
CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.
POSGRADO EN CIENCIAS MATERIALES POLIMÉRICOS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de Wilbert José Rodríguez Canto titulado **“EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL GALACTOMANANO DE *DELONIX REGIA* EN LAS PROPIEDADES REOLÓGICAS DE SUS DISPERSIONES, GELES Y PELÍCULAS”** fue realizado en la Unidad de Materiales Poliméricos, en el Laboratorio de Membranas Poliméricas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Manuel de Jesús Aguilar Vega, perteneciente al Programa de Doctorado en Materiales Poliméricos de este Centro.

Atentamente.

Dra. Clelia De la Peña Seaman
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 12 de julio de 2019

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Materiales Poliméricos

Evaluación del efecto de la hidrólisis enzimática del galactomanano de *Delonix regia* en las propiedades reológicas de sus dispersiones, geles y películas.

Tesis que presenta

Wilbert José Rodríguez Canto

En opción al título de

DOCTOR EN CIENCIAS
EN MATERIALES POLIMÈRICOS

Mérida, Yucatán, México

JULIO 2019

Agradecimientos

Primeramente, quiero agradecer a toda mi familia por el apoyo que me han brindado desde que comencé la aventura de estudiar un posgrado, en particular a mis papas por su apoyo y comprensión, así como a mis hermanas y abuelos que siempre estuvieron presentes cuando los necesité.

A mi esposa Lourdes, que estuvo siempre apoyándome en esos momentos de frustración y miedo, así como tolerar el estrés y las ausencias que el desarrollo de este proyecto generó, brindándome un pilar para sostenerme.

A mi tía Beatriz que lamentablemente no pudo acompañarnos en vida hasta la finalización de este doctorado, se que siempre estuvo orgullosa y espero poder corresponder para bien todo el cariño y apoyo que me dio en su vida.

Al Dr. Manuel Aguilar Vega, por aceptarme en su equipo de trabajo, asesorarme y aconsejarme en lo académico y en lo personal. Le agradezco el ejemplo que me dio estos años, espero poder ser igual de responsable, trabajador y gentil en mi futuro.

Al Dr. Luis Chel, por su apoyo académico brindado desde la maestría, así como su amistad que se remonta desde antes, por ser uno de los principales causantes de que me encuentre aquí este momento.

Finalmente, a todas las amistades que se generaron en este período en el CICY y fuera de el, desde mis compañeros del laboratorio de membranas, Marisa, Dra. Ortencia, Dr. José Luis (QEPD), compañeros de generación, de pasillos, de platicas y a las personas que pude haber omitido, pero fueron parte de este proceso.

Wilbert Rodríguez

ÍNDICE

ÍNDICE	i
ÍNDICE DE TABLAS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	i
RESUMEN	i
ABSTRACT	iii
INTRODUCCIÓN	i
HIPÓTESIS.....	iii
OBJETIVO GENERAL	iii
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	iii
Capítulo 1	1
Antecedentes	1
1.1 Uso de Biopolímeros	1
1.2 Los galactomananos vegetales como fuente natural de biopolímeros	2
1.3 Estructura y propiedades del biopolímero extraído del árbol Flamboyán (<i>Delonix regia</i>)	3
1.4 Propiedades espesantes de los galactomananos	4
1.5 Películas.....	7
1.5.1 Películas biodegradables a partir de polisacáridos	8
1.6 Geles débiles y fuertes de polisacáridos.....	9
1.6.1 Geles de galactomananos.....	11
1.6.2 Comportamiento reológico de geles de galactomananos.....	14
Capítulo 2	18
Metodología.....	18
2.1 Extracción del galactomanano nativo del <i>Delonix regia</i> (GMNDR).....	18
2.2 Hidrólisis enzimática.....	18
2.3 Caracterización del Galactomanano y los hidrolizados	19
2.3.1 Cromatografía de permeación de gel (GPC).....	19
2.3.2 Contenido total de carbohidratos	19
2.3.3 ¹ H NMR	20
2.3.4 Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR).....	20
2.3.5 Difracción de Rayos-X.....	20
2.3.6 Solubilidad	20
2.4 Caracterización reológica de las dispersiones.....	21
2.4.1 Dispersiones del GMNDR y los HGDR.....	21
2.4.2 Dispersiones de la mezcla de galactomananos y k-carragenano	22
2.5 Elaboración de películas	22

2.6 Caracterización de las películas	22
2.6.1 Color y opacidad	22
2.6.2 Micrografías por microscopía electrónica de barrido (SEM).....	23
2.6.3 Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier de las películas.....	23
2.6.4 Solubilidad en agua y contenido de humedad de las películas.....	23
2.6.5 Permeación al vapor de agua (PVA) de las películas.....	24
2.6.6 Propiedades Mecánicas.....	24
2.6.7 Ángulo de contacto.....	25
2.7 Formación de Geles	25
2.7.1 Preparación de geles con el galactomanano del <i>Delonix regia</i>	25
2.7.3 Preparación de geles con la mezcla de galactomanano y k-carragenano.....	26
2.7.6 Preparación de geles con el galactomanano del <i>Delonix regia</i> y el líquido iónico cloruro de 1-butil-3-metilimidazol (LI).	27
Capítulo 3	28
Caracterización de los Hidrolizados enzimáticos del galactomanano del <i>Delonix regia</i>28	
3.1 Extracción del galactomanano e hidrólisis enzimática	28
3.2 Caracterización espectroscópica del GMNDR y de los HGDR.....	31
3.3 Efecto de la hidrólisis enzimática en la solubilidad del galactomanano del <i>Delonix regia</i>	33
3.4 Propiedades reológicas de las dispersiones.....	35
3.4.1 Pruebas oscilatorias del galactomanano y los hidrolizados al 3%.....	35
3.4.2 Pruebas en flujo en cortante del galactomanano y los hidrolizados al 3%	38
3.4.3 Efecto de la concentración en las propiedades reológicas de las dispersiones del galactomanano y los hidrolizados	43
3.4.4 Pruebas oscilatorias del galactomanano y los hidrolizados a diferentes concentraciones.	46
3.5 Efecto de la adición de k-Carragenano en las propiedades reológicas de las dispersiones del galactomanano del <i>Delonix regia</i> con diferentes pesos moleculares.....	49
Capítulo 4	52
Resultados: Elaboración de Películas y geles a partir del galactomanano del <i>Delonix regia</i> y sus hidrolizados.....	52
4.1 Películas.....	52
4.2 Micrografías SEM y caracterización por infrarrojo de las películas	53
4.3 Contenido de humedad, solubilidad y permeación de vapor de agua de las películas ...	55
4.4 Angulo de contacto y propiedades mecánicas de las películas de galactomanano y las mezclas con k-Carragenano.....	59
4.5 Formación g.....	60
eles de Galactomanano nativo del <i>Delonix regia</i>	60
4.6 Geles de Galactomanano del <i>Delonix regia</i> mezclada con k-Carragenano.....	63
4.6.1 Temperatura de gelación de las SFPs que contienen k-Carr.....	63
4.7 Geles de GMNDR e hidrolizados usando como solvente un Líquido Iónico.....	68
CONCLUSIONES	73
Bibliografía	75

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3.1. Características del galactomanano nativo del Delonix regia y sus hidrolizados en función de la dosis de enzima y tiempo de reacción.	29
Tabla 3.2. Parámetros de la ley de la potencia de los ajustes del galactomanano nativo del Delonix regia y los hidrolizados a la concentración del 3% p/v.	40
Tabla 3.3. Parámetros de los modelos con mejor ajuste (Ley de la potencia o Williamson) para las dispersiones del Galactomanano del Delonix regia y hidrolizados a las concentraciones de 0.5, 1 y 1.5% p/v.	46
Tabla 3.4. Parámetros de los modelos que mejor se ajustaron a las dispersiones a 50 °C.	51
Tabla 4.1 Parámetros CIEL*a*b* de las películas elaboradas con el GMNDR, HAPM, HMPM, HBPM y k-carr, así como la mezcla de la k-carr con cada galactomanano.	53
Tabla 4.2. Porcentaje de humedad y solubilidad de las películas	56
Tabla 4.3. Propiedades mecánicas y ángulo de contacto de las películas elaboradas con galactomananos de diferentes pesos moleculares y k-carr	60
Tabla 4.4 Parámetros del modelo mecánico viscoelástico lineal de Burger para la prueba de cedencia ajustados a los datos experimentales de los geles del galactomanano al 5% y 10% (p/v).....	62
Tabla 4.5. Valores de la temperatura de gelación (T_G) y fusión (T_f) de los geles formados a partir de las dispersiones de k-carr y la mezcla de este con galactomananos de diferentes pesos moleculares.	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Unidad repetitiva de a) quitina, b) celulosa, c) pectina y d) amilopectina.....	1
Figura 1.2. a) Unidad repetitiva del galactomanano del guar. b) Unidad repetitiva del algarrobo.....	3
Figura 1.3. a) Árbol de Flamboyán con sus características hojas rojas, b) vaina y semillas del árbol de Flamboyán.	4
Figura 1.4. Unidad repetitiva del galactomanano de la semilla de flamboyán.....	4
Figura 1.5. Curvas de flujo de goma tara (GT), goma tara purificada (GTp) y goma de algarrobo (GA) a 25°C. Símbolos 0.4% GA (-), 0.5% GT (x), 1.0% GA (◇), 0.88% GTp (Δ), 1.29% GT (o) y 1.19% GTp (□); líneas continuas representan al modelo de Cross y líneas punteadas al modelo de Carreau	6
Figura 1.6. Módulo de almacenamiento G'(a) y módulo de pérdida G''(b) contra la frecuencia para dispersiones de goma de algarrobo a diferentes concentraciones a 25 °C: 0.4% (◇), 0.6% (o), 0.8% (Δ) y 1.0% (□). Las líneas continuas representan el ajuste del modelo de Maxwell generalizado con cuatro tiempos de relajación.....	7
Figura 1.7. Barrido de frecuencia de: a) geles de alginato de calcio (1.4% p/p). b) geles débiles de varios polisacáridos, (△▲) Rhamsan 1% p/p, (□■) Xantana 1% p/p, 0.02 M KCl y (○●) Welan 0.25%/p/p símbolos rellenos G' símbolos vacíos G''	11
Figura 1.8. Estructura de los líquidos iónicos mas utilizados como solventes	12
Figura 1.9. Proceso de fundición del gel y su posterior regeneración	13
Figura 1.10. Modelo propuesto para la formación de un gel a partir de una mezcla de celulosa y BMIMCl.....	14
Figura 1.11. Barrido de frecuencia de la dispersión de goma de algarrobo al 1.5% con 60% sacarosa a diferentes temperaturas. a) recién hecha, b) gel formado a -5 °C por 70 h. G' (■), G'' (○).....	15
Figura 1.12. Dependencia de la frecuencia de G'(símbolos rellenos) y G''(símbolos abiertos) de guar/BMIMCl (▲△) , guar/EMIMMP(■□) y guar/AMIMCl (●○) a 25° C y 15% peso, la goma guar de 126kDa	15
Figura 1.13. Prueba de fluencia a geles formados con goma guar de 126 kDa a 25° C, 10%peso/AMIMCl (a), 8%peso/BMIMCl (b) y 10%peso/BMIMCl (c).....	16
Figura 3.1. Recíproco del peso molecular en número contra el tiempo de hidrólisis a diferentes dosis de enzima.	30
Figura 3.2. Espectro de resonancia magnética nuclear de ¹ H del galactomanano del <i>Delonix regia</i>	32

Figura 3.3. Espectro de infrarrojo de: a) galactomanano nativo, b) hidrolizado a 0.5 nKat /g a 30 min, c) hidrolizado a 1 nKat /g a 60 min y d) hidrolizado a 1.5 nKat /g a 90 min.....	33
Figura 3.4. Difractograma de rayos X de: a) galactomanano nativo, b) hidrolizado a 0.5 nKat /g a 30 min, c) hidrolizado a 1 nKat /g a 60 min y d) hidrolizado a 1.5 nKat /g a 90 min.....	33
Figura 3.5. Solubilidad del galactomanano nativo y de los hidrolizados a 25 °C a) y 60 °C b). Muestras con letras diferentes presentan diferencia estadísticamente significativa (p<0.05)..	35
Figura 3.6. Barridos de frecuencia del galactomanano nativo del <i>Delonix regia</i> y de los hidrolizados a diferentes tiempos de hidrólisis usando una dosis de enzima de: 0.5 nKat g ⁻¹ a), 1 nKat g ⁻¹ b) y 1.5 nKat g ⁻¹ c).....	37
Figura 3.7. Viscosidad del galactomanano nativo del <i>Delonix regia</i> y de los hidrolizados a diferentes tiempos de hidrólisis usando una dosis de enzima de: 0.5 nKat g ⁻¹ a), 1 nKat g ⁻¹ b) y 1.5 nKat g ⁻¹ c).....	39
Figura 3.8. Viscosidad en cortante (rojo) y viscosidad compleja (azul) en función de la tasa de corte y frecuencia angular respectivamente del galactomanano nativo y los hidrolizados a: a) 0.5 nKat g ⁻¹ , b) 1 nKat g ⁻¹ y c) 1.5 nKat g ⁻¹ . Tiempos de hidrólisis: (●) 0; (■) 30; (▲) 60; and (◆) 90.	42
Figura 3.9. Viscosidad contra velocidad de corte de dispersiones de: nativa ▼, 0.5 nKat/g a 30 min■, 1 nKat/g a 60 min● y 1.5 nKat/g a 90 min▲. A las concentraciones de 0.5% a), 1% b) y 1.5% c) en peso volumen.....	45
Figura 3.10. Barridos de frecuencia de las dispersiones de: a) galactomanano nativo del <i>Delonix regia</i> , b) hidrolizado a 0.5 nKat g ⁻¹ x 30 min y 1 nKat g ⁻¹ x 60 min a las concentraciones de 1.5% (■,□) y 1% (▲,△). Símbolos abiertos módulo viscoso y símbolos cerrados módulo elástico.	48
Figura 3.11. Viscosidad de las soluciones formadoras de películas.	50
Figura 4.1. Micrografías de las superficies de las películas tomadas con un aumento de 1000x. a) GMNDR, b) k-carr, c) k-carr:GMNDR, d) HAPM, e) HMPM, f) HBPM, g) k-carr:HAPM, h) k-carr:HMPM, i) k-carr:HBPM.	54
Figura 4.2. Espectro de infrarrojo de las películas con: a) GMNDR, b) HAPM, c) HMPM y d) HBPM. Película de K-carr (línea roja), película de solo galactomanano (línea negra), película de mezcla de galactomanano y k-carr (línea azul).	55
Figura 4.3. Películas después de 24 horas de inmersión en agua a 25 °C. Películas de: a) GMNDR, b) HAPM, c) HMPM, d) HBPM, e) GMNDR:k-carr, f) HAPM:k-carr, g) HMPM:k-carr y , h) HBPM:k-carr.....	57
Figura 4.4. Permeación al vapor de agua de las películas de galactomanano de <i>Delonix</i> y <i>regia</i> y k-carr. Muestras con letras diferentes presentan diferencia estadísticamente significativa (p<0.05).....	58
Figura 4.5 Gel del galactomanano nativo en el plato peltier para los barridos de frecuencia) al 5% p/v, b al 10% p/v).	61

Figura 4.6 Barridos de frecuencia de los geles del GMNDR: 5% p/v (78), 10% p/v (●○).....	62
Figura 4.7 Curvas de fluencia de los geles de galactomanano nativo con un esfuerzo constante de 50 Pa. a) 5% (p/v), b) 10% (p/v).....	63
Figura 4.8. Barridos de temperatura de los geles de: a) k-carr, b) GMNDR:k-carr, c) HAPM:k-carr, d) HMPM:k-carr y e) HBPM:k-carr.	66
Figura 4.9. Barridos de frecuencia de los geles de: a) k-carr, b) GMNDR:k-carr, c) HAPM:k-carr, d) HMPM:k-carr y e) HBPM:k-carr.	67
Figura 4.10 a) Solución de Galactomanano del <i>Delonix regia</i> al 10% (p/v) en BMIMCl, b) gel formado pasadas 48 horas expuesto al ambiente y 5 minutos en etanol al final.	68
Figura 4.11. Curva de absorción de agua del entorno de la dispersión del GMNDR en el LI cloruro de 1-butil 3-metil imidazol al 10% p/v en función del tiempo.	69
Figura 4.12 Barrido de frecuencia del Galactomanano del <i>Delonix regia</i> (GMNDR) al 10% (p/p) en BMIMCl a) gel formado en 48 h expuesto al ambiente, b) solución macromolecular concentrada formada al dejar 48 h en el desecador.....	70
Figura 4.13. Geles formados usando BMIMCL con a) GMNDR, b) HMPM y c) HBPM.....	71
Figura 4.14. Barridos de frecuencia de los geles de GMNDR, HMPM y HBPM en BMIMCL a la concentración de 10% p/v.	72

RESUMEN

En este trabajo se estudió el efecto de la reducción del peso molecular del galactomanano de *Delonix regia*, por medio de una hidrólisis enzimática generada por medio de la β -mananasa proveniente del *Cellvibrio japonicus*, sobre su capacidad de formar dispersiones viscosas, geles y películas. Se caracterizó fisicoquímicamente el galactomanano y los hidrolizados obtenidos. El galactomanano se extrajo de la semilla de *Delonix regia*, en la extracción del galactomanano el rendimiento obtenido fue del 10% con respecto del peso de la semilla. Se evaluó la hidrólisis enzimática con dosis de enzima de 0.5, 1 y 1.5 nKat/g y tiempos de hidrólisis de 30, 60 y 90 min. La reacción de hidrólisis siguió una cinética de pseudoprimer orden, donde la constante aparente de reacción aumentó al incrementar la dosis de enzima. El peso molecular del galactomanano nativo fue de 4.86×10^5 Da y la hidrólisis enzimática lo redujo a un intervalo de 4.15×10^5 y 1.95×10^5 Da dependiendo de la dosis y el tiempo de hidrólisis, mientras que la polidispersidad aumento de 1.23 a 2.4 al disminuir el peso molecular. El espectro de resonancia magnética nuclear de protón mostró que el polisacárido de *Delonix regia* es un galactomanano con una relación de galactosa:manosa de 1:3.48, la cual incrementó ligeramente, 1:3.9 por la hidrólisis enzimática, mientras que la caracterización por infrarrojo y dispersión de rayos X mostraron que la estructura química y amorfa del galactomanano no fue alterada por la hidrólisis enzimática. La solubilidad del galactomanano se elevó debido a la hidrólisis enzimática de 49.59 a 70 % a 25 °C. A la temperatura de 60°C, la solubilidad del galactomanano nativo y los hidrolizados fue de 93.6 %. Los resultados de las pruebas reológicas indican que la viscosidad en estado estacionario de las dispersiones acuosas de los hidrolizados al 3% p/v disminuye con el aumento en la hidrólisis enzimática, con lo cual es posible ajustar el grado de hidrólisis para obtener una viscosidad deseada a cierta concentración del galactomanano. Por otra parte, los barridos de frecuencia evidenciaron que a pesos moleculares menores a 4.14×10^5 Da, los enredamientos entre las cadenas de las moléculas disminuyen significativamente, provocando que no sea posible la formación de una estructura tipo gel; mientras que las dispersiones de los galactomananos por arriba de este peso molecular formaron una estructura tipo gel débil a la concentración de 3% p/v. El

galactomanano del *Delonix regia* fue capaz de formar películas incoloras flexibles sin la incorporación de agentes plastificantes y la reducción del peso molecular no disminuyó significativamente sus propiedades mecánicas; no obstante, su solubilidad aumentó de 69 a 76%. Por otra parte, la incorporación de k-Carragenano en la formulación de las películas de galactomanano aumentó la solubilidad de las películas hasta un 100 % y le dio una ligera coloración amarilla. Además, la permeación de vapor de agua de las películas del galactomanano creció por la hidrólisis enzimática hasta que el peso molecular fue de 2.85×10^5 Da, donde empezó a decrecer, mientras que, la incorporación del k-Carragenano con el galactomanano nativo incrementó la permeación de vapor de agua; sin embargo, para las mezclas con los hidrolizados la permeación de vapor de agua disminuyó. Finalmente, el galactomanano nativo fue capaz de formar geles a concentraciones de 5 y 10 % del polisacárido en agua, los cuales tuvieron un carácter de gel débil, con módulos elásticos entre 1600 Pa y 10750 Pa respectivamente; mientras, los geles de hidrolizados a estas concentraciones no tuvieron la fuerza necesaria para mantener su forma al ser manipulados, por lo que se estudió la formación de geles con la adición del k-Carragenano o usando el líquido iónico como el cloruro de 1-Butil 3-metil imidazol. La adición del k-carragenano a la dispersión del galactomanano en agua, teniendo una relación de 60% galactomanano y 40% k-carragenano a una concentración del 1% p/v, permitió la formación de geles térmicamente reversibles; además, se observó que, al disminuir el peso molecular del galactomanano, los módulos de los geles decrecieron. También, se observó un debilitamiento de la estructura por la presencia del galactomanano en la estructura formada por el k-carragenano. Por otra parte, se formaron geles disolviendo los galactomananos en el líquido iónico, los cuales no presentaron diferencia en sus módulos por la reducción del peso molecular, y se llegó a la conclusión que el gel es formado por la absorción de agua del medio ambiente, el cual forma puentes de hidrógeno con el galactomanano y el líquido iónico.

ABSTRACT

In this work the effect of *Delonix regia* galactomannan molecular weight reduction by enzymatic hydrolysis on its ability to form viscous dispersions, gels and films was studied. The native *Delonix regia* galactomannan and the hydrolysates were physicochemical characterized. The galactomannan extraction yield was 10% with respect to the seed weight. The enzymatic hydrolysis was evaluated at different enzyme dosages and hydrolysis times which were 0.5, 1 and 1.5 nKat/g for 30, 60 and 90 min, respectively. The hydrolysis reaction follows a pseudo first order kinetic and the apparent reaction rate constant increases as the enzyme dosage increased. The native *Delonix regia* galactomannan molecular weight was 4.86×10^5 Da whereas the hydrolysates were within 4.15×10^5 and 1.95×10^5 Da depending on enzyme dosage and hydrolysis time used; at the same time the polydispersity increased from 1.23 to 2.4 as the hydrolysis increased. The ^1H nuclear magnetic resonance shows that *Delonix regia* polysaccharide was a galactomannan with a galactose:mannose ratio of 1:3.48 which increases slightly due to enzymatic hydrolysis. Infrared spectroscopy and X-ray diffraction showed that the chemical and amorphous structure were not affected by enzymatic hydrolysis. Although, the galactomannan solubility increased due to the hydrolysis from 49.59% to 70% at 25 °C and the solubility of all galactomannans reached around 93.6 % at 60° C. The steady state viscosity measurement showed that it was possible to control the viscosity values by controlling the enzymatic hydrolysis and galactomannan concentration. Furthermore, frequency sweeps evidenced that below a 4.14×10^5 Da, molecular weight the chain entanglements decrease considerably, leading to a non-gel structure formation; in contrast, molecular weights above this limit will lead to a weak gel behavior as assessed by a solution containing 3% galactomannan concentration. On other hand, *Delonix regia* native galactomannan and their hydrolysates were able to form flexible and transparent films from film forming solutions containing 1% w/v without the addition of a plasticizing agent. The molecular weight reduction did not affect significantly the film's mechanical properties; although the films solubility increased from 69% to 76% as the molecular weight was hydrolytically reduced. However, the k-carragennan addition to the film forming solution at 60% galactomannan and 40% k-carragennan ratio increases the solubility of films made thereof to 100% and gives a slightly yellow coloration. Also, the galactomannan films

water vapor permeation increased due to the molecular weight reduction until a particular molecular weight is reached where it started to decrease. Meanwhile, k-carragennan addition to native galactomannan film forming solution increased the water vapor permeation but the k-carragennan addition decreased the hydrolysates water vapor permeation. Finally, the native *Delonix regia* galactomannan was able to form weak gels at 5% and 10% w/v concentration with enough strength to be manipulated without structure destruction and with elastic moduli of 1600 Pa and 10750 Pa respectively. The hydrolysates from *Delonix regia* formed weak gels that did not have enough strength to be manipulated; therefore, the addition of k-carragennan or 1-butyl 3-methyl imidazolium chloride ionic liquid were used to form gels. The gel formed with k-carragennan addition to galactomannan solution were weaker than pure k-carragennan gel, so the galactomannan chains interfered with the k-carragennan gel formation even though the hydrolysates mixed with k-carragennan were able to produce thermally reversible gels; also, the molecular weight reduction decrease the gels moduli. On the other hand, the use of ionic liquid instead of water as solvent led to strong gel formation at the concentration of 10% galactomannan in the ionic liquid and the molecular weight reduction did not affect significantly the moduli value. It was also found that there was an increment in the weight in gels formation, concluding that the gel formation is due to environmental water absorption which form hydrogen bonds with the ionic liquid and galactomannan chains.

INTRODUCCIÓN

Los biopolímeros son interesantes para diversas aplicaciones en el área biomédica, alimenticia, como material de empaque y control de humedad, entre otros [1]. Su principal ventaja es que la materia prima proviene de recursos renovables como árboles, algas o bacterias. Algunos de estos biopolímeros tienen las propiedades de espesantes, formar geles y películas; estas propiedades hacen que sean materiales muy versátiles en diversas aplicaciones y tengan posibilidades para industrializarse. En particular los biopolímeros de polisacáridos de alto peso molecular, entre los que se encuentran los galactomananos, ofrecen posibilidades para la formación de geles y películas para diversas aplicaciones. Los polisacáridos, en especial la variedad de los galactomananos están presentes en algunas semillas, como la de Guar, y se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza; poseen cadenas formadas por enlaces $(1\beta,4)$ de D, manopiranosas, las cuales tienen ramificaciones de enlaces $(1\alpha,6)$ de D-galactopiranosas [2]. La semilla del árbol de flamboyán (*Delonix regia*) contiene un polisacárido del tipo galactomanano el cual ha sido estudiado para la variedad de Japón. La masa molecular de éste se estimó en 2.5×10^5 Da aproximadamente, con una relación de manosa a galactosa de 3.9:1 [3]. Los polisacáridos del tipo galactomanano son ricos en grupos OH en posición *cis* a lo largo de la cadena de manosas, lo cual permite la agregación entre cadenas por puentes de hidrógeno; debido a esto, si ocurre entrecruzamiento inter-cadena la capacidad de hidratación disminuye al formarse una estructura semicristalina impidiendo la solvatación de la macromolécula; lo anterior, dificulta su uso a nivel industrial, ya que se requiere la aplicación de energía, ya sea térmica o mecánica para solvatarlas. Para evitar esto se puede modificar la estructura por medio de una hidrólisis enzimática utilizando la $(1-4) \beta$ D-mananasa, la cual proviene del *Cellvibrio japonicus*. Debido a que la hidrólisis disminuye el peso molecular y modifica la estructura de la cadena del galactomanano del *Delonix regia*, es de esperarse cambios en las propiedades de solubilidad, capacidad de formación de geles y películas, así como las propiedades mecánicas y permeación de vapor de agua. El control de la reducción del peso molecular para generar galactomananos con propiedades reológicas en un intervalo específico es una herramienta que puede traer grandes beneficios a los procesos industriales

actuales y diversificar los usos de los galactomananos. Por lo que, en este trabajo se estudió cómo diferentes grados de hidrólisis cambian la estructura del galactomanano de la semilla del *Delonix regia* y cómo se afectan las propiedades mencionadas anteriormente. Además, se estudió la interacción con otro polisacárido con carga negativa como es el k-carragenano, esto en sistemas generados usando agua, y el líquido iónico cloruro de 1-butil-3-metilimidazol (BMIMCl), como disolventes. Las propiedades se determinaron por medio de pruebas reológicas como barridos de frecuencia, fluencia, relajación de esfuerzos y curvas de flujo. En particular, a las películas generadas con agua como solvente, se les determinó su permeación de vapor de agua, para su posible uso como sistemas de atmósferas modificadas para empaque.

HIPÓTESIS

La hidrólisis enzimática y la interacción con un polisacárido iónico (k-carragenano) y un líquido iónico (cloruro de butil metil imidazol) modificarán de manera controlada las propiedades viscoelásticas de las dispersiones y geles, así como las propiedades de película del galactomanano del *Delonix regia*.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar las propiedades estructurales y reológicas de las dispersiones y geles del galactomanano de la semilla del *Delonix regia* hidrolizado enzimáticamente, y el efecto de la incorporación del k-carragenano en las propiedades de películas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar la estructura del galactomanano nativo de la semilla del *Delonix regia* (GMNDR) y sus hidrolizados (HGDR).
- Evaluar el efecto de la hidrólisis sobre las propiedades fisicoquímicas del galactomanano extraído de la semilla del *Delonix regia* a diferentes tiempos y dosis de enzima.
- Evaluar el cambio en el comportamiento reológico de dispersiones de GMNDR y los HGDR por medio de barridos de corte y frecuencia ajustando la viscosidad de corte a un modelo reológico.
- Determinar el efecto de la adición de k-carragenano en las propiedades reológicas de las dispersiones del GMNDR y los hidrolizados, así como su capacidad de formar geles.
- Caracterizar fisicoquímicamente las películas por medio de SEM, FTIR, ángulo de contacto y color.
- Analizar el efecto del peso molecular y también de la presencia de carragenina en la permeación de vapor de agua, solubilidad y propiedades mecánicas de las películas.

- Determinar la diferencia en el comportamiento viscoelástico de los geles logrados con los diferentes hidrolizados del galactomanano usando agua y el LI BMIMCl por medio de barridos de frecuencia.
-

Capítulo 1

Antecedentes

1.1 Uso de Biopolímeros.

La incesante actividad biológica de organismos vivos genera una multitud de compuestos, incluyendo una variedad de monómeros y polímeros. No es nueva la explotación de recursos renovables; desde el inicio de las actividades humanas la necesidad de abrigo, ropa, herramientas, armas, utensilios y todo tipo de revestimientos han provenido de estas fuentes, inicialmente sin grandes modificaciones y progresivamente se fueron elaborando procesos para la mejora y optimización de su rendimiento y durabilidad. A finales del siglo XIX el uso de biopolímeros había alcanzado un alto grado de sofisticación tecnológica, sin embargo, la importancia de estos compuestos macromoleculares basados en fuentes renovables sufrió un decaimiento gradual, debido al uso de polímeros sintéticos derivados del petróleo. En la actualidad, se sabe que las fuentes de recursos fósiles se agotarán al no ser renovables, además el precio del petróleo es variable, por lo que gobiernos y empresas están retomando el estudio y uso de fuentes renovables como los biopolímeros. Entre estos, los más usados sin modificar están la celulosa, la quitina y el almidón (Figura 1.1), debido a su relativa abundancia, además, estos biopolímeros muestran diferentes propiedades de cristalinidad, solubilidad, y posibilidades de modificación química lo que les permite ser usados en diferentes aplicaciones [4].

