-1} y T_m^{-1} varían linealmente con el logaritmo de C_T indicando una entalpía constante asociada con los procesos de gelificación y fusión dentro del intervalo de concentraciones de polímero y sal evaluadas. Las pendientes de regresión de estas líneas son particulares para cada polímero y sal adicionada. En este trabajo, los datos experimentales durante el calentamiento y enfriamiento produjeron pendientes de -2 824.5 y -5 623.9 K, respectivamente. El hecho de que los valores de estas pendientes resultaran diferentes indica que, si se evaluaran valores más bajos de C_T, sería posible observar un punto en el que ambas logren intersecarse.

MacArtain et al., (2003) reportaron un valor de aproximadamente -4 500 K para ambas pendientes (T_g^{-1} y T_m^{-1}) en el sistema Ca^{2+}–κ-carragenina. Sin embargo, las pendientes de las variaciones parecieron ser iguales (líneas paralelas) y,

consecuentemente, los autores no encontraron indicios de un punto tricrítico, a diferencia del diagrama de fases establecido a partir de los datos experimentales del presente estudio. Esta diferencia podría ser atribuida a que MacArtain et al., (2003) utilizaron κ-carragenina en la forma de sal de Na^+, mientras que, en este trabajo usamos κ-carragenina en la forma de sal de K^+ para mostrar el comportamiento del polímero en su forma más comercializable.

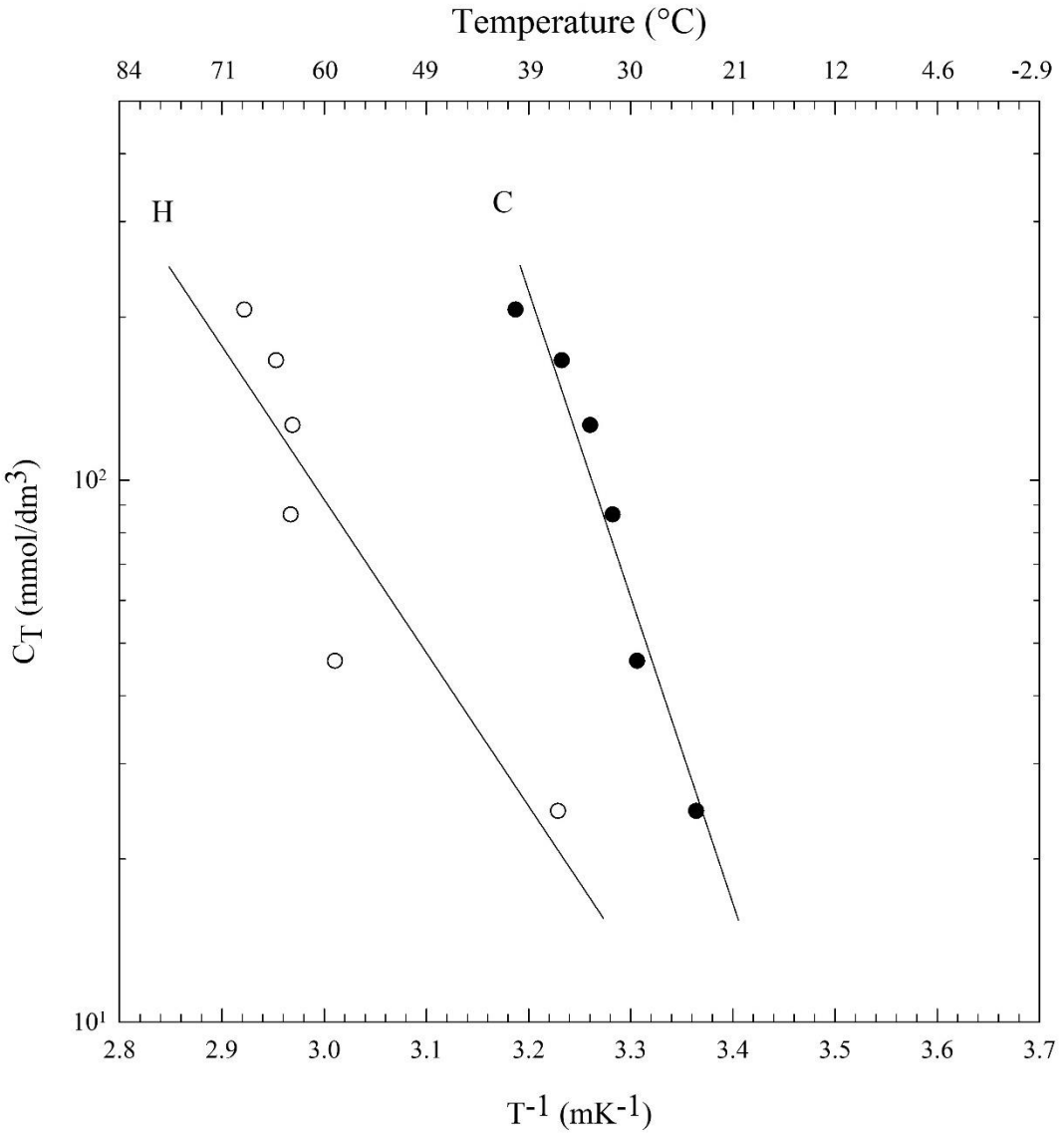


Figura 15. Diagrama de transición sol–gel para la forma de potasio de κ-carragenina con y sin $CaCl_2$ agregado. Las líneas continuas son regresiones de datos obtenidos por reometría durante el enfriamiento (C) y el calentamiento (H).

4.4.3 Modelado computacional

Galactosa-sulfato/Anhidrogalactosa (gsag)

En el Cuadro 6 se reportan los confórmeros más estables estudiados como modelos de κ-carragenina, así como sus energías relativas (a T = 0 K). Cabe señalar que este modelo mostró un gran número de confórmeros debido a sus grados de libertad. El análisis a nivel teórico indicó que los confórmeros optimizados son los de mínima energía, debido a que el análisis de frecuencia mostró que cada molécula en la matriz Hessiana no tenía valores propios negativos; por lo tanto, no hubo frecuencias imaginarias.

Para la optimización de los diferentes confórmeros, se eligieron aquellos que presentaron diferencias significativas en sus coordenadas. En este sentido, los confórmeros menos estables, probablemente, podrían no existir o con una existencia mínima. Se analizaron doce confórmeros gsag, que es el bloque de formación de la κ-carragenina. Los confórmeros mostraron una energía que se localiza entre 0.0 a 13.0 kcal mol^{-1} y sus parámetros geométricos importantes se ilustran en la Figura 16 (a - e). El confórmero más estable de gsag, mostró dos puentes de hidrógeno intramoleculares, O H ··· O y O H ··· O – S, 2.155 y 1.767 Å, respectivamente (Figura 16a_2).

Galactosa-sulfato/Anhidrogalactosa/Ca^{2+} (gsag–Ca^{2+})

Con base en los datos previos, se utilizó el confórmero de máxima estabilidad (gsag-6) para analizar la coordinación con el catión calcio divalente. El número de confórmeros se reduce debido a que algunos de estos difieren solo por el lugar de interacción de los iones Ca^{2+}. Se analizaron nueve confórmeros de gsag–Ca^{2+} considerando la energía y el tipo de coordinación (Cuadro 6); sin embargo, solo se presentan cuatro (Figura 16 b, c, d, e).

