



Tesis para optar al Título de
Magíster en Ciencia y Tecnología de Alimentos

OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE
GOMAS PROVENIENTES DE SEMILLAS DE
ESPECIES NATIVAS DEL GÉNERO
PROSOPIS

Autor: PILAR VILARÓ LUNA

**Directores de Tesis: Prof. Dr. Luis Alberto
PANIZZOLO y
Prof. Dr. Fernando Amaury FERREIRA CHIESA**

A Matilde, que nunca calme su espíritu ávido de respuestas.

AGRADECIMIENTOS

A mis tutores por introducirme con libertad en la fisicoquímica de polímeros, a Daniel Ferrari, por haber sido mi primer tutor y haberme transmitido el gusto por la investigación, así como a Mónica Cadenazzi que inspiró mi interés por la estadística inferencial. A Pilar Menéndez, Eliana Budelli y Patricia Lema por el ánimo y los consejos en las diferentes etapas y los ricos comentarios, correcciones y discusiones que confluyeron en este trabajo. A Guillermo Moyna por la corrección final del artículo y por enseñarme a dejar un artículo “perfecto” desinteresadamente. A mis compañeros Cristina Olivaro, Luis Reina, Federico Wallace, Micaela Escobal y Francisco Báez por los consejos y por haber sido soporte de mis ansiedades, así como mis compañeros de los distintos trabajos que recuerdo con especial cariño.

Quiero agradecer formalmente a la institución a la que pertenezco el CUT, y en ella a los funcionarios que hacen posible muchas de las actividades que aquí se presentan, así como a los compañeros del INIA Tacuarembó especialmente a Guillermo de Souza, a los laboratorios LBB (Facultad de Química), al LGC (Instituto de Higiene), especialmente a María Inés Bessio y a los Lab. de Alimentos (Facultad de Ingeniería) y DQL (Litoral Norte) y a Alejandra y Rosina del Servicio de Referencia de FVET. Asimismo, a la financiación de CSIC – Iniciación y el apoyo del proyecto L4 INIA-UdelaR en que se enmarcó este trabajo.

Finalmente, a mi familia por transmitirme el amor por el conocimiento y la contemplación de la naturaleza. A mi hermano Ignacio por el entrenamiento en las discusiones familiares y a mi hermana Mercedes por las correcciones lingüísticas del inglés. A mis amigos en que he encontrado aliento e inspiración. Y, por último, a Javier y a Matilde por el apoyo y el soporte en mis ausencias y por la compañía y cariño.

TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	III
TABLA DE CONTENIDO	I
ÍNDICE DE FIGURAS.....	I
ÍNDICE DE TABLAS.....	I
RESUMEN	XI
SUMMARY	XII
1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	1
1.1. GOMAS.....	2
1.2. GALACTOMANANOS.....	2
1.2.1. Estructura de galactomananos	3
1.2.2. Elucidación estructural en galactomananos	5
1.2.3. Propiedades funcionales y uso de galactomananos.....	9
1.2.4. Relación estructura – funcionalidad	14
1.3. FUENTES DE GALACTOMANANOS	19
1.3.1. Fuentes tradicionales de galactomananos.....	19
1.3.2. Nuevas fuentes de galactomananos	20
1.3.3. <i>Prosopis spp.</i>	22
1.3.4. <i>Prosopis affinis</i> en Uruguay.....	24
1.3.5. Extracción de galactomananos	26
1.4. PARÁMETROS MACROMOLECULARES EN GALACTOMANANOS	28
1.4.1. Definiciones de las masas promedio molares y polidispersabilidad	28
1.4.2. Determinación de parámetros macromoleculares por HPLC/SEC/MALS.....	30
1.4.3. Caracterización de polímeros ramificados por dispersión de luz.....	36
1.4.4. Determinación de viscosidad intrínseca y masa molar viscosimétrica ...	39

1.5.	PARÁMETROS DE FLUENCIA EN GALACTOMANANOS.....	43
1.5.1.	<i>El parámetro crítico de superposición de cadenas c*</i>	45
1.5.2.	<i>Dependencia de la viscosidad con la concentración y el efecto cortante</i>	
	48	
2.	OBJETIVOS	54
2.1.	OBJETIVOS GENERALES	55
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	55
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	1
3.1.	MATERIAL DE REFERENCIA.....	53
3.2.	MATERIAL VEGETAL	53
3.3.	ACONDICIONAMIENTO DE LA MUESTRA.....	55
3.4.	SEPARACIÓN DEL ENDOSPERMO	55
3.5.	EXTRACCIÓN DE LOS GALACTOMANANOS	56
3.6.	PURIFICACIÓN DE GALACTOMANANOS	58
3.7.	COMPOSICIÓN DE MONOSACÁRIDOS	58
3.8.	ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA.....	58
3.9.	ANÁLISIS DE AZÚCARES Y DETERMINACIÓN DE RELACIÓN MANOSA: GALACTOSA	59
3.10.	ANÁLISIS DE METILACIÓN O DE POSICIÓN DE UNIÓN.....	59
3.11.	CONTENIDO PROTEICO	60
3.12.	ESPECTROSCOPÍA DE RMN	61
3.13.	EXPERIMENTOS DE HPLC/SEC/MALLS/RI	61
3.14.	EXPERIMENTOS REOLÓGICOS REALIZADOS EN CURVAS DE FLUJO (A ESFUERZOS DE CORTE	
FIJO)	62	
3.14.1.	DETERMINACIÓN DE LA VISCOSIDAD INTRÍNSECA Y EL PESO MOLECULAR PONDERADO EN	
VISCOSIDAD	62	

3.14.2.	VISCOSIDAD DEPENDIENTE DEL ESFUERZO DE CIZALLA.....	63
3.15.	ENSAYOS REOLÓGICOS DINÁMICOS	64
3.16.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	64
4.	RESULTADOS.....	65
4.1.	RENDIMIENTO DE EXTRACCIÓN DE GOMA DE <i>P. AFFINIS</i>	66
4.1.1.	<i>Determinación del porcentaje cuantitativo de semillas</i>	66
4.1.2.	<i>Separación de los componentes de la semilla y extracción del endospermo</i>	67
4.2.	OBTENCIÓN DEL EXTRACTO (GOMA DE <i>P. AFFINIS</i>)	70
4.2.1.	<i>De la metodología de obtención de los galactomananos</i>	70
4.2.2.	<i>De los rendimientos de extracción</i>	72
4.3.	COMPOSICIÓN DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS: ASPECTOS METODOLÓGICOS	75
4.3.1.	<i>Optimización de hidrólisis para análisis de azúcares simples por HPLC reversa y GC-MS</i>	75
4.3.2.	<i>Determinación de la relación M:G en extractos de <i>P. affinis</i> y gomas comerciales purificadas</i>	77
4.3.3.	<i>Contenido de proteína</i>	80
4.4.	COMPOSICIÓN DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS DE GM	81
4.4.1.	ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE LOS GALACTOMANANOS OBTENIDOS	82
4.5.	RELACIÓN MANOSA: GALACTOSA.....	90
4.6.	DISTRIBUCIÓN DE PESO MOLECULAR.....	91
4.7.	DETERMINACIÓN DE VISCOSIDAD INTRÍNSECA Y ESTIMACIÓN DE M_v	97
4.8.	PROPIEDADES DE FLUENCIA DE LOS GALACTOMANANOS DE <i>P. AFFINIS</i>	99
4.8.1.	<i>Viscosidad dependiente del esfuerzo de cizalla (Shear viscosity)</i>	100
4.8.2.	<i>Determinación del valor de concentración de superposición de cadenas (c^*)</i>	102

4.8.3.	<i>Estudio de tixotropía de las soluciones</i>	105
4.8.4.	<i>Comportamiento viscoso en comparación a fuentes comerciales y grado de purificación</i>	108
4.8.5.	<i>Comportamiento con la temperatura</i>	113
4.8.6.	<i>Dependencia de la viscosidad con la concentración y la magnitud de la velocidad de cizallamiento</i>	114
4.8.7.	<i>Ensayos reológicos dinámicos</i>	118
5.	CONCLUSIONES	120
6.	BIBLIOGRAFÍA	123
7.	ANEXO	142
7.1.	CALIBRACIONES UTILIZADAS.....	143
7.1.1.	<i>Determinación de galactosa y manosa</i>	143
7.1.2.	<i>Determinación del contenido de proteínas</i>	144
7.2.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	144
7.2.1.	<i>Análisis de varianza para la comparación de los rendimientos de extracción (Y_1)</i>	144
7.2.2.	<i>Análisis de varianza para la composición de extractos:</i>	145
7.2.3.	<i>Análisis estadístico de los resultados de parámetros moleculares (R_g)</i> 152	
7.2.4.	<i>Estimación de viscosidad intrínseca</i>	153
7.2.5.	<i>Curvas de flujo utilizadas para el cálculo de viscosidad intrínseca</i>	155
7.3.	ANÁLISIS DE AZÚCARES POR METILACIÓN – GC-MS	157
7.3.1.	<i>Extractos de Prosopis affinis RT</i>	157