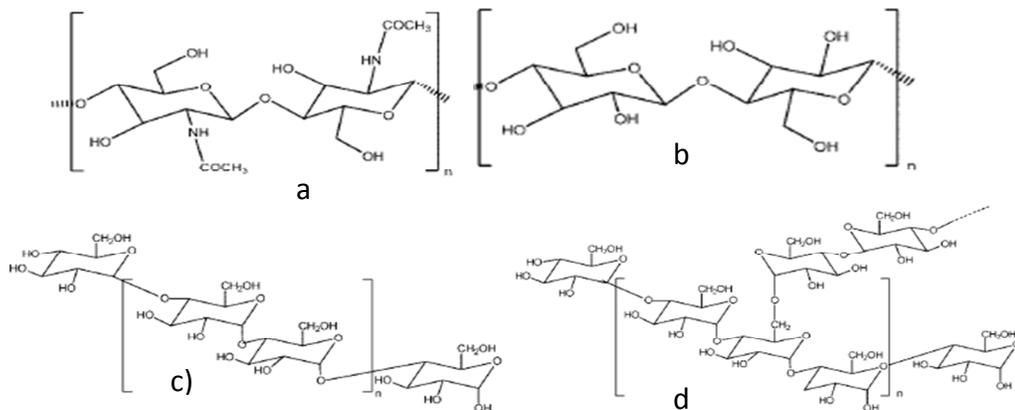


Figura 1.1. Unidad repetitiva de a) quitina, b) celulosa, c) pectina y d) amilopectina.

1.2 Los galactomananos vegetales como fuente natural de biopolímeros.

Los galactomananos son biopolímeros presentes en algunas semillas; son polisacáridos heterogéneos, ampliamente distribuidos en la naturaleza y poseen cadenas principales formadas por enlaces $\beta(1,4)$ de D-manopiranosas. Estas cadenas tienen ligadas galactosas por medio de enlaces $\alpha(1,6)$ [2]. Estos polisacáridos sirven como almacenamiento de energía para la germinación de las semillas de las leguminosas. Debido que tienen alta viscosidad e interacciones sinérgicas con otros polisacáridos, como la xantana y la agarosa, son usados a menudo como agentes espesantes y estabilizantes en la industria alimentaria [3]. Se diferencian unos de otros por la relación de unidades de manosas y galactosas presentes en sus cadenas. Las cuatro principales fuentes de galactomananos en la naturaleza son: la semilla del algarrobo (*Ceratonia siliqua*), guar (*Cyamopsis tetragonoloba*), tara (*Caesalpinia spinosa Kuntze*) y fenogreco (*Trigonella foenum-graecum*); de éstas únicamente la de algarrobo y guar (Figura 1.2) son de importancia comercial. La relación molar de manosa y galactosa varía con el origen de la planta, pero está en el rango de 1.0:1.0-1.1, 1.0:1.6-1.8, 1.0:3.0, 1.0:3.9-4.0 para el fenogreco, guar, tara y algarrobo respectivamente. La conformación del enlace $1\rightarrow4\beta$ en la cadena de manosas es similar al de la celulosa, la cual no se disuelve en agua. Las moléculas de galactosa unidas a la cadena principal provocan impedimentos estéricos en la asociación intercadena y cristalización, por lo que imparten cierta solubilidad en agua a los galactomananos. Debido a esto la solubilidad se incrementa al aumentar el grado de sustitución de galactosas; por ejemplo, la goma guar se solubiliza en agua fría mientras que la goma de algarrobo requiere una mayor temperatura para solubilizarse. La mejor solubilidad se encuentra en galactomananos con relación 1:1 (galactosa/manosa) en la cual la alta sustitución por las galactosas establece mayor impedimento estérico que permite solubilizarse en agua fría, además de prevenir el ataque de enzimas. Galactomananos con una relación de 1:4, como el encontrado en *Delonix regia*, no se disuelven en agua fría, pero son solubles en agua temperaturas moderadas (>60 °C). La relación entre galactosa y manosa depende de la fuente del galactomanano, pudiendo variar desde 1:1 a 1:5. Usualmente los galactomananos con un

alto contenido de galactosas exhiben una menor tendencia a formar geles como resultado del impedimento que generan éstas en las interacciones entre las cadenas principales de manosas, mientras que a menor cantidad de galactosas las interacciones entre las cadenas principales favorecen la formación del gel [5].

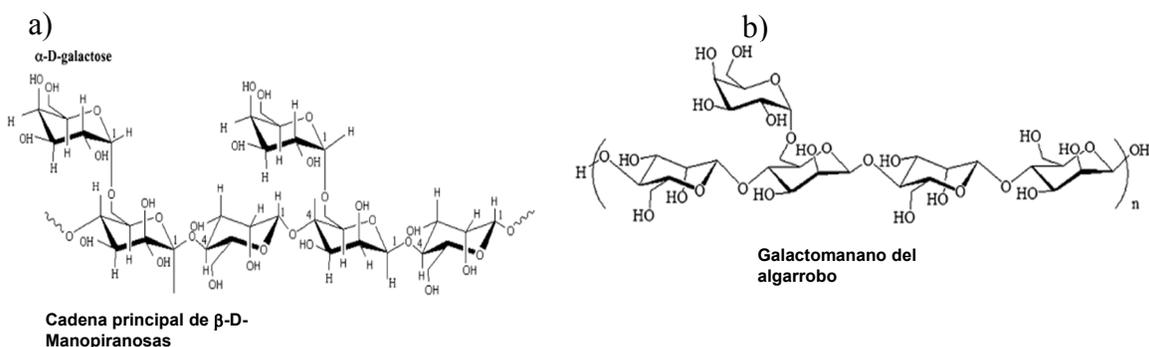


Figura 1.2. a) Unidad repetitiva del galactomanano del guar. b) Unidad repetitiva del algarrobo.

1.3 Estructura y propiedades del biopolímero extraído del árbol Flamboyán (*Delonix regia*).

El árbol de flamboyán (*Delonix regia*) pertenece a la familia *Fabaceae*, este árbol crece en zonas tropicales y subtropicales. Por otra parte, esta planta es cultivada como un árbol ornamental, sus hojas son de tipo helecho y da flores rojizas (Figura 1.3a), crece desde una altura de 5 m hasta los 12 m, se extiende ampliamente y por su denso follaje provee una gran sombra. Las vainas de las semillas son café oscuro y pueden medir más de 60 cm de largo por 5 cm de ancho (Figura 1.3b); sin embargo, las semillas son pequeñas, pesando en promedio 0.4 g. La semilla del *Delonix regia* contiene un galactomanano, el cual ha sido estudiado para la variedad de Japón, de la que se obtuvo un rendimiento del 20% con base en el peso de la semilla. La masa molecular del galactomanano del *D. regia* es de 2.5×10^5 aproximadamente, y tiene una relación de manosa y galactosa de 3.9:1, como se puede observar en la estructura del polisacárido (Figura 1.4) [3].

a)



b)



Figura 1.3. a) Árbol de Flamboyán con sus características hojas rojas, b) vaina y semillas del árbol de Flamboyán.

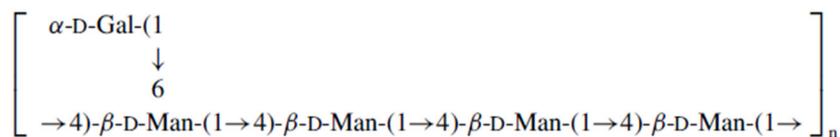


Figura 1.4. Unidad repetitiva del galactomanano de la semilla de flamboyán.

1.4 Propiedades espesantes de los galactomananos.

Una de las propiedades más explotadas de los polisacáridos, y en especial de los galactomananos, es su capacidad de aumentar la viscosidad (η) del medio en el que se dispersa. En dispersiones de polisacáridos, el agua es absorbida como una envoltura por el polisacárido. Por arriba de una concentración crítica, las moléculas del polisacárido muestran enredamientos e interpenetramiento; por lo tanto, la viscosidad aumenta. En general, las soluciones de polisacáridos tienen una alta viscosidad a bajas velocidades de corte ($\dot{\gamma}$), por lo que son utilizadas en la suspensión de partículas; sin embargo, a altas velocidades de corte también tienen un comportamiento refluidificante. Además, el comportamiento refluidificante permite el control de procesos como el bombeo, trasvase y atomización. Los polisacáridos son ampliamente utilizados en aplicaciones como en el concreto, procesamiento de cerámicos, perforación para la extracción de petróleo entre otras [6].

Los modelos más usados para describir el comportamiento de la viscosidad de los galactomananos a diferentes velocidades de corte son el modelo de la ley de la potencia (Ec. 1), el de Cross (Ec. 2) y el de Carreau (Ec. 3) las cuales son:

$$\eta = m\dot{\gamma}^{n-1} \quad (1)$$

$$\eta = \eta_{\infty} + \frac{(\eta_0 - \eta_{\infty})}{1 + \tau\dot{\gamma}^k} \quad (2)$$

$$\frac{\eta - \eta_{\infty}}{\eta_0 - \eta_{\infty}} = [1 + (\lambda\dot{\gamma})^2]^{(n-1)/2} \quad (3)$$

En donde $\dot{\gamma}$ es la velocidad de corte, η es la viscosidad, η_0 y η_{∞} expresa la viscosidad a una velocidad de deformación cero e infinita, respectivamente, λ y τ son constantes de tiempo, n y k son constantes.

Los modelos de Cross y Carreau usan como parámetros la viscosidad a velocidad de corte cero e infinita por lo que abarcan todo el espectro de viscosidades de la dispersión. En algunas dispersiones es difícil observar la zona newtoniana a altas velocidades de corte, por lo que el término de la viscosidad a de velocidad corte infinita es eliminada del modelo, un ejemplo de este ajuste es el modelo de Williamson (Ec. 4) el cual es:

$$\eta = \frac{\eta_0}{1 + \tau \cdot \dot{\gamma}^{n_w}} \quad (4)$$

Donde η_0 es la viscosidad a tasa de corte cero, τ el tiempo de relajación de Williamson y n_w índice de flujo de Williamson; mientras que, la ley de la potencia solamente tiene una constante de proporcionalidad para la región pseudoplástica. Por otra parte, las mediciones dinámicas son ampliamente usadas para el estudio reológico de dispersiones de polisacáridos; en galactomananos a relativamente altas concentraciones se observa un comportamiento tipo líquido viscoso donde a bajas frecuencias el módulo viscoso es mayor al elástico ($G'' > G'$), y a altas frecuencias el sistema se comporta como un sólido. Lo anterior se debe a que la energía almacenada representada por el módulo elástico es mayor a la disipada en el módulo viscoso ($G' > G''$); además la frecuencia donde se cruzan $G' = G''$ se desplazan a valores menores de frecuencia cuando se incrementa la concentración. Este comportamiento en las pruebas oscilatorias es comúnmente modelado utilizando el modelo de Maxwell generalizado (Ec. 5) [7] del cual los módulos de pérdida y almacenamiento se expresan como:

$$G''(\omega) = \sum_{i=1}^N \frac{g_i \tau_i \omega}{1 + \tau_i^2 \omega^2} \quad (5a)$$

$$G'(\omega) = \sum_{i=1}^N \frac{g_i \tau_i^2 \omega^2}{1 + \tau_i^2 \omega^2} \quad (5b)$$

donde $g_i = \eta_i / \tau_i$ son los módulos, ω la frecuencia, τ_i los tiempos de relajación.

Este comportamiento reofluidificante y comportamientos dinámicos fueron investigados por W. Sittikijyothin y col., [7] para dos galactomananos, del árbol de algarrobo y tara. En la Figura 1.5 se presentan las curvas de flujo para dispersiones de las gomas tara, tara purificada y algarrobo, a diferentes concentraciones y los ajustes de los modelos de Cross y Carreau.

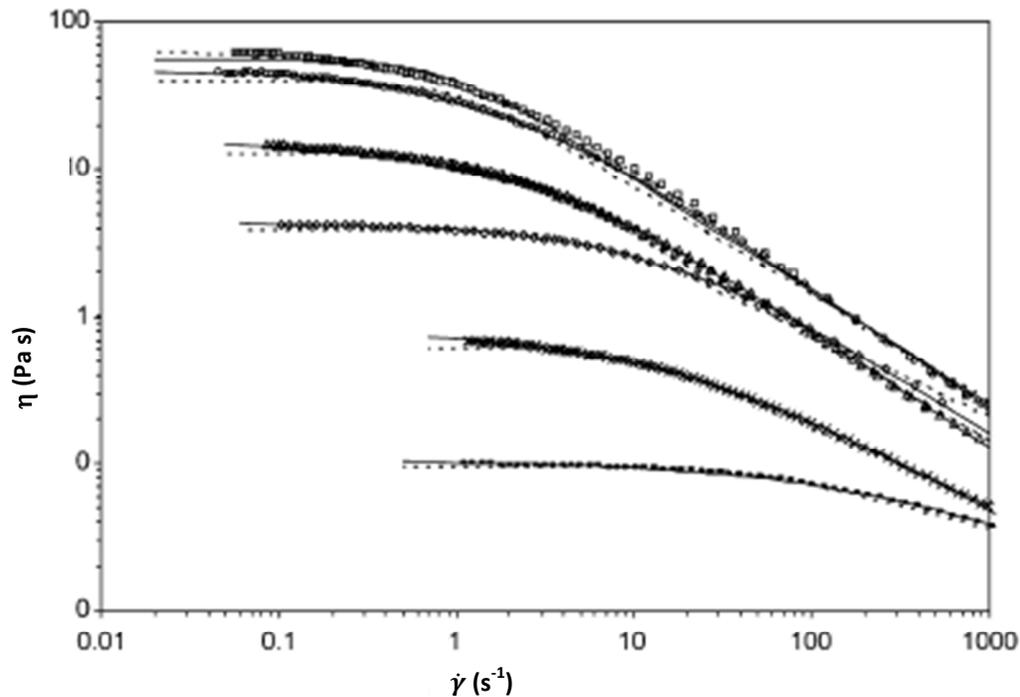


Figura 1.5. Curvas de flujo de goma tara (GT), goma tara purificada (GTp) y goma de algarrobo (GA) a 25°C. Símbolos 0.4% GA (-), 0.5% GT (x), 1.0% GA (\diamond), 0.88% GTp (Δ), 1.29% GT (\circ) y 1.19% GTp (\square); líneas continuas representan al modelo de Cross y líneas punteadas al modelo de Carreau [7].

En la Figura 1.6 se ve como el modelo de Maxwell representa bien a los datos experimentales obtenidos en pruebas dinámicas de dispersiones de goma de algarrobo; en este caso se utilizó un modelo generalizado de Maxwell con 4 tiempos de relajación.

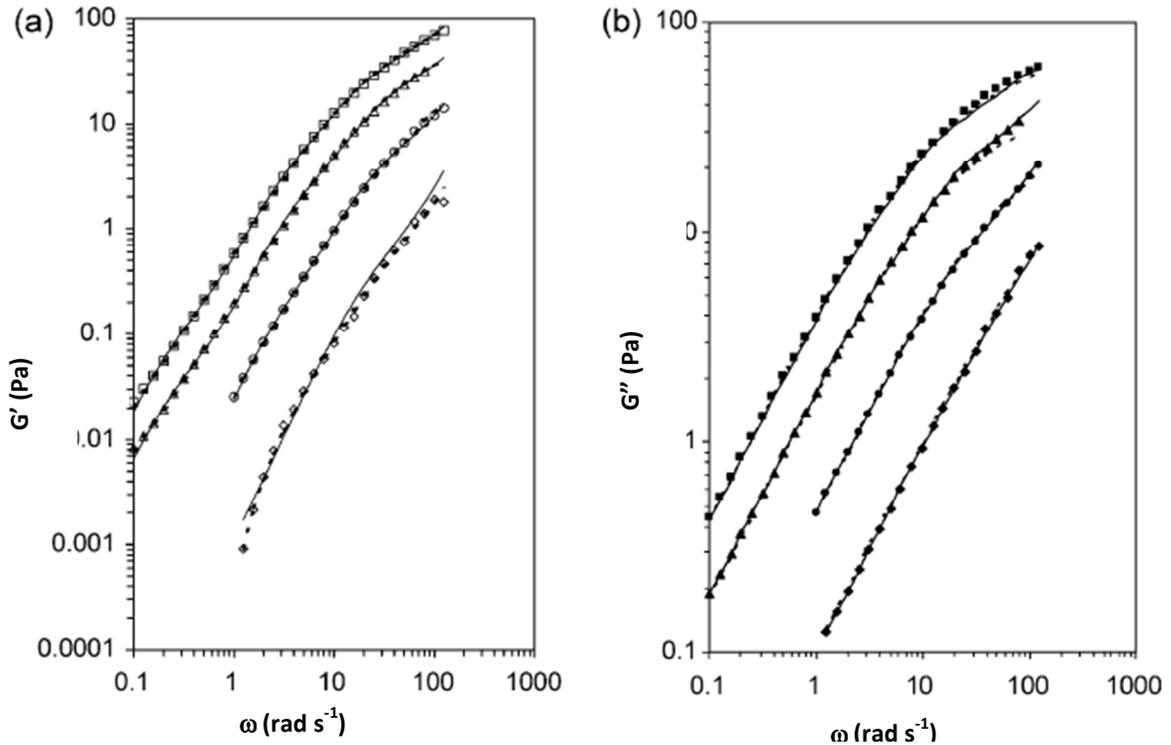


Figura 1.6. Módulo de almacenamiento G' (a) y módulo de pérdida G'' (b) contra la frecuencia para dispersiones de goma de algarrobo a diferentes concentraciones a 25 °C: 0.4% (\diamond), 0.6% (\circ), 0.8% (Δ) y 1.0% (\square). Las líneas continuas representan el ajuste del modelo de Maxwell generalizado con cuatro tiempos de relajación.

1.5 Películas.

La definición exacta de una película delgada es un problema de semántica y depende del campo y de su propósito. Se puede definir como una capa delgada de cualquier material, la cual se puede considerar delgada si su grosor es mucho menor que todas las otras dimensiones críticas de la película (longitud y ancho) [8]. Mikkonen y col. [9] , estudió cómo el cambio en la estructura de un polisacárido afecta sus propiedades mecánicas de sus películas, donde se hidrolizó el galactomanano presente en las semillas del árbol guar por medio de dos enzimas, una mananasa que disminuyó el grado de polimerización al cortar los enlaces de la cadena principal de manosas y, posteriormente, una galactosidasa para remover las galactosas de la cadena, esto se realizó a diferentes concentraciones de enzima. Estos hidrolizados fueron utilizados para la formación de películas con glicerol como

agente plastificante. Los resultados indican que los hidrolizados con menor cantidad de galactosas formaron los geles con mayor porcentaje de elongación a la ruptura y resistencia a la tracción. Además, indica que la estructura de los galactomananos afecta claramente la formación de las películas; interesantemente el mayor porcentaje de elongación se obtuvo en el tratamiento con una masa molar media baja, y la mayor resistencia a la tracción en masas molares a niveles medios, lo cual indica que las propiedades mecánicas de las películas preparadas con el galactomanano del guar se modificaron por medio de hidrólisis enzimática y los galactomananos de medio peso molecular obtuvieron los mejores comportamientos.

1.5.1 Películas biodegradables a partir de polisacáridos.

La industria de materiales para empaque, está trabajando en el uso de materiales biodegradables, por lo que la nueva generación de empaques deben derivarse de recursos naturales y ser biodegradables [10]. Los polisacáridos han sido utilizados como material de empaque por su habilidad de formar películas con permeabilidad selectiva a oxígeno y dióxido de carbono además de tener propiedades mecánicas las cuales pueden modificarse al adicionar aditivos plastificantes. Usualmente se utilizan agentes plastificantes como glicerol o polietilenglicol, ya que algunos polisacáridos generan películas rígidas las cuales no son flexibles y se rompen al doblarse; sin embargo, al aumentar el volumen libre entre las moléculas usando los plastificantes, las propiedades de barrera contra gases se reducen [11]. Por otra parte, las moléculas de agua en las películas funcionan como agentes plastificantes; pero puede perderse fácilmente debido a la deshidratación a bajas humedades relativas en el ambiente [12]. Rojas-Argudo y col., [11] investigaron las propiedades de recubrimientos formulados con goma de algarrobo y lípidos para la protección de mandarinas; primeramente lograron mejorar el brillo y disminuir la pérdida de peso con el recubrimiento, sin embargo, debido a las condiciones anaerobias se incrementó la cantidad de etanol en la mandarina. Por lo tanto, estos investigadores modificaron la fórmula añadiendo agentes plastificantes con lo que lograron reducir la cantidad de etanol formado. Cerqueira y col., [13] determinaron las composiciones óptimas de recubrimientos elaborados con galactomananos extraídos de *Caesalpinia pulcherrima* (CP) y *Adenanthera*

pavonina (AP) y glicerol (Gly) para recubrir frutas tropicales, trabajaron a concentraciones de 0.5, 1 y 1.5 % p/p de galactomanano y 1, 1.5 y 2% v/v de glicerol, de las películas formadas midieron la permeabilidad de vapor de agua, oxígeno y dióxido de carbono. Los resultados que obtuvieron mostraron una menor permeación de CO₂ y O₂ estando en el orden de 10⁻¹⁵ g (m s Pa)⁻¹, comparado con la del vapor de agua que estuvo en 10⁻¹¹ g (m s Pa)⁻¹. También observaron que la permeación de vapor de agua y O₂ se incrementó al incrementar el porcentaje de glicerol en las películas, mientras que la del CO₂ disminuyó al incrementar el porcentaje de glicerol. Por otra parte, se han realizado estudios de la interacción del k-carragenano con el galactomanano de la goma de algarrobo a diferentes proporciones de mezcla para la elaboración de películas, donde se obtuvo como resultado que estos dos polisacáridos presentan una alta miscibilidad y sinergia, ya que sus propiedades en la permeación de vapor de agua y propiedades mecánicas se incrementaron cuando se usó una relación de 40:60 (k-carragenano:galactomanano). La permeación de vapor de agua obtenida en esta mezcla fue de 5.15x10⁻¹¹ g (m s Pa)⁻¹, menor a los 8.01 x10⁻¹¹ g (m s Pa)⁻¹ de la película de solo galactomanano. Los análisis de los espectros de infrarrojo sugieren que esta sinergia se debió a interacciones por puentes de hidrógeno entre las cadenas [14].

1.6 Geles débiles y fuertes de polisacáridos.

La asociación entre macromoléculas existe aun a altas condiciones de dilución, pero cualquier clase de agregación intramolecular produce un apreciable efecto en las propiedades reológicas del sistema solo cuando se alcanza una concentración crítica de las cadenas, y las condiciones de flujo o deformación impuestas son lo suficientemente pequeños para dejar el estado de la estructura casi imperturbado. Las asociaciones cadena-cadena se pueden limitar a la formación de enredamientos moleculares, o extenderse a través de todo el sistema, con el consecuente desarrollo de una red tridimensional, en el primer caso la conectividad existe a pequeñas distancias, mientras que en el ultimo caso se expande en toda la muestra, lo que se observa como una transición de un comportamiento tipo líquido viscoso a un comportamiento tipo sólido elástico. El término gel generalmente define una clase de sistemas que muestran propiedades del tipo sólido elástico en presencia

de un exceso de solvente. La gelación puede resultar de una variedad de mecanismos, como por ejemplo de reacciones químicas de entrecruzamientos que pueden conducir a la formación de enlaces covalentes entre diferentes cadenas obteniendo geles químicos; otro tipo de gel puede ser generado por interacciones físicas entre los segmentos de las cadenas, formando los geles físicos. Estos últimos son característicos de los polisacáridos y otros biopolímeros, donde las zonas de unión están dadas por interacciones débiles (fuerzas de London, puentes de hidrógeno) los cuales actúan cooperativamente y dan estabilidad al gel. Estas fuerzas en la zona de unión en los geles físicos implican una dificultad para establecer el número de entrecruzamientos que se forman además de que estos son transitorios; por lo que el rango de deformación en el cual la estructura del gel no sufra modificaciones apreciables bajo la acción de una fuerza es limitado. Los geles fuertes poseen las características de los geles verdaderos: bajo pequeñas condiciones de deformación, estos manifiestan un comportamiento de sólido viscoelástico y por arriba de su deformación crítica estos se rompen en vez de fluir; los geles débiles son aquellos cuya clasificación cae entre soluciones concentradas y geles fuertes. Bajo pequeñas condiciones de deformación y bajas frecuencias los geles débiles se comportan como los geles fuertes en su respuesta mecánica, al aumentar la deformación la red tridimensional se puede romper formando pequeños racimos permitiendo que el material fluya como un sistema disperso. Para poder clasificar correctamente el tipo de gel es necesario realizar pruebas oscilatorias a frecuencias en el intervalo de 10^{-2} a 10^2 Hz que corresponde a la escala de tiempo de 10^{-2} a 10^2 segundos, aun así, se requiere de pruebas a periodos de tiempos mas largos por lo que se deben realizar pruebas de relajación de esfuerzos y de fluencia en intervalos de tiempo entre 10^2 a 10^6 segundos. En el caso de los geles el uso del principio de superposición tiempo-temperatura puede dar resultados cuestionables debido a la complejidad de la estructura del gel y su dependencia con la temperatura. Comportamientos clásicos encontrados en geles débiles y fuertes se presentan en la Figura 1.7 [15].

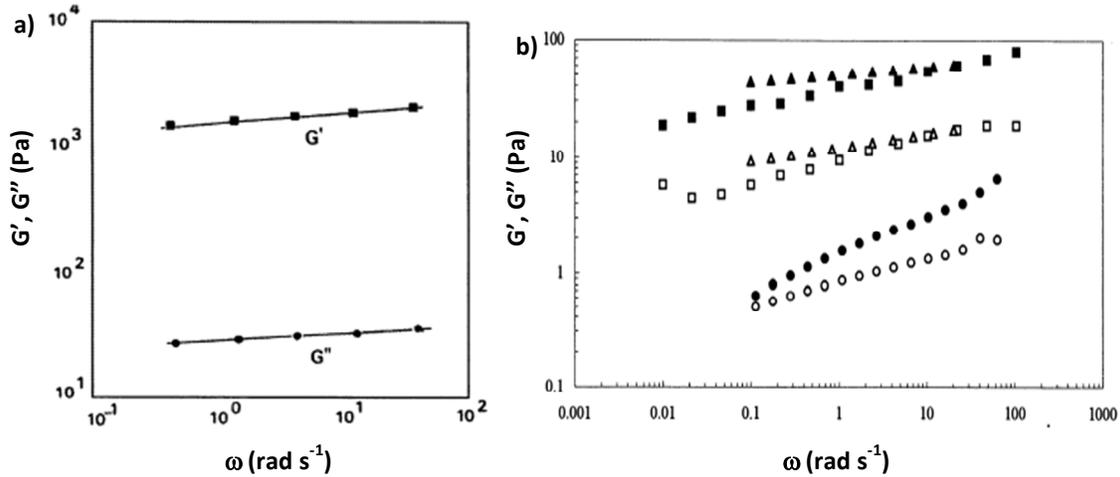


Figura 1.7. Barrido de frecuencia de: a) geles de alginato de calcio (1.4% p/p). b) geles débiles de varios polisacáridos, (Δ \blacktriangle) Rhamsan 1% p/p, (\square \blacksquare) Xantana 1% p/p, 0.02 M KCl y (\circ \bullet) Welan 0.25% p/p símbolos rellenos G' símbolos vacíos G'' [15].

1.6.1 Geles de galactomananos.

Se han realizado varias investigaciones acerca de las propiedades de formar geles con mezclas de galactomananos con otros polisacáridos; por ejemplo, en la mezcla de goma de algarrobo [16] con el k-carragenano existe un efecto sinérgico, debido a la asociación de la cadena no sustituida de la manosas con la hélice de la carragenina, lo que se atribuye a las cargas de la carragenina. Debido a la baja toxicidad de los geles de polisacáridos, estos son muy utilizados en la industria alimenticia, cosmética, en la biomedicina entre muchas otras dependiendo de sus propiedades reológicas y mecánicas. Existen pocos estudios sobre la capacidad de gelación de galactomananos en agua sin la necesidad de otros polisacáridos, ya que por la falta de carga en su estructura y la sustitución de galactosas en la cadena se dificulta la formación de redes tridimensionales. Sin embargo, Richardson y Norton [17], así como Richardson y col. [18], han investigado la capacidad de la goma de algarrobo de formar geles; en un estudio formaron geles disolviendo la goma en una solución concentrada de sacarosa (1% de goma en 60% de sacarosa p/p); mientras que, en otro formaron geles solo de goma de algarrobo a bajas concentraciones (0.4 a 1.5 %p/p) dejando las dispersiones a temperatura controlada por 80 días. Por otro parte, en estudios preliminares se observó que la goma extraída del árbol de flamboyán forma geles a partir de concentraciones superiores a 5 % en peso disolviendo la goma en agua a 60 °C por 3

horas y dejándola enfriar 24 horas a 4 °C. Por otra parte, actualmente se investiga la formación de geles de polisacáridos usando como solvente líquidos iónicos (LI). Estos materiales son generalmente sales orgánicas las cuales tienen un punto de fusión bajo comparado con las sales inorgánicas; por ejemplo, algunos LI son líquidos a temperatura ambiente. Se puede decir que la mayor ventaja que tienen los LI con respecto a los demás fluidos es que poseen un mayor intervalo de temperaturas donde se comportan como líquidos, (la mayoría presenta una presión de vapor extremadamente baja) esta propiedad permite químicamente tener un entorno iónico lo suficientemente alto para que se tengan mayores rendimientos o selectividades en algunas reacciones [19], [20]. Actualmente, hay un interés en el uso de LI como disolventes de polisacáridos ya que permite una mayor concentración de polisacárido disuelto en el. Los cationes y aniones de los LI mas usados como disolventes se muestran en la Figura 1.8.

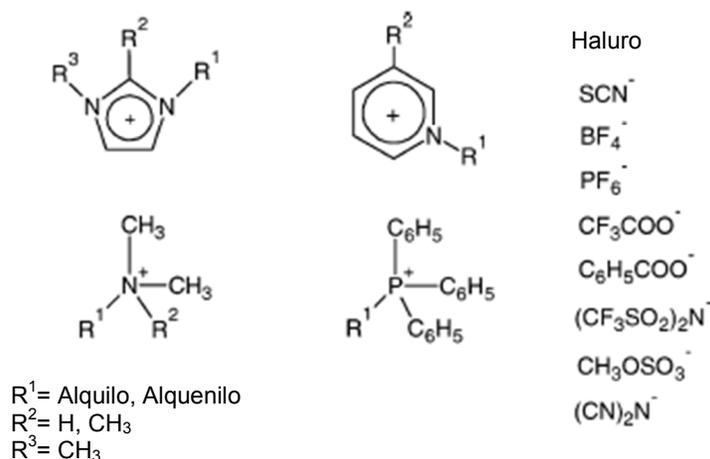


Figura 1.8. Estructura de los líquidos iónicos mas utilizados como solventes [21].