Cuadro 6. Energía electrónica y relativa para los modelos de galactosa-sulfato/anhidrogalactosa y galactosa-sulfato/anhidrogalactosa-Ca^{2+}.

galactosa-sulfato/ anhidrogalactosa	$\mathbf{E}_{electronica}$ (Hartree)	$\mathbf{E}_{relativa}$ (kcal mol^{-1})	galactosa-sulfato/ anhidrogalactosa-Ca^{2+}	$\mathbf{E}_{electronica}$ (Hartree)	$\mathbf{E}_{relativa}$ (kcal mol^{-1})
gsag-1	-1844.662439	13.0	gsag-1-Ca^{2+}	-2522.119556	16.9
gsag-2	-1844.671944	7.0	gsag-2-Ca^{2+}	-2522.120508	16.3
gsag-3	-1844.664895	11.5	gsag-3-Ca^{2+}	-2522.115813	19.3
gsag-4	-1844.675229	5.0	gsag-4-Ca^{2+}	-2522.121170	15.9
gsag-5	-1844.675349	4.9	gsag-5-Ca^{2+}	-2522.123278	14.6
gsag-6	-1844.683147	0.0	gsag-6-Ca^{2+}	-2522.146243	0.2
gsag-7	-1844.665682	11.0	gsag-7-Ca^{2+}	-2522.146508	0.0
gsag-8	-1844.674303	5.5	gsag-8-Ca^{2+}	-2522.133353	8.3
gsag-9	-1844.673505	6.0	gsag-9-Ca^{2+}	-2522.120508	16.3
gsag-10	-1844.672930	6.4			
gsag-11	-1844.676057	4.4			
gsag-12	-1844.674295	5.5			

Los átomos de oxígeno están marcados con líneas discontinuas coordinadas al Ca^{2+}. Las energías electrónicas de las gsag con iones Ca^{2+} están entre 0.2 y 19.3 kcal mol^{-1} con respecto a la interacción de máxima estabilidad. Las coordinaciones favorecidas del catión son aquellas en las que se producen interacciones con los átomos de oxígeno (de grupos hidroxilo) y el átomo de oxígeno que une los anillos de 3,6-anhidro-galactosa y galactosa-4-sulfato de gsag (Figura 16 c–e).

Los cálculos mostraron que hay cuatro conformaciones favorables para la coordinación de Ca^{2+} con cinco átomos de oxígeno de gsag (Figura 16 b-e). La descripción de estas coordinaciones son: dos oxígenos del grupo sulfato (Figura 16b y 16c); un oxígeno del grupo sulfato (Figura 16d y 16e); dos átomos de oxígeno, uno del grupo hidroxilo y uno del heteroátomo de la galactosa-4S (Figura 16b y 16d); dos átomos de oxígeno, uno del grupo hidroxilo y uno del heteroátomo de la 3,6-anhidro-galactosa (Figura 16e); un átomo de oxígeno de un grupo hidroxilo y un heteroátomo de 3,6-anhidro-galactosa (Figura 16c) y el átomo de oxígeno del enlace O-glicosídico entre la 3,6-anhidrogalactosa y la galactosa-4S (Figuras 16c–e).

Puede corroborarse que en la interacción entre gsag y el Ca^{2+} se observaron puentes de hidrógeno intramoleculares. El confórmero gsag-4-Ca^{2+} (Figura 16b) mostró dos interacciones; una entre la 3,6-anhidro-galactosa y la galactosa-4S, y otra en la galactosa-4S, y otra en la galactosa-4S con 1.865 y 1.950 Å, respectivamente. Los complejos gsag-7-Ca^{2+} (Figura 16d) y gsag-8-Ca^{2+} (Figura 16e) mostraron una interacción entre la 3,6-anhidro-galactosa y la galactosa-4S con 1.960 y 1.665 a 1.736 Å, respectivamente. Algunas distancias de enlace están de acuerdo con las reportadas por Benniston et al. (2014), quienes reportaron distancias de enlace interatómicos (Ca^{2+}–O) de entre 2.229 y 2.580 Å. Por otra parte, Wang et al., (2009) observaron que las distancias calcio-oxígeno oscilan entre 2.4 a 2.6 Å.