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1-1 ESTRUCTURA GENERAL DE LOS GALACTOMANANOS	3
FIGURA 1-2: ESTRUCTURA BÁSICA DE ALGUNOS GALACTOMANANOS	4
FIGURA 1-3: DISTRIBUCIONES TEÓRICAS DE SUSTITUCIÓN DE GALACTOSILOS EN GALACTOMANANOS:.....	6
FIGURA 1-4: MODELOS DE UNA RED DE PARTÍCULAS O DE POLÍMEROS.....	10
FIGURA 1-5: COMPONENTES DE LA VAINA DE PROSOPIS SP.	23
FIGURA 1-6: DESCRIPCIÓN DEL MOVIMIENTO BROWNIANO QUE OCASIONA LA FUNCIÓN DE CORRELACIÓN EN LOS DETECTORES DE TIPO LIGHT SCATTERING	33
FIGURA 1-7: MODELO DE GRÁFICO DE ZIMM PARA EL POLIESTIRENO NIST SRM 706.	35
FIGURA 1-8: GRÁFICO DE CONFORMACIÓN DE POLIESTIRENO DETERMINADO POR SEC-MALS () PARA UN POLIESTIRENO LINEAR Y () PARA UNO RAMIFICADO	38
FIGURA 1-9: REPRESENTACIÓN GRÁFICA DEL EFECTO DE “ANCHORING” EN COLUMNAS SEC	39
FIGURA 1-10: REPRESENTACIÓN TÍPICA DE UN GRÁFICO CON ECUACIONES DE HUGGINS & KRAEMER	41
FIGURA 1-11: RELACIÓN CONCENTRACIÓN – VISCOSIDAD GENERALIZADA PARA CADENAS DE POLISACÁRIDOS	46
FIGURA 1-12: MODELO FUERZA DE CIZALLA ENTRE DOS PLANOS PARALELOS.....	48
FIGURA 1-13: MODELO DE CROSS PARA LPDE.....	52
FIGURA 3-1: MONTE DE PROSOPIS AFFINIS EN LA ZONA DE COLECTA	54
FIGURA 3-2: DISPERSIÓN GEOGRÁFICA DE LA VARIEDAD PROSOPIS AFFINIS Y ZONA DE COLECTA DE LAS MUESTRAS ..	54
FIGURA 3-3: VAINAS DE PROSOPIS AFFINIS	55
FIGURA 3-4: DIAGRAMA DE FLUJO REPRESENTATIVO DE LA EXTRACCIÓN DE GALACTOMANANOS A PARTIR DE ENDOSPERMO DE P. AFFINIS Y GOMAS COMERCIALES	57
FIGURA 4-1: PARTES DE LA SEMILLA IDENTIFICADAS LUEGO DE LA HIDRATACIÓN DE LA MUESTRA	69
FIGURA 4-2: SEGUIMIENTO DE OPTIMIZACIÓN DE TIEMPOS DE HIDROLIZADO PARA EL ANÁLISIS DE AZÚCARES POR TLC DE PRODUCTOS DE HIDRÓLISIS DE GMP _{1/80}	76
FIGURA 4-3: TLC DE PRODUCTOS DE HIDRÓLISIS DE GMP _{1/RT} Y GOMAS GUAR Y DE ALGARROBO COMERCIALES.....	76
FIGURA 4-4: ALGUNOS CROMATOGRAMAS UTILIZADOS PARA LA OBTENCIÓN DE UNA CURVA DE CALIBRACIÓN DE GALACTOSA Y MANOSA.	78

FIGURA 4-5: CROMATOGRAMA DE EXTRACTO DE GMP1/RT HIDROLIZADO	79
FIGURA 4-6: ESPECTROS ¹ H-1D NMR CON SUPRESIÓN DE AGUA (A), TOCSY (B), Y ESPECTRO HSQC (C) DE MUESTRA DE GALACTOMANANOS DE P. AFFINIS GMP _{2/RT} A 60 °C.....	87
FIGURA 4-7: EXPANSIÓN DE LA REGION ANOMÉRICA DEL ESPECTRO MONODIMENSIONAL ¹ H-RMN	89
FIGURA 4-8: PERFILES DE ELUCIÓN DE SEC/MALLS-QUELS/RI DE GALACTOMANANOS DE P. AFFINIS EXTRAÍDOS A RT.....	92
FIGURA 4-9: COMPARACIÓN DE LOS PERFILES DE DISTRIBUCIÓN DE PESO MOLECULAR DE GALACTOMANANOS PURIFICADOS A PARTIR DE P. AFFINIS Y GOMAS COMERCIALES:.....	93
FIGURA 4-10: GRÁFICO DE CONFORMACIÓN RMS RADIUS (NM) EN FUNCIÓN DEL MW PARA GMP _{2/RT} Y GMP _{2/80} (A); GG _{2/RT} Y GG _{2/80} (B); LBG _{2/RT} Y GBG _{2/80} (C).....	96
FIGURA 4-11: GRÁFICO DE FEDOR UTILIZADO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA VISCOSIDAD INTRÍNSECA DE LOS GALACTOMANANOS DE P. AFFINIS (GMP _{2/RT} Y GMP _{2/80C}) Y GG (GG _{2/RT})	98
FIGURA 4-12: CURVA DE FLUJO PARA LA OBTENCIÓN DE VISCOSIDADES INTRÍNECAS DE MUESTRAS DE P. AFFINIS (GMP _{1/RT}). A CADA CURVA OBTENIDA SE LE SUPERPONE LA REGRESIÓN LINEAL OBTENIDA (EN PUNTEADO) (MODELO NEWTONIANO).....	101
FIGURA 4-13: CURVAS DE FLUJO EN MODO ASCENDENTE Y DESCENDENTE PARA GMP1/RT	102
FIGURA 4-14: DETERMINACIÓN DEL PARÁMETRO DE SUPERPOSICIÓN DE CADENAS C*	104
FIGURA 4-15: ANÁLISIS DE FLUJO EN MODO CRECIENTE – DECRECIENTE PARA DISPERSIONES DE GMP AL 0,4%. ..	106
FIGURA 4-16: COMPARACIÓN DE CURVAS DE FLUJO DE SOLUCIONES AL 0,1%.....	108
FIGURA 4-17: COMPARACIÓN DE VISCOSIDAD DE SOLUCIONES AL 0,4%	109
FIGURA 4-18: COMPARACIÓN DE CURVAS DE FLUENCIA SEGÚN EL GRADO DE PURIFICACIÓN	113
FIGURA 4-19: EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA VISCOSIDAD APARENTE EN SOLUCIONES DE GMP Y GG 0,2% .	114
FIGURA 4-20: PERFILES DE VISCOSIDAD – CIZALLAMIENTO A DIFERENTES CONCENTRACIONES PARA GOMAS DE P. AFFINIS Y COMERCIALES.....	117
FIGURA 4-21: G' Y G'' COMO FUNCIÓN DE LA FRECUENCIA ANGULAR PARA MUESTRAS DE P. AFFINIS Y MUESTRAS COMERCIALES AL 0,4% A 25°C.	118

FIGURA 7-1: CURVAS DE CALIBRACIÓN DE CONCENTRACIÓN DE GALACTOSA (A) Y MANOSA (B) RESPECTIVAMENTE	143
FIGURA 7-2: CURVA DE CALIBRACIÓN DE PROTEÍNA POR EL MÉTODO BCA.....	144
FIGURA 7-3: GRÁFICOS DE RESIDUOS PARA EL ANOVA DE AZÚCARES TOTALES.....	146
FIGURA 7-4: ANÁLISIS DE RESIDUOS PARA EL ANOVA DEL CONTENIDO DE PROTEÍNAS.....	149
FIGURA 7-5: ANÁLISIS DE RESIDUOS PARA EL ANOVA DE LA RELACIÓN MANOSA: GALACTOSA EN EL MODELO A UN FACTOR.....	151
FIGURA 7-6: CURVAS DE FLUJO $GMP_{1/RT} < 0,1\%$	155
FIGURA 7-7: CURVAS DE FLUJO $GMP_{1/80} < 0,1\%$	155
FIGURA 7-8: CURVAS DE FLUJO $GMP_{2/80} < 0,1\%$	156
FIGURA 7-9: CURVAS DE FLUJO $LBG_{1/RT} < 0,1\%$	156
FIGURA 7-10: ANÁLISIS DE METILACIÓN, CROMATOGRAFÍA GC-MS DE LOS PMAAS OBTENIDOS DEL EXTRACTO GMP _{2/RT} :	157

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 4-1: RENDIMIENTO DE SEMILLA EXTRAÍDA A PARTIR DE VAINAS DE P. AFFINIS	67
TABLA 4-2: COMPOSICIÓN PORCENTUAL DE LA SEMILLA DE P. AFFINIS.....	70
TABLA 4-3: COMPARACIÓN DE LOS RENDIMIENTOS DE LA PRECIPITACIÓN DE GALACTOMANANO SOLUBILIZADO EN AGUA CON 2 VOLÚMENES DE ETANOL Y 3 VOLÚMENES DE ISOPROPANOL	72
TABLA 4-4 RENDIMIENTOS DE EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE GOMAS A PARTIR DE ENDOSPERMO DE P. AFFINIS Y GOMAS COMERCIALES.....	73
TABLA 4-5: COMPOSICIÓN DE LOS GALACTOMANANOS ESTUDIADOS	82
TABLA 4-6: COMPOSICIÓN DE MONOSACÁRIDOS DE GALACTOMANANOS DE P. AFFINIS Y EXTRACTOS COMERCIALES.	83
TABLA 4-7: RESULTADOS DE GC-MS DE LOS ACETATOS DE ALDITOL DE LOS GALACTOMANANOS PERMETILADOS DE P. AFFINIS Y PRODUCTOS COMERCIALES.....	85
TABLA 4-8: DATOS DE ^1H Y ^{13}C PARA GALACTOMANANOS PURIFICADOS DE MUESTRA GMP _{2/RT}	88
TABLA 4-9: PARÁMETROS OBTENIDOS POR SEC/MALLS-QUELS/RI PARA GALACTOMANANOS DE P. AFFINIS, GG Y LBG OBTENIDOS POR EXTRACCIÓN ACUOSA.	92
TABLA 4-10: CÁLCULO DE PARÁMETRO DE CONCENTRACIÓN CRÍTICA	105
TABLA 4-11: PARÁMETROS DEL MODELO DE WILLIAMSON PARA GMP _{1/RT} , LBG _{1/RT}	118
TABLA 7-1: ANÁLISIS DE VARIANZA Y POST-TEST DE TUKEY AL 0,05% PARA EL RENDIMIENTO DE EXTRACCIÓN.....	145
TABLA 7-2: ANÁLISIS DE VARIANZA PARA EL CONTENIDO DE AZÚCARES TOTALES	146
TABLA 7-3: CUADRO DE VARIANZA PARA EL CONTENIDO DE PROTEÍNAS.	148
TABLA 7-4: CUADRO DE VARIANZA PARA LA RELACIÓN GALACTOSA – MANOSA	150
TABLA 7-5: ANÁLISIS DE VARIANZA PARA EL RADIO DE GIRO (ZIMM)	152
TABLA 7-6: TEST DE TUKEY PARA EL R _G (ZIMM)	152
TABLA 7-7: ANÁLISIS DE REGRESIÓN DEL MODELO DE FEDOR :	153
TABLA 7-8: REGRESIÓN VISCOSIDADES EN RÉGIMEN DILUÍDO PARA GMP _{1/RT}	154