Kadokawa y col. [22], encontraron que las soluciones de celulosa con altas concentraciones en cloruro de 1-butil-3-metil-imidazol (BMIMCl) a 25 °C, forman un gel, el cual exuda una parte del BMIMCl del gel al formarse. Un análisis de TGA mostró que el gel formado presentó una pérdida de peso a 230° C la cual es una temperatura menor a los 300° C que se tiene solo con la celulosa; los autores atribuyen este resultado a la reducción o perdida de las regiones cristalinas en el material. Por otra parte, el gel al ser calentado a 120 °C se

suaviza, y a 150° C se vuelve fluido, si se deja a temperatura ambiente por 2 días el gel se regenera como se observa en la Figura 1.9.

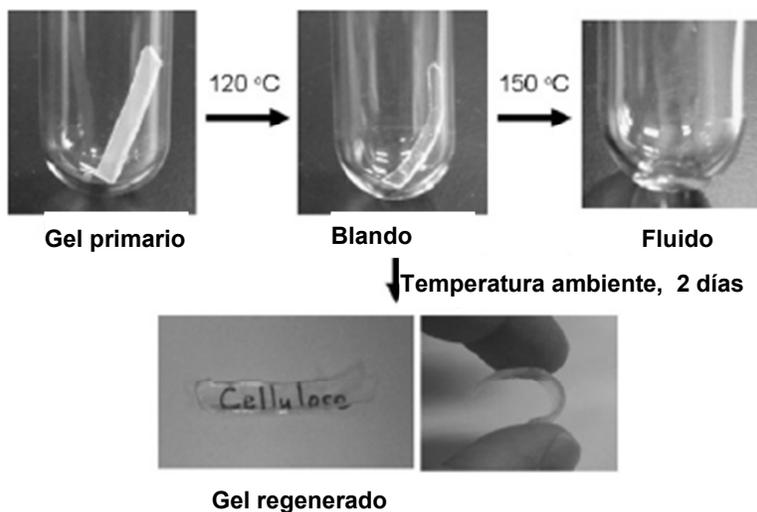


Figura 1.9. Proceso de fundición del gel y su posterior regeneración [22].

Los análisis elementales por medio de la dispersión de energía de rayos X y termogravimetría, sugieren que el gel está compuesto por celulosa, BMIMCl y agua. Se considera que el gel se produjo por la formación de agregados no cristalinos de la celulosa en la disolución, estos agregados se generaron por la interacción de las cadenas de celulosa con el agua que se absorbió del medio ambiente por el carácter higroscópico del BMIMCl (Figura 1.10), estos agregados probablemente actuaron como agentes de entrecruzamiento en la gelación [23]. Los geles de polisacáridos con LI han sido estudiados y dada la fuente de galactomananos disponibles es interesante determinar su comportamiento reológico el cual puede resultar atractivo para diversas aplicaciones en sensores o en sistemas de control mecánico que respondan a cambios en las condiciones de esfuerzo o medio ambiente.

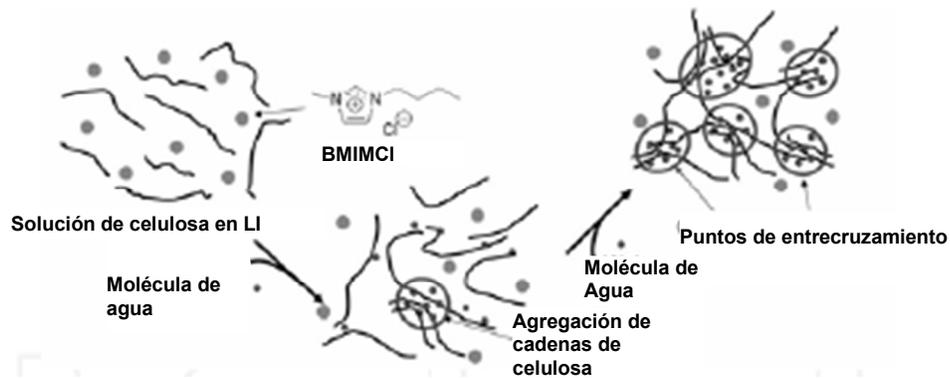


Figura 1.10. Modelo propuesto para la formación de un gel a partir de una mezcla de celulosa y BMIMCl [23].

1.6.2 Comportamiento reológico de geles de galactomananos.

Como se mencionó anteriormente existen pocos estudios acerca del comportamiento de geles formados únicamente con galactomananos; Richardson y col. [17], investigaron el comportamiento de los módulos elástico y viscoso de la dispersión de 1.5% goma de algarrobo y 60% sacarosa a diferentes temperaturas. En la Figura 1.11a) se observa que la dispersión se comportó como una solución macromolecular concentrada al existir un punto de cruzamiento de los módulos a temperaturas mayores de 15 °C; mientras que, a -5 °C el módulo elástico, G' , es mayor que el módulo de pérdida, G'' . En la Figura 1.11b) se muestran las mismas dispersiones después de se mantuvieron a -5 °C por 70 horas para la formación del gel, donde se observa que en todo el intervalo de temperaturas y a todas las frecuencias el módulo elástico es mayor que el viscoso y no hay un cruce entre los módulos [17].

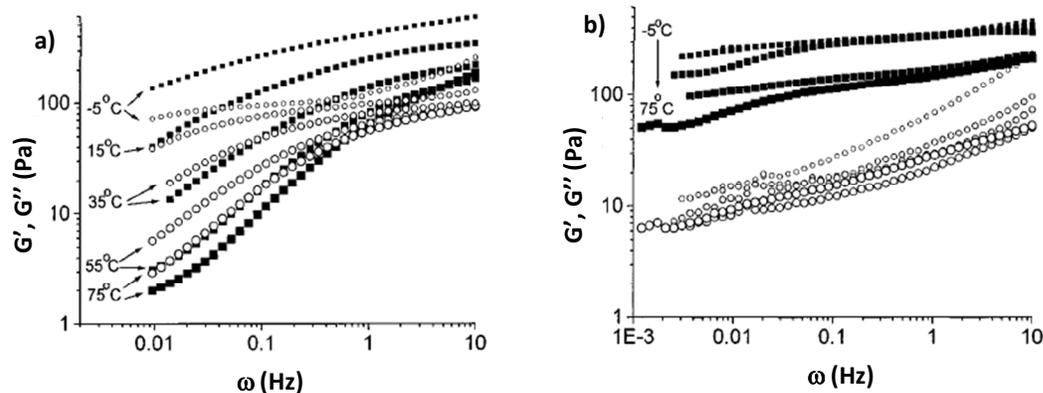


Figura 1.11. Barrido de frecuencia de la dispersión de goma de algarrobo al 1.5% con 60% sacarosa a diferentes temperaturas. a) recién hecha, b) gel formado a -5 °C por 70 h. G' (■), G'' (○) [17].

Con respecto a la interacción del LI con los galactomananos, Verger y col. [24], investigaron la formación del gel compuesto de goma guar y líquidos iónicos. A los geles formados se les realizaron estudios a través de pruebas oscilatorias y de fluencia, donde el resultado de las pruebas oscilatorias para los geles formados con guar y varios tipos de LI (BMIMCl, 1-etil-3-metilimidazodium metilfosfonato (EMIMMP) y 1-alil-3-metilimidazodium (AMIMCl)) se muestra en la Figura 1.12.

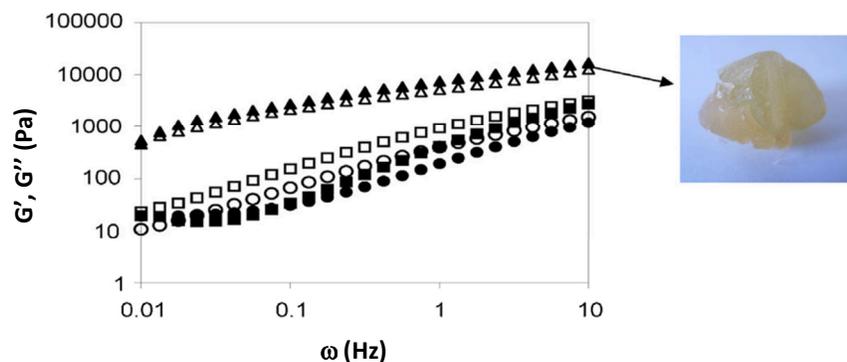


Figura 1.12. Dependencia de la frecuencia de G' (símbolos rellenos) y G'' (símbolos abiertos) de guar/BMIMCl (▲△), guar/EMIMMP (■□) y guar/AMIMCl (●○) a 25 °C y 15% peso, la goma guar de 126kDa [24].

La Figura 1.12 muestra como el LI utilizado afecta en el comportamiento reológico del gel, observando que cuando se utilizó el BMIMCl se tuvo un valor de G' ligeramente mayor que G'' en todo el intervalo de frecuencia estudiado, demostrando un comportamiento de

tipo sólido, mientras que con los otros dos LI's se tuvo un comportamiento de líquido, donde la G' es menor que G'' .

En este mismo trabajo, los investigadores observaron cómo al usar goma guar, de varios pesos moleculares, con BMIMCl obtenían un valor menor del módulo elástico conforme disminuía el peso molecular. Los resultados de la prueba de fluencia realizadas a las mismas muestras son presentados en la Figura 1.13. En esta figura se observa el mismo comportamiento que en las pruebas oscilatorias, ya que el gel formado con BMIMCl con 10 % en peso de goma presentó un comportamiento más cercano al de un sólido, debido a que presentó una etapa de recuperación mientras que los demás sistemas no presentan esta recuperación, por lo que se comportaron como fluidos viscosos.

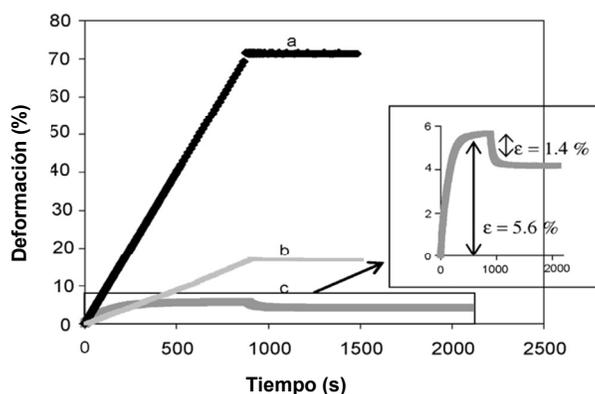


Figura 1.13. Prueba de fluencia a geles formados con goma guar de 126 kDa a 25° C, 10%peso/AMIMCl (a), 8%peso/BMIMCl (b) y 10%peso/BMIMCl (c) [24].

El galactomanano del *Delonix regia* es considerado como un producto desaprovechado, ya que la semilla que lo contiene son un desecho. Con los antecedentes presentados sobre la importancia de los galactomananos en la industria y la investigación, el uso del galactomanano del *Delonix regia* podría ser de interés si éste presenta propiedades necesarias para su aplicación industrial, ya sea como un agente que modifique las propiedades reológicas o como formador de películas biodegradables. Por ejemplo, la goma guar que es utilizada en varias industrias siendo la petrolera la que tiene una mayor demanda, tiene periodos de sobredemanda, en donde el precio se vuelve muy elevado. En este tipo de situación el galactomanano del *Delonix regia* puede ser modificado enzimáticamente para tener las propiedades requeridas en la industria petrolera y así cubrir

la demanda de un agente que modifique las propiedades reológicas que se requieran. Por lo que es importante estudiar como las variables de concentración de enzima y galactomanano cambian las propiedades reológicas.

Capítulo 2

Metodología

2.1 Extracción del galactomanano nativo del *Delonix regia* (GMNDR).

Las semillas del *Delonix regia* fueron obtenidas en el norte, este y oeste de la ciudad de Mérida, Yucatán, México. Estas fueron remojadas en agua (6:1 peso_{agua}:peso_{semilla}) a 90 °C bajo agitación mecánica por 5 horas (Heidolph modelo RZR1, Alemania); pasado este tiempo se dejaron enfriar a temperatura ambiente. El endospermo fue removido manualmente de las semillas y mezclado con agua destilada en una relación de 1:1 (v:v) en triturador de alimentos hasta obtener una mezcla homogénea. Posteriormente, la mezcla se diluyó con agua destilada (1:1 v:v) para disminuir la viscosidad. A partir de este punto, la mezcla diluida se agitó mecánicamente a 60 °C por 30 minutos, después fue filtrada a través de una malla metálica cuadrada de 1 mm de abertura para obtener una solución viscosa. El residuo sólido fue mezclado con agua destilada y fue filtrada de nuevo para incorporarse a la solución viscosa. La solución viscosa obtenida se centrifugó a 4000 g por 30 minutos. Posteriormente, el galactomanano fue precipitado adicionando etanol al sobrenadante (1:1 v/v). El precipitado fue secado en una estufa de convección por 12 horas a 60 °C. Después de secarse el precipitado seco fue molido y se pasó por un tamiz #20.

2.2 Hidrólisis enzimática.

Las reacciones enzimáticas fueron realizadas con la endo-1,4- β -mananasa del *Cellvibrio japonicus* (E.C. 3.2.1.78 Megazyme, Irlanda). Tres tiempos de reacción 30, 60 y 90 minutos, así como tres dosis de enzima 0.5, 1.0 y 1.5 nkat por gramo de galactomanano fueron evaluadas. (Un katal es definido por el fabricante como la cantidad de enzima requerida para liberar un mol de equivalentes de manosa por segundo del galactomanano del algarrobo a una concentración de 5 mg ml⁻¹ en una solución buffer de fosfato de sodio 100 mM a pH 7). Las condiciones de hidrólisis usadas fueron las recomendadas por el fabricante, por lo que primero se dispersó el GMNDR una concentración de 1% (p/v) en una solución buffer de fosfato de sodio a 100mM y pH 7 a 60 °C por 2 horas bajo agitación magnética antes de adicionar la enzima. La hidrólisis enzimática se llevó acabo a 40 °C a cada tiempo y dosis de enzima descrita

anteriormente. Las reacciones de hidrólisis enzimática fueron detenidas calentando la dispersión del galactomanano a 90 °C por 10 minutos; después fueron enfriadas a 25 °C y finalmente fueron precipitadas con etanol (1:0.8 $v_{\text{agua}}:v_{\text{etanol}}$). El precipitado fue filtrado con papel filtro de poro mediano y fue secado en una estufa de convección a 60 °C por 12 horas. Los hidrolizados fueron dispersados en agua destilada, precipitados con etanol y filtrados de nuevo para purificarlos. Finalmente, fueron molidos y pasados por un tamiz #20.

2.3 Caracterización del Galactomanano y los hidrolizados.

2.3.1 Cromatografía de permeación de gel (GPC).

El peso molecular en número (M_n) y el índice de polidispersidad (PDI) del galactomanano de *Delonix regia* (GMNDR) y los hidrolizados fueron obtenidos en un GPCmax VE2001 acoplado a un TDA 302 con detectores de índice de refracción, viscosímetro y dispersor de luz de ángulo bajo y ángulo recto (Viscotek, Houston, TX, U.S.A.) y una columna TSKgel-GMPWxl (Tosoh, Tokio, Japón.) con tamaños de exclusión desde 500 a 8×10^6 Da. Las condiciones de medición fueron flujo de 1 ml min^{-1} a 45 °C con NaNO_3 al 0.1M como eluyente [25]. Las muestras fueron disueltas en agua grado HPLC (2 mg ml^{-1}) a 65 °C con agitación magnética por 2 h. Después, se pasó por un filtro ($0.45 \mu\text{m}$) y se inyectaron 100 μl en el equipo del GPC. Los datos fueron analizados con el software Omniasec 5.02 (Malvern, Malvern, U.K.)

2.3.2 Contenido total de carbohidratos.

El contenido total de carbohidratos se midió tal como fue reportado en la literatura [26]. El polisacárido fue hidrolizado con ácido sulfúrico concentrado para convertirlo a hidroxi metil furfural, y posteriormente ser condensado con fenol para producir una solución estable de color amarillo. Las soluciones para la prueba del GMNDR y todos los hidrolizados (HGDR) fueron preparados a una concentración de $25 \mu\text{g ml}^{-1}$ en agua destilada, las soluciones estándar de manosa en agua destilada fueron preparadas a las concentraciones de 0, 10, 20, 30 y $50 \mu\text{g ml}^{-1}$. Para la determinación del contenido total de carbohidratos, 2 ml de solución de muestra o estándar se vertió en un tubo de ensayo, donde posteriormente se adicionaron 0.05 ml de una solución de fenol al 80 %. El tubo

de ensayo con la solución se agitó con la ayuda de un vórtex y se añadieron rápidamente 5 ml de ácido sulfúrico concentrado y con la ayuda de una pipetor mecánico se mantuvo mezclando y se dejó reaccionar por 10 min. Pasado el tiempo, la solución fue enfriada en agua con hielo hasta alcanzar la temperatura de 25 °C. En este punto, se midió la absorbancia a 490 nm con un espectrofotómetro UV-vis y se calculó el contenido de carbohidrato comparando los valores con las de las soluciones estándar de manosa.

2.3.3 Resonancia magnética nuclear de protón (¹H NMR).

Las muestras de galactomanano fueron disueltas en agua deuterada (D₂O) a 0.1% (p/v) en un vial sellado a 65 °C por 2 h y liofilizadas [3]. Las muestras secas fueron redisueltas en D₂O (0.1% p/v) y analizadas en ¹H NMR a 65 °C usando un equipo Varian-600 MHz NMR [27].

2.3.4 Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR).

Los espectros de absorción FT-IR del galactomanano y los hidrolizados fueron obtenidos entre 4000 y 400 cm⁻¹ (FTIR Thermo Nicolet, 8700) a una resolución de 2 cm⁻¹ con 32 barridos. Las muestras se prepararon mezclando 1 mg de GMNDR o HGDR con KBr en una relación 1:100. La mezcla sólida fue sometida a una presión de 6000 psi para la formación de la pastilla con una prensa hidráulica manual.

2.3.5 Difracción de Rayos-X.

La difracción de rayos-X de ángulo amplio de las muestras de GMNDR o HGDR en forma de polvo fueron obtenidas usando un difractómetro Bruker D8-Advance con un ánodo de CuK α ($\lambda=1.54 \text{ \AA}$). El tiempo de paso y tamaño de paso fueron de 0.5 s y 0.02° respectivamente, con un ángulo de dispersión (2θ) en el intervalo de 3° a 60°.

2.3.6 Solubilidad.

Se seleccionaron 2 temperaturas para la prueba de solubilidad (25 y 60 °C). Las muestras del GMNDR y HGDR fueron dispersadas en agua destilada (0.1% p/v) con agitación magnética por 1 hora a la temperatura de prueba. El recipiente fue sellado con

papel aluminio y cinta adhesiva para prevenir la evaporación del agua. Pasado el tiempo, las dispersiones fueron centrifugadas a 3500 g por 30 min a 25 °C para remover el material insoluble, el sobrenadante fue secado en una estufa de convección a 105 °C por 24 h. Finalmente, el material seco fue pesado para determinar la concentración del galactomanano en el sobrenadante. El porcentaje de solubilidad fue calculado con la siguiente ecuación [28]:

$$\%Solubilidad = \frac{\text{concentración del sobrenadantes } \left(\frac{mg}{ml}\right)}{\text{concentración inicial } \left(\frac{mg}{ml}\right)} \times 100 \quad (6)$$

2.4 Caracterización reológica de las dispersiones.

2.4.1 Dispersiones del GMNDR y los HGDR.

La caracterización reológica se llevó a cabo usando un reómetro rotacional AR-2000 con control de esfuerzo (TA Instruments Co., E.U.A.). Se usó una geometría cono-plato de acero inoxidable con 40 mm de diámetro y un ángulo de 2° para la medición de las muestras del GMNDR y todos los HGDR al 3 % (p/v). Mientras que, para el GMNDR y los hidrolizados de alto peso molecular obtenido a 0.5 nKat g⁻¹ x 30 min (HAPM), el de peso molecular intermedio obtenido a 1 nKat g⁻¹ x 60 min (HMPM) y el de bajo peso molecular obtenido a 1.5 nKat g⁻¹ x 90 min (HBPM) se analizaron con una geometría cono-plato de acero inoxidable con un diámetro de 60 mm y un ángulo de 1°, a una concentración de galactomanano de 0.5, 1.0 y 1.5% en agua. Una trampa de humedad se colocó sobre la geometría para evitar la pérdida de agua durante la prueba. Las muestras se disolvieron a 60 °C por 2 horas con agitación magnética, posteriormente se dejaron 12 horas a 4 °C. La muestra se depositó en el plato peltier con la ayuda de una jeringa y se dejó reposar por 3 minutos a 25 °C antes de cada prueba [29]. La zona viscoelástica lineal (ZVL) fue determinada con barridos de deformación a una frecuencia constante (0.1, 1.0 y 10 Hz) de 0.1 a 5% de deformación. El comportamiento viscoelástico se determinó por medio de barridos de frecuencia dentro de la ZVL a frecuencias de 0.1 a 10 Hz obteniendo los valores de G', G'' y η*. A estas muestras también se les determinó la viscosidad aparente en función de la velocidad de corte en estado estacionario de 0.1 a 1000 s⁻¹. Estas pruebas se realizaron a 25 °C.

2.4.2 Dispersiones de la mezcla de galactomananos y k-carragenano.

Para observar el efecto de la adición de un polisacárido con carga negativa en la viscosidad de las dispersiones del galactomanano, se prepararon nueve dispersiones las cuales son: GMNDR, k-carragenano (k-carr), HAPM, HMPM, HBPM, las mezclas (60:40) GMNDR:k-carr, HAPM:k-carr, HMPM:k-carr y HBPM:k-carr con una concentración total de polisacárido del 1 % p/v. Las cantidades necesarias para tener la proporción de 60% galactomanano y 40% de k-carr fueron pesadas y dispersadas en agua destilada con una concentración total de 1 % p/v, y se agitaron magnéticamente por 2 horas a 65 °C. La viscosidad aparente se obtuvo realizando los barridos de velocidad de corte de 1 s^{-1} a 1000 s^{-1} en condiciones de estado estacionario; para lo cual se usó una geometría cono-plato de acero inoxidable con un ángulo de 1° y un diámetro de 60 mm. Las mediciones se realizaron a 50 °C para prevenir la formación del gel, por lo que se usó una trampa de humedad para evitar la pérdida de agua.

Los resultados de la viscosidad contra la velocidad de corte fueron ajustados a la ley de la potencia (Ec. 1) y al modelo de Williamson (Ec.4).

2.5 Elaboración de películas.

Se vertieron 32.5 ml de cada una de las 9 dispersiones preparadas en cajas Petri (9.2 cm de diámetro interno) cuidando que su temperatura no baje a menos de 40 °C. Se secaron a 50 °C por 24 horas en una estufa de convección natural. Las películas obtenidas se dejaron por lo menos 48 horas previas a su análisis a una atmósfera controlada, 52% de humedad relativa y una temperatura de 20 °C.

2.6 Caracterización de las películas.

2.6.1 Color y opacidad.

El color y opacidad de las películas fueron medidos por el método de reflectancia usando un colorímetro Minolta (Cr 400, Minolta, Japón). Se usó un plato estándar de color blanco ($Y=93.8$, $x=0.3159$ e $y=0.3321$) para la calibración del equipo y como fondo blanco para la medición de los parámetros Y , L^* , a^* y b^* . El valor de la diferencia total de color (DE^*) se obtuvo usando la película del galactomanano nativo, GMNDR, como referencia ($L^*=96.82$, $a^*=0.09$ y $b^*=2.37$) en la Ec. 7:

$$\Delta E^* = \sqrt{\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2}} \quad (7)$$

Donde Δa^* , Δb^* y Δc^* son las diferencias entre la película usada como referencia (nativo) y la película evaluada. El método de Hunter Lab se usó para la determinación de la opacidad usando una placa negra como fondo estándar ($Y=2.92$, $x=0.3146$ e $y=0.3307$). El cálculo se realizó usando la Ec. 8 donde se relaciona la opacidad de la muestra usando el fondo estándar negro (Y_b) y el fondo estándar blanco (Y_w).

$$Op. = \frac{Y_b}{Y_w} \times 100 \quad (8)$$

2.6.2 Micrografías por microscopía electrónica de barrido (SEM).

Las micrografías de la superficie de las películas fueron obtenidas usando un microscopio electrónico de barrido (Quanta FEG 650, FEI, USA) con un voltaje de aceleración de 3 kV y una magnificación de 1000x. Todas las muestras fueron recubiertas con una fina capa de oro antes de ser observadas por el SEM.

2.6.3 Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier de las películas.

El espectro de absorción de las películas en el infrarrojo fue obtenido por medio de la técnica de reflectancia total atenuada (ATR por sus siglas en inglés) en el intervalo de número de onda entre 4000 y 650 cm^{-1} (FT-IR Thermo Nicolet, 8700). Para la obtención de los espectros se usó una resolución de 0.5 cm^{-1} con un total de 32 barridos.

2.6.4 Solubilidad en agua y contenido de humedad de las películas.

La solubilidad en agua de las películas fue evaluada de acuerdo con el procedimiento reportado en la literatura por Costa y col., [30]. Para esto, se cortaron las películas en forma de discos con un diámetro de 2 cm de la película original. La materia seca y el contenido de humedad de la película se midieron al secar la muestra a 105 °C en una estufa de convección hasta alcanzar un peso constante. El contenido de humedad fue calculado como el porcentaje de masa perdida. Después, las películas secas fueron inmersos en 50 ml de agua por 24 horas a 25 °C con agitación proporcionada con un

agitador orbital a 75 RPM. Pasado el tiempo, los fragmentos de las películas fueron retirados y secados a 105 °C hasta obtener un peso constante para determinar la cantidad de material que no se solubilizó. La solubilidad se calculó con la siguiente Ec. 9:

$$S = \frac{M_i - M_f}{M_i} \times 100 \quad (9)$$

Donde M_i es la masa inicial del disco seco y M_f la masa final del disco que no se solubilizó.

2.6.5 Permeación al vapor de agua (PVA) de las películas.

La permeación al vapor de agua de las películas de polisacáridos fue medida de acuerdo con el procedimiento reportado por Dos Santos y col., [31]. Para la determinación se usaron celdas cilíndricas de aluminio con una cara superior de 30 cm². En el interior de las celdas se vertieron 50 ml de agua destilada. Las celdas fueron selladas con la película en la cara superior, quedando expuesto un lado de la película a la atmósfera externa, y el otro, a una atmósfera saturada de agua (Hr = 100%, 2337 Pa de presión de vapor a 20 °C). La atmósfera externa se controló colocando las celdas dentro de un desecador con sílica previamente secada a 105 °C por 12 horas (Hr=0%, 0 Pa de presión de vapor a 20 °C). El peso de las celdas fue medido cada 2 horas durante 10 horas; todas las determinaciones de permeación de vapor de agua se realizaron por triplicado.

2.6.6 Propiedades Mecánicas.

Para la medición de las propiedades mecánicas se siguió la metodología reportada por Martins y col., [14] con algunas modificaciones; esta metodología está basada en la ASTM D 882-91. El esfuerzo a la tensión y la elongación a la ruptura fueron medidos usando un analizador de textura T.A. HD Plus (Stable micro system, Godalming, U.K.) y los datos fueron procesados usando el software del equipo Exponent del mismo fabricante. El tamaño de las muestras fue de 45 x 20 mm de largo y ancho respectivamente, teniendo un grosor las películas entre 37 y 59 μm. La distancia inicial entre las mordazas fue de 25 mm y la prueba se realizó con una velocidad de tracción constante de 5 mm/min. Para cada película se realizaron por lo menos 5 réplicas.

2.6.7 Ángulo de contacto.

El ángulo de contacto de la cara superior de las películas obtenidas se midió usando un goniómetro estándar (Ramé-Hart Instrument Co., modelo No. 250-U1) con el método de la gota sésil usando agua grado HPLC. Las mediciones se realizaron a los 5 segundos posteriores de dejar caer la gota de agua sobre la superficie de la película. El ángulo de contacto se determinó analizando las imágenes obtenidas con el software ImageJ 1.52 (National institutes of Health, U.S.A.) usando la extensión de ángulo de contacto. Por lo menos 5 mediciones se realizaron para cada muestra.

2.7 Formación de Geles.

2.7.1 Preparación de geles con el galactomanano del *Delonix regia*.

Se vertieron 15 ml de agua destilada en un recipiente cilíndrico de poliestireno con una base de 3 cm; el recipiente se calentó a 70 °C (tapando el recipiente para evitar pérdida de agua por evaporación) en un baño de agua, una vez alcanzados los 70 °C se añadió rápidamente la cantidad necesaria del galactomanano para tener una concentración de 5 y 10 % (p/v) y se cerró inmediatamente el recipiente; el galactomanano disperso en agua fue agitado esporádicamente usando un vórtex hasta que alcanzó la viscosidad suficiente para permanecer homogéneo; se dejó a 70 °C por 4 horas. Posteriormente, se dejó reposar a 4 °C por 24 horas.

2.7.2 Pruebas reológicas a los geles de galactomanano al 5% y 10% (p/v).

Los geles elaborados fueron cortados formando un cilindro de 2 cm de diámetro y aproximadamente 5 mm de altura. Se usó una geometría de platos paralelos de acrílico con un diámetro de 2 cm para las pruebas reológicas a una temperatura de 25 °C. A los geles se les realizó el barrido de frecuencia dentro de la zona viscoelástica lineal en un intervalo de 0.1 a 100 rad/s. Además, se les realizó la prueba de fluencia aplicando un barrido de esfuerzo constante de 50 Pa por 5 minutos, pasado el tiempo se retiró el esfuerzo y se dejó a la muestra recuperarse. Los datos se procesaron en el software Origin 8 para ajustarlos al modelo de Burger (Ec. 10):

$$\varepsilon(t) = \frac{\sigma}{E_m} + \frac{\sigma}{\eta_m} t + \frac{\sigma}{E_k} \left(1 - e^{-\frac{E_k * t}{\eta_m}} \right) \quad (10)$$

En donde ε es la deformación, t es el tiempo, σ es el esfuerzo (Pa), E_m y η_m son el módulo elástico y el coeficiente de la viscosidad dinámica de Maxwell, E_k y η_k son el módulo elástico y el coeficiente de la viscosidad dinámica de Kelvin

2.7.3 Preparación de geles con la mezcla de galactomanano y k-carragenano.

Las dispersiones elaboradas con las mezclas de k-carragenano y el GMNDR así como con los hidrolizados del alto, medio y bajo peso molecular a la concentración de 1% (p/v) y una relación de 60 % galactomanano y 40 % de k-carragenano, fueron elaboradas como se describió previamente para *Delonix regia* puro y los hidrolizados. Estas se dejaron 12 horas a 5 °C para la formación del gel. Los geles formados se cortaron en cilindros con un sacabocados con una navaja se ajustaron las dimensiones de 2 cm de diámetro y aproximadamente 5 mm de altura.