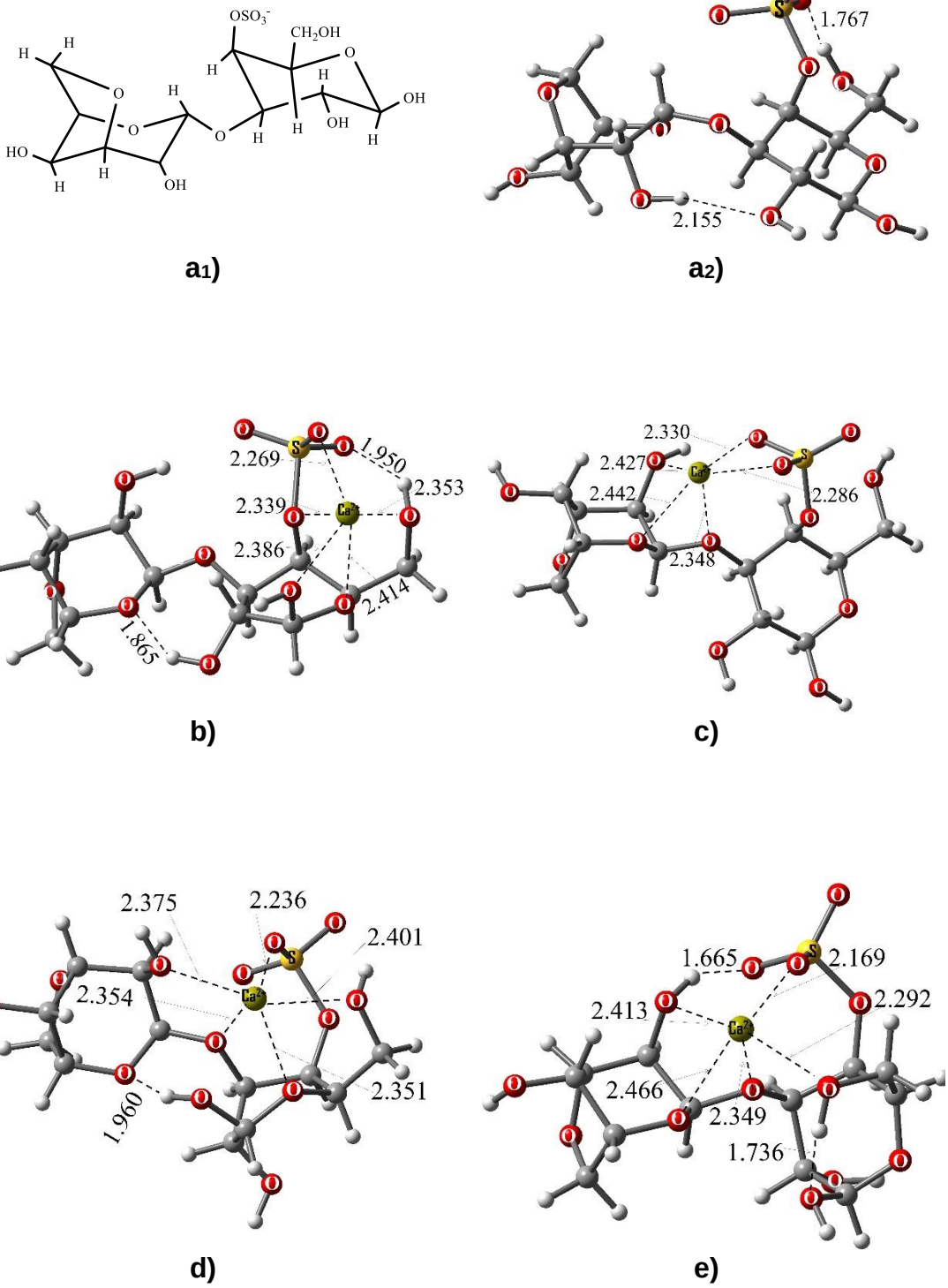


Figura 16. Estructuras más estables optimizadas por M062X/6-311G(d,p). a_1) fórmula estructural de gsag. Modelos computacionales: a_2) gsag-6, b) gsag-4-Ca^{2+}, c) gsag-5-Ca^{2+}, d) gsag-7-Ca^{2+} y e) gsag-8-Ca^{2+}.

Anhidrogalactosa/Galactosa-sulfato/anhidrogalactosa (gs2ag)

Las energías relativas de algunos confórmeros de gs2ag como modelos de κ-carragenina, con respecto al complejo más estable están reportadas en el Cuadro 7. Se analizaron cinco confórmeros de la κ-carragenina gs2ag; los confórmeros están localizados entre 0.0 a 5.3 kcal mol^{-1}. Los gs2ag más estables presentan tres puentes de hidrógeno intramoleculares (Figura $17a_2$), O-H ⋯ O, O-H ⋯ O-S y O H ⋯ O-S, 2.074, 1.887 y 1.876 Å, respectivamente.

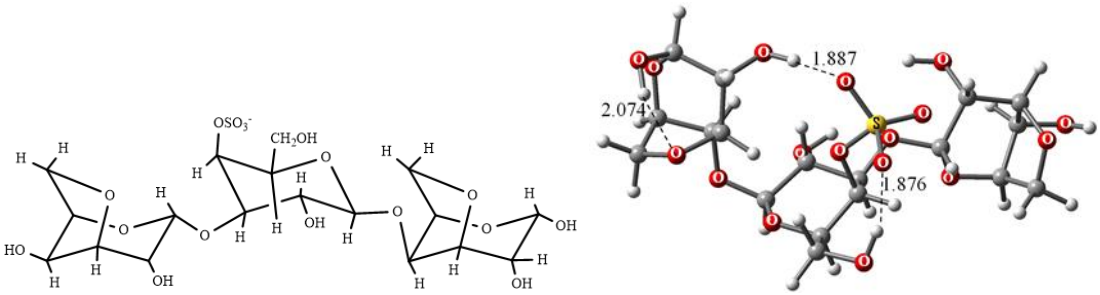
Cuadro 7. Energías electrónicas y relativas para los modelos de Anhidrogalactosa/galactosa-sulfato/anhidro-galactosa (gs2ag), sola y con un ion Ca^{2+}.

Anhidrogalactosa/ galactosa-sulfato/anhidro-galactosa	$E_{electronic}$ (Hartree)	$E_{relativa}$ (kcal mol^{-1})	Anhidrogalactosa/ galactosa-sulfato/anhidro-galactosa/Ca^{2+}	$E_{electronic}$ (Hartree)	$E_{relativa}$ (kcal mol^{-1})
gs2ag-1	-2378.977938	0	**gs2ag**-1-Ca^{2+}	-3056.424405	8.1
gs2ag-2	-2378.973375	2.9	**gs2ag**-2-Ca^{2+}	-3056.390296	29.5
gs2ag-3	-2378.969541	5.3	**gs2ag**-3-Ca^{2+}	-3056.437230	0
gs2ag-4	-2378.971473	4.1			
gs2ag-5	-2378.970965	4.4			

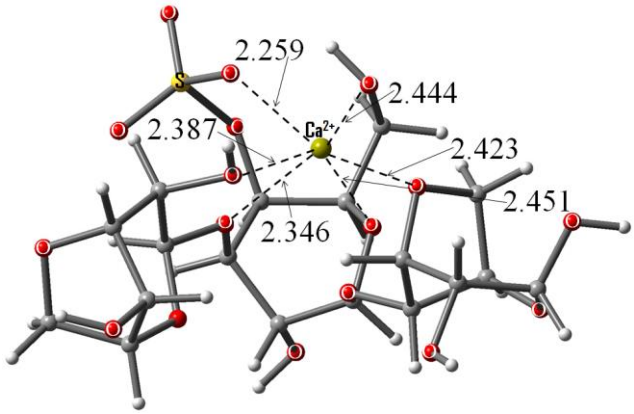
Galactosa-sulfato/2anhidrogalctosa/Ca^{2+} (gs2ag-Ca^{2+})

El confórmero gs2ag-1 de máxima estabilidad se usó para analizar la coordinación con el ion calcio divalente; las posiciones favorecidas del metal son aquellas donde ocurren interacciones con átomos de oxígeno (de grupos hidroxilo) y un oxígeno del anillo. Se examinaron tres complejos (Cuadro 7) según la energía y el tipo de interacción y, uno de ellos fue reportado, gs2ag-3-Ca^{2+} (Figura 17b). La energía electrónica de κ-carragenina gs2ag con iones Ca^{2+} se localizó entre 8.1 y 29.5 kcal mol^{-1} con respecto a la interacción de máxima estabilidad. Los cálculos demostraron que las tres conformaciones son favorables para la unión de cationes mediante la coordinación de seis átomos de oxígeno en gs2ag. El complejo gs2ag con un átomo de Ca^{2+} se muestra en la

Figura 17b. Las distancias Ca^{2+}–O, en este confórmero, se encuentran entre 2.259 y 2.451 Å, en fase gas. La coordinación es con un oxígeno sulfato del residuo galactosa-4S y con dos átomos de oxígeno de un grupo hidroxilo del residuo 3,6-anhidro-galactosa y galactosa-4S, un heteroátomo de oxígeno de la galactosa-4S, un átomo de oxígeno entre 3,6-anhidrogalactosa y galactosa-4S y un heteroátomo de oxígeno de 3,6-anhidro-galactosa.



a1 **a2**



b)

Figura 17. Estructuras más estables por M062X/6-311G(d,p) optimizadas. a_1) Fórmula estructural de gs2ag. Modelos computacionales: a_2) gs2ag y b) gs2ag-3-Ca^{2+}. Las longitudes de enlace están en Å. Los átomos de oxígeno se ilustran en color rojo y los átomos de Ca^{2+} están en verde.