RESUMEN

Resumen

Los hidrocoloides, polímeros hidrofílicos naturales o sintéticos de alto peso molecular, son componentes habituales en la formulación de productos farmacéuticos y alimentarios. Estos compuestos son utilizados por sus propiedades de interaccionar con el agua, modificar su movilidad y aumentar la viscosidad en dispersión, jugando un papel fundamental en la determinación de las características texturales de los productos y su estabilidad en el tiempo. La necesidad de la industria de desarrollar productos con nuevas funcionalidades, el creciente interés en la población en el consumo de productos de origen natural y los problemas de suministro existentes ha dado un nuevo impulso a la búsqueda de nuevas fuentes de hidrocoloides de bajo costo y obtenidos de fuentes renovables. Las semillas de leguminosas son una fuente conocida de galactomananos (GM), utilizados como estabilizantes, agentes emulsificantes, espesantes y otros, basados en sus características fisicoquímicas específicas. En este contexto y en el marco de un proyecto de bioprospección con INIA, se ha comenzado el estudio de una especie forestal nativa, *Prosopis affinis* (Ñandubay), como fuente de galactomananos que puedan potencialmente ser utilizados como aditivos alimentarios.

El objetivo general de este trabajo ha sido la caracterización primaria química y funcional de los galactomananos extraídos de las semillas de *Prosopis affinis*, y su comparación con muestras purificadas comerciales. Se analizaron las diferencias en las características químicas de los galactomananos extraídos a dos temperaturas, y cómo fueron luego

Resumen

afectadas sus propiedades en dispersión coloidal. Se estudiaron parámetros de rendimiento, químicos (pureza, relación galactosa – manosa), fisicoquímicos (M_w , R_g , R_h , viscosidad intrínseca), en un diseño factorial a dos niveles, resultando significativo el método de extracción y el tipo de goma, así como la interacción entre estos factores. Se modeló la viscosidad intrínseca de los polímeros obtenidos y los extractos purificados de gomas comerciales, ajustando al modelo de Fedor. La caracterización de los galactomananos obtenidos a partir de *P. affinis* mostró que son heteropolisacáridos regulares con una distribución de pesos moleculares aproximadamente monomodal que depende de las condiciones de extracción y propiedades funcionales similares a las de goma guar. Por tanto, representa un promisorio biomaterial para la industria alimentaria que puede ser producido sosteniblemente a partir de productos de flora nativa.

Palabras clave: galactomananos, dispersión de luz, elucidación estructural, hemicelulosa, funcionalidad.

SUMMARY

Summary

Hydrocolloids, often called gums, are hydrophilic natural or synthetic polymers with high molecular weight. They are usual components that are included in the formulation of food and pharmaceutical products in order to control its functional properties. These properties are related to the capability of interacting with water, modifying its movility and enhancing the viscosity of the dispersions, playing a key role in the determination of the textural properties of the products and stability. The industries need to develop products with new functionalities, the consumers care towards the natural or “bio” products and the supply chain problems has driven the search of new sources of hydrocolloids with low cost and obtained in a sustainable way. Leguminous seeds are a known source of galactomannans (GM) that are used as stabilizers, emulsifying agents, thickeners among other uses based on its specific physicochemical properties. In this context and related to a Project of bioprospecting the Natural Forest resources with INIA, we have started to study the specie *Prosopis affinis* (Ñandybay), as a GM source with potencial use as food ingredient.

The aim of this work was the primary structural and functional characterization of the GMs extracted from *Prosopis affinis* and its comparison with commercial purified gums. Galactomannans were extracted at two different temperatures to compare its chemical characteristics and physicochemical properties in colloidal dispersion. The overall yield, chemical parameters such as purity and galactose-manose

Summary

ratio and physicochemical parameters (M_w , R_g , R_h , intrinsic viscosity) were studied in a two-level factorial design. The extraction methodology and kind of gum (*P. affinis*, GG or LBG) were significantly different, as well as the interaction between these two factors. The intrinsic viscosity of the extracted polymers were obtained using Fedor's model. The overall characterization of the GM from *P. affinis* demonstrated that they are regular heteropolysaccharides with an approximately monomodal molecular weight distribution that depends on the extraction conditions, and functional properties similar to those of guar gum. Hence, they represent new promising biomaterials for the food industry that can be produced from the native flora in a sustainable way.

Keywords: *galactomannans; light scattering; structural elucidation, hemicellulose, functionality.*

Abreviaturas

Lista de siglas y abreviaturas

$\dot{\gamma}$	Velocidad de cizallamiento (shear rate) s ⁻¹
γ_0	Amplitud de la onda de deformación
T_0	Amplitud de la onda de esfuerzo
$[\eta]$	Viscosidad intrínseca
¹³ C RMN	Resonancia Magnética Nuclear de carbono
¹ H RMN	Resonancia Magnética Nuclear de protón
a_w	Actividad de agua
C	Concentración
C*	Concentración crítica (superposición de cadenas de polímero).
C _m	Límite de concentración de la ecuación de Fedor
dn/dc	Incremento específico de índice de refracción
G'	Módulo de almacenamiento (componente elástico)
G''	Módulo de pérdida (componente viscosa)
GG	Goma guar (de calidad comercial)
GG _{1/80}	Galactomanano de goma guar extraído a temperatura 80 °C
GG _{1/RT}	Galactomanano de goma guar extraído a temperatura ambiente
GMP	Galactomanano de Prosopis affinis
GMP _{1/80}	Galactomanano de Prosopis affinis extraído a 80°C
GMP _{1/RT}	Galactomanano de Prosopis affinis extraído a temperatura ambiente
HPSEC	Cromatografía líquida de alta performance en columna de exclusión por tamaño
J _{CH}	Constante de acoplamiento carbono – protón
J _{HH}	Constante de acoplamiento protón – protón
k	Índice de consistencia para el modelo de Potencia
K	Constante de la ecuación de Mark-Howink Sakurada

Abreviaturas

k_H	Constante de Huggins
k_K	Constante de Kramer
LBG	Goma de algarrobo (comercial)
$LBG_{1/80}$	Galactomanano de goma de algarrobo extraído 80°C
$LBG_{1/RT}$	Galactomanano de goma de algarrobo extraído a temperatura ambiente
LS	Dispersión de luz (<i>light scattering</i>)
m	Índice relativo de refracción de las moléculas dispersadas
m_0	Pendiente de la variación angular de la intensidad dispersada a ángulo cero
MALLS	Detector de dispersión de luz láser multiángulo
M_n	Masa molar promediada en número
M_v	Masa molar viscosimétrica
M_w	Masa molar promediada en peso
M_w/M_n	Índice de poli- dispersabilidad de masa
M_z	Masa molar ponderada en función del factor z
η	Viscosidad (viscosidad dinámica)
n	Índice de comportamiento en el modelo de potencia
n	Índice de refracción de la solución de polímero
N	índice de Williamson
η	Viscosidad (dependiente de la velocidad de cizallamiento)
η_0	Viscosidad del solvente
n_0	Índice de refracción del solvente
η_0	Viscosidad medida sin esfuerzo de deformación
N_A	Número de Avogadro ($6,022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$)
SD	Sin determinar
η_r	Viscosidad reducida

Abreviaturas

η_s	Viscosidad de la solución
η_{sp}	Viscosidad específica
$P(\theta)$	Función de dispersión de la partícula
QELS	Detector cuasi-elástico de dispersión de luz
R_g	Radio de giro
R_h	Radio hidrodinámico
RI	Detector de índice de refracción
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
Rms	(root mean square radius) radio de giro (R_g)
R_e	Radio de Raileigh (en el ángulo Θ)
TA	Temperatura ambiente (RT)
TG	Goma tara
TSP	Ácido trimetilsililpropanoico
Y	(yield) rendimiento (% m/m)
α	Exponente de la ecuación de Mark-Howink Sakurada
A	Parámetro de la ecuación de Schulz-Zimm
δ	Ángulo de desfasaje
τ	Esfuerzo cortante (Pa)
τ	Tiempo de relajación para el modelo de Williamson (s)

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Revisión Bibliográfica

1.1. Gomas

El término goma se utilizó inicialmente para designar a los productos de la exudación de algunas plantas y árboles. Actualmente, se utiliza la denominación en un grupo muy amplio de polisacáridos de alto peso molecular, obtenidos de plantas o por producción microbológica, que tienen la capacidad de actuar como espesantes y gelificantes al mezclarse con agua fría o caliente y que además presentan algunas propiedades funcionales tales como las de estabilizar emulsiones, espumas y suspensiones (Valdés, 2006, Gutiérrez *et al.*, 2007).

Los agentes espesantes y de gelificación se usan extensamente en productos alimenticios, principalmente para hacerlos atractivos al consumidor y para mejorar su vida útil. Actúan en dispersión ligando el agua, controlando la textura, influenciando la cristalización, para mejorar el comportamiento congelamiento - descongelamiento, para prevenir sinéresis y la retrogradación de los productos con almidón, para mantener la turbiedad de bebidas y jugos con fibras dietéticas. También se utilizan en productos farmacéuticos y cosméticos (Williams & Phillips, 2001).

1.2. Galactomananos

Algunas harinas provenientes de semillas de leguminosas se utilizan a nivel industrial como estabilizantes, agentes emulsificantes, y otros usos determinados por sus propiedades funcionales. Estas propiedades dependen de la estructura y características fisicoquímicas de los

galactomananos presentes en el endospermo de estas semillas. Actualmente son utilizados como aditivos alimentarios a nivel comercial tres fuentes de galactomananos: la goma guar (obtenida de *Cyamopsis tetragonolobus*), goma de algarrobo (obtenida de *Ceratonia siliqua*) y goma tara (obtenida de *Caesalpinia spinosa*), este último con uso limitado por condiciones de precio y disponibilidad (López-Franco, 2013).