2.7.4 Barridos de frecuencia de los geles con k-carragenano.

Los barridos de frecuencia se realizaron dentro de la zona viscoelástica lineal (previamente determinada por barridos de deformación) con una deformación de 0.1%, el intervalo de frecuencia fue de 1 a 100 rad/s a 25 °C usando una geometría de plato rugoso de acrílico con 2 cm de diámetro y un gap de aproximadamente 1 cm.

2.7.5 Medición de la temperatura de gel (T_G) y temperatura de fundido (T_f) de los geles formados a partir de las SFPs que contienen k-Carragenano.

Para obtener la T_G y la T_f se aplicó una rampa de temperatura a las dispersiones en 4 etapas: (1) la dispersión se calentó a 60 °C y se dejó a esta temperatura por 5 minutos; (2) se aplicó una rampa de enfriamiento de 60 °C a 5 °C con una velocidad de 2 °C/min; (3) alcanzados los 5 °C se dejó a esta temperatura por 10 minutos; y (4) el gel formado se sometió a una rampa de calentamiento de 5 °C a 60 °C a una velocidad de 2 °C/min. Los barridos de temperatura fueron realizados a una deformación y frecuencia de 0.1% y 1 Hz, respectivamente. Se usó una geometría cono y plato, de acero inoxidable, de 40 mm de diámetro y un ángulo de 2°. Además, se colocó una trampa de humedad para evitar la pérdida de agua.

2.7.6 Preparación de geles con el galactomanano del *Delonix regia* y el líquido iónico cloruro de 1-butil-3-metilimidazol (LI).

El líquido iónico (LI), fue sacado del envase y se secó en estufa de vacío a 80 °C por 24 horas. Durante el proceso de secado el líquido iónico se fundió ya que su temperatura de fusión (T_f) es de 70 °C. Pasado este tiempo se sacó de la estufa y se vertió rápidamente con una pipeta en un vial de 25 ml previamente pesado y se selló con la tapa. Se dejó enfriar en un desecador y se pesó. Por medio de la diferencia de peso se determinó la cantidad de líquido iónico en el vial y se colocó rápidamente la cantidad necesaria para tener una concentración del 5% o 10% (p/p) del galactomanano sellándolo inmediatamente. Luego se sumergió en aceite mineral a 100°C y se agitó hasta su completa solubilización (aproximadamente 48 horas); pasado el tiempo se destapo el vial y se dejó en una atmósfera de 75% de humedad relativa (Hr). Dado que la solución absorbe agua del exterior en el proceso de gelación, se realizó un seguimiento del incremento del peso del vial cada 24 horas. Para la formación del gel se dejó 10 días en una atmósfera de 75% de Hr; pasados los 10 días, el líquido en la superficie del gel se eliminó con lavados de etanol y acetona. Para observar el efecto de la humedad del exterior en la gelación, la solución viscosa que contiene el GMNDR y LI, se dejó en dos condiciones diferentes por 48 horas, uno en un desecador (0% de Hr) y otro en una solución saturada de NaCl (Hr del 75%).

2.7.7 Barridos de frecuencia de los geles de galactomanano con el LI.

Los barridos de frecuencia de los geles de galactomanano con el LI se realizaron dentro de la zona viscoelástica lineal determinada previamente con una deformación del 0.1%. Se trabajó en un intervalo de frecuencia de 0.1 a 100 rad/s a 25 °C. La geometría utilizada fue de platos paralelos. Se utilizó un plato de acrílico con estrías para evitar el deslizamiento entre la muestra y el plato, la cual tenía un diámetro de 2 cm. Los geles fueron cortados para darles las dimensiones de un cilindro con 2 cm de diámetro y 5 mm de altura. Para realizar el barrido de frecuencia de la solución que se dejó 48 horas en el desecador, la muestra se colocó en el reómetro con la ayuda de una espátula y se usó una geometría de cono-plato de 2 cm de diámetro y un ángulo de 4 °. Esto debido a que se obtuvo una solución muy viscosa y con mucha adherencia.

Capítulo 3

Caracterización de los Hidrolizados enzimáticos del galactomanano del *Delonix regia*.

3.1 Extracción del galactomanano e hidrólisis enzimática.

El rendimiento del galactomanano extraído de la semilla del *Delonix regia* fue de 10% con respecto al peso de la semilla. Comparativamente este rendimiento fue menor al reportado en otros trabajos (20%) usando la misma especie de semilla [3]. Esta diferencia se puede atribuir al diferente método de extracción, ya que en trabajos previos se usó temperaturas mayores de 90 °C, además del uso de autoclave, lo que pudo permitir que algunas fracciones menos solubles del galactomanano sean extraídas. Es conocido que galactomananos de alto peso molecular y/o bajo contenido de galactosa son menos solubles en agua fría, mientras que su solubilidad aumenta al incrementar la temperatura [32]. Por otro lado, el rendimiento del galactomanano del *Delonix regia* encontrado en este estudio fue de 10%, coincidiendo con lo reportado para el galactomanano extraído del árbol de fenogreco[33]. Otras fuentes de galactomananos no convencionales como la goma de *G. sinensis*, *G. triacanthos* y *S. japónica* tienen rendimientos de 15, 25 y 9 %, respectivamente [34], [35].

La dosis de enzima y los tiempos de hidrólisis fueron seleccionados de pruebas preliminares midiendo la reducción de la viscosidad. El Mn del GMNDR medido con el GPC fue de 4.86×10^5 Da con una polidispersidad de 1.23. Este valor es similar a los reportados previamente 2.5×10^5 Da [3] y 7.23×10^5 Da [36], con una polidispersidad de 1.23. El Mn del GMNDR fue similar al Mn del galactomanano del algarrobo, uno de los galactomananos más usados en la actualidad, del cual se han reportado Mn que van de 3×10^5 y 2×10^6 Da [37]. Las diferencias del Mn del *Delonix regia* con los reportados en otros trabajos puede ser atribuido a las diferentes condiciones climáticas, y al proceso de extracción. No hay reportes del uso de la enzima β -mananasa del *Cellvibrio japonicus* para controlar la reducción del peso molecular por medio de hidrólisis enzimática. La reducción del Mn se pudo controlar de manera satisfactoria por medio de diferentes tiempos de hidrólisis y la concentración de la enzima, como se puede observar en la Tabla 3.1. Dado que las propiedades reológicas de los galactomananos

dependen, entre otros factores, del Mn su control es importante. Por medio de la hidrólisis enzimática, se puede lograr un control fino para ajustar sus propiedades reológicas. Los valores del Mn de los hidrolizados del galactomanano del *Delonix regia* (HGDR) estuvieron en el intervalo de 4.15×10^5 a 1.95×10^5 Da. La máxima reducción del Mn se alcanzó a la dosis máxima de enzima y al mayor tiempo de hidrólisis (1.5 nkat g⁻¹, 90 min), mostrando una reducción de 2.49 veces con respecto al peso original del GMNDR. Se observó también un incremento en la polidispersidad (Tabla 3.1) con el incremento de la dosis de enzima y el tiempo de hidrólisis; así, el hidrolizado obtenido con una dosis de enzima de 1.5 nKat g⁻¹ y 90 minutos de reacción alcanzó la máxima polidispersidad de 2.4.

Tabla 3.1. Características del galactomanano nativo del *Delonix regia* y sus hidrolizados en función de la dosis de enzima y tiempo de reacción.

Dosis de enzima (nKat g ⁻¹)	Tiempo de hidrólisis (min)	M _n (Da) ^a	Polidispersidad ^b	G:M ^c	C. T. C. (%) ^e
0	0	4.86×10^5	1.23	1:3.48	88.74±5.45
0.5	30	4.15×10^5	1.31	1:3.77	96.93±2.79
	60	3.58×10^5	1.34	1:3.72	93.48±0.96
	90	3.16×10^5	1.49	1:3.73	95.29±1.28
1	30	3.43×10^5	1.32	1:3.73	94.17±0.7
	60	2.85×10^5	1.38	1:3.71	95.1±0.65
	90	2.32×10^5	1.53	1:3.75	95.82±3.17
1.5	30	2.71×10^5	1.39	1:3.73	93.73±5.3
	60	2.55×10^5	1.65	1:3.72	94.89±2.56
	90	1.95×10^5	2.40	1:3.72	93.97±5.74

^a Peso molecular en número. ^b Polidispersidad (M_w/M_n). ^c Relación galactosa manosa ^e Contenido total de carbohidratos.

Este incremento de la polidispersidad era esperado, ya que la β-mananasa corta específicamente los enlaces glucosídicos β,1-4 de las manosas en la cadena principal del

galactomanano, resultando en una distribución más amplia de cadenas con diferentes M_n al aumentar la hidrólisis. La máxima polidispersidad obtenida (2.4) fue menor que el 8.1 reportado en la degradación enzimática de la goma guar después de 20 h usando la b-mananasa del *Aspergillus niger* en una solución de goma guar al 0.5% (p/p) con una dosis de enzima de 3.3×10^{-3} nKat ml^{-1} (~ 0.66 nKat g^{-1} de polisacárido) [38]. La velocidad de la hidrólisis al incrementar la dosis de enzima fue medida calculando la constante de velocidad aparente [38], [39], usando la Ec. 11:

$$\frac{1}{M_n(t)} = \frac{1}{M_{n0}} + \frac{kt}{m} \quad (11)$$

Donde $M_n(t)$ es el peso molecular promedio en número en el tiempo t , M_{n0} es el peso molecular inicial del galactomanano, m es el peso molecular de la unidad repetitiva (≈ 232 Da para el GMNDR) y k es la constante de velocidad aparente.

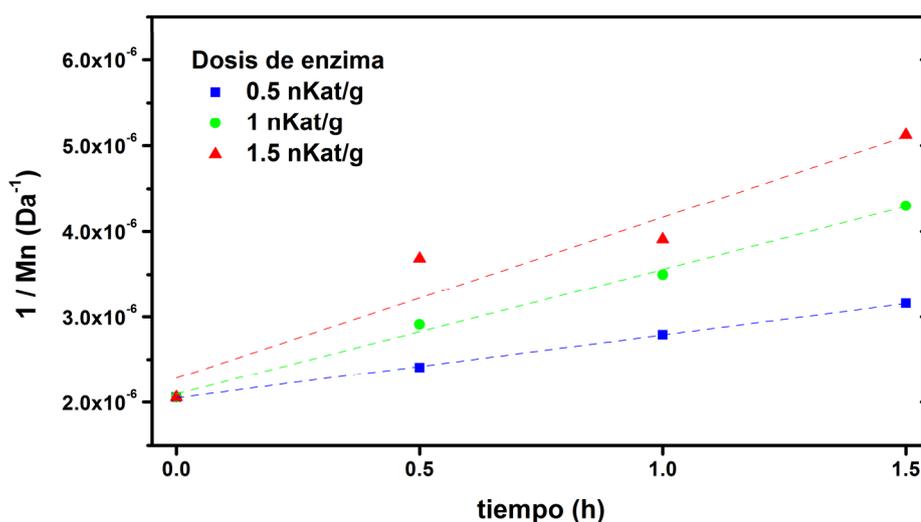


Figura 3.1. Recíproco del peso molecular en número contra el tiempo de hidrólisis a diferentes dosis de enzima.

Como se puede observar en la Figura 3.1, el ajuste lineal de los valores experimentales del inverso de $M_n(t)$ como función del tiempo de hidrólisis fue consistente con la ecuación (8). Se observó que el valor de k está relacionado con la concentración de la enzima y la velocidad de reducción del M_n , ya que k incrementó a 1.71×10^{-4} , 3.4×10^{-4} y 4.37×10^{-4} h^{-1} para dosis de enzima de 0.5, 1.0 y 1.5 nKat g^{-1} , respectivamente. Adicionalmente los valores de R^2 que se obtuvieron a 0.5, 1.0 y 1.5 nKat g^{-1} fueron

0.9995, 0.9931 and 0.8965, respectivamente. Estos resultados sugieren un mayor control en la hidrólisis enzimática a bajas dosis de enzima (0.5 y 1.0 nKat g⁻¹).

3.2 Caracterización espectroscópica del GMNDR y de los HGDR.

El contenido de carbohidratos totales del GMNDR fue medido por medio de espectroscopia UV, teniendo un contenido de 88.74%±5.45. El proceso de hidrólisis incrementó ligeramente el contenido de carbohidratos, como se puede observar en la Tabla 3.1. Esto se puede atribuir a la etapa de reprecipitación con etanol, el cual elimina una cantidad mayor de impurezas.

Por otra parte, la Figura 3.2 muestra el espectro de ¹H-NMR del GMNDR. Las señales de los protones fueron observadas a 4.99 y 4.71 ppm, las cuales están relacionadas con los protones en el enlace 1-6- α -galactosil (H G1) y al enlace β -1-4-manosil (H M1), respectivamente. También las señales correspondientes a los protones relacionados a los carbonos 2 (H M2) y 5 (H M5) de la manosa se observaron a 4.08 y 3.52 ppm respectivamente. Igualmente, la señal de los protones relacionados con los carbonos 4 (H G4) y 6 (H G6) de la galactosa se encontraron a 3.97 y 3.73 ppm respectivamente [3], [40], [41]. El cálculo de la relación de manosa:galactosa se realizó con las áreas bajo las curvas de las señales de los protones relacionados con los carbonos anoméricos (4.99 ppm y 4.71 ppm). La relación manosa:galactosa del GMNDR fue de 3.42:1, este valor fue ligeramente inferior al 4:1 y 5:1 reportados previamente para el galactomanano del *Delonix regia* [3], [36], pero fue similar al 3.5:1 reportado para la goma de algarrobo [42]. Como se discutió anteriormente, la diferencia de la relación manosa:galactosa encontrada en el GMNDR comparada con los de trabajos previos, podría ser atribuida a condiciones climatológicas donde crece el árbol y al proceso de extracción. La temperatura usada en la extracción fue de 60 °C, la cual es menor a los 100 y 140 °C reportados previamente para la extracción [3]. Temperaturas menores no proveen de la energía suficiente para romper los puentes de hidrógeno intermoleculares entre las secciones sin galactosas de la cadena principal del galactomanano, lo cual reduce la solubilidad para los galactomananos con una alta relación manosa:galactosa. La relación de manosa:galactosa para los hidrolizados fue de 3.7:1.

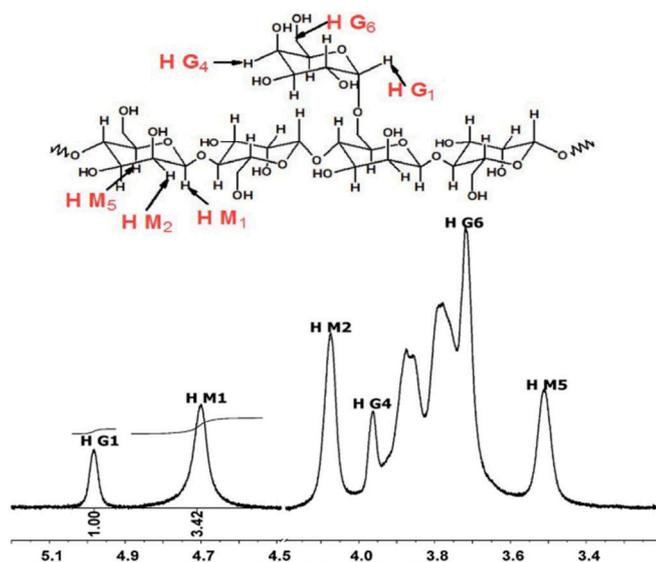


Figura 3.2. Espectro de resonancia magnética nuclear de ^1H del galactomanano del *Delonix regia*.

La Figura 3.3 muestra el espectro de FT-IR del GMNDR y de los HGDR, donde se observan las bandas típicas de absorción del galactomanano [1]. Se observan bandas de absorción a 3500 y 2900 cm^{-1} relacionados a las vibraciones de estiramiento de los enlaces O-H y C-H, respectivamente [43], mientras que a 1641 y 1400 cm^{-1} se observaron las bandas correspondientes al agua asociada y las deformaciones de los CH_2 , respectivamente [44]. Las bandas de absorción a 1151 , 1092 y 1025 cm^{-1} están relacionadas con los estiramientos C-C-O, C-OH, y C-O-C, respectivamente [45]. Las bandas características del galactomanano que indican la presencia de las unidades de β -D-manopiranososa α -D-galactopiranososa fueron observadas a 873 y 811 cm^{-1} , respectivamente [46]. La ausencia de diferencias entre los espectros de FT-IR del GMNDR y los HGDR sugieren que la estructura química no se modificó por la hidrólisis enzimática, como también se puede observar en los difractogramas de rayos X (Figura 3.4) donde se observó la naturaleza amorfa del GMNDR y los HGDR. Esto indicó que la reducción del peso molecular de las cadenas del galactomanano por la hidrólisis enzimática no afectó la naturaleza amorfa original del galactomanano; lo cual, va de acuerdo con lo observado en otros trabajos reportados previamente [47].

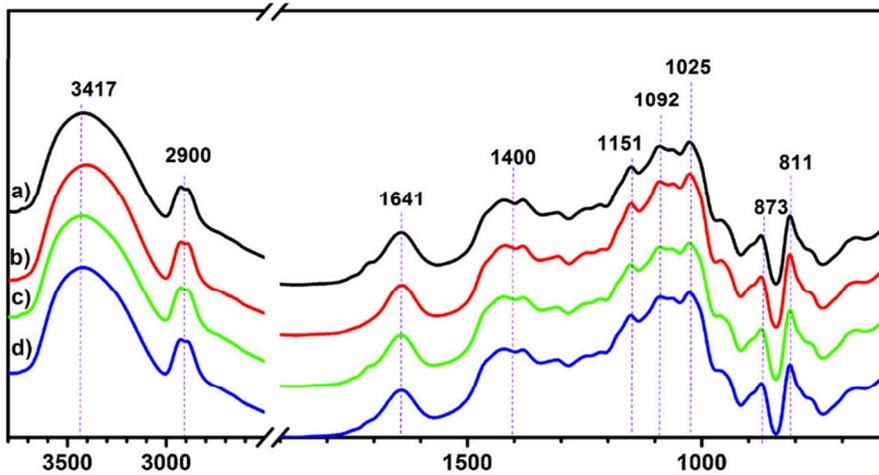


Figura 3.3. Espectro de infrarrojo de: a) galactomanano nativo, b) hidrolizado a 0.5 nKat /g a 30 min, c) hidrolizado a 1 nKat /g a 60 min y d) hidrolizado a 1.5 nKat /g a 90 min.

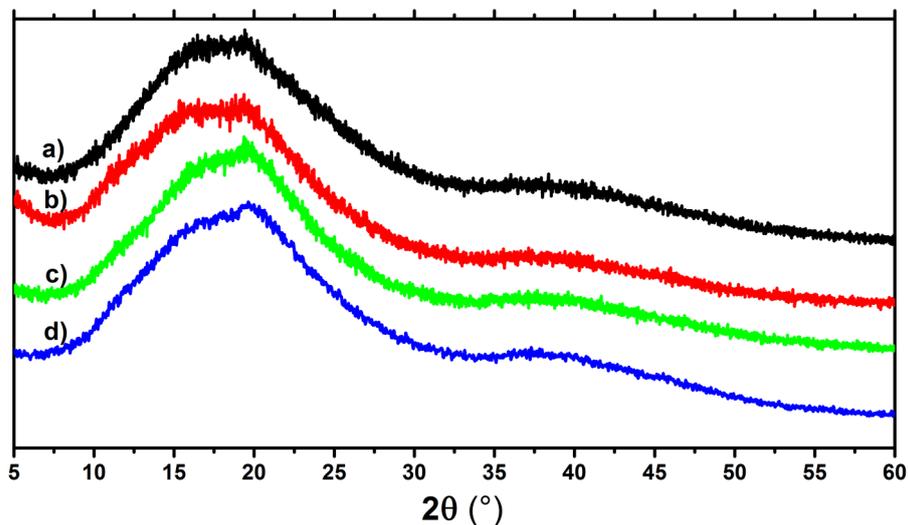
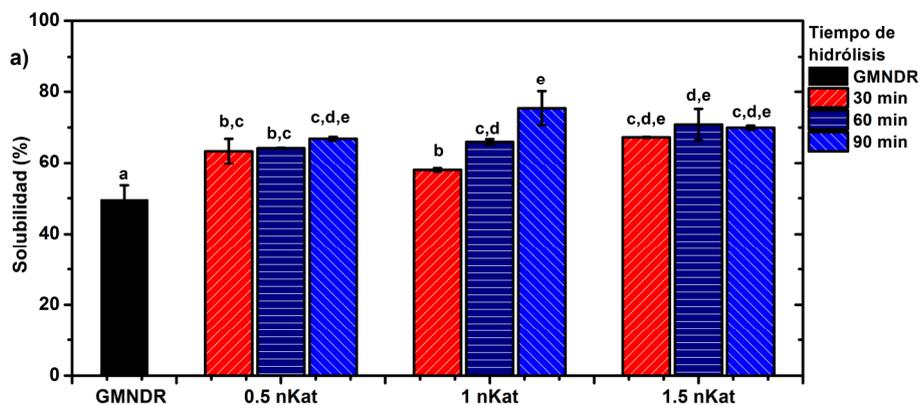


Figura 3.4. Difractograma de rayos X de: a) galactomanano nativo, b) hidrolizado a 0.5 nKat /g a 30 min, c) hidrolizado a 1 nKat /g a 60 min y d) hidrolizado a 1.5 nKat /g a 90 min.

3.3 Efecto de la hidrólisis enzimática en la solubilidad del galactomanano del *Delonix regia*.

La Figura 3.5 muestra la solubilidad a 25 y 60 °C del GMNDR y los HGDR a diferentes dosis de enzima y tiempos de hidrólisis. A 25 °C la solubilidad del galactomanano nativo del *Delonix regia* fue de $49.59\% \pm 1.98$ e incrementó hasta alrededor del 70% debido a la hidrólisis enzimática. En la Figura 3.5a) el efecto del tiempo de hidrólisis en la solubilidad se observó claramente cuando se usó una dosis de enzima de 1 nKat g⁻¹. A esta dosis de enzima la solubilidad del galactomanano se incrementó significativamente

($p < 0.05$) con el tiempo, mientras que a las dosis de 0.5 nKat g^{-1} y 1.5 nKat g^{-1} no se presentaron cambios significativos ($p > 0.05$) en la solubilidad con el tiempo para cada dosis de enzima. La solubilidad del galactomanano depende generalmente de tres características: el peso molecular, la relación de galactosa manosa y la distribución de la galactosa a lo largo de la cadena principal de manosa [32]. A $25 \text{ }^\circ\text{C}$ la solubilidad del GMNDR tuvo el mismo valor de 50% reportado para la goma del algarrobo [28]; sin embargo, la solubilidad de los HGDR fue mayor a la de 45.34% observada en hidrolizados ácidos en alcohol de goma guar ($M_n \approx 1.86 \times 10^6 \text{ Da}$) a 51.05% ($M_n \approx 1 \times 10^5 \text{ Da}$), la cual fue medida por un método similar al usado en este trabajo con la diferencia en la concentración del galactomanano en agua (1% p/v) y el tiempo de la prueba (30 min) [45]. Por otra parte, a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ la solubilidad del GMNDR y los HGDR no presentaron diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$) teniendo una solubilidad mayor comparada con la de $25 \text{ }^\circ\text{C}$, $93.6\% \pm 2.3$ como se puede observar en la Figura 3.5b). La mayor solubilidad obtenida a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ comparada con la de $25 \text{ }^\circ\text{C}$ era de esperarse, ya que el aumento de la energía cinética de las moléculas con el incremento de la temperatura ayuda al rompimiento de los puentes de hidrógeno que existen intra- e inter- cadenas.



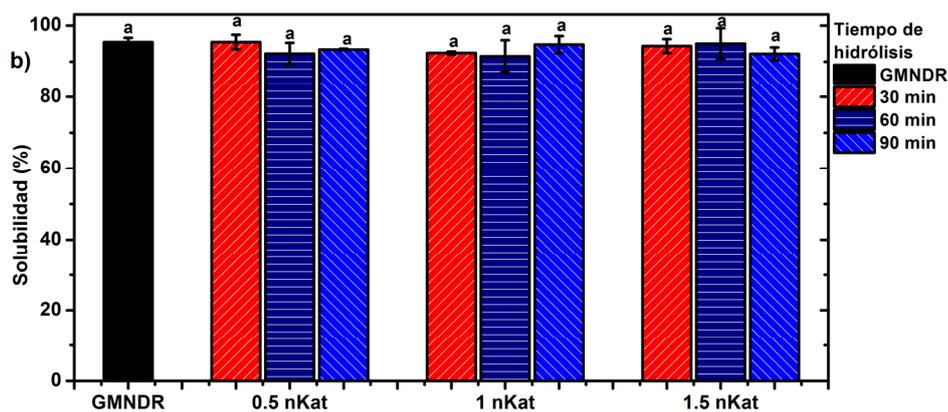


Figura 3.5. Solubilidad del galactomanano nativo y de los hidrolizados a 25 °C a) y 60 °C b). Muestras con letras diferentes presentan diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

3.4 Propiedades reológicas de las dispersiones.

3.4.1 Pruebas oscilatorias del galactomanano y los hidrolizados al 3%.

Los barridos de frecuencia se realizaron a las dispersiones al 3% (p/v) del GMNDR y los HGDR para las diferentes dosis de enzima y tiempos de hidrólisis con el fin de establecer la relación entre la reducción del peso molecular y su comportamiento reológico. La concentración del 3% (p/v) se escogió dado que fue la concentración máxima donde se pudo disolver con facilidad el GMNDR en agua caliente. La Figura 3.6 muestra los módulos de almacenamiento (G') y módulos de pérdida (G'') contra la frecuencia angular (ω). Resulta evidente que para las dispersiones del galactomanano nativo y el hidrolizado a 0.5 nKat g^{-1} a 30 min, los cuales corresponden a cadenas moleculares de alto peso molecular ($>4.15 \times 10^5$ Da), presentaron un comportamiento del tipo gel débil (Figura 3.6a) teniendo el valor de $G' > G''$ en todo el intervalo de frecuencias estudiado. Además, ambos módulos presentaron dependencia a la frecuencia, sin un cruzamiento entre ellos. Con el incremento del grado de hidrólisis las dispersiones obtenidas a 0.5 nKat g^{-1} a 60 min ($M_n = 3.58 \times 10^5$ Da) y 1 nKat g^{-1} a 30 min ($M_n = 3.43 \times 10^5$ Da), el comportamiento reológico fue predominantemente viscoso ($G'' > G'$) a bajas frecuencias; mientras que, a altas frecuencias, se observó un punto de cruce de G' y G'' a una frecuencia característica (ω_c) de 6.5 y 7 Hz para el hidrolizado de 0.5 nKat g^{-1} a 60 min y 1 nKat g^{-1} a 30 min, respectivamente. Este comportamiento es típico de soluciones macromoleculares, donde el recíproco de ω_c corresponde al tiempo principal de relajamiento (o de desenredamiento) (τ) del material. Aunque solo fueron encontradas dos frecuencias características en estas mediciones, la tendencia va acorde a lo reportado en la literatura [48], [49] donde la frecuencia a la cual sucede el cruce

entre los módulos incrementa, lo que significa un desplazamiento a menores tiempos de relajación característicos cuando el peso molecular disminuye. En consecuencia, los valores de τ disminuyen al incrementar el grado de hidrólisis, lo que es un indicativo en la disminución en la densidad de enredamiento en el sistema por la reducción en el peso molecular, tal como lo predice la teoría de Doi-Edwards [49]. Por otro lado, hidrolizados con un peso molecular menor a 3.16×10^5 Da, los cuales corresponden al hidrolizado a 0.5 nKat g^{-1} por 90 min, presentaron un comportamiento que fue predominantemente viscoso en todo el intervalo de frecuencias estudiado como se puede observar en las Figura 3.6 a,b y c. Este resultado sugiere que, a pesos moleculares menores a 4.15×10^5 Da, sucede un cambio reológico, probablemente por debajo de este peso molecular la estructura de red del gel no se alcanza a formar. Una estructura de tipo gel débil en dispersiones del galactomanano del *Delonix regia* fue también observada; en la cual, la formación de la estructura del gel débil es atribuida a los enredos de las cadenas de alto peso molecular y por interacción por puentes de hidrógeno entre las zonas de las cadenas donde no se encuentran galactosas [36].

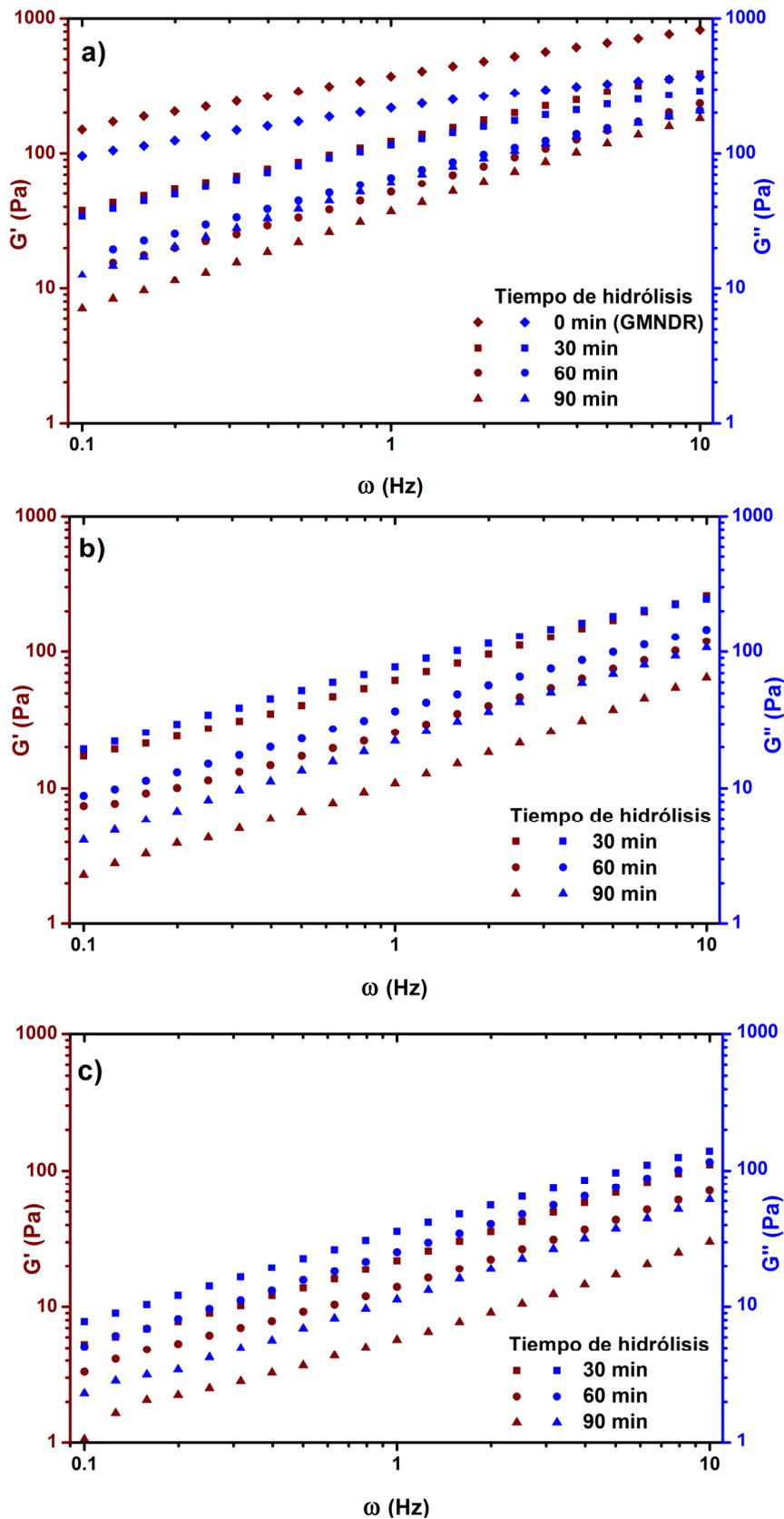


Figura 3.6. Barridos de frecuencia del galactomanano nativo del *Delonix regia* y de los hidrolizados a diferentes tiempos de hidrólisis usando una dosis de enzima de: 0.5 nKat g⁻¹ a), 1 nKat g⁻¹ b) y 1.5 nKat g⁻¹ c).