Galactosa-sulfato/anhidrogalactosa/Galactosa-sulfato/anhidrogalactosa (2gs2ag)

Cada confórmero está formado con dos unidades galactosa-sulfato y dos anhidrogalactosa. Se analizaron cuatro confórmeros del modelo 2gs2ag de κ-carragenina. En la Figura 18a_2, está indicado el confórmero más estable. Los confórmeros son 2.6 a 3.9 kcal mol^{-1} menos estables con respecto al confórmero de máxima estabilidad (Cuadro 8). El tetrámero más estable muestra seis puentes de hidrógeno intramoleculares, cinco O–H ··O–S están localizados entre 1.828 – 1.939 Å y un O–H ··O está a 2.055 Å.

Galactosa-sulfato/anhidrogalactosa/Galactosa-sulfato/anhidrogalactosa/Ca^{2+} (2gs2ag–Ca^{2+})

El confórmero de máxima estabilidad de la 2gs2ag, fue usado para analizar la interacción con el ion divalente calcio. Se analizaron cinco complejos. La energía electrónica relativa del modelo de 2gs2ag con un ion Ca^{2+} está situado entre 7.4 y 21.3 kcal mol^{-1} con respecto al complejo de máxima estabilidad (Cuadro 8). La coordinación entre el oxígeno y el ion metálico es con átomos de oxígeno de grupos hidroxilo, del grupo sulfato y oxígenos incluidos en el anillo de galactosa.

El catión se une a través de la coordinación de seis y cinco átomos de oxígeno (Figura 18b y 18c). En el complejo 2gs2ag-5-Ca^{2+}, la coordinación es con un átomo de oxígeno de grupo hidroxilo, tres oxígenos de sulfatos, uno con el átomo de oxígeno de anhidrogalactosa y uno con el átomo de oxígeno entre la anhidrogalactosa y la galactosa sulfato (Figura 18b); y muestra longitudes de enlace de coordinación entre 2.268–2.503 Å. En el complejo 2gs2ag-6-Ca^{2+} (Figura 18c), las localizaciones preferidas del metal son aquellas donde las interacciones ocurren con un átomo de oxígeno de grupos hidroxilo, tres oxígenos de grupos sulfato y un átomo de oxígeno entre la anhidrogalactosa y la galactosa-sulfato; y exhibieron longitudes de enlace entre 2.228–2.420 Å.

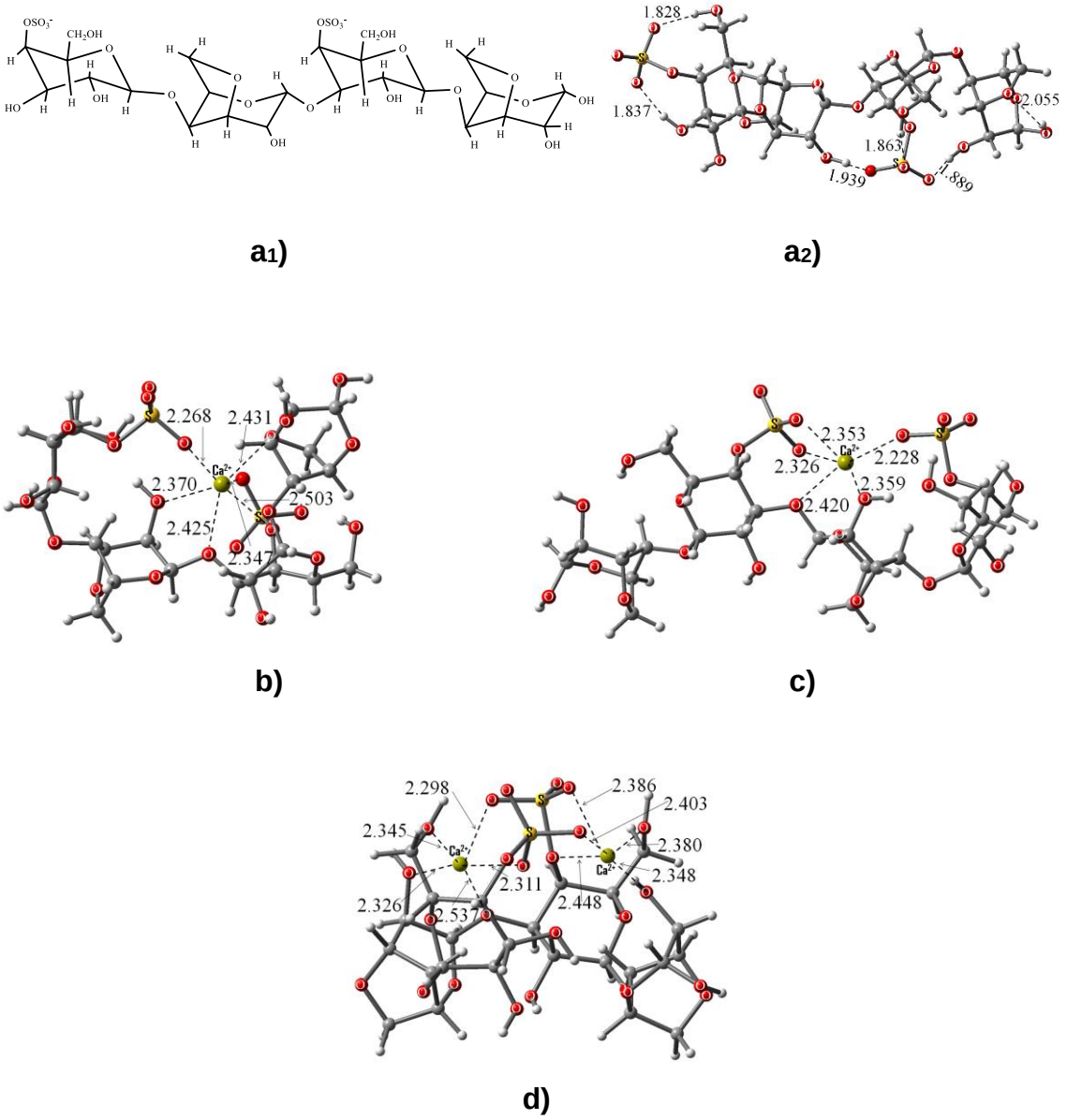


Figura 18. Estructuras más estables optimizadas por M062X/6-311G(d,p). a_1) Fórmula estructural de 2gs2ag. Modelos computacionales: a_2) 2gs2ag, b) 2gs2ag-5-Ca^{2+}, c) 2gs2ag-6-Ca^{2+} y d) 2gs2ag-4-2-Ca^{2+}. Las longitudes de enlace están dadas en Å. Los átomos de oxígeno se ilustran en color rojo y los átomos de Ca^{2+} están en verde.

Galactosa-sulfato/anhidrogalactosa/Galactosa-sulfato/anhidrogalactosa/2Ca^{2+} (2gs2ag-2Ca^{2+})

El modelo de estabilidad máxima 2gs2ag fue usado para analizar la interacción con dos iones calcio divalentes. Se analizaron cuatro complejos. Las energías

electrónicas del modelo 2gs2ag con dos iones Ca^{2+} estuvieron entre 4.2 y 13.1 kcal mol^{-1} con respecto a la interacción de estabilidad máxima (Cuadro 8). En el complejo 2gs2ag-4-2Ca^{2+}, ambos cationes mostraron un número de coordinación cinco (Figura 18d), exhibiendo longitudes de enlace entre 2.298 – 2.537 Å y 2.348 – 2.4480 Å, respectivamente. El complejo mostró cinco interacciones con átomos de oxígeno de sulfato, dos con átomos de oxígeno de grupos hidroxilo y uno con el átomo de oxígeno del enlace O-glicosídico entre la anhidro-galactosa y la galactosa-sulfato. La coordinación del Ca^{2+} ocurre en diferentes confórmeros que presentan fuerzas de atracción electrostáticas (Tako and Konishi, 2018).