1.2.1. Estructura de galactomananos

Estructuralmente, los galactomananos son polisacáridos neutros formados por una cadena lineal de manosa unidas por enlace glicosídico β (1-4), sobre la cual se unen ramas de diversa longitud de D-galactosa, mediante enlaces α -(1-6) (Rincón *et al.*, 2014). La estructura básica de los galactomananos se presenta en la Figura 1-1.

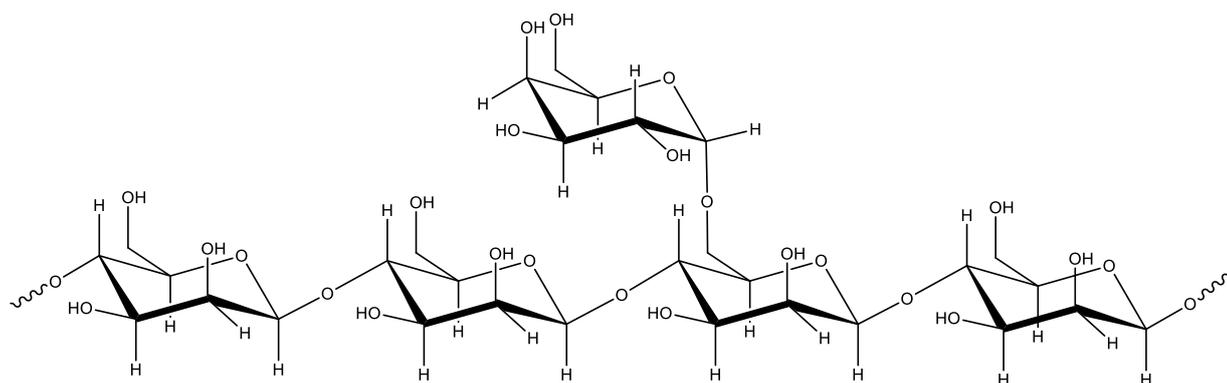


Figura 1-1 Estructura general de los galactomananos (adaptado de Morris, 1990)

Los diferentes galactomananos se diferencian entre sí en la relación manosa: galactosa (M: G) y en la distribución de ramas de galactosa individuales en la cadena principal, como así también en el tamaño molecular, que influyen en propiedades como la solubilidad, y el comportamiento reológico (Pinto Vieira *et al.*, 2007). La masa molecular, la relación M: G y la distribución secuencial de los sustituyentes de galactosa depende del origen del galactomanano (Azero y Andrade, 2006). La goma acacia, goma de algarrobo, goma tara, goma guar y la goma de fenogreco se diferencian en su grado de sustitución promedio, pues sus galactomananos presentan relaciones M: G de aproximadamente 5, 4, 3, 2 y 1, respectivamente. (Iijima *et al.*, 2012). En la Figura 1-2 se puede observar un esquema básico de los galactomananos más utilizados comercialmente: goma guar (GG), goma de algarrobo (LBG) y goma tara (TG), utilizando la representación gráfica de glicanos utilizada en Varki *et al.* (2015).

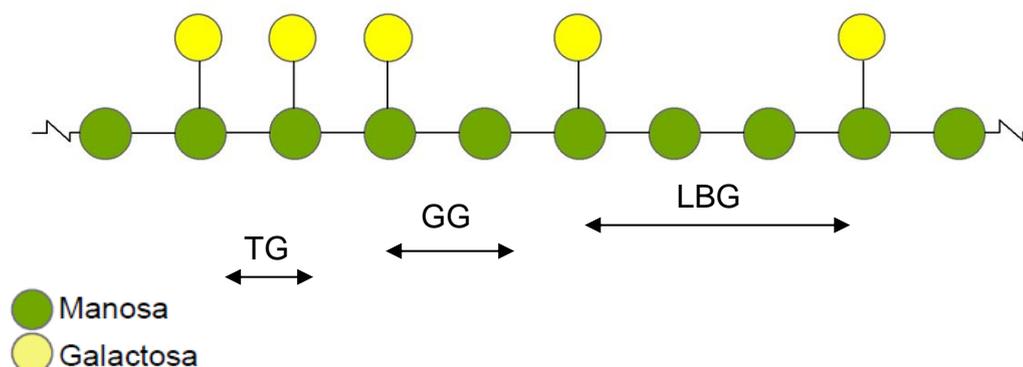


Figura 1-2: Estructura básica de algunos galactomananos Representada utilizando la simbología de Varki *et al.*, 2015

1.2.2. Elucidación estructural en galactomananos

La estructura básica de los galactomananos es bastante conocida, y sigue la estructura ya mencionada. Sin embargo, la relación M:G sólo nos explica el contenido global promedio de residuos galactosilo que sustituyen la cadena principal de manosa. La regularidad y el patrón de sustitución juega un papel importante en sus propiedades de interacción con otros polisacáridos (Dea *et al.* 1986), y en numerosas propiedades funcionales, como la solubilidad, y las propiedades de gelificación, co-gelificación y aumento de viscosidad (Pollard, 2006; Sébastien *et al.*, 2014), aunque la literatura no es tan abundante en este último aspecto.

Existe poca información acerca de la estructura fina de los galactomananos, incluso de aquellos más conocidos y con mayor valor comercial. Los métodos que se han utilizado para evaluar los patrones de distribución de galactosilos son análisis de RMN de C¹³ o modelado computacional luego de hidrólisis enzimáticas (Baker & Whistler, 1975; Daas *et al.*, 2002; Grasdalen & Painter, 1980; Izydorczyk & Biliaderis, 1996; Lazaridou, *et al.*, 2000; Manzi, *et al.*, 1986; McCleary, 1979; Painter, *et al.*, 1979). En esta bibliografía se muestra que la estructura de los galactomananos de la goma de algarrobo no es homogénea (Sébastien, *et al.*, 2014) sino que la estructura fina está compuesta por zonas libres (con baja sustitución de galactosilos) y zonas muy sustituidas, en que los galactosilos no están distribuidos regularmente (Sébastien, *et al.*, 2014). En

la figura 1-3 se muestran las diferentes estructuras teóricas de sustitución de galactosilos en galactomananos.

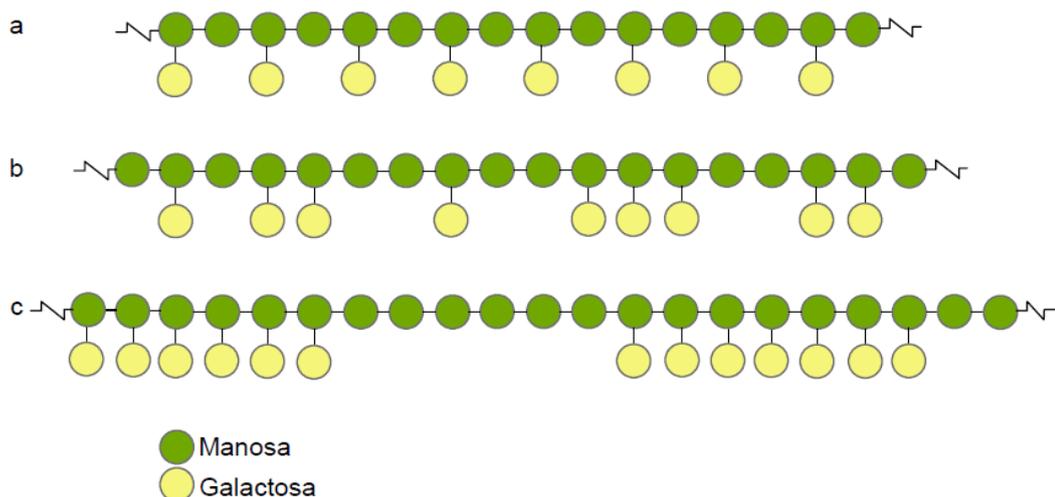


Figura 1-3: Distribuciones teóricas de sustitución de galactosilos en galactomananos: a) distribución regular, b) distribución aleatoria, c) distribución de bloques con un patrón uniforme (tomado de Dea & Morrison, 1975)

Numerosos estudios de la estructura de galactomananos de diferentes orígenes han sido realizados analizando los oligosacáridos liberados de los polímeros por β -D-endomananasas (Davis, 1995). Dichos estudios han indicado que la distribución de galactosa en los galactomananos no es regular (McCleary *et al.*, 1985; Sébastien *et al.*, 2014; Malgas, *et al.* 2015). Para poder describir la distribución de las cadenas laterales de galactosilo a lo largo de la cadena principal de manano, se debe tener un conocimiento detallado acerca de las estructuras y las cantidades relativas de los diferentes oligómeros liberados por β -D-mananasa (Davis *et al.*, 1995). La actividad de las endo β -mananasas depende del patrón de sustitución de

galactosilos y por tanto se ha probado como un método adecuado para el estudio de la distribución de los residuos de galactosilos (ramificaciones). La hidrólisis enzimática simultánea de β -mananasa (EC 3.2.1.78) y α -galactosidasas (EC 3.2.1.22) (Malgas, 2015) también ha sido utilizado con este fin.

La elucidación estructural de galactomananos de diferentes orígenes ha sido realizada mediante la combinación de métodos químicos, espectroscópicos y enzimáticos. Para la composición cuantitativa de monosacáridos se han utilizado técnicas de HPLC con columnas de intercambio catiónico o cromatografía gaseosa (GC -F) de los acetatos de alditol correspondientes, previo tratamiento de hidrólisis química o enzimática (Cruz, 1999; Fernandes de Souza *et al.*, 2009; Cerqueira *et al.*, 2011). La identificación de la posición de los enlaces glucosídicos de los galactomananos aislados y purificados se ha realizado por cromatografía en fase gaseosa acoplada a espectroscopía de masas (GC-MS) analizando los derivados de acetatos de alditoles parcialmente metilados derivados del polímero original (Cruz, 1999; Fernandes de Souza *et al.*, 2009; Cerqueira *et al.*, 2011).