3.4.2 Pruebas en flujo en cortante del galactomanano y los hidrolizados al 3%.

Los resultados de viscosidad (η) de corte contra la velocidad de corte ($\dot{\gamma}$) de las dispersiones del GMNDR y de los HGDR a una concentración del 3% (p/v) en función del tiempo de hidrólisis y la dosis de la enzima se muestran en la Figura 3.7. En todo el intervalo de $\dot{\gamma}$ estudiado, se observó un comportamiento de adelgazamiento al corte (pseudoplástico) en las dispersiones del galactomanano nativo del *Delonix regia* y todos sus hidrolizados. A bajas velocidades de corte, alrededor de 50 s^{-1} , la η está relacionada con la percepción inicial de la consistencia viscoelástica de líquidos semifluidos [50]. Por otro lado, a altas velocidades de corte, la η se encontró dentro del intervalo de valores usados en los procesos industriales tales como el bombeo[51]. Como se observa en la Figura 3.7 al incrementar la dosis de enzima y/o el tiempo de hidrólisis, los valores de η decrecieron. Además, se puede observar con líneas sólidas los mejores ajustes de los datos experimentales al modelo de la ley de potencia, también conocido como Ostwald de Waele (Ec. 1). Los valores de los parámetros de la ley de la potencia de las dispersiones del GMNDR y de sus hidrolizados a la concentración del 3% (p/v) se muestran en la Tabla 3.2. Las dispersiones de los hidrolizados exhibieron un descenso en el valor de la constante de flujo (K) y un incremento en el índice de la ley de potencia (n) al incrementar el tiempo de hidrólisis y/o la dosis de enzima utilizada, lo cual se atribuye a que se redujo el peso molecular del galactomanano.

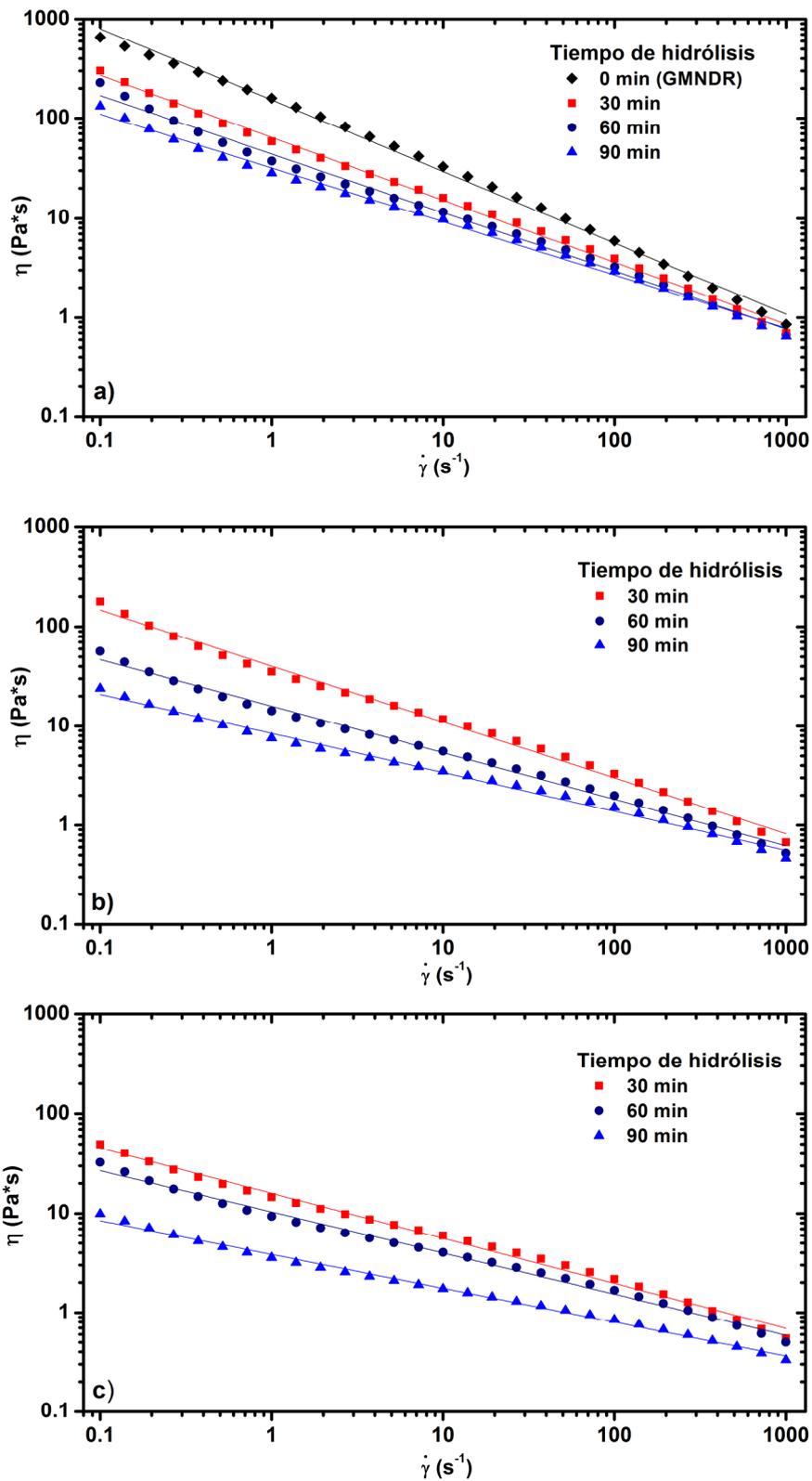


Figura 3.7. Viscosidad del galactomannano nativo del *Delonix regia* y de los hidrolizados a diferentes tiempos de hidrólisis usando una dosis de enzima de: 0.5 nKat g^{-1} a), 1 nKat g^{-1} b) y 1.5 nKat g^{-1} c).

Tabla 3.2. Parámetros de la ley de la potencia de los ajustes del galactomanano nativo del *Delonix regia* y los hidrolizados a la concentración del 3% p/v.

Dosis de enzima (nKat g ⁻¹)	Tiempo de hidrólisis(min)	<i>K</i>	<i>n</i>	S.E.*
0	0	148.82	0.31	7.65
0.5	30	62.29	0.40	3.25
	60	45.05	0.42	6.24
	90	32.68	0.46	3.49
1	30	39.95	0.44	5.94
	60	15.66	0.53	5.39
	90	8.16	0.61	4.33
1.5	30	14.71	0.55	2.80
	60	10.32	0.58	5.17
	90	3.74	0.65	5.59

* Error estándar: $\frac{\sqrt{\sum(x_m - x_c)^2 / n - 2}}{\text{Rango}} x 100$, donde x_m y x_c son los valores medidos y calculados respectivamente y n el número total de puntos.

El índice de la ley de la potencia (n) es un parámetro que indica el grado del adelgazamiento al corte, al desviarse de la unidad; mientras que K indica la magnitud del cambio de la viscosidad por el intervalo de la velocidad de corte evaluado. Se encontró que, controlando adecuadamente el proceso de hidrólisis enzimática, se puede obtener un determinado peso molecular, lo cual hace posible ajustar los valores de K de las dispersiones en agua de los hidrolizados en un intervalo deseado para determinada aplicación. Por ejemplo, las dispersiones de los hidrolizados obtenidos usando una dosis de enzima de 0.5 nKat g⁻¹ presentaron valores de K entre 62 y 33 Pa sⁿ⁻²; mientras que los hidrolizados obtenidos con una dosis mayor de enzima (1.5 nKat g⁻¹) presentaron un valor de K entre 15 y 4 Pa sⁿ⁻² (Tabla 3.2). El intervalo de los valores de K para los hidrolizados obtenidos con una dosis de enzima intermedia (1 nKat g⁻¹) abarcó el intervalo entre los hidrolizados a 0.5 y 1.5 nKat g⁻¹, lo que indica que con un apropiado control del proceso de hidrólisis enzimática es posible obtener un amplio intervalo de valores de viscosidad para una misma concentración del galactomanano. El uso del modelo de la ley de potencia nos permite poder inferir el mejor tiempo de hidrólisis y la dosis de enzima para alcanzar la viscosidad deseada. La reducción de la viscosidad es

atribuida al decrecimiento en la densidad de los enredamientos de las cadenas debida a la hidrólisis enzimática; además, esta reducción en los enredamientos entre las cadenas decrece también la fricción entre ellas y consecuentemente favorece el alineamiento de las cadenas en dirección del flujo como lo indicó el aumento en el valor de n . Es interesante que, para la dispersión del hidrolizado obtenido con una dosis de enzima de 1 nKat g^{-1} y con un tiempo de hidrólisis de 60 min, el valor de K se redujo un 58% comparado con el hidrolizado previo con un tiempo de 30 min, a la misma dosis de enzima. Esto puede ser atribuido al hecho de que un peso molecular y/o una polidispersidad fue alcanzado; por lo cual, los enredamientos entre las cadenas se debilitaron como se corroboró en las pruebas oscilatorias.

Los gráficos de la viscosidad compleja (η^*) en función de la frecuencia angular (ω) y la viscosidad de corte (η) en función de la velocidad de corte ($\dot{\gamma}$) obtenidas de las dispersiones del GMNDR y de los HGDR a una concentración del 3% se presentan en la Figura 3.8. Para el GMNDR y el hidrolizado de alto peso molecular ($0.5 \text{ nKat g}^{-1} \times 30 \text{ min}$), se observó que no sigue la regla de Cox-Merz en el intervalo de frecuencia estudiado, la cual establece que η^* y η son iguales cuando η de corte (no lineal) y η^* (lineal) provocan los mismos cambios estructurales en la topología del polímero [52]. La regla de Cox-Merz es un indicativo del carácter elástico en la red y estas desviaciones son atribuidas a la destrucción de la estructura debido a la deformación aplicada por el flujo cortante.

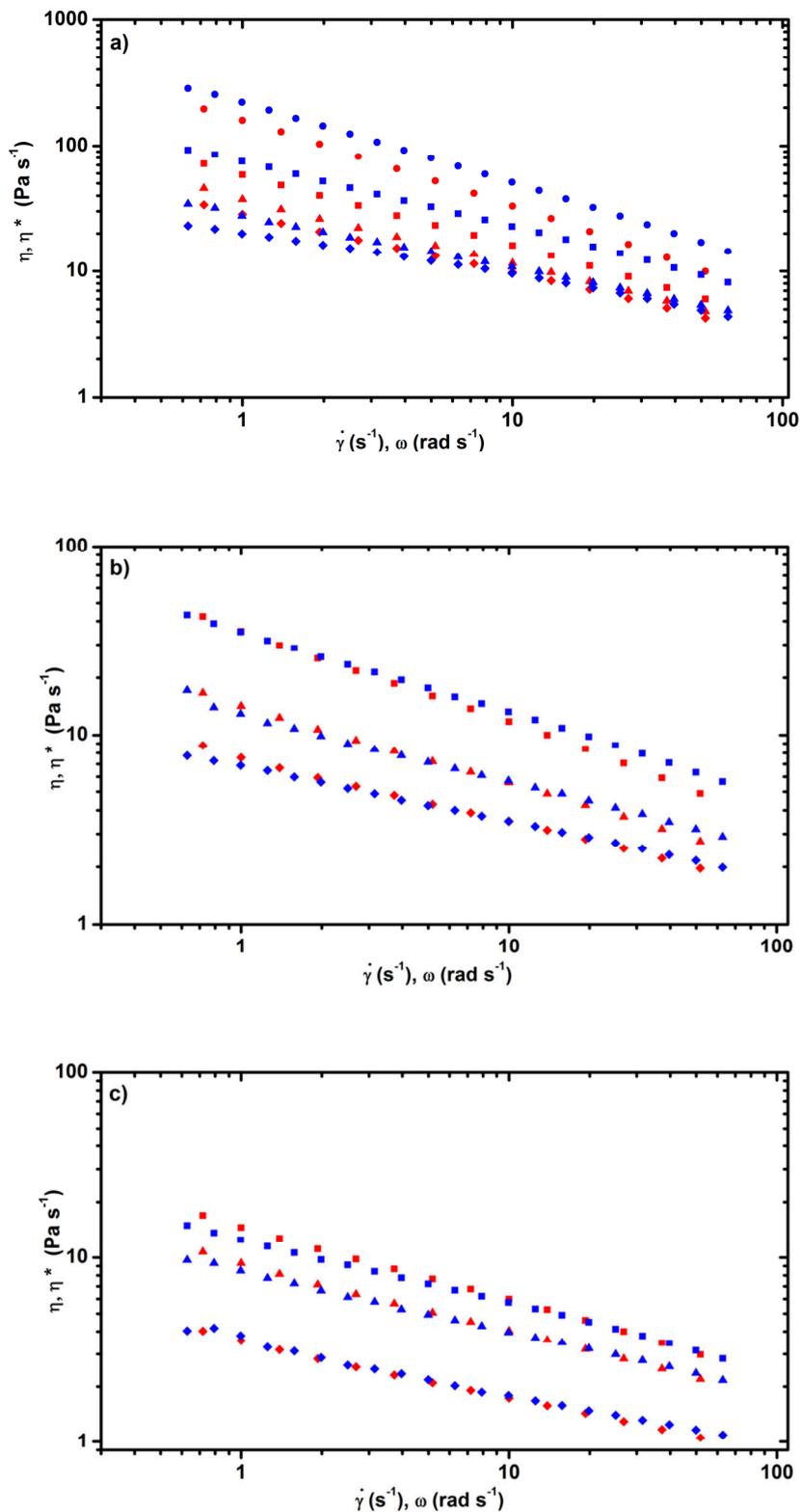


Figura 3.8. Viscosidad en cortante (rojo) y viscosidad compleja (azul) en función de la tasa de corte y frecuencia angular respectivamente del galactomannano nativo y los hidrolizados a: a) 0.5 nKat g⁻¹, b) 1 nKat g⁻¹ y c) 1.5 nKat g⁻¹. Tiempos de hidrólisis: (●) 0; (■) 30; (▲) 60; and (◆) 90.

Además, en las dispersiones de los galactomananos de alto peso molecular se refleja la naturaleza del gel débil, en donde la curva de viscosidad de corte en estado estacionario es gobernada por un tiempo de relajación alto. Por otro lado, en las dispersiones del hidrolizado de peso molecular intermedio ($1 \text{ nKat g}^{-1} \times 60\text{min}$) la desviación de la regla de Cox-Merz disminuyó como se observa en la Figura 3.8b); mientras que, el hidrolizado de menor peso molecular obtenido ($1.5 \text{ nKat g}^{-1} \times 90\text{min}$) siguió la regla de Cox-Merz (Figura 3.8c), indicando una reducción en los enredos de las cadenas, como también se observó en los módulos del barrido de frecuencia ($G'' > G'$).

3.4.3 Efecto de la concentración en las propiedades reológicas de las dispersiones del galactomanano y los hidrolizados.

Se seleccionaron los hidrolizados del galactomanano del *Delonix regia* a las condiciones de hidrólisis de 0.5 nKat/g por 30 min, 1 nKat/g por 60 min y 1.5 nKat/g por 90 min, los cuales se denominaron: hidrolizado de alto peso molecular (HAPM), hidrolizado de peso molecular medio (HMPM) e hidrolizado de bajo peso molecular (HBPM), respectivamente. Se determinó el efecto de la concentración del galactomanano en el comportamiento reológico de las dispersiones. Todas las dispersiones evaluadas presentaron un comportamiento pseudoplástico como se puede observar en la Figura 3.9. Como era de esperarse, la viscosidad de las dispersiones aumentó al incrementar la concentración del galactomanano (0.5%, 1% y 1.5% p/v). Los valores de la viscosidad contra la velocidad de corte se ajustaron al modelo reológico que tuvo el mejor ajuste para cada sistema. De esta forma, las dispersiones al 0.5 % (Figura 3.9a) se ajustaron al modelo de la ley de la potencia; donde los valores de los parámetros de ajuste se presentan en la Tabla 3.3. En la tabla se observa que el índice de flujo de la dispersión del GMNDR al 0.5% es de 0.85 y para el HBPM de 0.96; al disminuir el peso molecular, n presentó una tendencia al valor de 1.0, indicando que el comportamiento de la viscosidad con la velocidad de corte es de un líquido newtoniano. Este comportamiento se debe a que, a bajas concentraciones, y bajos pesos moleculares, las moléculas tienen menores restricciones para alinearse a la dirección del campo de velocidades de flujo impuesto. Por otra parte, se observó de igual manera la reducción de la viscosidad por la hidrólisis enzimática en la reducción del valor del índice de consistencia (K). Para las dispersiones a la concentración de 1% (Figura 3.9b), se usaron dos modelos para ajustar los valores de la viscosidad con la velocidad de

corte, siendo el modelo de Williamson (Ec. 4) el que obtuvo un mejor ajuste para las dispersiones del GMNDR y HAPM, mientras que fue el modelo de la ley de la potencia el que logró el mejor ajuste para los HMPM y HBPM. Para las dispersiones del galactomanano nativo y HAPM a bajas velocidades de corte, se observa una zona newtoniana, en donde al aumentar la velocidad de corte la viscosidad disminuye. El modelo de Williamson presentó un mejor ajuste para estas dos dispersiones, ya que este modelo usa los parámetros de viscosidad a velocidad de corte cero (η_0) y el tiempo de relajación de Williamson (τ) que es el inverso de la velocidad de corte crítica donde comienza el comportamiento pseudoplástico, además de un índice de flujo (n) [36]. El tiempo de relajación de Williamson del galactomanano nativo fue mayor al del HAPM; la explicación para este comportamiento es que, al aumentar el peso molecular del galactomanano y la concentración de este en la solución se genera una mayor cantidad de enredamientos entre las moléculas, aumentando el tiempo de relajación [48]. La aparición de dos zonas de flujo diferentes se debió a que, a bajas velocidades de corte los enredamientos de cadenas destruidos son compensados por la generación de nuevos enredamientos, dando como resultado la zona con un comportamiento newtoniano; pero al aumentar la velocidad de corte a un valor crítico, el tiempo de relajación de las cadenas no permitió igualar la velocidad de formación a la de destrucción de los enredamientos, observando el cambio de comportamiento newtoniano a pseudoplástico. Por otro lado, a la concentración de 1.5% de galactomanano, el modelo de la ley de la potencia dio el mejor ajuste como se puede observar en la Figura 3.9c. El comportamiento reológico de los hidrolizados es similar al reportado para hidrolizados del galactomanano del Guar obtenidos por medio de hidrólisis ácida, básica y enzimática [51]. Los resultados obtenidos evidencian la aplicabilidad del proceso de hidrólisis enzimática para obtener galactomananos con un determinado peso molecular, que permite obtener valores de viscosidad requeridos a una determinada concentración; por ejemplo, la dispersión del GMNDR al 0.5% tuvo un valor de K de 0.08 Pa s^{n-2} , mientras que a la concentración de 1.5% K aumentó a 6.53 Pa s^{n-2} . Sin embargo, la dispersión del hidrolizado de menor peso molecular a la concentración de 1.5% tuvo un valor K de 0.15 Pa s^{n-2} . Esto quiere decir que se puede añadir 3 veces más este hidrolizado comparado con el nativo al 0.5% para rondar el valor obtenido en esta última dispersión. Esto podría ser deseable en algunas aplicaciones como la incorporación de fibra soluble en una bebida sin un incremento abrupto de la

viscosidad, para el proceso de atomización de las dispersiones para recubrimientos o disminuir la energía requerida para bombear la dispersión en un proceso industrial.

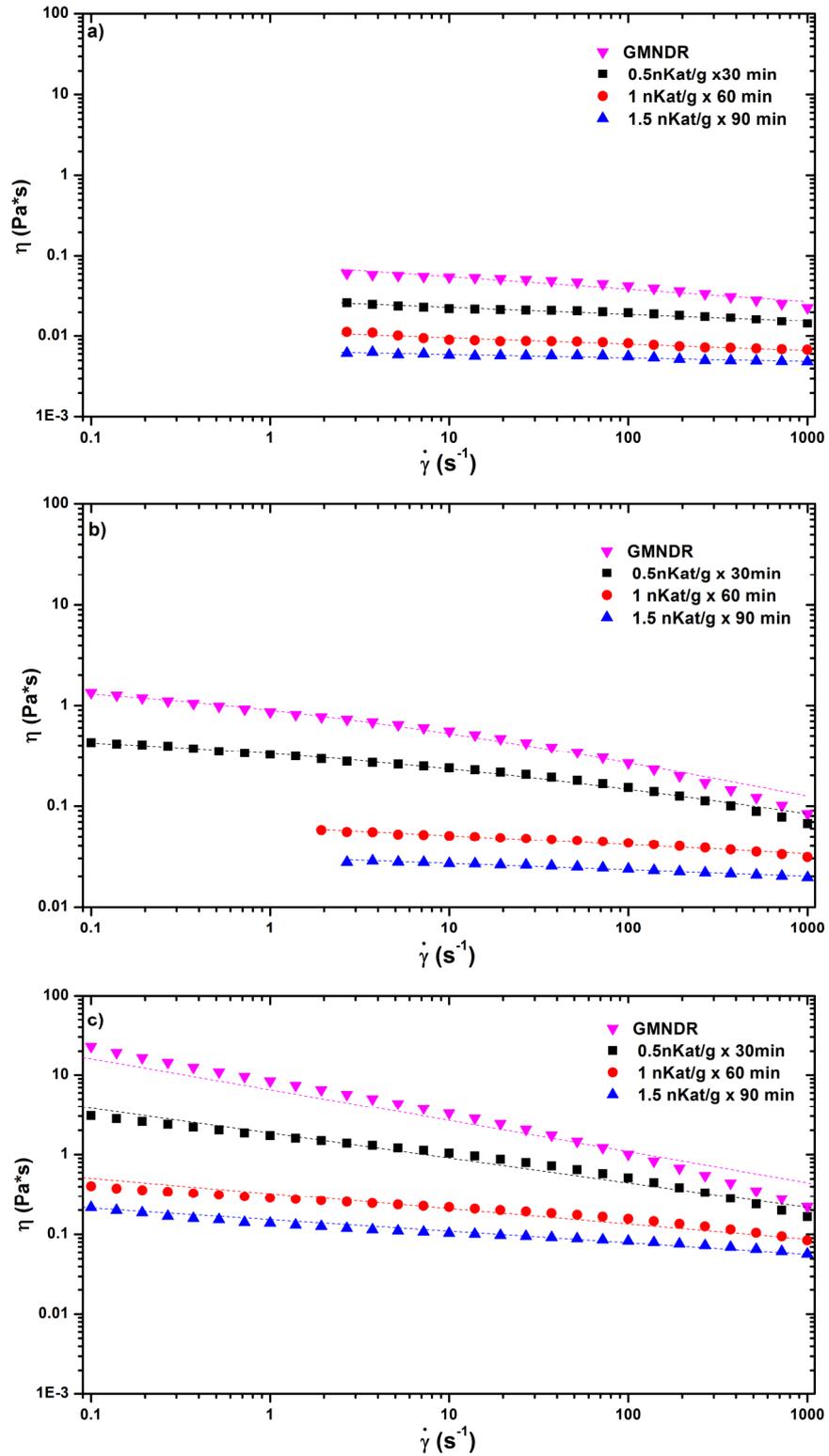


Figura 3.9. Viscosidad contra velocidad de corte de dispersiones de: nativa ▼, 0.5 nKat/g a 30 min ■, 1 nKat/g a 60 min ● y 1.5 nKat/g a 90 min ▲. A las concentraciones de 0.5% a), 1% b) y 1.5% c) en peso volúmen.

Tabla 3.3. Parámetros de los modelos con mejor ajuste (Ley de la potencia o Williamson) para las dispersiones del Galactomanano del Delonix regia e hidrolizados a las concentraciones de 0.5, 1 y 1.5% p/v.

Ley de la potencia		K (Pa sⁿ⁻²)	n	*S.E. (%)	
0.5%(p/v)	GMNDR	0.08	0.85	9.36	
	0.5nKat g ⁻¹ x 30min	0.03	0.91	5.26	
	1nKat g ⁻¹ x60min	0.01	0.91	7.38	
	1.5nKat g ⁻¹ x90min	0.01	0.96	10.50	
Modelo Williamson		η₀ (Pa s)	τ (s)	n_w	*S.E. (%)
1%(p/v)	GMNDR	1.96	1.64	0.36	2.13
	0.5nKat g ⁻¹ x 30min	0.58	0.41	0.30	2.39
	Ley de la potencia		K (Pa sⁿ⁻²)	n	*S.E. (%)
	1nKat g ⁻¹ x60min	0.06	0.86	6.05	
	1.5nKat g ⁻¹ x90min	0.03	0.94	6.79	
Ley de la potencia		K (Pa sⁿ⁻²)	n	*S.E. (%)	
1.5%(p/v)	GMNDR	6.53	0.61	9.56	
	0.5nKat g ⁻¹ x 30min	1.85	0.69	8.58	
	1nKat g ⁻¹ x60min	0.32	0.81	12.95	
	1.5nKat g ⁻¹ x90min	0.15	0.86	5.89	

* Error estándar: $\frac{\sqrt{\sum(x_m - x_c)^2 / n - 2}}{\text{Rango}} \times 100$, donde x_m y x_c son los valores medidos y calculados respectivamente y n el número total de puntos.

3.4.4 Pruebas oscilatorias del galactomanano y los hidrolizados a diferentes concentraciones.

Los HAPM, HMPM y HBPM fueron seleccionados para evaluar el efecto de la concentración de las dispersiones en agua a 0.5, 1 y 1.5 % p/v en el comportamiento viscoelástico por medio de barridos de frecuencia. El HBPM y los sistemas a la concentración de 0.5% no pudieron ser evaluados en los barridos de frecuencia, ya que debido a la baja viscosidad de estas dispersiones se obtuvieron valores negativos del módulo de almacenamiento por efecto de la inercia, además el módulo de pérdida presentó una alta variación. En el intervalo de frecuencia de 0.1 a 10 Hz, todos los sistemas presentaron una zona viscoelástica lineal, con la cual se escogió el valor de deformación de 0.1% para los barridos de frecuencia. En la Figura 3.10 se muestran los barridos de frecuencia de las dispersiones a 1% y 1.5 % p/v; en todos los casos los módulos de almacenamiento (G') y pérdida (G'') presentaron una fuerte dependencia con la frecuencia aplicada, empezando con un comportamiento predominantemente

viscoso ($G'' > G'$). A bajas frecuencias (equivalente a tiempo largos) las cadenas pueden relajarse y disipar la mayor parte de la energía aplicada externamente, por lo que G'' es mayor que G' . Por otra parte, a la concentración de 1.5% la dispersión del GMNDR presentó un comportamiento característico de una solución macromolecular, ya que se observó que con el aumento de la frecuencia hay una tendencia a un cambio en el comportamiento del material, pasando de predominantemente viscoso a predominantemente elástico.

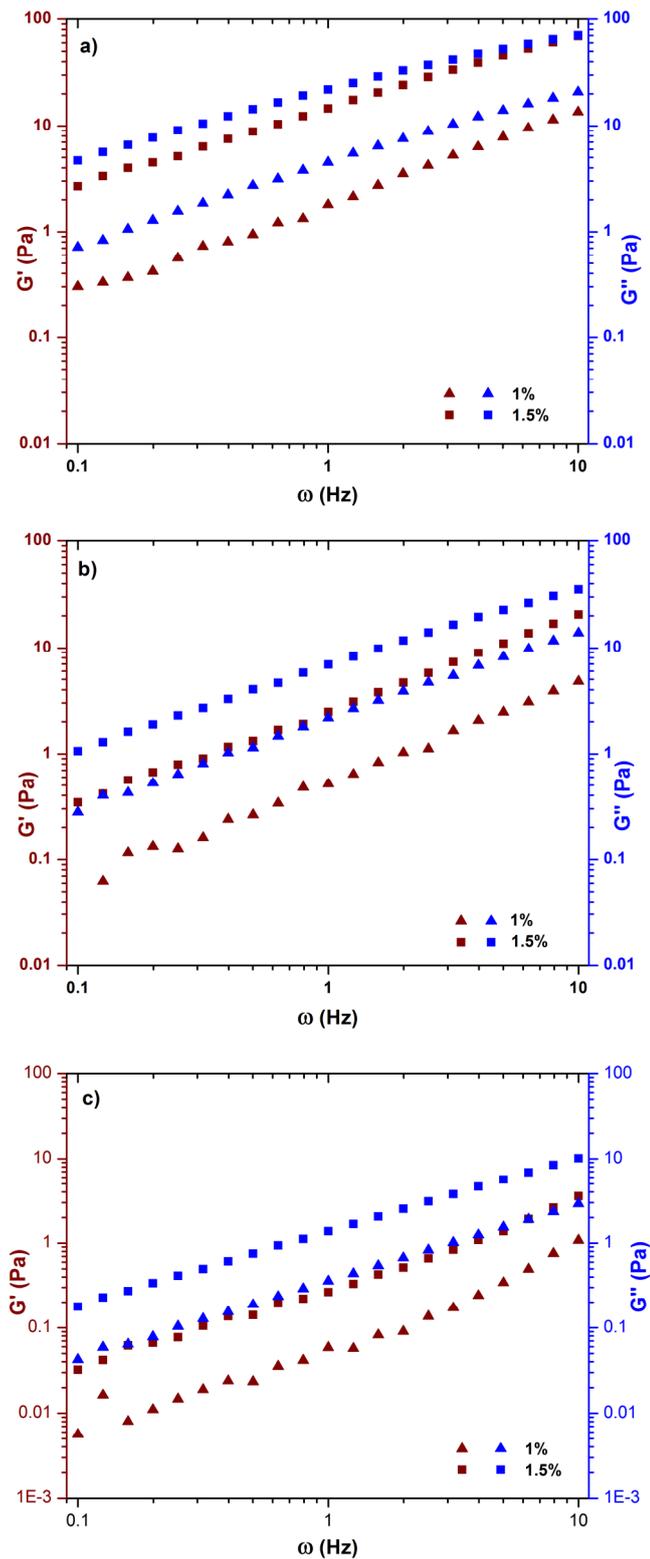


Figura 3.10. Barridos de frecuencia de las dispersiones de: a) galactomanano nativo del *Delonix regia*, b) hidrolizado a $0.5 \text{ nKat g}^{-1} \times 30 \text{ min}$ y $1 \text{ nKat g}^{-1} \times 60 \text{ min}$ a las concentraciones de 1.5% (■, □) y 1% (▲, △). Símbolos abiertos módulo viscoso y símbolos cerrados módulo elástico.