Puentes de hidrógeno intra e intermoleculares del modelo de κ-carragenina gs2ag/gs2ag

Para examinar los puentes de hidrógeno intermoleculares entre gs2ag/gs2ag, se analizaron cuatro confórmeros. Mediante cálculos de DFT/M06-2X/6-311G(d,p), éstos mostraron diferencias energéticas de 5.8 a 10.7 kcal mol^{-1} con respecto a la interacción más estable. Para el análisis de los puentes intra e intermoleculares entre dos gs2ag del modelo de κ-carragenina se consideró al confórmero de máxima estabilidad. En la Figura 19 se muestra el confórmero de máxima estabilidad.

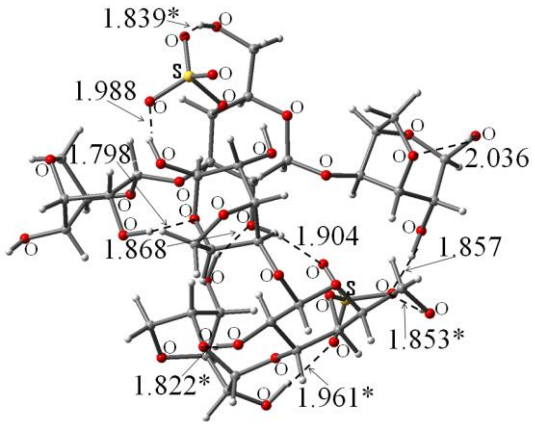


Figura 19. Enlace de hidrógeno intramolecular (*) y seis puentes de hidrógeno intermoleculares de gs2ag/gs2ag del modelo de κ-carragenina.

Cuadro 8. Energía electrónica y relativa para los modelos de 2(galactosa-4S)/2(3,6-anhidro-galactosa) sola, con uno y con dos iones Ca^{2+}.

2(galactosa-sulfato)/2(anhidro-galactosa)	$\mathbf{E}_{electronica}$ (Hartree)	$\mathbf{E}_{relativa}$ (kcal mol^{-1})	2(galactosa-sulfato)2(anhidro-galactosa)-Ca^{2+}	$\mathbf{E}_{electronica}$ (Hartree)	$\mathbf{E}_{relativa}$ (kcal mol^{-1})
2gs2ag-1	-3612.953451	0	**2gs2ag-1-Ca^{2+}**	-4290.616190	0
2gs2ag-2	-3612.948301	3.2	**2gs2ag-2-Ca^{2+}**	-4290.604454	7.4
2gs2ag-3	-3612.947231	3.9	**2gs2ag-3-Ca^{2+}**	-4290.582320	21.3
2gs2ag-4	-3612.949386	2.6	**2gs2ag-5-Ca^{2+}**	-4290.601477	9.2
			2gs2ag-6-Ca^{2+}	-4290.583509	20.5
			2(galactosa-sulfato)2(anhidro-galactosa)-2Ca^{2+}	$\mathbf{E}_{electronic}$ (Hartree)	$\mathbf{E}_{relativa}$ (kcal mol^{-1})
			2gs2ag-1-Ca^{2+}	-4967.878658	4.2
			2gs2ag-2-Ca^{2+}	-4967.877466	4.9
			2gs2ag-3-Ca^{2+}	-4967.864406	13.1
			2gs2ag-4-Ca^{2+}	-4967.885292	0

En el modelo de gs2ag/gs2ag, hay cuatro enlaces de hidrógenos intramoleculares (1.822 – 1.961 Å) y seis enlaces de hidrógenos intermoleculares (1.798 – 2.036 Å), estas interacciones son entre los átomos de hidrógeno del grupo hidroxilo y el átomo de oxígeno del grupo sulfato de la galactosa-4S y la 3,6-anhidrogalactosa. De acuerdo con Desiraju y Steiner (2001), estos puentes de hidrógeno son fuertes, ya que presentan una energía de interacción de 14.21 kcal mol^{-1}.

Mapa de potencial electrostático molecular (MEP)

El MEP fue obtenido del mapeo electrostático sobre la densidad total de electrones. En un código de colores, el azul indica un potencial electrostático positivo máximo y el rojo un potencial electrostático negativo máximo. Existe un área de potencial electrostático negativo que rodea principalmente a los heteroátomos O (OH, O = S). El mapa de iones de calcio obtenido muestra un área de carga positiva. Un intervalo de color de -0.175 para átomos de oxígeno OH o O = S (rojo más intenso) a +0.175 para átomos de hidrógeno o para el ion Ca^{2+} (azul más profundo) se muestra en la Figura 20. La aggs, gs2ag y 2ag2gs son donantes de átomos de hidrogeno. Los resultados de MEP muestran que los modelos aggs, gs2ag y 2ag2gs son solo donadores de pares de electrones; por lo tanto, la coordinación con cationes es factible. Los resultados de MEP cambian después de la formación de complejos.

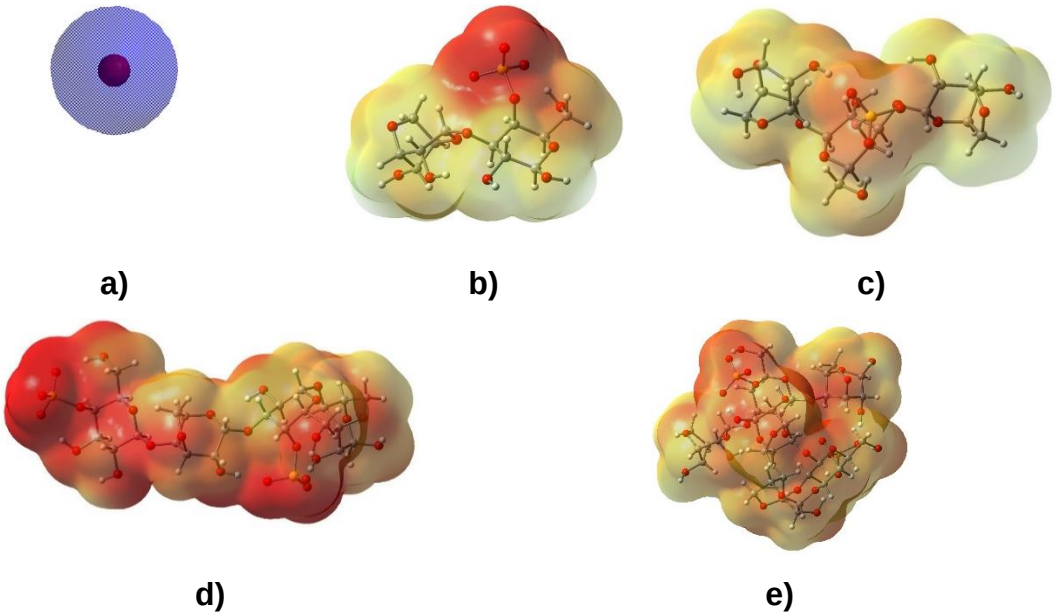


Figura 20. Mapa de potencial electrostático en la superficie de la densidad electrónica, a nivel de M06-2X/6-311G(d,p), calculado en la superficie de isodensidad 0.0004 a.u; para el modelo molecular de κ-carragenina y el ion Ca^{2+}. a) ion calcio, b) aggs, c) gs2ag, d) 2ag2gs y e) gs2ag/gs2ag.