La configuración de los enlaces glicosídicos (α , β), la confirmación de las posiciones de sustitución y el grado de sustitución ha sido determinado mediante la aplicación de espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de Protón (RMN- ^1H) y de Carbono-13 (RMN- ^{13}C) (Pinto Vieira *et al.*, 2007; Fernandes de Souza *et al.*, 2009; Jian *et al.*, 2011). El grado de sustitución

(relación M:G) ha sido determinado comparando las áreas de las señales del protón anomérico (H de C-1) por RMN ^1H (Joshi & Kapoor, 2003; Muschin, & Yoshida, 2012; Azero & Andrade, 2006). Sin embargo, la superposición de los residuos de D-manosa y D-galactosa del polímero no hace de aquel el mejor método para la estimación de la proporción de los sustituyentes. La relación de sustituyentes se ha estimado por análisis de metilación y cuantificación de los acetatos de alditol parcialmente metilados por cromatografía de gases utilizando detector FID (Sébastien *et al.*, 2014; Cruz, 1999). También ha sido determinada por análisis de los componentes monosacáridicos por cromatografía líquida luego de hidrólisis en medio ácido, seguida de hidrólisis en medio ácido, utilizando columnas de intercambio catiónico con detector de índice de refracción y de evaporativo de dispersión de luz (ELSD) (Joshi & Kapoor, 2003). Estos últimos dos métodos son muy adecuados para la detección y cuantificación de monosacáridos, dada la linealidad de la respuesta del detector FID y universalidad y linealidad de la respuesta del RI. Últimamente, se han utilizado técnicas computacionales para modelar las constantes de acoplamiento de los enlaces glicosídicos obtenidas por RMN y poder determinar la conformación espacial de los polímeros en dispersión, en particular en galactomananos (Bergamini *et al.*, 1994, Petkowicz *et al.*, 1998).

1.2.3. Propiedades funcionales y uso de galactomananos

Los usos alimentarios de la goma de algarrobo, guar y tara dependen de sus propiedades en solución, incluyendo las interacciones en el estado coloidal con otras moléculas. Las propiedades más importantes de los galactomananos son la capacidad de retención de agua y su habilidad de formar soluciones muy viscosas a baja concentración. La solubilidad en agua depende del contenido de galactosa (cadenas laterales del polisacárido) (Cruz, 1999). El grado de sustitución (efecto de presencia de cadenas laterales) tiene el efecto de disminuir el volumen del polímero para un mismo valor de peso (M_w) (Wu. *et al*, 2012).

La aplicación de los galactomananos como tales se resumen a tres propiedades funcionales: su habilidad de espesar soluciones acuosas (*thickener*), su interacción sinérgica con otros polisacáridos, y su capacidad de controlar o prevenir la sinéresis (Fox, 1997). Asimismo, se han citado aquí propiedades benéficas por su utilización como fibra alimentaria, y aquellas propiedades funcionales que derivan de una pequeña transformación química de los mismos. Algunas de las propiedades que dan lugar a numerosas aplicaciones se resumen a continuación:

a) Aplicación como agentes espesantes

La aplicación de los galactomananos como agente espesante ha sido vastamente descrita (Bayarri *et al.*; 2010, Cruz, 1999). El mecanismo de actuación de los agentes espesantes es similar a la formación de un gel por debajo de la concentración límite, como se muestra en la siguiente figura.

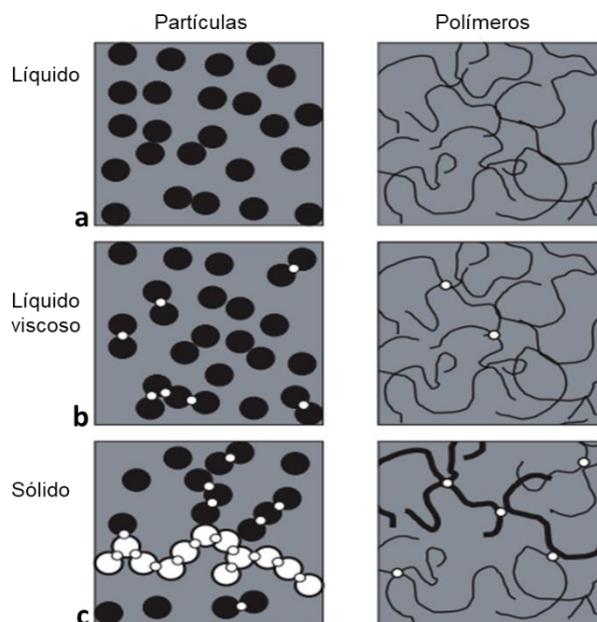


Figura 1-4: Modelos de una red de partículas o de polímeros. Tomado de Couplan, 2014.

Couplan (2014) considera dos extremos para considerar la estructura de los elementos sólidos dispersos: partículas esféricas y polímeros extendidos. Estos dos puntos extremos corresponderían, respectivamente a polímeros en un mal solvente que se simbolizan por partículas (por ej. Proteínas globulares de la clara de huevo) y en polímeros que se encuentran dispersados en un buen solvente, simbolizados como una bovina al azar (sería el caso de gelatina o almidón en agua caliente). En el modelo de dispersión de partículas, se comienza con partículas aisladas suspendidas en un fluido (fig. 1.9a). Las partículas no interactúan entre sí. El volumen total de partículas afecta la viscosidad del líquido, y el movimiento browniano que describen las partículas en estas condiciones de dispersión diluida se describe mediante la relación de Einstein Stokes.

$$D_h = \frac{k_B T}{3\pi\eta D_t}$$

Donde D_h es el diámetro hidrodinámico, k_B es la constante de Boltzmann, T es la temperatura, η es la viscosidad de la solución y D_t es el coeficiente de difusividad. Hasta este punto la dispersión permanece como líquido. En la fig. 1.9b se muestra como algunas atracciones empiezan a desarrollarse. Algunas de estas atracciones, hacen al fluido más viscoso. Como las conexiones son aisladas, no hay forma de que la fuerza aplicada en el material se transmita instantáneamente a lo largo del material. En la figura 1.9 c un mayor número de estas conexiones logra una estructura en que existe un camino para que las fuerzas instantáneas sean transmitidas a través del material, generando un verdadero gel. De forma similar, en polímeros, conexiones limitadas localmente sólo aumentan la viscosidad y conexiones extensivas forman una red sólida: un verdadero gel (Couplan, 2014).

Si bien los galactomananos no forman en principio verdaderos geles como otros hidrocoloides, los mecanismos de aumento de viscosidad son similares y como se ha visto, es función de la magnitud de las fuerzas cohesivas. Estas fuerzas cohesivas aisladas que no llegan a formar un verdadero gel sí tienen gran importancia al ser agregados en sistemas complejos. Los espesantes se utilizan en un sinnúmero de productos, para hacerlos más atractivos al consumidor, prevenir la sinéresis, disminuir la retrogradación en productos con almidón, y lograr la turbidez de bebidas

cuando éste es el objetivo desde el punto de vista sensorial (Williams & Phillips, 2001). Por ejemplo, en productos lácteos, es usual su agregado como estabilizantes en helados, yogures, yogures reducidos en grasa, etc. (Fox, 1997; Estévez *et al.*, 2004). El hecho de que los galactomananos sean polisacáridos neutros los hace excelentes aditivos para la utilización de formulaciones complejas con proteínas, como en productos lácteos y en que el pH pueda cambiar en la vida útil del producto o sea deseable modificar la fuerza iónica de los mismos (Bourriot, *et al.*, 1999; Perissutti *et al.*, 2002).

b) Aplicación como agentes gelificantes

Una propiedad interesante de los galactomananos es su capacidad para formar mezclas sinérgicas, incluyendo las interacciones en el estado coloidal con carrageninas, con las que forman soluciones altamente viscosas y geles más fuertes y elásticos (Morris, 1990; Wielinga, 2009; Sworn, 2004; Pinheiro *et al.*, 2011). En la formulación de alimentos diversos es habitual la aplicación de espesantes y gelificantes, con una muy vasta aplicación industrial, especialmente en los productos reducidos en grasa en se utilizan para lograr propiedades sensoriales texturales similares a los productos altos en grasa (Bayarri *et al.*, 2010), o en otras formulaciones en que se adicionan para mejorar la estabilidad en la estructura coloidal tipo emulsiones o espumas (por ejemplo, en fórmulas de helados, salsas, etc. (Schuppner *et al.*, 1967; Igoe *et al.*, 1977^{a, b}).

Sin embargo, la utilización de gomas naturales y mucílagos para formular geles farmacéuticos es un nuevo concepto (Prajapati *et al.*, 2013). Las gomas y mucílagos pueden formar geles por sí mismos o en combinación con otras gomas o moléculas. El mecanismo de gelificación es resultado de numerosas asociaciones inter e intra- moleculares que producen una red tridimensional, donde las moléculas de agua son atrapadas. Estas asociaciones se generan por cambios de pH, de temperatura, o cambios de la composición química del medio (ej. presencia de cationes, como en el caso de formación de geles con alginatos), en pectinas, se cataliza por medio ácido. En el caso de los galactomananos, pueden interaccionar sinérgicamente con goma xantana para formar geles elásticos a bajas concentraciones de polímero. La utilización como agente gelificante se basa no solamente en sus funcionalidades sino en su inocuidad, bajo costo, disponibilidad, naturaleza emoliente y no irritante (Kumar *et al.*, 2009).

c) Utilización en suplementos dietéticos (fibra)

Existen dos patentes que reivindican el uso de galactomananos combinados con otras fibras de origen vegetal como componente principal en cápsulas y tabletas para regular el movimiento intestinal en personas sanas y también como un suplemento dietético para personas con enfermedades diabéticas (Saura-Calixto *et al.*, 1999).

d) Utilización en fórmulas de liberación controlada

Numerosos materiales poliméricos han sido utilizados en la formulación de comprimidos con fórmulas de liberación controlada. En estas formulaciones, se han probado con éxito la utilización de goma guar, y de galactomananos extraídos de fuentes no tradicionales: *Mimosa scabrella*, *Gleditsia triacanthos*, *Sesbania aculeata*, *Hibiscus esculenta*, *Tamarindus indica*, etc. (Efentakis & Kouttis, 2001).

e) Utilización en la formulación de filmes

La utilización de galactomananos como filmes ha sido patentada por Barkalow *et al.* (2006), que desarrolló filmes comestibles que se disuelven rápidamente a partir de goma guar hidrolizada enzimáticamente, luego Mikkonen *et al.*, (2007), logró formar filmes a partir de goma guar y goma de algarrobo utilizando glicerol y sorbitol como plastificantes. Otras aplicaciones han desarrollado polímeros mixtos con nanocompuestos de celulosa (Keating *et al.*, 2013), o por entrecruzamiento con filmes de colágeno (Figueiro *et al.*, 2004). Existe además una patente para la utilización de galactomananos para la creación de un filme detergente soluble en agua que se puede imprimir por al menos por una tinta (Icht *et al.*, 2011).