3.5 Efecto de la adición de k-Carragenano en las propiedades reológicas de las dispersiones del galactomanano del *Delonix regia* con diferentes pesos moleculares.

Existen varios trabajos en la literatura científica donde se ha estudiado la interacción entre varios tipos de galactomananos con otros polisacáridos y generalmente se ha encontrado interacciones entre polisacáridos con carga y los galactomananos [53]–[56]. Para determinar el efecto de la adición de un polisacárido con carga en la η de las dispersiones, se añadió a las dispersiones del GMNDR, HAPM, HMPM y HBPM el k-carragenano (k-carr) a las concentraciones mencionadas en la metodología. En la Figura 3.11 se muestra η en función de la velocidad de corte de todas las dispersiones al 1%, medidas a 50 °C; se usó esta temperatura para prevenir la formación de geles en los sistemas que contenían k-carr. Se observó que todas las dispersiones presentaron un comportamiento del tipo de adelgazamiento al corte (pseudoplástico), además de que la viscosidad de las dispersiones decreció al disminuir el peso molecular del galactomanano, tal y como se puede apreciar en el valor de la viscosidad a la velocidad de corte de 10 s^{-1} ($\eta_{\dot{\gamma}=10\text{s}^{-1}}$) en la Tabla 3.4. Los valores de $\eta_{\dot{\gamma}=10\text{s}^{-1}}$ decrecieron desde 0.325 hasta 0.01 Pa s y de 0.195 a 0.023 Pa s para las dispersiones de solo galactomanano y mezclas, respectivamente. Las dispersiones que contienen al GMNDR o el HAPM tuvieron una viscosidad apreciable (0.325-0.083 Pa s) con un comportamiento cercano al newtoniano a bajas velocidades de corte, incrementando mientras que se incrementa su dependencia con la velocidad de corte; por lo cual el modelo de Williamson presentó un mejor ajuste (Menor error estándar) a los valores experimentales. Mientras que, las que contenían el HMPM o el HBPM, así como la de solo k-carr no formaron una región newtoniana apreciable a bajas velocidades de corte; estas dispersiones se ajustaron al modelo de la ley de la potencia. Los parámetros de los modelos de la ley de la potencia y de Williamson se presentan en la Tabla 3.4. La disminución de la viscosidad al disminuir el peso molecular, podría ser una ventaja en algunos procesos; por ejemplo, se pueden tener ahorros en electricidad al requerir menos energía para el bombeo del fluido por las tuberías. También en procesos de recubrimiento por medio de aspersión, una baja viscosidad facilita la operación de la atomización. Además, la disminución de la viscosidad puede permitir elaborar películas más gruesas al trabajar con dispersiones de mayor concentración [57]. Por otro lado, la $\eta_{\dot{\gamma}=10\text{s}^{-1}}$ de la dispersión del galactomanano nativo (0.325 Pa s) fue mayor que el de su mezcla con k-carr (0.195 Pa s); sin embargo, al disminuir el peso molecular del

galactomanano, la diferencia de la $\eta_{\dot{\gamma}=10s^{-1}}$ de su dispersión con la que contiene k-carr fue disminuyendo hasta que en la mezcla HMPM:k-carr fue mayor que la del HMPM, siendo 1.51 veces mas grande. Para la dispersión del HBPM esta diferencia en los valores de $\eta_{\dot{\gamma}=10s^{-1}}$ con HBPM:k-carr incremento 2.3 veces con respecto al HBPM (0.010 Pa s). Este comportamiento fue observado de igual manera en los parámetros η_0 y K de los modelos de Williamson y ley de la potencia respectivamente (Tabla 3.4). Una posible explicación para este resultado es la interacción entre las moléculas del k-carr y las del galactomanano en la dispersión. Cuando el peso molecular del galactomanano fue suficientemente alto, la energía disipada por los enredamientos formados entre las cadenas de galactomanano fue mayor que la energía disipada por las interacciones entre el galactomanano y el k-carr. Cuando el peso molecular fue reducido por la hidrólisis enzimática generando el HMPM con un peso molecular de 2.85×10^5 Da, los enredamientos que se dieron entre las cadenas de este galactomanano se vieron reducidas [58]. Por lo que la energía disipada por la interacción entre el k-carr y el galactomanano se volvió significativa, produciendo un incremento observable en la viscosidad del HMPM:k-carr comparado con la dispersión del HMPM.

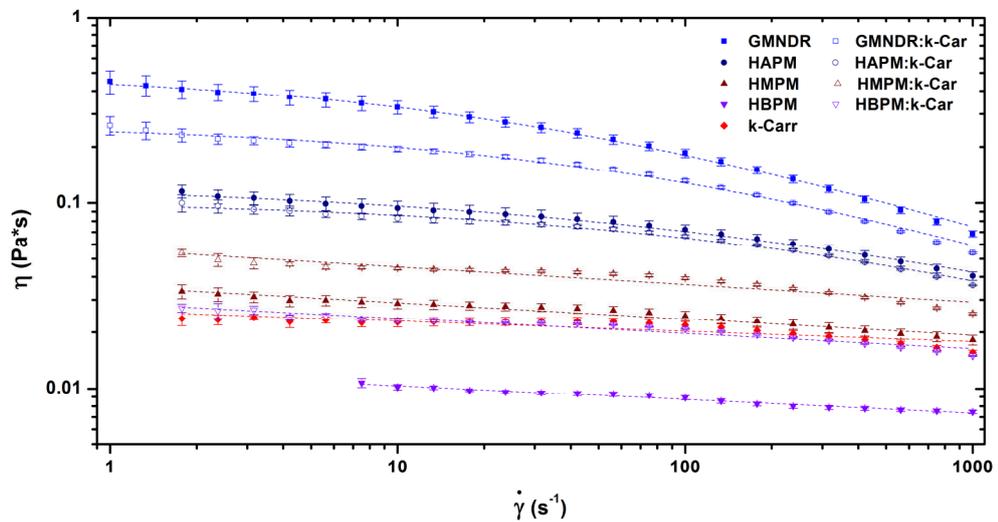


Figura 3.11. Viscosidad de las soluciones formadoras de películas.

Tabla 3.4. Parámetros de los modelos que mejor se ajustaron a las dispersiones a 50 °C.

Modelo de Williamson	η_0 (Pa s)	τ (s)	n_w	*S.E. (%)	$\eta_{\dot{\gamma}=10s^{-1}}$ (Pa s)
GMNDR	0.515	0.034	0.502	1.25	0.325
Nativa:k-carr	0.265	0.012	0.508	3.11	0.195
HAPM	0.128	0.006	0.392	2.56	0.094
HAPM:k-carr	0.104	0.003	0.460	3.15	0.083

Modelo de ley de potencia	K (Pa s ⁿ⁻²)	n	*S.E. (%)	
HMPM	0.035	0.912	5.92	0.029
HMPM:k-carr	0.056	0.905	8.29	0.044
HBPM	0.012	0.925	4.55	0.010
HBPM:k-carr	0.029	0.918	6.80	0.023
k-carr	0.026	0.945	15.83	0.023

* Error estándar: $\frac{\sqrt{\sum(x_m - x_c)^2 / (n-2)}}{\text{Rango}} \times 100$, donde x_m y x_c son los valores medidos y calculados respectivamente y n el número total de puntos.

Capítulo 4

Resultados: Elaboración de Películas y geles a partir del galactomanano del *Delonix regia* y sus hidrolizados.

4.1 Películas.

En la elaboración de las películas se evaluó el efecto de la disminución del peso molecular y la adición del k-carr sobre las propiedades de las películas. Las películas obtenidas del galactomanano del *Delonix regia* y de los hidrolizados fueron transparentes y sin color, la disminución del peso molecular no provocó diferencia significativa en los parámetros CIEL*a*b* como se puede observar en la Tabla 4.1. Por otra parte, se observó una ligera coloración amarilla en las películas donde el k-carr estuvo presente. La diferencia total de color (ΔE^*) usando la película del GMNDR como referencia fue calculada usando la Ec. 7. El ΔE^* de los hidrolizados incrementó ligeramente (0.49). Además, cuando el k-carr fue mezclado con el galactomanano, el valor de ΔE^* incremento hasta 2.28. Mientras que el máximo ΔE^* fue obtenido con la película elaborada con solo el k-carr, donde se tuvo un valor de 5.78. Esta diferencia es atribuida al color amarillento que tiene el k-carr como se ve en el parámetro b^* , en el cual valores positivos están relacionados con el color amarillo. Aunque, se observó un incremento en el valor de ΔE^* en las películas de los hidrolizados de los galactomananos y la mezcla de estos con el k-carr, el parámetro de luminosidad (L^*) y opacidad (Op) se encontraron en el mismo intervalo, por lo que las películas continuaron siendo transparentes, como la obtenida con el GMNDR. Es importante señalar que, aun cuando no se usó glicerol en las películas como aditivo plastificante, los valores de opacidad obtenidos se encuentran en el intervalo de valores reportados en otros trabajos, donde el glicerol fue usado en mezclas de galactomanano de algarrobo y k-carr [14]. La característica de transparencia es deseable en empaques ya que permiten visualizar los productos y el color del empaque podría influenciar el gusto del consumidor.

Tabla 4.1 Parámetros CIEL*a*b* de las películas elaboradas con el GMNDR, HAPM, HMPM, HBPM y k-carr, así como la mezcla de la k-carr con cada galactomanano.

Película	L*	a*	b*	Op	ΔE
GMNDR	96.82±0.20 ^d	0.09±0.03 ^{a,b,c}	2.37±0.07 ^a	9.77±0.24 ^{a,b,c}	-
HAPM	96.51±0.32 ^{c,d}	0.13±0.04 ^{b,c}	2.67±0.25 ^a	9.63±0.38 ^a	0.49±0.32 ^a
HMPM	96.50±0.13 ^{c,d}	0.13±0.06 ^{b,c}	2.52±0.27 ^a	10.69±1.65 ^{b,c}	0.42±0.20 ^a
HBPM	96.75±0.16 ^d	0.14±0.03 ^c	2.19±0.10 ^a	9.81±0.80 ^{a,b}	0.27±0.04 ^a
k-carr:GMNDR	96.04±0.38 ^{b,c}	0.06±0.03 ^a	4.51±0.38 ^b	9.94±0.68 ^{a,b}	2.28±0.47 ^b
k-carr:HAPM	95.89±0.40 ^b	0.12±0.03 ^{b,c}	4.23±0.63 ^b	10.93±0.85 ^c	2.09±0.70 ^b
k-carr:HMPM	96.15±0.16 ^{b,c}	0.08±0.02 ^{a,b}	4.43±0.13 ^b	10.04±0.52 ^{a,b,c}	2.17±0.16 ^b
k-carr:HBPM	96.19±0.12 ^{b,c}	0.06±0.01 ^a	4.29±0.29 ^b	10.22±0.19 ^{a,b,c}	2.01±0.31 ^b
k-carr	94.92±0.98 ^a	0.13±0.10 ^{b,c}	7.82±2.02 ^c	12.11±0.86 ^d	5.78±2.20 ^c

Muestras con letras diferentes en la misma columna presentan diferencia estadísticamente significativa (p<0.05).

4.2 Micrografías SEM y caracterización por infrarrojo de las películas.

La superficie de las películas fue observada en las micrografías obtenidas por SEM, las cuales se muestran en la Figura 4.1. En la película del galactomanano nativo se puede observar la presencia de partículas menores a 1 μm (Figura 4.1a), las cuales son atribuidas al material insoluble presente en el extracto del galactomanano. En contraste, en las películas de los hidrolizados del galactomanano el material insoluble fue disminuyendo conforme la hidrólisis del galactomanano fue incrementando, como se puede observar en las Figura 4.1d) a la f). Lo anterior fue debido al proceso de purificación que se llevó a cabo al reprecipitar el hidrolizado con etanol, después del proceso de la hidrólisis; además, la solubilidad del galactomanano aumentó por la hidrólisis enzimática como se observó previamente. Por otra parte, la película de la carragenina presenta agregados en su superficie (Figura 4.1e) los cuales prevalecieron aún cuando esta se encontraba mezclada con los galactomananos. Los espectros de infrarrojo se presentan en la Figura 4.2. Las bandas características de absorción de los galactomananos aparecen en los números de onda 810 y 869 cm⁻¹ relacionados con las unidades de D-α-galactopiranososa y D-β-manopiranososa, respectivamente [44]. A 3323, 2880 y 1640 cm⁻¹ aparecen las bandas asociadas con las vibraciones de estiramiento de los O-H, los estiramientos de C-H y el agua, respectivamente. En el intervalo de 1200 a 900 cm⁻¹ se observaron varios picos, los cuales se deben a los estiramientos entre los

grupos C-O-C o C-O-H provenientes de la conformación del anillo piranoico del galactomanano [59], [60]. Además, las bandas de absorción características del k-carr se observaron a 1220, 919 y 842 cm^{-1} las cuales corresponden a las vibraciones de los grupos éster de sulfato, 3,6-anhidro galactosa y galactosa-4-sulfato, respectivamente [61], [62].

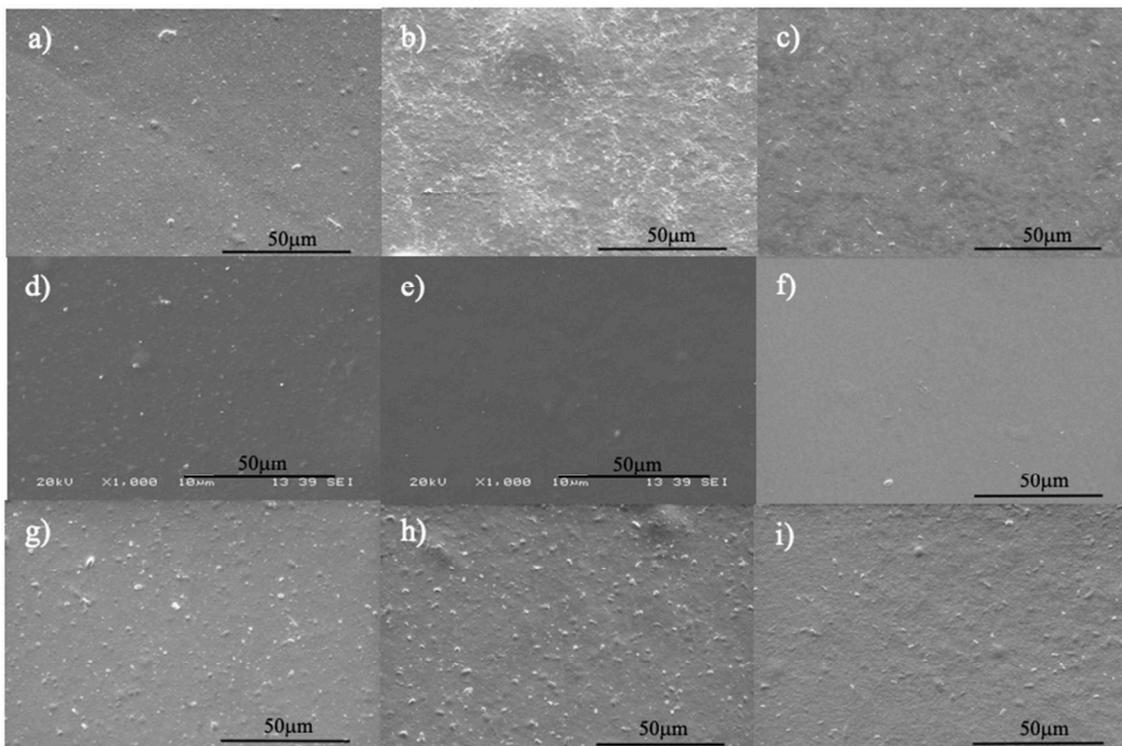


Figura 4.1. Micrografías de las superficies de las películas tomadas con un aumento de 1000x. a) GMNDR, b) k-carr, c) k-carr:GMNDR, d) HAPM, e) HMPM, f) HBPM, g) k-carr:HAPM, h) k-carr:HMPM, i) k-carr:HBPM.

Las películas elaboradas con las mezclas de galactomananos y k-carr presentaron las bandas mencionadas previamente como se puede observar en la Figura 4.2. Sin embargo, se observaron desplazamientos en algunas bandas por la mezcla de los polisacáridos tal como fue observado en trabajo reportado previamente [14]. Se detectaron desplazamientos en los picos de las bandas correspondientes a las vibraciones de los grupos C-O-C y C-O-H en el intervalo entre 900 y 1200 cm^{-1} . Las bandas a 919 y 1032 cm^{-1} observadas en las películas de solo k-carr correspondientes al grupo C-O-C, se desplazaron a 927 y 1022 cm^{-1} , mientras que la banda a 1156 cm^{-1} correspondiente a las vibraciones de estiramiento de los enlaces C-O-H, se desplazaron a 1147 cm^{-1} cuando el galactomanano nativo fue mezclado con el k-Carr en la formación de las películas. Estos desplazamientos podrían ser explicados a la

interacción por medio de puentes de hidrógeno entre las moléculas de los polisacáridos, estas interacciones también estarían relacionadas con el aumento de la viscosidad en algunas mezclas de hidrolizados con k-carr en las dispersiones discutidas previamente.

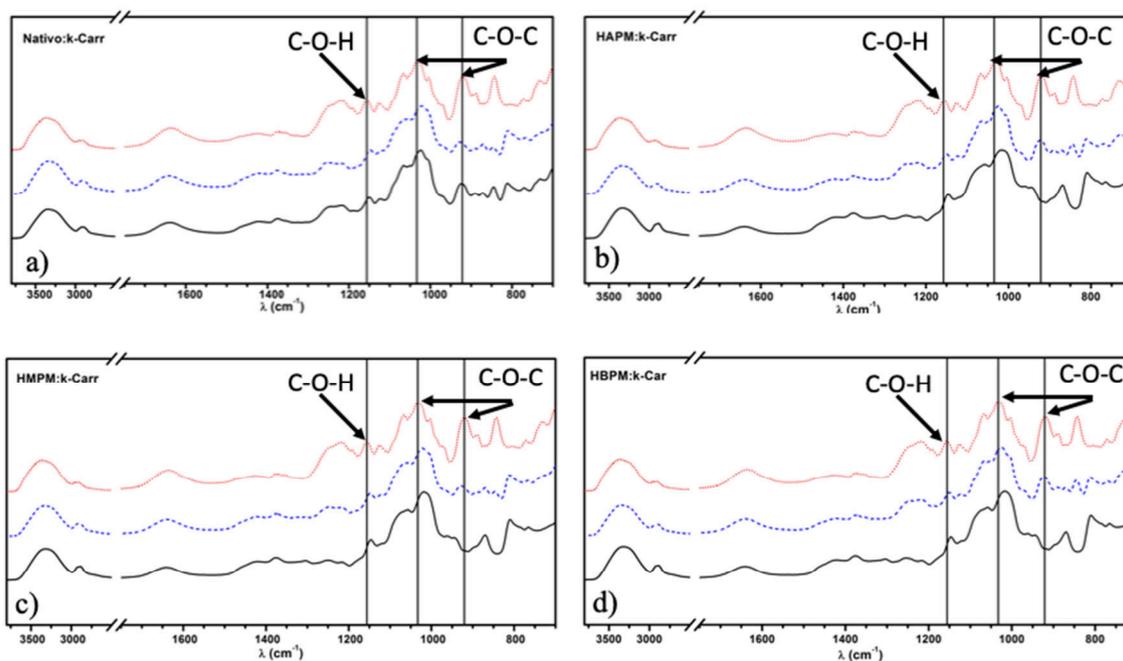


Figura 4.2. Espectro de infrarrojo de las películas con: a) GMNDR, b) HAPM, c) HMPM y d) HBPM. Película de K-carr (línea roja), película de solo galactomanano (línea negra), película de mezcla de galactomanano y k-carr (línea azul).

4.3 Contenido de humedad, solubilidad y permeación de vapor de agua de las películas.

El contenido de humedad fue del 11% en peso para las películas de galactomanano y las mezclas de galactomanano y k-carr, mientras que para la película que solo contenía k-carr presentó una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$), teniendo un valor del 15%, lo cual presentó una diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto a las otras películas (Tabla 4.2). El contenido de humedad de las películas obtenidas en este trabajo fueron menores que las reportadas para películas elaboradas con mezclas de galactomanano y k-Carr [14]. Es conocido que la presencia del glicerol (usado como agente plastificante) en películas, ayuda a retener agua por su alto carácter hidrofílico [63]; dado que el uso de glicerol no fue requerido para obtener películas en los sistemas estudiados en este trabajo, se obtuvo una menor cantidad de humedad. Por otra parte, la reducción del peso molecular del galactomanano del *Delonix regia* tuvo como efecto un

incremento en la solubilidad de las películas, incrementando de 69.1 a 76.08 %, que va de acuerdo con los resultados obtenidos en la prueba de solubilidad del hidrolizado en forma de polvo. Además, como se observó en las micrografías del SEM, la disminución de partículas en la superficie de las películas se debió al aumento de la solubilidad por la hidrólisis enzimática del galactomanano. Además, la solubilidad de la película de solo k-carr y las mezclas de galactomanano con k-Carr fueron del 100%, debido a que después de 24 horas de inmersión en agua, no se obtuvieron partículas las cuales puedan ser recuperadas y pesadas para la determinación de la solubilidad. Esta alta solubilidad de las películas cuando el k-carr se encuentra presente se puede explicar por los grupos sulfato que se encuentran en su estructura, los cuales pueden formar puentes de hidrógeno con el agua, ayudando a la desintegración y solubilización de la película en agua. Este comportamiento en la solubilidad de películas con k-Carr fue observado previamente en mezclas con agar [64].

Tabla 4.2. Porcentaje de humedad y solubilidad de las películas.

Película	Humedad (%)	Solubilidad (%)
GMNDR	10.43±1.25 ^{a,b}	69.10±3.17 ^a
HAPM	9.76±0.60 ^a	71.90±5.05 ^a
HMPM	11.13±1.74 ^{a,b}	72.16±0.52 ^a
HBPM	10.92±0.53 ^{a,b}	76.08±0.94 ^b
k-Carr:GMNDR	11.23±2.33 ^{a,b}	100 ^c
k-Carr:HAPM	11.62±0.10 ^{a,b}	100 ^c
k-Carr:HMPM	12.39±0.38 ^b	100 ^c
k-Carr:HBPM	9.65±1.51 ^a	100 ^c
k-Carr	15.08±0.12 ^c	100 ^c

Muestras con letras diferentes en la misma columna presentan diferencia estadísticamente significativa (p<0.05).

En la prueba de solubilidad de las películas, se observó un interesante resultado al finalizar las 24 horas de inmersión en agua; donde las películas elaboradas con el GMNDR y el HAPM presentaron un incremento en su volumen por el agua absorbida manteniendo su integridad; sin embargo, las películas elaboradas con los HMPM y HBPM se desintegraron en pequeñas piezas como se puede observar en la Figura 4.3. Esto se atribuye a que al reducir el peso molecular del galactomanano los enredamientos

entre las cadenas se debilitan, así mientras la película se va solvatando se va desintegrando.

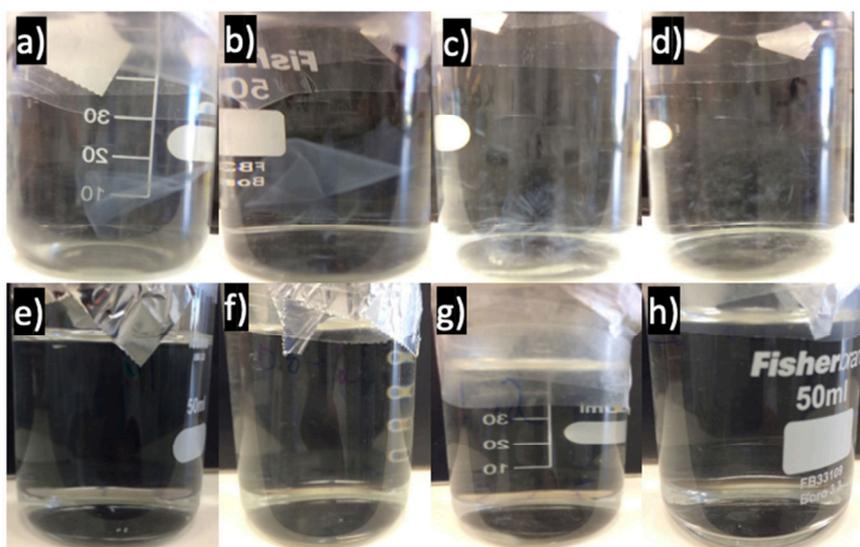


Figura 4.3. Películas después de 24 horas de inmersión en agua a 25 °C. Películas de: a) GMNDR, b) HAPM, c) HMPM, d) HBPM, e) GMNDR:k-carr, f) HAPM:k-carr, g) HMPM:k-carr y , h) HBPM:k-carr.

La permeación al vapor de agua (PVA) es un parámetro importante para las aplicaciones de las películas como material de empaque o recubrimiento para impedir la interacción de la humedad con el material a proteger. [65]. La Figura 4.4 presenta los valores de la permeación al vapor de agua de las películas elaboradas con los galactomananos de diferente peso molecular y las mezclas de éstos con k-Carr. Los valores obtenidos de la permeación al vapor de agua de las películas de GMNDR y los hidrolizados, además de las mezclas con k-carr, están dentro del intervalo reportado por otros autores [14], [66], [67]. La reducción del peso molecular a partir del GMNDR produjo un incremento en la permeación al vapor de agua de $7.55 \times 10^{-11} \text{ g (m s Pa)}^{-1}$ a 12.54 y $12.70 \times 10^{-11} \text{ g (m s Pa)}^{-1}$ para el HAPM y HMPM, respectivamente. Sin embargo, la permeación al vapor de agua se redujo a $9.60 \times 10^{-11} \text{ g (m s Pa)}^{-1}$ en la película HBPM. En la literatura se encuentran algunos trabajos acerca de la influencia del Mn en la permeación al vapor de agua de películas elaboradas con polisacáridos. Algunos autores reportan un incremento en la permeación cuando el Mn del galactomanano se reduce [68], [69]. En películas de hidroxipropilmetilcelulosa se observó una disminución en la permeación al vapor de agua debido al incremento del Mn; este comportamiento fue explicado por la disminución en la movilidad de la cadena por el incremento del peso molecular, lo cual produjo una reducción en la transferencia

de las moléculas de vapor de agua a través de la película. Para películas de metil celulosa la permeación de vapor de agua incrementó con la reducción del peso molecular hasta llegar a los 41000 Da, por debajo de este peso molecular se observó una disminución en la permeación al vapor de agua [70]. Este comportamiento es similar al obtenido en este trabajo con la película del galactomanano de bajo peso molecular. Una posible razón para la reducción de la permeación al vapor de agua en esta película es que la hidrólisis enzimática dio como resultado cadenas de bajo peso molecular y un aumento en la polidispersidad (2.9); las cadenas pequeñas podrían acomodarse en los espacios libres entre los enredos de las moléculas más grandes, formando una matriz más compacta, dando como consecuencia que el movimiento de las moléculas de vapor de agua por la matriz de la película se vea entorpecido. Por otra parte, la permeación al vapor de agua de la película de k-carr fue mayor que la del GMNDR; esto se debe a la mayor afinidad al agua por los grupos sulfatos, lo cual corresponde con los resultados obtenidos en la prueba de solubilidad de las películas discutidas previamente. La permeación al vapor de agua del galactomanano nativo se vio incrementada al mezclarlo con el k-carr. Las mezclas de GMNDR:k-Carr mostraron tener una menor permeación al vapor de agua en comparación con la película del respectivo galactomanano hidrolizado. Además, una reducción en la permeación también fue observada al disminuir el Mn del galactomanano de la mezcla con el k-carr. Este comportamiento indica que menores Mn del galactomanano favorece un acomodo molecular más compacto además de interacciones físicas entre los enlaces, como puentes de hidrógeno.

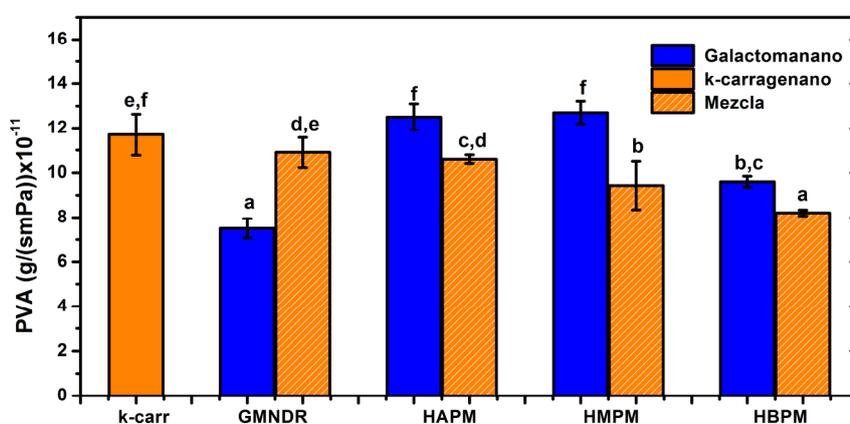


Figura 4.4. Permeación al vapor de agua de las películas de galactomanano de Delonix y regia y k-carr. Muestras con letras diferentes presentan diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

4.4 Propiedades mecánicas y ángulo de contacto de las películas de galactomanano y las mezclas con k-Carragenano.

Los resultados del esfuerzo máximo a tensión y la elongación a la ruptura de las películas elaboradas en este trabajo se presentan en la Tabla 4.3. Es evidente que la película de solo k-carr fue la que presentó el menor esfuerzo a la tensión ($p < 0.05$), lo cual estuvo de acuerdo con la película frágil obtenida. Sin embargo, cuando el k-carr fue mezclado con los galactomananos se obtuvieron películas fuertes y flexibles como se puede observar en el incremento en el valor del esfuerzo máximo a la tensión. El esfuerzo a la tensión fue mayor y la elongación a la ruptura menor que los valores reportados en otros trabajos [9], [66], [71]. Esta diferencia es debida al hecho de que en este trabajo no fue necesario el uso de glicerol como agente plastificante. Por otra parte, la reducción del peso molecular no presentó un gran impacto en las propiedades mecánicas de las películas de galactomanano, esto se debió a que el peso molecular mas bajo obtenido podría estar aún por encima de un peso molecular crítico, M_{wc} , por debajo del cuál las propiedades mecánicas caen abruptamente, por el contrario, por arriba de M_{wc} las propiedades mecánicas se mantienen sin cambio generalmente [72].