4.5 Discusión

Se ha afirmado que la gelificación de κ-carragenina inducida por cationes Ca^{2+} es diferente al de los contraiones monovalentes. La adición de iones Ca^{2+}, tiene impacto tanto en la transición hebra-hélice como en la estructura final del gel. Una concentración de Ca^{2+} creciente mejoró el módulo elástico del gel de κ-carragenina. El aumento de la fuerza de los geles se debe a la neutralización de las cargas electrostáticas de las cadenas de polisacáridos que promueven su asociación. Los trabajos realizados por Liu y Li (2016) mostraron evidencia de que, al aumentar la concentración de iones Ca^{2+}, se inducen más hélices de κ-carragenina para que se 'orienten' y luego participen en la agregación; lo que conduce a incrementos tanto en número como en tamaño de los agregados. Sin embargo, una alta concentración de cationes permitió la disminución de G' significativamente (Lai et al., 2000). Esta disminución se atribuye a que el Ca^{2+} induce un gran aumento en el número de ramificaciones formadas por los agregados durante la gelificación de κ-carragenina, lo que resulta en estructuras muy grandes que eventualmente precipitan (Tecante y Núñez-Santiago, 2012),

lo que podría explicar la disminución de los módulos cuando la concentración de la sal externa aumenta (MacArtain et al., 2003). Evageliou, Ryan y Morris (2019), encontraron que los valores de temperaturas de gelificación y fusión incrementaron progresivamente con el aumento en la concentración de sal, siguiendo el orden $Na^+ < Ca^{2+} < K^+$, pero la mayor histéresis térmica fue vista con Ca^{2+}. Su interpretación propuesta fue que los cationes Ca^{2+} "cementan" las hélices de carragenina al unirse directamente entre ellas, lo que proporciona mayor estabilidad térmica y, por tanto, mayor histéresis que los cationes K^+, que actúan indirectamente por supresión de cargas.

Por otra parte, el modelado molecular propone que en presencia de iones Ca^{2+}, se desarrollan enlaces entrecruzados entre los grupos sulfato para formar un dímero "intra" o intermolecular cuyas energías relativas son bajas (entre 0.5 y 29.5 kcal mol^{-1}) y propias de las fuerzas intermoleculares que constituyen a los enlaces físicos.

4.6 Conclusiones

Los cationes divalentes son muy eficientes para incrementar las T_g y T_m pues se requieren bajas concentraciones de Ca^{2+} para lograr un aumento significativo en temperatura. La histéresis térmica en el intervalo completo de fuerza iónica evaluada fue siempre notable (> 20 °C) y directamente relacionado con el mecanismo a través del que interactúan las moléculas de κ-carragenina con los cationes divalentes en medio acuoso.

El modelado por computadora a nivel de mecánica cuántica, en particular usando DFT permitió mostrar una serie de confórmeros de modelos de κ-carragenina, que podrían presentar puentes de hidrógeno intramolecular, con una energía electrónica entre 0-13 kcal mol^{-1}. La coordinación con los iones de calcio se sitúa entre 0-29.5 kcal mol^{-1}. El modelo de κ-carragenina, gs2ag/gs2ag, usado en este trabajo muestra que la estructura del azúcar puede presentar puentes de hidrógeno intra e intermoleculares. La energía de interacción que pueden presentar confórmeros de dos modelos de κ-carragenina es localizado entre 6-

11 kcal mol^{-1}. La coordinación entre el metal y el azúcar, así como las interacciones intra e inter moleculares de dos azúcares, puede ser uno de los factores por los que las cadenas de polisacáridos pueden presentar asociación entre ellas. El estudio del comportamiento gelificante de la forma comercial de κ-carragenina podría ser de gran ayuda para el establecimiento de las aplicaciones tecnológicas en la industria de alimentos.

4.7 Referencias

Anderson, N. S., Campbell, J. W., Harding, M. M., Rees, D. A., & Samuel, J. W. B. (1969). X-ray diffraction studies of polysaccharide sulphates: Double helix models for κ- and ι-carrageenans. *Journal of Molecular Biology, 45*(1), 85-97. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0022-2836(69)90211-3

Benniston, A. C.; Melnic, S.; Turta, C.; Arauzo, A. B.; Bartolomé, J.; Bartolomé, E.; Harrington, R. W.; Probert, M. R. (2014). Preparation and properties of a calcium(II)-based molecular chain decorated with manganese(II) butterfly-like complexes. *Dalton Transactions, 43*(35): 13349–13357. https://doi.org/10.1039/C4DT01518E

Bercea, M., & Wolf, B. A. (2019). Associative behaviour of κ-carrageenan in aqueous solutions and its modification by different monovalent salts as reflected by viscometric parameters. *International Journal of Biological Macromolecules, 140*, 661-667. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.144

Chambon F. & Winter, H. H. (1987). Linear Viscoelasticity at the Gel Point of a Crosslinking PDMS with Imbalanced Stoichiometry. *Journal of Rheology 31*(8):683-697. https://doi.org/10.1122/1.549955

Chen, Y., Liao, M.-L., & Dunstan, D. E. (2002). The rheology of K^+–κ-carrageenan as a weak gel. *Carbohydrate Polymers, 50*(2), 109-116. https://doi.org/10.1016/S0144-8617(02)00009-7

Deppmeier, B. J.; Driessen, A. J.; Hehre, T. S.; Hehre, W. J.; Johnson, J. A.; Klunzinger, P. E.; Leonard, J. M.; Pham, I. N.; Pietro, W. J.; Jianguo, Y.; Kong, J.; White, C. A.; Krylov, A. I.; Sherrill, C. D.; Adamson, R. D.; Furlani, T. R.; Lee, M. S.; Lee, A.M. (2006). In: *Spartan 06 for Windows*; Wavefunction Inc, 18401 Von Karman Avenue, Suite 370 Irvine, CA, 92612. USA.

Desiraju, G.; Steiner, T. (2001) The Weak Hydrogen Bond: In *Structural Chemistry and Biology*. Oxford University. Pp. 13

Doyle, J., Giannouli, P., Philp, K., & Morris, E. R. (2002). Effect of K^+ and Ca^{2+} cations on gelation of κ-carrageenan. In P. A. Williams, & G. O. Phillips (Eds.), *Gums and Stabilisers for the Food Industry 11* (pp. 158-164). Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry. https://doi.org/10.1039/9781847551016-00158

Evageliou, V. I., Ryan, P. M., & Morris, E. R. (2019). Effect of monovalent cations on calcium-induced assemblies of kappa carrageenan. *Food Hydrocolloids, 86*, 141–145. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.03.018

Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; et al. (2009). *Gaussian 09, revision A.02*. Wallingford, C.T: Gaussian Inc.