1.2.4. Relación estructura – funcionalidad

La relación de sustituciones de galactosa no sólo describe la estructura de los galactomananos, sino que además tiene un papel significativo en sus propiedades funcionales, como condiciones de

hidratación, capacidad de retención del agua y comportamiento reológico. Dentro de este último la viscosidad es el criterio de calidad fundamental para los agentes de espesamiento y ésta difiere entre galactomananos de diversas fuentes y extraídos por diferentes métodos (Cheng *et al.*, 2002; Dakia *et al.*, 2008; Bourbon *et al.*, 2010; López-Franco *et al.*, 2013). El grado de sustitución de los galactomananos afecta su dispersabilidad en agua y es determinante en la capacidad de esas moléculas para interactuar entre sí y con otros polisacáridos (McCleary, 1981; Larizadou *et al.*, 2000; Mao *et al.*, 2006; Secouard *et al.*, 2007). Los niveles de distribución de galactosa sobre la cadena principal ocupan un papel importante en las propiedades fisicoquímicas del polímero (Ganter *et al.*, 1991). Por ejemplo, la dispersabilidad en agua de los galactomananos se incrementa con el aumento de las ramas de galactosa simples (Sierakowski *et al.*, 2000; Jian *et al.*, 2011). Pollard & Fischer (2006) remarcan la influencia de los grados de sustitución y de la distribución de pesos moleculares en la predicción de las solubilidades parciales de los diferentes galactomananos que están presentes en la estructura del endospermo de las leguminosas.

Según Sittikijyothin *et al.* (2005), propiedades como la viscosidad y el efecto sinérgico con otros polisacáridos está directamente relacionada al tamaño y masa molar y a la relación M: G. La viscosidad de las soluciones depende principalmente de la masa molar, mientras que las interacciones sinérgicas parecen estar determinadas por la relación (M: G) y el patrón de distribución de galactosa en la cadena de galactomanano (Dea *et al.*, 1986;

Fernandes *et al.*, 1991; Schorsch *et al.*, 1997). Dentro de los diferentes patrones de sustitución, es especialmente relevante la presencia de zonas de la cadena de manano sin sustituir (zonas “desnudas”), que, en el caso de geles complejos actuarían como zonas de interacción inter-polímero e intra-polímero que generan una estructura más fuerte y con menor tendencia a la sinéresis que los geles simples realizados con los mismos componentes (Dea *et al.*, 1986).

El efecto de la estructura fina de los galactomananos, así como de la distribución de pesos moleculares ha sido objeto de estudio para varios autores. Particularmente Sébastien *et al.*, 2014 señalan que el efecto de la estructura fina de los galactomananos, obtenidos por extracción diferencial a bajas y altas temperatura influencia las propiedades físicas de los productos. Para los galactomananos obtenidos a mayor temperatura, la viscosidad aparente de soluciones al 1% fue mayor que los extraídos a menor temperatura, mostrando un grado mayor de presencia de interacciones intermoleculares. A su vez mostraron un comportamiento viscoelástico más fuerte, con mayores valores de los módulos de viscoelasticidad (G' y G''). La estructura diferencial de estos galactomananos extraídos a altas temperaturas generó mayores interacciones entre cadenas, entre porciones de las propias cadenas y mayores interacciones moleculares, resultando en la formación de una red más fuerte. La solubilidad de los galactomananos obtenidos a temperatura ambiente y alta temperatura también fue marcadamente diferente.

Pequeñas diferencias estructurales repetidas a lo largo del polímero generan comportamientos fisicoquímicos muy diferentes. Con estos resultados, se pudo establecer el efecto del fraccionamiento y purificación en la estructura y funcionalidad de los polímeros que se obtienen en las distintas condiciones de extracción.

El peso molecular ponderado en peso (M_w) de la goma de fenugreco, determinada por HPSEC-MALLS/RI/VIS, está reportada en un rango 1.5 a 2×10^6 Da (Youseef *et al.*, 2009) y en el caso de goma de *Mimosa Scabrella*, *Stryphnodendron dstringens* y *Schizolobium parahybae* hasta del orden de 1×10^6 Da en condiciones óptimas de extracción. En estas últimas especies se ha evidenciado degradación de los polímeros a tiempos crecientes de extracción (24 a 48 horas), obteniendo pesos moleculares inferiores en las muestras degradadas, con pesos moleculares de orden 10^4 hasta 10^6 . El tiempo de extracción está relacionado inversamente al M_w del polímero obtenido, con soluciones de compromiso para obtener un rendimiento elevado del polímero de alto M_w . (De Oliveira Salvalaggio, 2010).

La presencia de diferentes patrones de distribución de unidades de galactosa a lo largo de la cadena origina que se presenten diferentes interacciones polímero-polímero y polímero solvente y además ocasiona variaciones en la distribución del M_w . Estas variaciones, además de la cantidad de subunidades que se presentan en el polímero, influyen en la distribución promedio de peso que se observa en galactomananos de diferentes especies. La relación M: G origina, para un M_w dado del

polímero, variaciones de tamaño molecular y en la distribución de unidades de galactosa a lo largo de la cadena de los galactomananos, tanto sean oriundos de diferente o de la misma especie, y esos factores influyen fuertemente en las interacciones moleculares y las propiedades reológicas de sus dispersiones acuosas de los distintos galactomananos (Dakia, 2010).

Por otro lado, la solubilidad de los galactomananos depende en gran parte de la presencia de residuos de galactosilo unidos a la cadena principal de manosa e interactúan con las moléculas de agua del solvente por medio de la formación de puentes de hidrógeno, influenciando su solubilidad y propiedades reológicas (Pollard, 2006). Por ejemplo, el galactomanano del sagú (*Metroxylon amicarum*) es totalmente insoluble en agua, y no tiene aplicaciones alimentarias. Por el contrario, la goma de fenogreco (M: G 1:1) es el GM más soluble de todos, la goma guar (M: G 2:1) es soluble en agua fría, y para disolver la goma de algarrobo (4:1) es necesario calentar al menos hasta los 80°C. Los galactomananos poseen la capacidad de absorber agua y forman soluciones acuosas muy viscosas y estables a bajas concentraciones de polisacárido. Debido a su carácter neutro, su comportamiento no depende del pH y son muy estables en un amplio rango de pH (de 3,5 a 11). Se ha evidenciado que a valores de pH menores o iguales a 3, los galactomananos pierden sus propiedades y se degradan por hidrólisis (Sittikijyothin *et al.*, 2005).

1.3. Fuentes de galactomananos

1.3.1. Fuentes tradicionales de galactomananos

Los galactomananos se han obtenido tradicionalmente de las especies: *Cyanopsis tetragonolobus* (goma guar), *Ceratonia siliqua* (goma de algarrobo), y *Caesalpinia spinose* (goma tara) (López-Franco *et al.*, 2013). Respecto a su utilización, la más utilizada es la goma guar, seguida de la goma de algarrobo, y en una escala menor la goma tara (Wielinga, 2009). Pese a que la goma guar presenta propiedades funcionales inferiores a las que se pueden observar en dispersiones de goma de algarrobo, presenta gran disponibilidad y bajo costo, lo que ha permitido su aplicación en los más diversos rubros: desde la industria farmacéutica a la aplicación en pozos petroleros o minería, pasando por la industria del papel, textil, cosmética y alimentaria (Joshi & Kapoor, 2003).

Por otro lado, la goma de algarrobo tiene mayor valor comercial, debido a sus capacidades para formar geles mixtos junto a κ carragenano con mayor elasticidad, firmeza y resistentes a la sinéresis que los geles similares sin adición de galactomanano (Dea *et al.*, 1972; Dea *et al.*, 1975; Rees, 1972). La goma de algarrobo se obtiene de las vainas de la especie *Ceratonia siliqua*, que se esparce naturalmente en las costas del Mediterráneo, pero ha tenido una creciente degradación en su disponibilidad debido a la deforestación y en regiones como las de Túnez está cercano a desaparecer (Bouzouita *et al.*, 2007). Este problema, sumado a las condiciones

sociopolíticas de la región ha incrementado los costos y baja disponibilidad de este recurso renovable que se utiliza ampliamente en las industrias farmacéutica, cosmética y alimentaria, impulsando a nuevas fuentes que puedan en parte sustituir este producto.