Los valores de ángulo de contacto obtenidos para las diferentes películas se presentan en la Tabla 4.3, donde se puede observar que todas las películas presentaron valores menores de 90° , lo cual se debe a la afinidad de las películas del galactomanano y el k-carr por el agua. En los resultados se observa el efecto de la variación del peso molecular debido a la hidrólisis; al disminuir M_n el ángulo de contacto disminuye. Un efecto notable es que la adición del k-carr al galactomanano para todas las mezclas casi duplica el ángulo de contacto que presentan las películas preparadas a partir del galactomanano o sus hidrolizados, e incluso es superior al de la película del k-carr puro, esto podría deberse a las interacciones que se dan entre los polisacáridos. Generalmente ángulos de contacto menores de 90° indican que la humectabilidad es favorable, mientras que ángulos mayores a 90° significan lo contrario [73]. Estos resultados están de acuerdo con el comportamiento observado.

Tabla 4.3. Propiedades mecánicas y ángulo de contacto de las películas elaboradas con galactomananos de diferentes pesos moleculares y κ -carr.

Películas	E.T. (MPa)	E.R. (%)	A.C.
GMNDR	69.04±12.46 ^{b,c,d}	3.75±2.02 ^{a,b,c}	44.93±4.74 ^{a,b}
HAPM	52.04±6.07 ^b	2.47±1.74 ^{a,b}	57.67±2.24 ^c
HMPM	57.40±8.60 ^b	4.76±2.60 ^c	48.16±7.74 ^b
HBPM	60.67±16.04 ^b	4.27±1.79 ^{b,c}	37.56±4.16 ^a
κ-Carr:GMNDR	62.85±13.47 ^b	2.14±0.41 ^a	71.83±12.32 ^d
κ-Carr:HAPM	81.10±17.00 ^{c,d}	2.52±0.88 ^{a,b}	78.45±10.56 ^{d,e}
κ-Carr:HMPM	84.27±16.66 ^d	2.05±1.07 ^a	85.43±8.28 ^{e,f}
κ-Carr:HBPM	64.05±17.87 ^{b,c}	1.96±0.61 ^a	88.64±7.98 ^f
κ-Carr	33.06±11.22 ^a	2.48±0.94 ^a	51.01±3.06 ^{b,c}

Muestras con letras diferentes en la misma columna presentan diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

4.5 Formación de geles a partir de Galactomanano nativo del *Delonix regia*.

Debido a la alta viscosidad obtenida en las dispersiones del GMNDR y de los hidrolizados a concentraciones por arriba del 3% (p/v), el procedimiento para dispersar el galactomanano en agua fue modificado, tal como se describió en la sección 2.7.1. El GMNDR a las concentraciones de 5 y 10 % p/v formó un gel con las propiedades mecánicas necesarias para soportar la manipulación en la elaboración de la muestra (Figura 4.5); mientras que los geles preparados a partir de hidrolizados enzimáticos no pudieron ser manipulados, ya que su estructura fue muy débil y al cortarlo con un filo se destruía. Este comportamiento se debe al debilitamiento de la estructura por la disminución de los enredamientos entre las cadenas del polisacárido, así como una disminución en los tiempos de relajación como consecuencia de la disminución del peso molecular por la hidrólisis enzimática. Es interesante señalar que, aunque los hidrolizados de alto peso molecular formaron un gel débil a la concentración del 3%, los geles al 5% y 10% no resistieron la manipulación para generar las muestras.

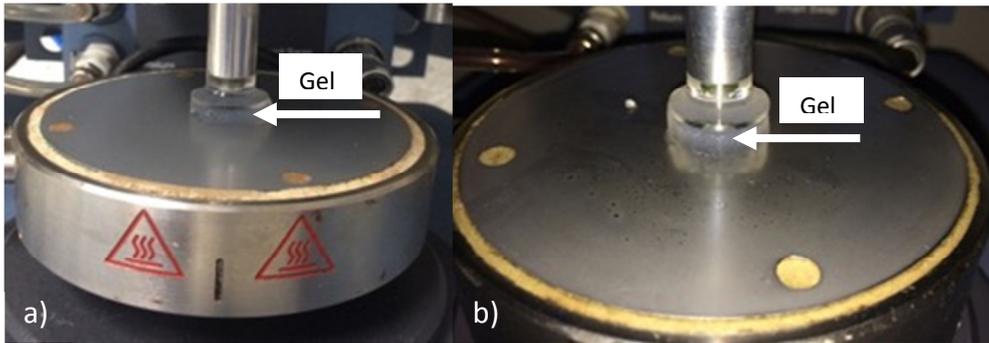


Figura 4.5 Gel del galactomanano nativo en el plato peltier para los barridos de frecuencia) al 5% p/v, b al 10% p/v).

El porcentaje de deformación seleccionado dentro de la zona viscoelástica lineal para los barridos de frecuencia fue del 0.1% (para deformar lo menos posible la muestra). Los barridos de frecuencia se muestran en la Figura 4.6, en la cual se observó que, aunque los módulos obtenidos son altos, éstos siguen teniendo una dependencia con la frecuencia aplicada; lo cual es característico de una estructura del tipo gel débil. Los valores de los módulos elástico y de pérdida de los geles al 5 y 10% mostrados en la Figura 4.6 comparados con los valores del gel débil del nativo al 3% presentado en la Figura 3.6, muestran que el módulo se incrementó casi en un orden de magnitud para la concentración del 5%, lo cual permitió que el gel sea manipulado. A la frecuencia de 3.16 rad/s, los geles del GMNDR al 5% y 10 % tuvieron un módulo elástico de 1600 ± 325 (Pa) y 10750 ± 919 (Pa), respectivamente. Son pocos los trabajos donde se generen geles de galactomanano con módulos altos sin la adición de algún otro componente. Por ejemplo, geles débiles de algarrobo fueron formados a partir de dispersiones acuosas al 4 % p/v sometidas a ciclos térmicos de -15 °C a 25 °C [74]. El valor del módulo elástico obtenido en este trabajo para el gel del 5% fue similar al valor del módulo elástico obtenido en el gel formado por los ciclos térmicos ≈ 1500 Pa a 3.16 rad/s, sin la necesidad de usar ciclos térmicos y con una temperatura de 70 °C.

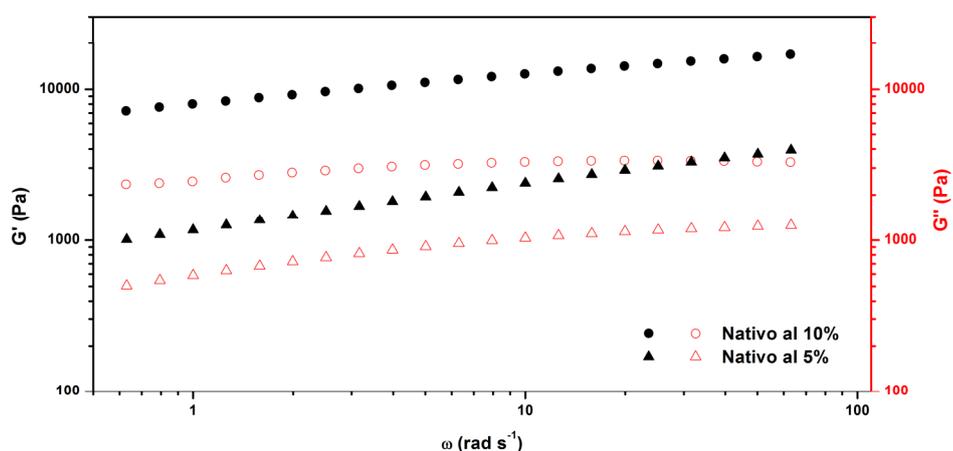


Figura 4.6 Barridos de frecuencia de los geles del GMNDR: 5% p/v (▲△), 10% p/v (●○).

A los geles se les realizó la prueba de fluencia. El comportamiento de los geles al ser sometidos a un esfuerzo constante de 50 Pa se muestra en la Figura 4.7. El gel del 5% tuvo una deformación máxima del 17% y una recuperación del 73%; como era de esperarse, el gel con una concentración del 10% tuvo una menor deformación máxima, siendo ésta de 1.6% y una mayor recuperación alcanzando el 86%. Esto es debido a la mayor cantidad de enredamientos en la estructura molecular del polisacárido, por lo que se requiere una mayor energía para deformar la estructura ya que cada enredamiento actúa como un resorte; además de que los enredamientos pueden almacenar más energía en forma de recuperación elástica. La fluencia sigue en forma muy cercana el modelo de Burger descrito por la Ec. 10, obteniendo los parámetros que se observan en la Tabla 4.4. Estos ajustes se realizaron por medio del software Origin 8, introduciendo la ecuación de Burger y usando como valores iniciales los parámetros calculados con los gráficos.

Tabla 4.4 Parámetros del modelo mecánico viscoelástico lineal de Burger para la prueba de fluencia ajustados a los datos experimentales de los geles del galactomanano al 5% y 10% (p/v).

Concentración (p/v)	E_M (Pa)	E_K (Pa)	η_M (Pa*s)	η_K (Pa*s)	ϵ_{max} (%)	Recuperación (%)
5%	2,158.19	639.44	147,146	3,111	17.76	73.44
10%	12,533.9	8,016.25	2.258E6	27,020	1.65	86.01

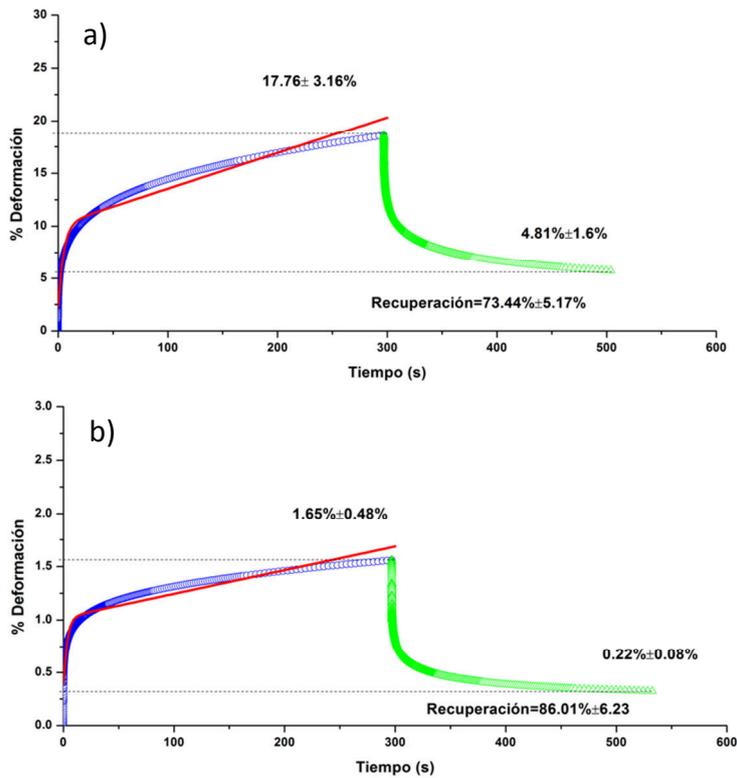


Figura 4.7 Curvas de fluencia de los geles de galactomanano nativo con un esfuerzo constante de 50 Pa. a) 5% (p/v), b) 10% (p/v).

4.6 Geles de Galactomanano del *Delonix regia* mezclada con k-Carragenano.

4.6.1 Temperatura de gelación de las SFPs que contienen k-Carr.

A altas temperaturas y baja fuerza iónica las cadenas del k-carr disueltas en agua se encuentra en un estado conformacional aleatorio (random coil). Cuando la temperatura decrece se produce una transición de una estructura aleatoria a una estructura helicoidal; bajando aun mas la temperatura las hélices del k-Carr empiezan a agregarse formando una estructura interconectada, en la cual las moléculas de agua quedan atrapadas formando un sólido tipo gel [75][75], [76]. Este fenómeno pudo ser observado en los barridos de temperatura a los que fueron sometidas los geles que contenían k-carr como se muestra en las Figura 4.8 a), b), c), y d). Cuando los geles se calentaron a 60 °C el módulo de pérdida (G'') fue mayor que el módulo elástico (G') debido a la conformación aleatoria de las moléculas, por lo que, la mayor parte de la energía aplicada se disipó como calor por el flujo viscoso. Por otra parte, al disminuir la temperatura en la etapa de enfriamiento los valores de los módulos cambiaron drásticamente en un intervalo de temperatura, en el cual se dio un cambio en los módulos pasando a ser mayor G' que G'' . La temperatura a la cual los módulos se

cruzaron se tomó como el valor de la formación del gel (T_G) [55]. A esta temperatura se generó la agregación entre las cadenas helicoidales de las cadenas del k-carr, lo que genera una estructura tridimensional; ocasionando que la mayor parte de la energía aplicada se almacene como una deformación elástica ($G' > G''$). En el siguiente paso de calentamiento, al aumentar la temperatura los módulos presentaron otro cruzamiento en el cual G'' se volvió mayor que G' , la temperatura a la que se dio este cruce se tomó como la temperatura de fundido, T_f , donde la estructura del gel es destruida por la energía cinética adquirida por las moléculas, y el regreso a la conformación aleatoria de las cadenas del k-carr. Únicamente las dispersiones que contenían k-Carr en 40% en peso en su formulación fueron capaces de formar geles a esta concentración. Los valores de las T_G y T_f de los geles se presentan en la Tabla 4.5. La T_G de las dispersiones de solo k-carr tuvo un valor de 22.5 °C y su T_f 43.9 °C. Estos valores corresponden a la T_G más baja y la T_f más alta de todos los sistemas capaces de formar geles. Para los geles que contenían la mezcla de galactomanano y k-carr, la T_G y T_f decrecieron 11 y 14 °C respectivamente comparada con el gel formado con la dispersión de solo k-carr. La disminución de la T_G por la adición del galactomanano ha sido observada también por otros autores donde la T_G fue determinada por medio de la medición de los cambios en la conductividad del sistema [16].

Tabla 4.5. Valores de la temperatura de gelación (T_G) y fundido (T_f) de los geles formados a partir de las dispersiones de k-carr y la mezcla de este con galactomananos de diferentes pesos moleculares.

	T_G (°C)	T_f (°C)
k-Carr	^c 22.5± 2.83	^a 43.95± 1.63
GMNDR:k-Carr	^b 13.6± 0.28	^b 31.75± 0.78
HAPM:k-Carr	^a 9± 1.13	^b 28.65± 0.78
HMPM:k-Carr	^a ^b 10.2± 0.99	^b 29.35± 1.63
HBPM:k-Carr	^a ^b 10.3± 0.78	^b 29.65± 0.78

Muestras con letras diferentes en la misma columna presentan diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

Los resultados obtenidos sugieren que la agregación de las cadenas fue entorpecida por la presencia de las cadenas del galactomanano en las dispersiones. Además, es conocido que la presencia de azúcares en soluciones de k-carr ayudan a la estructuración de la red tridimensional en la formación del gel actuando como un agente entrecruzante físico por puentes de hidrógeno, aumentando la fuerza del gel, así como la T_G y la T_f . El

carragenano comercial usado en este trabajo contiene dextrosa en su formulación según la ficha técnica del proveedor. Las cadenas del galactomanano pueden estar interfiriendo en la agregación de las dobles hélices del k-Carr y/o con los puentes de hidrógeno entre la dextrosa y el k-carr. Un debilitamiento en la estructura del gel también se observó en los barridos de frecuencia (Figura 4.9), donde el valor de G' de todos los geles que contienen galactomanano fueron menores al gel que solo contiene k-carr. Por otra parte, los valores de T_G y T_f no se vieron afectados por la reducción del M_n del galactomanano; sin embargo, los módulos si se vieron afectados por la reducción del peso molecular, teniendo una reducción en su valor conforme el peso molecular fue disminuyendo. Por otra parte, se puede observar que la presencia del k-carr les confiere a los geles un carácter de gel fuerte, a diferencia de los geles del GMNDR al 5 y 10% (Figura 4.6) discutidos previamente. La presencia de k-carr da entrecruzamientos más fuertes y estructurados que los que se generan por enredos físicos, como los de los geles de solo galactomanano, esto se observó en la nula dependencia a la frecuencia de los módulos del gel de solo k-carr y en los de las mezcla de galactomanano con k-carr; en estos últimos se observó un incremento en los módulos al incrementar la frecuencia, esto se debe a efectos de inercia en la prueba, ya que al disminuir los módulos de los geles los efectos inerciales del equipo o la geometría se tornan considerables.

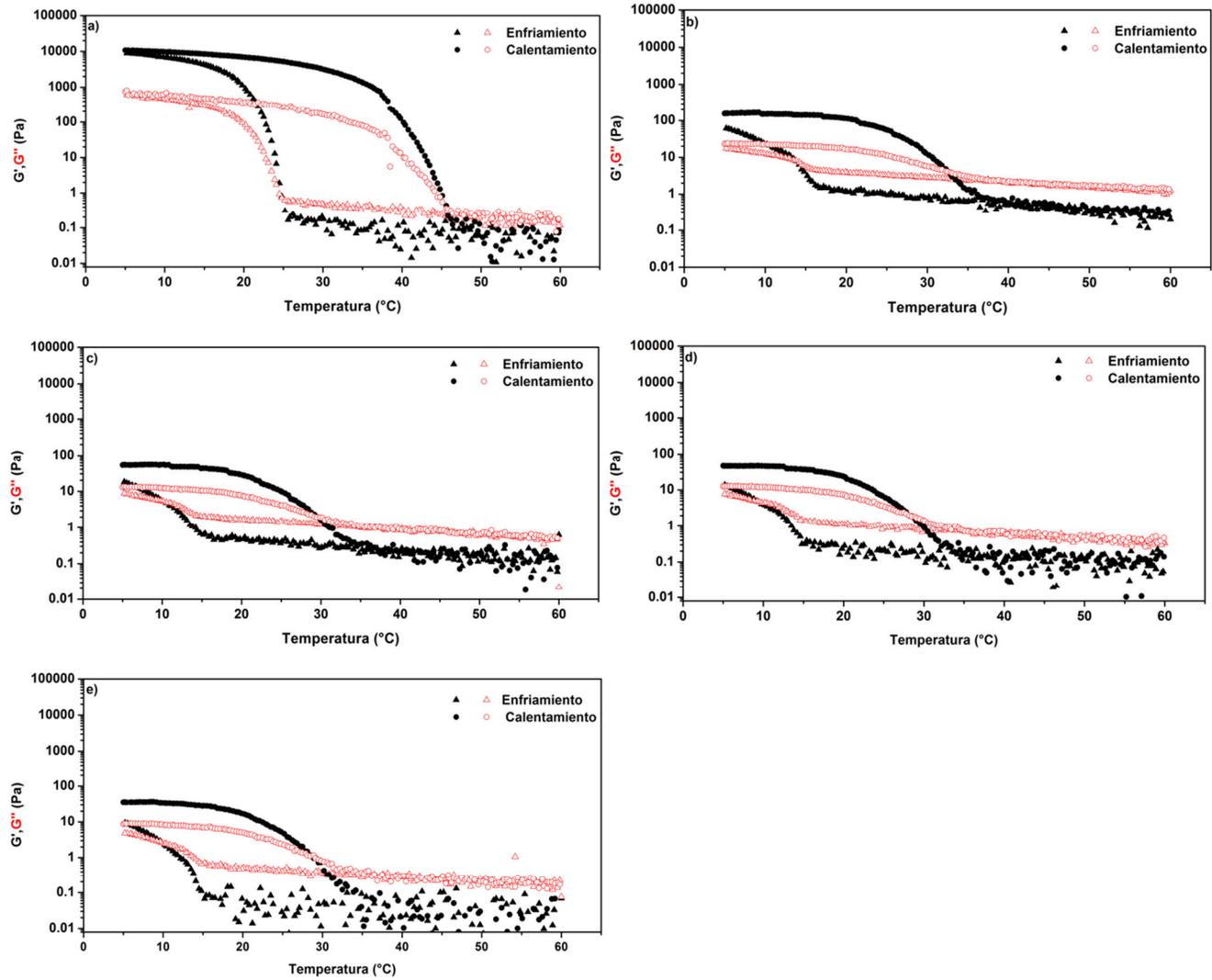


Figura 4.8. Barridos de temperatura de los geles de: a) k-carr, b) GMNDR:k-carr, c) HAPM:k-carr, d) HMPM:k-carr y e) HBPM:k-carr.

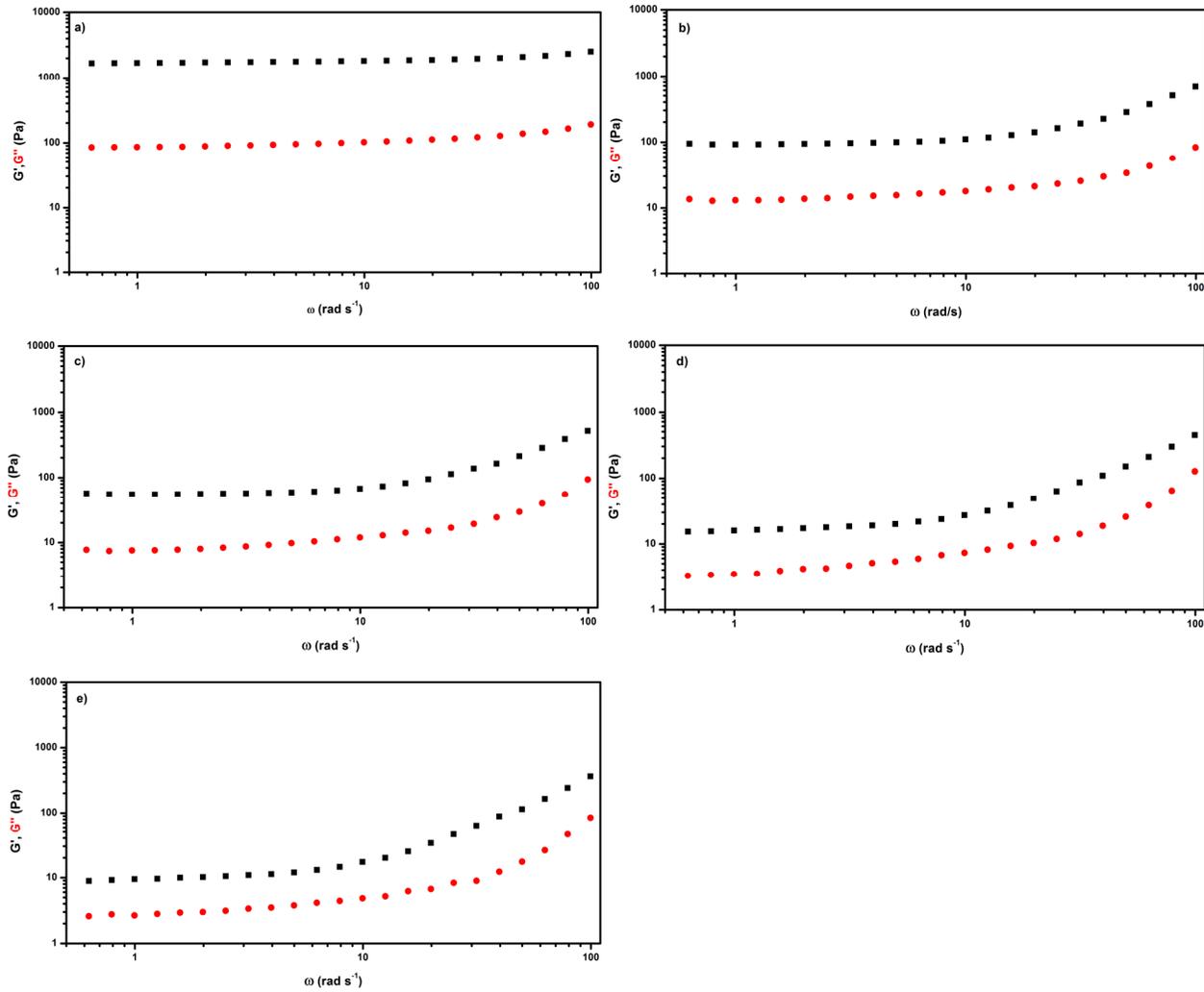


Figura 4.9. Barridos de frecuencia de los geles de: a) k-carr, b) GMNDR:k-carr, c) HAPM:k-carr, d) HMPM:k-carr y e) HBPM:k-carr.

4.7 Geles de GMNDR e hidrolizados usando como solvente un Líquido Iónico.

Para la formación de los geles usando como disolvente el líquido iónico cloruro de 1-butil,3-metilimidazol se tuvo que mantener a 100°C por 48 horas la dispersión para su completa homogeneización. El tiempo para disolver el galactomanano fue mayor al reportado por otros autores, quienes reportan un tiempo de 5 horas a 100 °C para solubilizar el galactomanano del guar, y 20 minutos para la formación del gel [77]. En este caso para la formación del gel la solución se dejó 48 horas al ambiente (Figura 4.10), se observó que al dejar expuesta la solución inmediatamente se formó una capa de líquido transparente sobre ella.

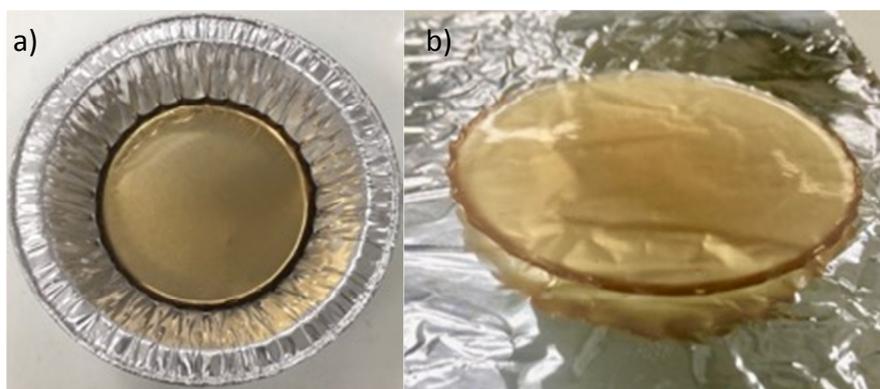


Figura 4.10 a) Solución de Galactomanano del *Delonix regia* al 10% (p/v) en BMIMCl, b) gel formado pasadas 48 horas expuesto al ambiente y 5 minutos en etanol al final.

Este fenómeno fue reportado por varios autores como la expulsión del exceso de líquido iónico hacia la superficie del gel [22], [24], [78], [79], el cual se remueve por medio de lavados con etanol o acetona. En este caso se observó que el líquido iónico presenta una viscosidad muy alta en su forma líquida; sin embargo, el líquido en la superficie del gel fue fluido, por lo que se midió el cambio del peso contra el tiempo. Para determinar el tiempo de estabilización del gel, se pesó por 10 días las disoluciones del galactomanano al 10% en el líquido iónico a una atmósfera controlada teniendo la humedad relativa en $\sim 75\%$. Los resultados se muestran en la Figura 4.11, donde se puede observar el incremento del peso de la muestra y la velocidad de absorción de agua fue disminuyendo, en el transcurso del tiempo.

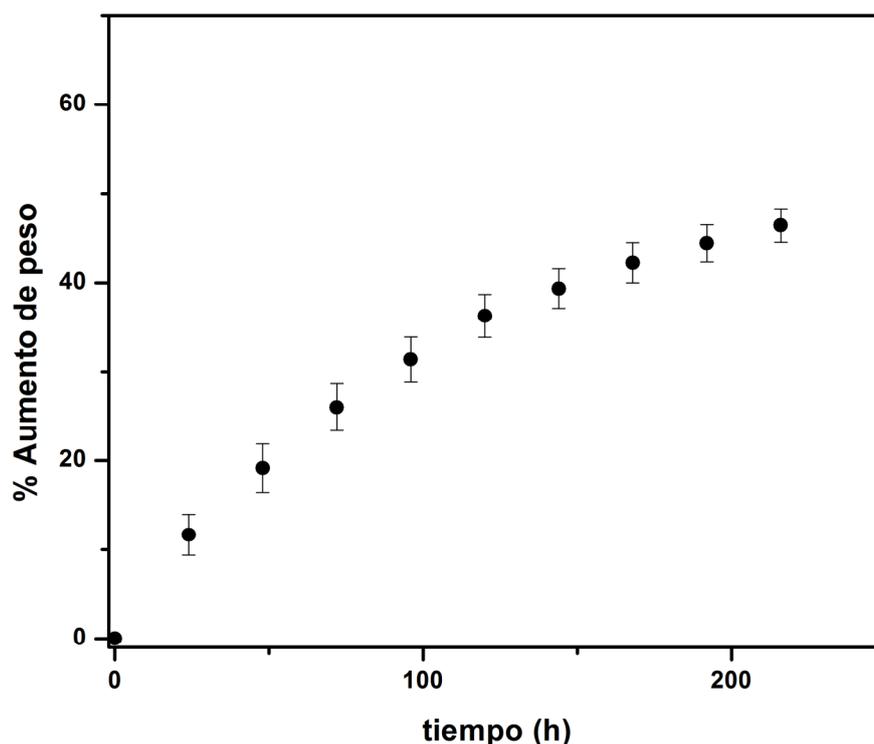


Figura 4.11. Curva de absorción de agua del entorno de la dispersión del GMNDR en el LI cloruro de 1-butil 3-metilimidazol al 10% p/v en función del tiempo.

Debido al carácter higroscópico del BMIMCl y del galactomanano, la solución fue absorbiendo agua del medio ambiente, el BMIMCl es más soluble que el galactomanano en el agua y migra hacia la superficie donde el agua se encuentra en mayor concentración. El agua absorbida por la solución funciona como un agente de entrecruzamiento para la formación del gel como fue reportado en la formación de geles de celulosa con BMIMCl [77]. Para verificar esto, una solución del galactomanano del *Delonix regia* al 10% (p/p) en BMIMCl se dejó por 48 horas en un desecador. Pasado el tiempo, la solución en el desecador era un material altamente viscoso, a éste se le realizó un barrido de frecuencia para ver su comportamiento viscoelástico. Se observó que a bajas frecuencias hubo una tendencia a la formación de una zona fluida, seguida por un *plateau* en G' , conocida como *rubbery plateau* del término en inglés, la cual se genera por los enredamientos entre las cadenas. No se pudo trabajar a frecuencias más bajas ya que la solución al quedar expuesta al medio ambiente inmediatamente comienza a absorber agua, por lo que, en el tiempo que transcurre durante las pruebas a bajas frecuencias tenderían a la formación del gel durante la prueba. Este comportamiento fue observado en soluciones concentradas de galactomananos en líquidos iónicos [80]. Con estos resultados se confirma que el agua absorbida del medio

ambiente es un factor importante para el proceso de gelación en este sistema, por lo que se decidió dejar las soluciones 10 días en atmósfera controlada a 75% para la formación de los geles.