Hermansson, A.-M., Eriksson, E., & Jordansson, E. (1991). Effects of potassium, sodium and calcium on the microstructure and rheological behaviour of kappa-carrageenan gels. *Carbohydrate Polymers, 16*(3), 297–320. https://doi.org/10.1016/0144-8617(91)90115-S

Hikichi, K. (1993). Sol-Gel transition of κ-Carrageenan as viewed through NMR. *Polymer Gels and Networks, 1*(1), 19-31. https://doi.org/10.1016/0966-7822(93)90021-9

Iijima, M., Hatakeyama, T., Takahashi, M., & Hatakeyama, H. (2007). Effect of thermal history on kappa-carrageenan hydrogelation by differential scanning calorimetry. *Termochimica Acta, 452*(1), 53-58. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tca.2006.10.019

Iijima, M., Takahashi, M., Hatakeyama, T., & Hatakeyama, H. (2013). Detailed investigation of gel-sol transition temperature of κ-carrageenan studied by DSC, TMA and FBM. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 114*(2), 895-901. https://doi.org/10.1007/s10973-013-2953-2

Kara, S., Arda, E., Kavzak, B., & Pekcan, Ö. (2006). Phase transitions of κ-carrageenan gels in various types of salts. *Journal of Applied Polymer Science, 102*(3), 3008–3016. https://doi.org/10.1002/app.24662

Kara, S., Tamerler, C., Bermek, H., & Pekcan, Ö. (2003). Cation effects on sol–gel and gel–sol phase transitions of κ-carrageenan–water system. *International Journal of Biological Macromolecules, 31*(4), 177-185. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0141-8130(02)00080-6

Krishnan, R.; Binkley, J. S.; Seeger, R.; Pople, J. A. (1980). Self-consistent molecular orbital methods. XX. A basis set for correlated wave functions. *The Journal of Chemical Physics, 72*, 650-654. https://doi.org/10.1063/1.438955

Lai, V. M. F., Wong, P. A.-L., & Lii, C.-Y. (2000). Effects of Cation Properties on Sol–gel Transition and Gel Properties of κ-carrageenan. *Journal of Food Science, 65*(8), 1332-1337. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2000.tb10607.x

Liu, S., Huang, S., & Li, L. (2016). Thermoreversible gelation and viscoelasticity of κ-carrageenan hydrogels. *Journal of Rheology, 60*(2), 203-214. https://doi.org/10.1122/1.4938525

MacArtain, P., Jacquier, J. C., & Dawson, K. A. (2003). Physical characteristics of calcium induced κ-carrageenan networks. *Carbohydrate Polymers, 53*, 395-400. https://doi.org/10.1016/S0144-8617(03)00120-6

Makshakova, O. N., Faizullin, D. A. & Zuev, Y. F. (2020). Interplay between secondary structure and ion binding upon thermoreversible gelation of κ-carrageenan. *Carbohydrate Polymers, 227*, 115342. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115342

Mangione, M. R., Giacomazza, D., Bulone, D., Martorana, V., & San Biagio, P.L. (2003). Thermoreversible gelation of κ-carrageenan: relation between conformational transition and aggregation. *Biophysical Chemistry, 104*(1), 95-105. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0301-4622(02)00341-1

Marynick, D. S. (1998). Accurate molecular electrostatic potentials based on modified PRDDO/M wave functions: III. Extension of the PESP method for calculation of electrostatic potential-derived atomic charges to compounds containing Li^+, Na^+, Mg^{2+}, K^+, Ca^{2+}, Zn^{2+}, and I. *Journal of Computational Chemistry, 19*(13): 1456-1469. https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(199810)19:13%3C1456::AID-JCC3%3E3.0.CO;2-P

Mischenko, N., Denef, B., Koch, M. H. J., & Reynaers, H. (1996). Influence of ionic effects on the ordering and association phenomena in dilute and semidilute carrageenan solutions. *International Journal of Biological Macromolecules, 19*(3), 185–194. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0141-8130(96)01126-9

Morris, E. R. (1986). Molecular Interactions in Polysaccharide Gelation. *British Polymer Journal, 18*(1), 14-21. https://doi.org/10.1002/pi.4980180105

Morris, V. J., & Chilvers, G. R. (1983). Rheological studies of specific cation forms of kappa carrageenan gels. *Carbohydrate Polymers, 3*(2), 129–141. https://doi.org/10.1016/0144-8617(83)90003-6

Morris, E. R., Rees, D. A., & Robinson, G. (1980). Cation-specific aggregation of carrageenan helices: Domain model of polymer gel structure. *Journal of Molecular Biology, 138*(2), 349-362. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0022-2836(80)90291-0

Murray, J. S.; Peralta-Inga, Z.; Politzer, P. (1999). Conformational dependence of molecular surface electrostatic potentials. *International Journal of Quantum Chemistry, 75*(3): 267-273. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-461X(1999)75:3<267::AIDQUA16>3.0.CO;2-N

Murray, J. S.; Abu-Awwad, F.; Politzer, P.; Wilson, L. C.; Troupin, A. S.; Wall, R. E. (1998). Molecular surface electrostatic potentials of anticonvulsant drugs. *International Journal of Quantum Chemistry, 70*(6): 1137-1143. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-461X(1998)70:6%3C1137::AID-QUA3%3E3.0.CO;2-0

Murray, J. S.; Politzer, P. (1998). Statistical analysis of the molecular surface electrostatic potential: an approach to describing noncovalent interactions in condensed phases. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM, 425*(1-2): 107-114. https://doi.org/10.1016/S0166-1280(97)00162-0

Murray, J. S.; Brinck, T.; Grice, M. E.; Politzer, P. (1992). Correlations between molecular electrostatic potentials and some experimentally-based indices of reactivity. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM, 256*: 29-45. https://doi.org/10.1016/0166-1280(92)87156-T

Nishinari, K. (2000). Sol-gel Transition of Biopolymer Dispersions. *Macromolecular Symposia, 159*(1), 205-214. https://doi.org/10.1002/1521-3900(200010)159:1<205::AID-MASY205>3.0.CO;2-B

Núñez-Santiago, M. C., Tecante, A., Garnier, C., & Doublier, J. L. (2011). Rheology and microstructure of κ-carrageenan under different conformations induced by several concentrations of potassium ion. *Food Hydrocolloids, 25*(1), 32-41. doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2010.05.003

Núñez-Santiago, M. C., & Tecante, A. (2007). Rheological and calorimetric study of the sol-gel transition of κ-carrageenan. *Carbohydrate Polymers, 69*(4), 763-773. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.02.017

Parr, R. G.; Yang, W. (1989). Density-functional theory of atoms and molecules, Oxford University Press, New York, Oxford, pp. 1–333.