1.3.2. Nuevas fuentes de galactomananos

En los últimos años, se han realizado esfuerzos para obtener nuevos aditivos que satisfagan la preferencia de los consumidores por formulaciones de origen natural, especialmente utilizando productos que provengan de fuentes renovables (Joshi & Kapoor, 2003). Por otra parte, las tendencias de la industria de obtener nuevas texturas y productos innovadores requieren la introducción de fuentes alternativas de polisacáridos que permitan continuar con la evolución de las formulaciones alimentarias. Es por esto fundamental la búsqueda de fuentes renovables, principalmente de especies vegetales de fácil acceso y bajo costo, que utilicen prácticas sostenibles de producción (Cerqueira *et al.*, 2009; Joshi & Kapoor, 2003). Existen además otras razones que han incentivado la búsqueda de nuevas materias primas capaces de producir gomas naturales, tales como la escasez e inseguridad en el suministro, la calidad y estabilidad de los precios de las gomas tradicionales, la necesidad de darle valor agregado a productos locales y la posibilidad de obtener productos con nuevas funcionalidades. Aparte de las fuentes tradicionales de goma guar y de algarrobo, numerosas semillas de leguminosas han sido

estudiadas como posibles fuentes de galactomananos. En general, se ha realizado la caracterización de fuentes no tradicionales de galactomananos, tales como: *Leucaena leucocephala* (Lombardi y Ramalho, 2003), *Gleditsia triacanthos*, *Sophora japonica*, *Adenanthera pavonina* y *Caesalpinia pulcherrima* (Sciarini *et al.*, 2009; Cerqueira *et al.*, 2009; Bourbon *et al.*, 2010), *Llemania royleana* (Razavi & Karazhiyan, 2009; Farahnaky *et al.*, 2010), *Dimorphandra gardneriana* (Cunha *et al.*, 2009) y *Mucuna flagellipes* (Nwokocha & Williams, 2009).

Otro de los géneros de la familia *Leguminaceae* es el género *Prosopis* perteneciente a la subfamilia de las *Mimosaceae*. Se han identificado 44 especies del género *Prosopis* (López-Franco *et al.*, 2013), de las cuales 40 son nativas de América y están distribuidas en una amplia variedad de zonas ecológicas. Estas especies se reproducen y sobreviven en zonas con suelos pobres en nutrientes y de baja humedad; con altas temperatura, alta tasa de evapotranspiración y con elevadas precipitaciones (Vilela y Ravetta, 2005). La información publicada sobre las propiedades fisicoquímicas y reológicas de gomas de semillas de *Prosopis spp.* no ha sido abundante. Se han publicado trabajos sobre gomas extraídas de las semillas de, entre otras especies: *P. flexuosa* (Ibañez y Ferrero, 2003) *P. pallida* (Cruz, 1999; Chaires-Martínez *et al.*, 2008), *P. chilensis* (Estévez *et al.*, 2004; Lira Toro, 2008), *P. juliflora* (Cruz, 1999; Azero y Andrade, 2002; 2006; Pinto-Vieira *et al.*, 2007), *P. africana* (Achi y Okolo, 2004; Nwokocha

& Williams, 2016); *P. alba* (Rozycki, 2007), *P. ruscifolia* (Busch, 2015 & 2017).

Los GM obtenidos de estas nuevas fuentes presentan diferentes grados de ramificación promedio, en diferentes patrones, y en ello radican las posibles funcionalidades y aplicaciones de los GM provenientes de estas fuentes diversas (Pollard, 2010). El grado de sustitución (GS) de las cadenas de manosa varía dentro de un rango limitado dependiendo del origen botánico. Dentro de la familia *Fabaceae* (*Leguminosae*), los galactomananos con bajo GS primariamente se presentan en la subfamilia *Caesalpinioideae* y los los GM con altos GS se presentan mayormente en la subfamilia *Faboideae*, según un análisis de frecuencia (Buckeridge *et al.*, 1995). La relación de M: G promedio varía de 1,8 en goma guar, a 3,0 en goma tara, y hasta 3,5 en goma de algarrobo. Los galactomananos procedentes de Sudamérica son poco utilizados en la industria, la goma tara es la única que llega a utilizarse masivamente en el ámbito internacional, a pesar de la biodiversidad de la flora local y el clima favorable para su producción o el desarrollo de especies nativas (Azero y Andrade, 2002).

1.3.3. *Prosopis* spp.

El fruto de las especies del género *Prosopis* es una vaina indehisciente que puede ser larga y derecha o corta y enroscada, dependiendo de la especie. Estas vainas, que varían en largo desde 3 a 30

centímetros, se producen colgantes sobre pequeños talluelos en ramilletes de hasta 12 (Ffolliot & Thames, 1983). En la figura 1-4 (Cruz, 1999) se pueden ver los diferentes componentes de la vaina de *Prosopis sp.*

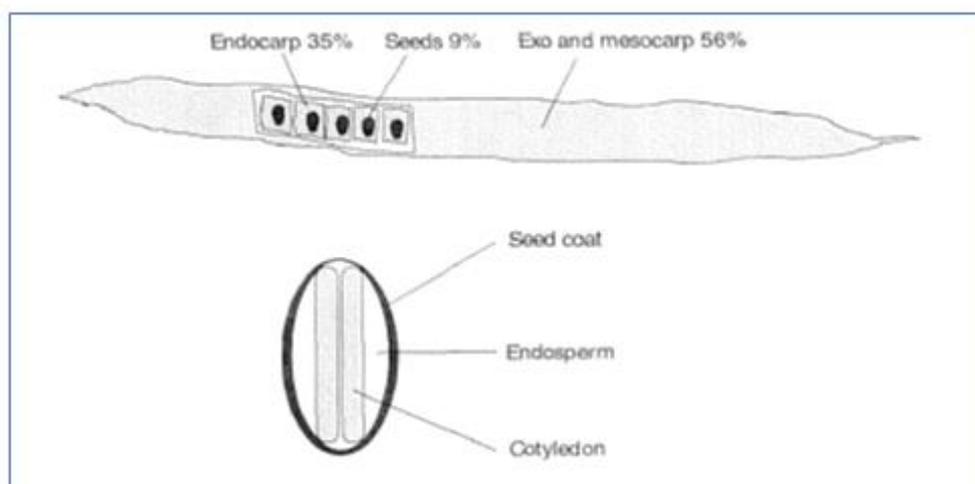


Figura 1-5: Componentes de la vaina de *Prosopis sp.*

El pericarpio es la parte que en los frutos de *Prosopis spp.* (la vaina) recubre la semilla, donde se puede distinguir tres capas, que de fuera hacia adentro son: exocarpio (cáscara), mesocarpio (pulpa) y endocarpio (cápsula). Dentro de la vaina, las semillas están encastradas en el mesocarpio. Las semillas están separadas entre sí por un tabique, denominado septum y cubierta por el endocarpio, que es impermeable al agua (Ffolliot & Thames, 1983).

El exocarpio posee un elevado contenido de fibras y es relativamente blando. El mesocarpio contiene una gran proporción de azúcares (40-45 %) es blando y sumamente higroscópico. Contiene bajas proporciones de proteína, lípidos y minerales. El endocarpio, posee un elevado contenido

de fibra al igual que el exocarpio y en condiciones determinadas de humedad se vuelve quebradizo al estar en estado vítreo al igual que el resto del fruto, posibilitando el desprendimiento de la semilla (Rozycki, 2007). La semilla constituye entre 10 y 25 % del peso del fruto. Presenta morfológicamente tres componentes: la testa que constituye el 30-33% del total de la semilla, el cotiledón, aproximadamente el 23-25%, y el endospermo el 42-46% (Figueiredo, 1983; Ffolliot & Thames, 1983). La testa (parte exterior) es de naturaleza fibrosa, muy dura, y está constituida principalmente por celulosa, lignina y taninos (Rozycki, 2007). El endospermo es el tejido de reserva de la semilla, está constituido por la aleurona y el endospermo harinoso. Los depósitos de galactomananos se encuentran en las paredes de las células del endospermo con una concentración de 35 a 85%, cantidad que depende de la especie, lugar de origen de la semilla y método de separación (Buckeridge *et al.*, 2000; Dakia *et al.*, 2008). Los cotiledones y el germen poseen un alto contenido de proteínas y constituyen un 23-50 % de la semilla (Ffolliot & Thames, 1983).

1.3.4. *Prosopis affinis* en Uruguay

Como parte del Programa Nacional para la Valorización de la flora nativa uruguaya, nuestro grupo interdisciplinario Udelar (CUT y FQ) e INIA Tacuarembó (área forestal), ha estudiado la especie *Prosopis affinis* (*Leguminosae*, *Mimosaceae*) como una fuente novedosa de galactomananos (Bennadji *et al.*, 2014). La especie *P. affinis*, que se

conoce popularmente como Ñandubay es un árbol nativo de Sudamérica, cuya área de distribución ocupa Uruguay, el este de Argentina, y el Sur de Brasil (Burkart, 1976; Pasiecznik *et al.*, 2004).

En la especie *P. affinis* no hay antecedentes de estudios sobre obtención y purificación de sus gomas ni de su caracterización estructural y propiedades funcionales (Vilaró *et al.* 2018).

Si bien los polisacáridos extraídos a partir de las semillas de *P. affinis* no han sido estudiados previamente, los estudios del grupo de Bennadji *et al.* (Programa Forestal, INIA Tacuarembó) acerca de la especie forestal datan del 2007 a la fecha. En este período, se ha avanzado en un programa de domesticación y mejoramiento con fines multipropósito utilizando una base de 200 accesiones colectadas a partir de formaciones naturales en el área de distribución (Bennadji *et al.*; 2008, 2010, 2011; 2012, 2014). Los datos preliminares de comportamiento productivos son alentadores tanto en sobrevivencia como en crecimiento. Por otra parte, los datos dasométricos de las poblaciones locales prospectadas, respaldados por datos recabados en zonas ecológicas similares a nivel regional, el buen comportamiento sanitario observado y la variabilidad genética registrada a nivel de individuos, han aportado buenos elementos de apreciación sobre el potencial uso multipropósito de *Prosopis affinis* (Bennadji *et al.*, 2012).