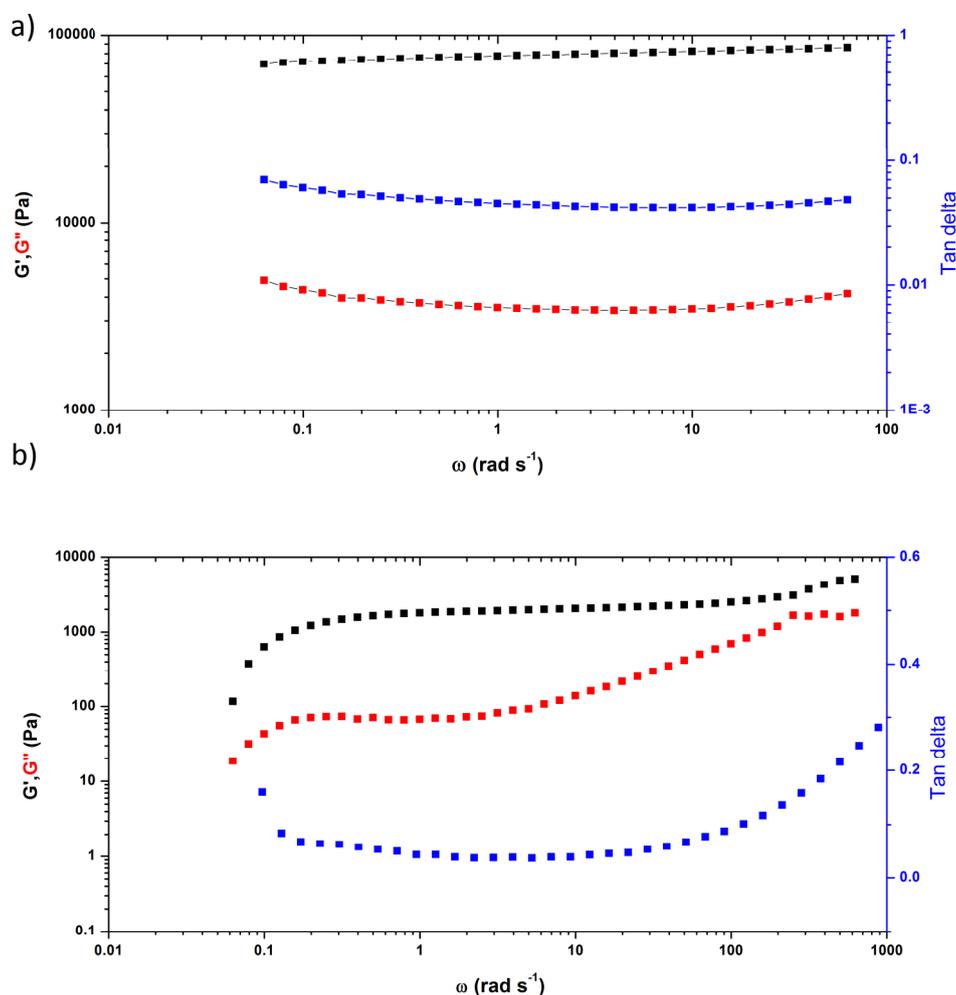


Figura 4.12 Barrido de frecuencia del Galactomanano del *Delonix regia* (GMNDR) al 10% (p/p) en BMIMCl a) gel formado en 48 h expuesto al ambiente, b) solución macromolecular concentrada formada al dejar 48 h en el desecador.

Los geles obtenidos del GMNDR, HMPM y HBPM con BMIBMCl se muestran en las Figura 4.13 a), b) y c) respectivamente. Éstos presentaron una coloración amarillenta, que probablemente se debió a la formación de melanoidinas, las cuales son el producto de la reacción entre un azúcar reductor y los grupos aminos de las proteínas (reacción de Maillard) que se caracterizan por tener un color que va del amarillo al café. Estudios previos realizados por Pacheco y col., [81] muestran que el galactomanano del *Delonix regia* tiene un contenido de proteína del 2.1%.

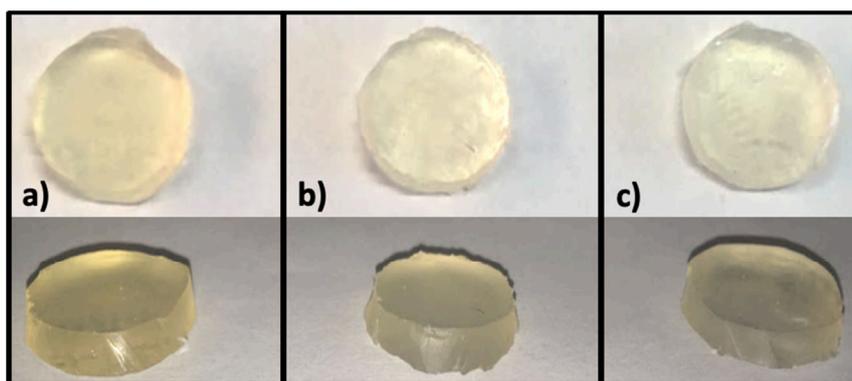


Figura 4.13. Geles formados usando BMIMCL con a) GMNDR, b) HMPM y c) HBPM.

Los barridos de frecuencia de los geles se presentan en la Figura 4.14, donde se puede observar los elevados valores obtenidos del módulo elástico, que estuvieron en el orden de 100 MPa, lo que refleja una estructura más rígida que las obtenidas en los geles elaborados con el k-carragenano (10 Pa a 1000 Pa) y el obtenido con solo el galactomanano nativo al 10% (10 MPa). El mayor módulo obtenido en los geles con el líquido iónico puede ser explicado debido a que además de que se dan los enredamientos entre las cadenas, el agua absorbida funciona como agente de enlace; además, se combina con la carga iónica del BMIMCl, el cual puede formar puentes de hidrógeno con las cadenas. Por otra parte, a diferencia de los geles obtenidos con el k-carr, en los de líquido iónico el peso molecular no afectó de manera significativa el valor de los módulos, lo cual hace suponer que el efecto de los enredamientos entre las cadenas es menor al efecto producido por los entrecruzamientos por puentes de hidrógeno que se dan entre el agua, el líquido iónico y el polisacárido. Debido a la presencia de cargas iónicas en los geles elaborados, estos podrían ser utilizados en dispositivos eléctricos dependiendo de la conductividad que estos presenten, con las ventajas que son materiales flexibles. Igualmente, se podría aprovechar su sensibilidad a la humedad exterior para su aplicación como sensores de humedad.

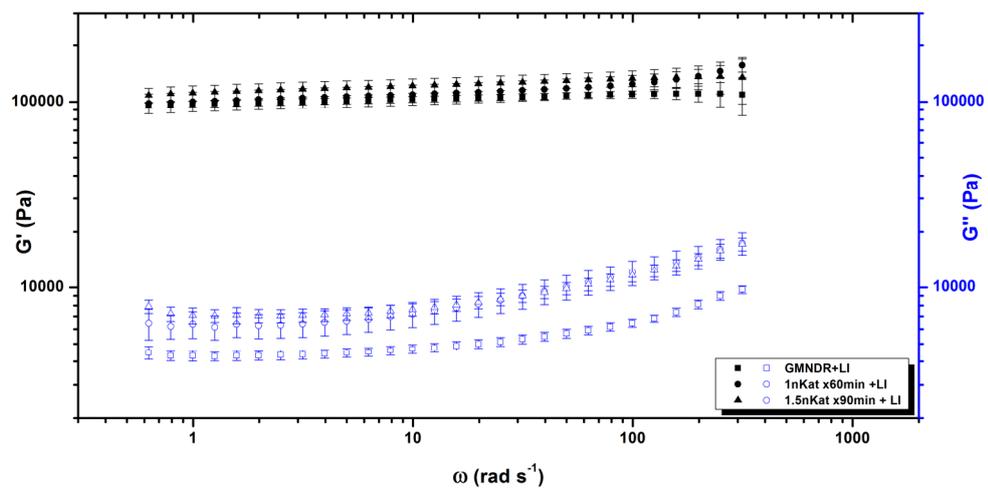


Figura 4.14. Barridos de frecuencia de los geles de GMNDR, HMPM y HBPM en BMIMCL a la concentración de 10% p/v.

CONCLUSIONES

La hidrólisis enzimática utilizando una enzima específica como la β -mananasa del *Cellvibrio japonicus*, permitió controlar la reducción del peso molecular sin un aumento considerable en la polidispersidad del galactomanano del *Delonix regia*. Al variar el peso molecular, los hidrolizados obtenidos presentaron un amplio intervalo de viscosidades al ser dispersados en agua, por lo cual podrían ser utilizados en varias aplicaciones tecnológicas donde se requiera una viscosidad a una concentración específica, ya que la hidrólisis enzimática solo cambió las propiedades reológicas por la disminución del peso molecular sin alguna otra modificación como fue corroborado por RMN, DRX y FTIR. Existe un peso molecular crítico, 4.14×10^5 Da, en el cual los enredamientos entre las cadenas disminuyen generando un abrupto cambio en las propiedades viscoelásticas de las dispersiones, con lo cual, basado en la disminución del peso molecular, se puede determinar si se obtendrán dispersiones predominantemente viscosas o elásticas, lo cual permitiría la adecuada selección de parámetros de la hidrólisis para una aplicación requerida. Por otra parte, los ajustes a los modelos reológicos de las curvas de flujo realizadas a las dispersiones de los HGDR permiten estimar que peso molecular se requiere para obtener una viscosidad a una concentración y una velocidad de corte específicas. La incorporación del k-carragenano en las dispersiones mostró la existencia de una interacción entre los polisacáridos, la cual fue observada a partir del HMPM donde la viscosidad del hidrolizado permitió ver esta interacción en un aumento de la viscosidad al mezclarlo con el k-carragenano. Además, el GMNDR y los hidrolizados fueron capaces de formar películas flexibles con buenas propiedades ópticas y mecánicas, las cuales presentaron valores de permeación de vapor de agua similares a los encontrados en la literatura para usos en el área de alimentos, con la ventaja de que, al disminuir el peso molecular, la viscosidad del sistema disminuyó. El efecto de la adición del k-carragenano en las películas de galactomananos se observó en un aumento al 100% de la solubilidad y una disminución en la permeación de vapor de agua con los hidrolizados del GMNDR. La reducción del peso molecular debilitó la formación de geles del galactomanano; a las concentraciones de 5% y 10% solo el GMNDR fue capaz de formar geles que pudiesen ser manipulados para darles forma. Por otra parte, la adición de k-carragenano en una relación de 60:40 (galactomanano:k-carragenano) a una concentración del 1% (p/v) en agua permitió

formar geles termorreversibles con la suficiente fuerza para ser manipulados. El galactomanano interfirió en la agregación de las cadenas del k-carragenano disminuyendo el valor de los módulos, al igual que la reducción del peso molecular; otro efecto fue que el galactomanano disminuyó la temperatura de gelación y fusión de los geles. Finalmente, el uso del líquido iónico como disolvente del GMNDR y los hidrolizados permitió la formación de geles fuertes con elevados módulos; se concluyó que el agua absorbida del medio ambiente es el responsable de la gelación actuando como agente de entrecruzamiento para la formación de los geles.

Bibliografía

- [1] M. a. Cerqueira *et al.*, “Structural and thermal characterization of galactomannans from non-conventional sources,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 83, no. 1, pp. 179–185, 2011.
- [2] M. Srivastava and V. P. Kapoor, “Seed galactomannans: An overview,” *Chem. Biodivers.*, vol. 2, no. 3, pp. 295–317, 2005.
- [3] Y. Tamaki, T. Teruya, and M. Tako, “The chemical structure of galactomannan isolated from seeds of *Delonix regia.*,” *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, vol. 74, no. 5, pp. 1110–2, Jan. 2010.
- [4] A. Gandini, “Polymer from renewable resources: A challenge for the future of macromolecular materials,” *Macromol.*, vol. 41, no. 24, pp. 9491–9504, 2008.
- [5] V. D. Prajapati *et al.*, “Galactomannan: A versatile biodegradable seed polysaccharide,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 60, pp. 83–92, Sep. 2013.
- [6] I. E. Isik and M. H. Ozkul, “Utilization of polysaccharides as viscosity modifying agent in self-compacting concrete,” *Constr. Build. Mater.*, vol. 72, pp. 239–247, 2014.
- [7] W. Sittikijyothin, D. Torres, and M. P. Gonçalves, “Modelling the rheological behaviour of galactomannan aqueous solutions,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 59, no. 3, pp. 339–350, 2005.
- [8] D. Cheneler and J. Bowen, “Degradation of polymer films,” *Soft Matter*, vol. 9, no. 2, pp. 344–358, 2013.
- [9] K. S. Mikkonen, H. Rita, H. Helén, R. A. Talja, L. Hyvönen, and M. Tenkanen, “Effect of polysaccharide structure on mechanical and thermal properties of galactomannan-based films,” *Biomacromolecules*, vol. 8, no. 10, pp. 3198–3205, 2007.
- [10] M. A. Cerqueira *et al.*, “Use of galactomannan edible coating application and storage temperature for prolonging shelf-life of ‘Regional’ cheese,” *J. Food Eng.*, vol. 97, no. 1, pp. 87–94, 2010.
- [11] C. Rojas-Argudo, M. A. A. del Río, and M. B. B. Pérez-Gago, “Development and optimization of locust bean gum (LBG)-based edible coatings for postharvest storage of ‘Fortune’ mandarins,” *Postharvest Biol. Technol.*, vol. 52, no. 2, pp. 227–234, 2009.

- [12] J. H. Han, "9. Edible Films and Coatings: A Review," in *Innovations in Food Packaging*, Segunda., Elsevier, 2014.
- [13] M. a. Cerqueira, Á. M. Lima, J. a. Teixeira, R. a. Moreira, and A. a. Vicente, "Suitability of novel galactomannans as edible coatings for tropical fruits," *J. Food Eng.*, vol. 94, no. 3–4, pp. 372–378, 2009.
- [14] J. T. Martins, M. A. Cerqueira, A. I. Bourbon, A. C. Pinheiro, B. W. S. Souza, and A. A. Vicente, "Synergistic effects between κ -carrageenan and locust bean gum on physicochemical properties of edible films made thereof," *Food Hydrocoll.*, vol. 29, no. 2, pp. 280–289, Dec. 2012.
- [15] R. Lapasin and S. Pricl, *Rheology of Industrial Polysaccharides: Theory and Applications*. Boston, MA: Springer US, 1995.
- [16] D. E. Dunstan, Y. Chen, M. L. Liao, R. Salvatore, D. V. Boger, and M. Prica, "Structure and rheology of the κ -carrageenan/locust bean gum gels," *Food Hydrocoll.*, vol. 15, no. 4–6, pp. 475–484, 2001.
- [17] P. H. Richardson and I. T. Norton, "Gelation behavior of concentrated locust bean gum solutions," *Macromolecules*, vol. 31, no. 5, pp. 1575–1583, 1998.
- [18] P. H. Richardson, A. H. Clark, A. L. Russell, P. Aymard, and I. T. Norton, "Galactomannan Gelation: A Thermal and Rheological Investigation Analyzed Using the Cascade Model," *Macromolecules*, vol. 32, no. 5, pp. 1519–1527, 1999.
- [19] B. Clare, A. Sirwardana, and D. R. Macfarlane, "Synthesis, purification and characterization of ionic liquids.," *Top. Curr. Chem.*, vol. 290, pp. 1–40, 2010.
- [20] D. Rooney, J. Jacquemin, and R. Gardas, "Thermophysical properties of ionic liquids.," *Top. Curr. Chem.*, vol. 290, pp. 185–212, 2010.
- [21] O. A. El Seoud, A. Koschella, L. C. Fidale, S. Dorn, and T. Heinze, "Applications of ionic liquids in carbohydrate chemistry: A window of opportunities," *Biomacromolecules*, vol. 8, no. 9, pp. 2629–2647, 2007.
- [22] J. I. Kadokawa, M. A. Murakami, and Y. Kaneko, "A facile preparation of gel materials from a solution of cellulose in ionic liquid," *Carbohydr. Res.*, vol. 343, no. 4, pp. 769–772, 2008.
- [23] J. Kadokawa, "Preparation of Polysaccharide-based Materials Compatibilized with Ionic Liquids," 2009.
- [24] L. Verger, S. Corre, R. Poirot, G. Quintard, E. Fleury, and A. Charlot, "Dual guar/ionic liquid gels and biohybrid material thereof: Rheological investigation,"

- Carbohydr. Polym.*, vol. 102, no. 1, pp. 932–940, 2014.
- [25] F. C. A. Buriti *et al.*, “Characterisation of partially hydrolysed galactomannan from *Caesalpinia pulcherrima* seeds as a potential dietary fibre,” *Food Hydrocoll.*, vol. 35, pp. 512–521, Mar. 2014.
- [26] S. S. Nielsen, “Total Carbohydrate by Phenol-Sulfuric Acid Method BT - Food Analysis Laboratory Manual,” S. S. Nielsen, Ed. Cham: Springer International Publishing, 2017, pp. 137–141.
- [27] P. L. R. R. Cunha *et al.*, “Isolation and characterization of galactomannan from *Dimorphandra gardneriana* Tul. seeds as a potential guar gum substitute,” *Food Hydrocoll.*, vol. 23, no. 3, pp. 880–885, May 2009.
- [28] P. A. Dakia, C. Blecker, C. Robert, B. Wathelet, and M. Paquot, “Composition and physicochemical properties of locust bean gum extracted from whole seeds by acid or water dehulling pre-treatment,” *Food Hydrocoll.*, vol. 22, no. 5, pp. 807–818, 2008.
- [29] S. M. Ali Razavi, A. Alghooneh, F. Behrouzian, and S. W. Cui, “Investigation of the interaction between sage seed gum and guar gum: Steady and dynamic shear rheology,” *Food Hydrocoll.*, vol. 60, pp. 67–76, 2016.
- [30] M. J. Costa, A. M. Marques, L. M. Pastrana, J. A. Teixeira, S. M. Sillankorva, and M. A. Cerqueira, “Physicochemical properties of alginate-based films: Effect of ionic crosslinking and mannuronic and guluronic acid ratio,” *Food Hydrocoll.*, vol. 81, pp. 442–448, 2018.
- [31] V. R. F. Dos Santos, B. W. S. Souza, J. A. Teixeira, A. A. Vicente, and M. A. Cerqueira, “Relationship between galactomannan structure and physicochemical properties of films produced thereof,” *J. Food Sci. Technol.*, vol. 52, no. 12, pp. 8292–8299, Dec. 2015.
- [32] M. A. Pollard and P. Fischer, “Partial aqueous solubility of low-galactose-content galactomannans—What is the quantitative basis?,” *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, vol. 11, no. 2–3, pp. 184–190, Jun. 2006.
- [33] F. Rashid, S. Hussain, and Z. Ahmed, “Extraction purification and characterization of galactomannan from fenugreek for industrial utilization,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 180, no. October 2017, pp. 88–95, Jan. 2018.
- [34] M. a. Cerqueira *et al.*, “Extraction, purification and characterization of galactomannans from non-traditional sources,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 75, no. 3, pp. 408–414, 2009.

- [35] H. lei Jian, C. Cristhian, W. ming Zhang, and J. xin Jiang, "Influence of dehulling pretreatment on physicochemical properties of *Gleditsia sinensis* Lam. gum," *Food Hydrocoll.*, vol. 25, no. 5, pp. 1337–1343, 2011.
- [36] L. M. Nwokocho, P. A. Williams, and M. P. Yadav, "Physicochemical characterisation of the galactomannan from *Delonix regia* seed," *Food Hydrocoll.*, vol. 78, pp. 132–139, May 2018.
- [37] S. Barak and D. Mudgil, "Locust bean gum: Processing, properties and food applications-A review," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 66, pp. 74–80, 2014.
- [38] Y. Cheng, K. M. Brown, and R. K. Prud'homme, "Preparation and characterization of molecular weight fractions of guar galactomannans using acid and enzymatic hydrolysis," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 31, no. 1–3, pp. 29–35, Dec. 2002.
- [39] Y. Cheng and R. K. Prud'homme, "Enzymatic Degradation of Guar and Substituted Guar Galactomannans," *Biomacromolecules*, vol. 1, no. 4, pp. 782–788, Dec. 2000.
- [40] T. Muschin and T. Yoshida, "Structural analysis of galactomannans by NMR spectroscopy," *Carbohydr. Polym.*, vol. 87, no. 3, pp. 1893–1898, 2012.
- [41] Í. G. P. Vieira, F. N. P. Mendes, M. I. Gallão, and E. S. de Brito, "NMR study of galactomannans from the seeds of mesquite tree (*Prosopis juliflora* (Sw) DC)," *Food Chem.*, vol. 101, no. 1, pp. 70–73, Jan. 2007.
- [42] D. Mudgil, S. Barak, and B. S. Khatkar, "Guar gum: processing, properties and food applications—A Review," *Journal of Food Science and Technology*, vol. 51, no. March. pp. 409–418, 2011.
- [43] Y. L. López-Franco, C. I. Cervantes-Montaño, K. G. Martínez-Robinson, J. Lizardi-Mendoza, and L. E. Robles-Ozuna, "Physicochemical characterization and functional properties of galactomannans from mesquite seeds (*Prosopis* spp.)," *Food Hydrocoll.*, vol. 30, no. 2, pp. 656–660, 2013.
- [44] D. Mudgil, S. Barak, and B. S. Khatkar, "X-ray diffraction, IR spectroscopy and thermal characterization of partially hydrolyzed guar gum," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 50, no. 4, pp. 1035–1039, 2012.
- [45] D. Li *et al.*, "Structural and physicochemical changes in guar gum by alcohol–acid treatment," *Carbohydr. Polym.*, vol. 179, no. September 2017, pp. 2–9, 2018.
- [46] H. A. Pawar and K. G. Lalitha, "Isolation, purification and characterization of

- galactomannans as an excipient from Senna tora seeds,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 65, pp. 167–175, 2014.
- [47] M. POLLARD *et al.*, “Investigation of equilibrium solubility of a carob galactomannan,” *Food Hydrocoll.*, vol. 21, no. 5–6, pp. 683–692, Jul. 2007.
- [48] T. Gao, R. Xie, L. Zhang, H. Gui, and M. Huang, “Use of Rubber Process Analyzer for Characterizing the Molecular Weight Parameters of Natural Rubber,” *Int. J. Polym. Sci.*, vol. 2015, pp. 1–6, 2015.
- [49] J. Roovers, “Linear Viscoelastic Properties of Polybutadiene. A Comparison with Molecular Theories,” *Polym. J.*, vol. 18, no. 2, pp. 153–162, Feb. 1986.
- [50] J. R. Stokes, M. W. Boehm, and S. K. Baier, “Oral processing, texture and mouthfeel: From rheology to tribology and beyond,” *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, vol. 18, no. 4, pp. 349–359, 2013.
- [51] M. Hussain, S. Bakalis, O. Gouseti, T. Zahoor, F. M. Anjum, and M. Shahid, “Dynamic and shear stress rheological properties of guar galactomannans and its hydrolyzed derivatives,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 72, pp. 687–691, 2015.
- [52] W. M. Kulicke and R. S. Porter, “Relation between steady shear flow and dynamic rheology,” *Rheol. Acta*, vol. 19, no. 5, pp. 601–605, Sep. 1980.
- [53] E. G. Azero and C. T. Andrade, “Characterisation of Prosopis juliflora seed gum and the effect of its addition to κ -carrageenan systems,” *J. Braz. Chem. Soc.*, vol. 17, no. 5, pp. 844–850, 2006.
- [54] M. Grisel, Y. Aguni, F. Renou, and C. Malhiac, “Impact of fine structure of galactomannans on their interactions with xanthan: Two co-existing mechanisms to explain the synergy,” *Food Hydrocoll.*, vol. 51, pp. 449–458, 2015.
- [55] A. C. Pinheiro *et al.*, “Rheological characterization of κ -carrageenan/galactomannan and xanthan/galactomannan gels: Comparison of galactomannans from non-traditional sources with conventional galactomannans,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 83, no. 2, pp. 392–399, Jan. 2011.
- [56] C. Sandolo *et al.*, “Synergistic interaction of Locust Bean Gum and Xanthan investigated by rheology and light scattering,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 82, no. 3, pp. 733–741, 2010.
- [57] P. Montero, C. Gómez-Guillén, E. López-Caballero, and G. V Barbosa-Canovas, *Edible Films and Coatings: Fundamentals and Applications*. Taylor & Francis, 2016.
- [58] W. Rodriguez-Canto, L. Chel-Guerrero, V. V. A. Fernandez, and M. Aguilar-

- Vega, “Delonix regia galactomannan hydrolysates: Rheological behavior and physicochemical characterization,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 206, no. August 2018, pp. 573–582, Feb. 2019.
- [59] M. A. Cerqueira, B. W. S. Souza, J. A. Teixeira, and A. A. Vicente, “Effect of glycerol and corn oil on physicochemical properties of polysaccharide films - A comparative study,” *Food Hydrocoll.*, vol. 27, no. 1, pp. 175–184, May 2012.
- [60] J. E. Li, W. J. Wang, G. D. Zheng, and L. Y. Li, “Physicochemical properties and antioxidant activities of polysaccharides from *Gynura procumbens* leaves by fractional precipitation,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 95, pp. 719–724, 2017.
- [61] E. Gómez-Ordóñez and P. Rupérez, “FTIR-ATR spectroscopy as a tool for polysaccharide identification in edible brown and red seaweeds,” *Food Hydrocoll.*, vol. 25, no. 6, pp. 1514–1520, 2011.
- [62] P. Volery, R. Besson, and C. Schaffer-Lequart, “Characterization of commercial carrageenans by Fourier transform infrared spectroscopy using single-reflection attenuated total reflection,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 52, no. 25, pp. 7457–7463, 2004.
- [63] J. Antoniou, F. Liu, H. Majeed, H. J. Qazi, and F. Zhong, “Physicochemical and thermomechanical characterization of tara gum edible films: Effect of polyols as plasticizers,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 111, pp. 359–365, Oct. 2014.
- [64] J.-W. Rhim, “Physical-Mechanical Properties of Agar/ κ -Carrageenan Blend Film and Derived Clay Nanocomposite Film,” *J. Food Sci.*, vol. 77, no. 12, pp. N66–N73, Dec. 2012.
- [65] J. Borges Laurindo, “Barrier Properties of Films,” in *Edible films and coatings Fundamentals and Applications*, First., G. V. Barbosa-Cánovas, Ed. CRC Press, 2017, p. 585.
- [66] M. A. Cerqueira, B. W. S. Souza, J. A. Teixeira, and A. A. Vicente, “Effect of glycerol and corn oil on physicochemical properties of polysaccharide films – A comparative study,” *Food Hydrocoll.*, vol. 27, no. 1, pp. 175–184, May 2012.
- [67] A. M. M. Sousa and M. P. Gonçalves, “Strategies to improve the mechanical strength and water resistance of agar films for food packaging applications,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 132, pp. 196–204, Nov. 2015.
- [68] L. H. Cheng, A. Abd Karim, and C. C. Seow, “Effects of acid modification on physical properties of konjac glucomannan (KGM) films,” *Food Chem.*, vol. 103, no. 3, pp. 994–1002, Jan. 2007.

- [69] H. Zhang, H. Hou, P. Liu, W. Wang, and H. Dong, "Effects of acid hydrolysis on the physicochemical properties of pea starch and its film forming capacity," *Food Hydrocoll.*, vol. 87, no. August 2018, pp. 173–179, Feb. 2019.
- [70] E. Ayrancı, B. Ş. Büyüktaş, and E. E. Çetin, "The Effect of Molecular Weight of Constituents on Properties of Cellulose-based Edible Films," *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 30, no. 1, pp. 101–104, Feb. 1997.
- [71] M. J. Bof, V. C. Bordagaray, D. E. Locaso, and M. A. García, "Chitosan molecular weight effect on starch-composite film properties," *Food Hydrocoll.*, vol. 51, pp. 281–294, 2015.
- [72] R. Nunes, J. Martin, and J. Johnson, "Influence of molecular weight and molecular weight distribution on mechanical properties of polymers," *Polym. Eng. Sci.*, vol. 22, no. 4, pp. 205–228, 1982.
- [73] Y. Yuan and T. R. Lee, "Contact Angle and Wetting Properties," in *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, vol. 38, no. 1, 2013, pp. 3–34.
- [74] R. Tanaka, T. Hatakeyama, and H. Hatakeyama, "Formation of locust bean gum hydrogel by freezing–thawing," *Polym. Int.*, vol. 45, no. 1, pp. 118–126, 1998.
- [75] L. Du, T. Brenner, J. Xie, and S. Matsukawa, "A study on phase separation behavior in kappa/iota carrageenan mixtures by micro DSC, rheological measurements and simulating water and cations migration between phases," *Food Hydrocoll.*, vol. 55, pp. 81–88, 2016.
- [76] P. A. Williams and M. J. Langdon, "The influence of locust bean gum and dextran on the gelation of κ -carrageenan," *Biopolymers*, vol. 38, pp. 655–664, 1996.
- [77] A. Takada and J. Kadokawa, "Fabrication and characterization of polysaccharide ion gels with ionic liquids and their further conversion into value-added sustainable materials," *Biomolecules*, vol. 5, no. 1, pp. 244–62, 2015.
- [78] K. Prasad, H. Izawa, Y. Kaneko, and J. Kadokawa, "Preparation of temperature-induced shapeable film material from guar gum-based gel with an ionic liquid," *J. Mater. Chem.*, vol. 19, no. 24, p. 4088, 2009.
- [79] S. Mine, K. Prasad, H. Izawa, K. Sonoda, and J. Kadokawa, "Preparation of guar gum-based functional materials using ionic liquid," *J. Mater. Chem.*, vol. 20, no. 41, pp. 9220–9225, 2010.
- [80] J. Horinaka, R. Yasuda, and T. Takigawa, "Rheological properties of

concentrated solutions of galactomannans in an ionic liquid,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 89, no. 4, pp. 1018–1021, 2012.

- [81] J. Pacheco-Aguirre, G. Rosado-Rubio, D. Betancur-Ancona, and L. Chel-Guerrero, “Physicochemical properties of carboxymethylated flamboyant (*Delonix regia*) seed gum Propiedades fisicoquímicas de la goma carboximetilada de flamboyán (*Delonix regia*),” *CyTA - J. Food*, vol. 8, no. 3, pp. 169–176, 2010.