Pass, G., Phillips, G. O., & Wedlock, D. J. (1977). Interaction of univalent and divalent cations with carrageenans in aqueous solution. *Macromolecules, 10*(1), 197-201. https://doi.org/10.1021/ma60055a039

Rao, M. (2014). Measurement of Flow and Viscoelastic Properties. In: *Rheology of Fluid, Semisolid, and Solid Foods*. Food Engineering Series. Springer, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-9230-6_3

Reed, A. E.; Weinstock, R. B.; Weinhold, F. (1985). Natural population analysis. The Journal of Chemical Physics, 83(2): 735-746. https://doi.org/10.1063/1.449486

Rhein-Knudsen, N., Ale, M. T., & Meyer, A. S. (2015). Seaweed hydrocolloid production: an update on enzyme assisted extraction and modification technologies. *Marine Drugs, 13*(6), 3340-3359. 3340–3359. https://doi.org/10.3390/md13063340

Rinaudo, M, Karimian, A., & Milas, M. (1979). Polyelectrolyte behavior of carrageenans in aqueous solutions. *Biopolymers, 18*(7), 1673–1683. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/bip.1979.360180707

Rinaudo, M. (2008). Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials. *Polymer International, 57*(3), 397-430. https://doi.org/10.1002/pi.2378

Robal, M., Brenner, T., Matsukawa, S., Ogawa, H., Truus, K., Rudolph, B., & Tuvikene, R. (2017). Monocationic salts of carrageenans: Preparation and physico-chemical properties. *Food Hydrocolloids, 63*, 655-667. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.09.032

Rochas, C. (1982). Étude de la transition sol-gel du kappa-carraghénane, Thèse Docteur. France: Institut National Polytechnique de Grenoble.

Rochas, C., & Landry, S. (1987). Molecular organization of kappa carrageenan in aqueous solution. *Carbohydrate Polymers, 7*(6), 435-447. https://doi.org/10.1016/0144-8617(87)90011-7

Rochas, C., & Rinaudo, M. (1980). Activity coefficients of counter-ions and conformation in kappa-carrageenan systems. *Biopolymers, 19*, 1675-1687. https://doi.org/10.1002/bip.1980.360190911

Rochas, C., & Rinaudo, M. (1984). Mechanism of gel formation in κ-carrageenan. *Biopolymers, 23*(4), 735-745. https://doi.org/10.1002/bip.360230412

Snoeren, T. H. M., & Payens, T. A. J. (1976). On the sol-gel transition in solutions of Kappa-carrageenan. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)–General Subjects, 437*(1), 264-272. https://doi.org/10.1016/0304-4165(76)90369-X

Smidsrød, O., & Grasdalen, H. (1982). Some physical properties of carrageenan in solution and gel state. *Carbohydrate Polymers, 2*(4), 270-272. https://doi.org/10.1016/0144-8617(82)90029-7

Sugiyama, M., Yuasa, C., Hara, K., Hiramatsu, N., Nakamura, A., Hayakawa, Y., & Maeda, Y. (1998). Structural change of κ-carrageenan gel near sol-gel transition point. *Physica B: Condensed Matter, 241-243*: 999–1001. https://doi.org/10.1016/S0921-4526(97)00779-5

Suresh, C. H.; Koga, N.; Gadre, S. R. (2001). Revisiting Markovnikov Addition to Alkenes via Molecular Electrostatic Potential. *The Journal of Organic Chemistry, 66*(21): 6883-6890. https://doi.org/10.1021/jo010063f

Takemasa, M., Chiba, A., & Date, M. (2001). Gelation Mechanism of κ- and ι-Carrageenan Investigated by Correlation between the Strain-Optical Coefficient and the Dynamic Shear Modulus. *Macromolecules, 34*(21), 7427-7434. https://doi.org/10.1021/ma0102924

Tako, M.; Konishi, T. (2018). Discovery of κ-Carrageenan-Like Agarose from a Red Seaweed, *Gracilaria coronopifolia*. *International Research Journal of Pure and Applied Chemistry. 17*(2): 1-11. 10.9734/IRJPAC/2018/45201

Tecante, A. & Núñez-Santiago, M. C. (2012). Solution properties of κ-carrageenan and its interaction with other polysaccharides in aqueous media. In: *Rheology*, De Vicente, J. (Ed.), ISBN: 978-953-51-0187-1, InTech. https://doi.org/10.5772/36619

van de Velde, F., Knutsen, S. H., Usov, A. I., Rollema, H. S., & Cerezo, A. S. (2002). ^{1}H and ^{13}C high resolution NMR spectroscopy of carrageenans: applications in research and industry. *Trends in Food Science & Technology, 13*(3), 73-92. https://doi.org/10.1016/S0924-2244(02)00066-3

Wang, X.; Kirberger, M.; Qiu, F.; Chen, G.; Yang, J. J. (2009). Towards predicting Ca^{2+}–binding sites with different coordination numbers in proteins with atomic resolution. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 75*(4): 787-798. https://doi.org/10.1002/prot.22285

Watase, M., & Nishinari, K. (1981). Effect of alkali metal ions on the rheological properties of κ-carrageenan and agarose gels. *Journal of Texture Studies, 12*(4), 427–445. https://doi.org/10.1111/j.1745-4603.1981.tb00259.x

Winter, H. H. & Chambon, F. (1986). Analysis of Linear Viscoelasticity of a Crosslinking Polymer at the Gel Point. *Journal of Rheology, 30*(2):367-382. https://doi.org/10.1122/1.549853

Yang, Z., Yang, H., & Yang, H. (2018). Effects of sucrose addition on the rheology and microstructure of κ-carrageenan gel. *Food Hydrocolloids, 75*, 164-173. https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2017.08.032

Yuguchi, Y., Thu Thuy, T. T., Urakawa, H., & Kajiwara, K. (2002) Structural characteristics of carrageenan gels: temperature and concentration dependence. *Food Hydrocolloids, 16*(6), 515-522. https://doi.org/10.1016/S0268 005X(01)00131-X

Yuguchi, Y., Urakawa, H., & Kajiwara, K. (2003). Structural characteristics of carrageenan gels: various types of counter ions. *Food Hydrocolloids, 17*(4), 481-485. https://doi.org/10.1016/S0268-005X(03)00021-3

Zhang, G.; Musgrave, C. B. (2007). Comparison of DFT Methods for Molecular Orbital Eigenvalue Calculations. *The Journal of Physical Chemistry A, 111*(8): 1554–1561. https://doi.org/10.1021/jp061633o

Zhao, Y. and Truhlar, D. G. (2008). The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: two new functionals and systematic testing of four M06-class functionals and 12 other functionals. *Theoretical Chemistry Accounts, 120*, 215-241. https://doi.org/10.1007/s00214-007-0310-x

5. CONCLUSIONES GENERALES

No solo las temperaturas de gelificación, sino también las temperaturas de fusión pueden ser determinadas con precisión mediante el método de la tangente de δ. La determinación del comportamiento reológico de la κ-carragenina en presencia de cationes Ca^{2+} resultó ser dependiente de la C_T y la temperatura. La abundante histéresis térmica y turbidez sugieren mayor agregación. El diagrama de transición mostró una variación lineal del inverso de las temperaturas (T^{-1}) *versus* log de la concentración iónica total (C_T), indicando entalpía constante asociada a los procesos de gelificación y fusión en el intervalo de sal y polímero estudiado. Sin embargo, los valores de las pendientes de regresión parecen ser casi iguales (pendientes paralelas), que no muestran un punto tricrítico en el diagrama de fase, como si ocurrió en el diagrama propuesto para el sistema K^+–κ-carragenina.