Considerando su relevancia económica, la especie ha sido reconocida como una especie clave para impulsar la reforestación dentro del género *Prosopis* (Burkart & Simpson, 1977), y se ha confirmado

localmente en base a encuestas con productores procedentes de las diferentes regiones en que se encuentra el área de dispersión (Bennadji *et al.*, 2007). Las estimaciones realizadas en el último inventario nacional de especies nativas permiten estimar que en el Uruguay solamente existen aproximadamente medio millón de árboles de *P. affinis* distribuidos a lo largo de las aproximadamente 852.000 ha de bosque nativo (Echeverría, 2010). Su área de dispersión geográfica se extiende sobre todo el litoral (Artigas, Salto, Paysandú y Soriano) y parte del suroeste (Colonia y San José) (Bennadji *et al.*, 2014). Respecto de la estimación de la producción de biomasa para la obtención de galactomananos, no existen reportes de la productividad de vainas por árbol para *P. affinis*. La producción de otras especies de *Prosopis*. está en el rango de 10 hasta 100 kg por árbol por año (Pasiiecznik *et al.*, 2004). La producción de semillas es muy variable, dependiendo no sólo de la variabilidad genética, sino de variación climática y estacionales y del modo de cultivo (Bouzouita *et al.*, 2006). Sin embargo, se ha reportado una producción de semillas en plantaciones comerciales de 2 años de antigüedad de 5kg por árbol (Felker, 1981), evidenciando la promisorio utilidad de la reforestación de esta especie.

1.3.5. Extracción de galactomananos

Una considerable variación en la producción de semillas desarrolladas completamente por fruto entre árboles individuales y de una población ha sido reportada. En general, en el género *Prosopis* se ha estimado una

producción de semilla que puede llegar a los 100 Kg de semilla por árbol maduro (Pasiiecznik, 2004). Se han reportado también en plantaciones comerciales jóvenes de 2 años y medio de antigüedad rendimientos de producción de 5 kg de vainas por árbol (Felker, 1981).

La recolección de la vaina se efectúa manualmente sometiéndose posteriormente a un proceso de secado natural o artificial que disminuye la actividad de agua (a_w) hasta niveles que aseguran la estabilidad del fruto por un período de tiempo prolongado (Figueiredo *et al.*, 1983). El secado de la vaina produce cambios relacionados con el fenómeno de transición vítrea, pasando del estado “gomoso” cuando su contenido de humedad es elevado, al estado vítreo cuando el contenido de humedad es inferior al 5%. En este estado, se puede reducir fácilmente su tamaño por procesos de molienda (Rozycki, 2007).

Para la extracción del galactomanano se realiza la separación de los componentes de la semilla, cotiledón, endospermo y testa. Se conocen tres métodos de separación ensayados a nivel de laboratorio: el tratamiento alcalino, el tratamiento ácido y por tostado, con rendimientos variables (Galera, 2000; Panegassi *et al.*, 2000; Frez, 2001; Suárez, 2003; Dakia *et al.*, 2008). Es importante destacar que las diversas técnicas utilizadas en la extracción de los galactomananos inciden en el rendimiento del proceso, pero también en las propiedades funcionales de los productos. Estas diferencias se basan fundamentalmente en la estructura que presenten los galactomananos extraídos, y principalmente en el grado de sustitución de

los residuos de galactosa en la cadena de manosa que se extraen dependiendo de las condiciones escogidas (Panegassi *et al.*, 2000; Dakia *et al.*, 2008).

1.4. Parámetros macromoleculares en galactomananos

Los parámetros moleculares de galactomananos han sido estudiados mediante diversas técnicas, tales como osmometría, centrifugación analítica, refractometría, viscosimetría y difracción de rayos X. La masa molar promedio de galactomananos ha sido determinada por cromatografía de permeación en geles (CPG) (Jian *et al.*, 2011;). Con el desarrollo de la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), estas técnicas fueron dejando de utilizarse y fueron parcialmente reemplazadas por técnicas SEC combinadas con detectores de dispersión de luz estática y dinámica (Podzimek, 2011). Algunas de estas técnicas, como la dispersión de luz han sido utilizadas en el análisis de polímeros, y también en el análisis de otras macromoléculas, como ser proteínas o polisacáridos (Wyatt, 1992).

1.4.1. Definiciones de las masas promedio molares y polidispersabilidad

En la bibliografía consultada se utilizan un sinnúmero de terminologías y expresiones para caracterizar la masa de los polímeros. Como los polímeros en general, y especialmente los polímeros naturales no tienen un valor de masa único, sino que se presentan como una distribución

continua de masa, distintos valores o índices se han utilizado para caracterizar el peso molar promedio de un polímero. Estos son el peso promediado en número, M_n , promediada en peso, M_w , z-average, M_z , y promediada en viscosidad o M_v . Las expresiones matemáticas que los definen se muestran a continuación.

$$M_n = \int_0^{\infty} M \cdot f_n(M) dM = \sum_i x_i M_i = \frac{\sum_i n_i M_i}{\sum_i n_i} = \frac{\sum_i m_i}{\sum_i m_i / M_i} = \frac{1}{\sum_i w_i / M_i} \quad (8)$$

$$M_w = \int_0^{\infty} M \cdot f_w(M) dM = \sum_i w_i M_i = \frac{\sum_i m_i M_i}{\sum_i m_i} = \frac{\sum_i n_i M_i^2}{\sum_i n_i M_i} \quad (9)$$

$$M_z = \frac{\int_0^{\infty} M^2 f_w(M) dM}{\int_0^{\infty} M f_w(M) dM} = \frac{\sum_i m_i M_i^2}{\sum_i m_i M_i} = \frac{\sum_i n_i M_i^3}{\sum_i n_i M_i^2} \quad (10)$$

$$M_v = \left[\int_0^{\infty} M^a \cdot f_w(M) dM \right]^{\frac{1}{a}} = \left[\sum_i w_i M_i^a \right]^{\frac{1}{a}} \quad (11)$$

Donde n_i es el número de moles, m_i es la masa, x_i es la fracción molar y w_i es la fracción en peso de las moléculas con masa molar M_i . El exponente a corresponde a la relación de Mark- Howink. Si el exponente es 1, entonces el exponente toma el valor 1 y el promedio ponderado en viscosidad se hace idéntico al promedio ponderado en peso (M_w). Los distintos promedios son sensibles a diferentes masas molares. M_n corresponde a la media aritmética, es el peso promedio de las masas que más se repiten en el polímero. Si el polímero tiene una distribución gaussiana de su masa molecular corresponde al punto máximo de la curva. Si el polímero tiene otro tipo de distribución no lo es. M_n es sensible a las fracciones con baja masa molar. En cambio, M_w o media cuadrática corresponde a la masa ponderada en peso y es más sensible a la existencia

de altas masas molares. La relación M_w/M_n se denomina índice de polidispersabilidad: cuando este índice es 1, se puede decir que el polímero es monodisperso, porque las masas molares promedio son idénticas. Si el polímero no es monodisperso, el valor de M_n se alejará tanto del de M_w en función de su grado de polidispersibilidad. En ocasiones se utiliza el parámetro M_z , cuando el valor M_n no puede ser determinado con exactitud, estimando la polidispersibilidad con la relación M_z/M_w . Finalmente, para los polímeros monodispersos todos los promedios molares son idénticos. La relación entre estas relaciones para polímeros polodispersos indica que tienen un valor tal que $M_n < M_v < M_w < M_z$.

1.4.2. Determinación de parámetros macromoleculares por HPLC/SEC/MALS

La aplicación de técnicas de dispersión de luz para la determinación del peso molecular absoluto ha sido vastamente establecida como una técnica válida para la descripción de polímeros en solución (McIntyre & Gornick, 1964; Flory, 1953; Wyatt, 1992). El término “absoluto” se refiere a que la masa molar medida está relacionada a una cantidad física exactamente determinable, como la presión de vapor, la presión osmótica, o la intensidad de luz dispersada (Podzimek, 2011).

La dispersión dinámica de luz acoplada a SEC ha sido utilizada para el análisis macromolecular de polisacáridos, en especial galactomananos (Salvalaggio *et al.*, 2014; Pollard, 2010; Picout, 2001). Mediante el sistema

de multidetección acoplada a los detectores de dispersión de luz se pueden estimar parámetros macromoleculares, como la masa molecular ponderada en peso (M_w), la masa molecular ponderada en número o número másico (M_n), a partir de correlaciones con parámetros como radio de giro (R_g) o viscosidad intrínseca (Wyatt, 1993; Reed, 1995). A los parámetros moleculares obtenidos por este método se los conoce también como peso molecular absoluto, denominación que se refiere al modo de obtención de los parámetros que formalmente no requiere de la utilización de estándares externos (Podzimek, 2011). La utilización de estándares como verificación es de todas formas usual y recomendable para confirmar unas correctas condiciones experimentales.

A continuación, se presenta el tratamiento matemático que permite obtener la masa molecular ponderada en peso y en número utilizando algunos formalismos muy conocidos.

La intensidad de la luz polarizada por una molécula es directamente proporcional a la masa molecular, según la ecuación de Rayleigh (1).

$$\frac{R_\theta}{K.c} = MP(\theta) - 2A_2c P^2(\theta) \quad (1)$$

Donde R_θ es la relación de Rayleigh (cm^{-1}), que mide la intensidad de la luz dispersada en función del ángulo, c es la concentración del polímero en solución (g/mL), M es la masa molar, A_2 es el segundo coeficiente virial, que caracteriza la intensidad de las interacciones del soluto con el solvente,

K es la constante óptica, y $P(\theta)$ es la función de dispersión de luz de la partícula (también llamada factor de dispersión de partícula).

La constante K es una constante óptica que es definida por la fuente de luz vertical polarizada incidente (2):

$$K = \frac{4\pi^2 \cdot n_0^2}{\lambda_0^4 \cdot N_A} (dn/dc)^2 \quad (2)$$

Donde n_0 es el índice de refracción del solvente a la longitud de onda de la luz incidente, λ_0 es la longitud de onda de la radiación incidente en el vacío, N_A es el número de Avogadro, y dn/dc es el incremento del índice de refracción de la muestra en función de la concentración. El valor de dn/dc se puede medir experimentalmente, y para polisacáridos de este tipo, con enlace glicosídico $\beta(1 \rightarrow 4)$ se encuentra en el rango 0,130 – 0,150 (Nwokocha *et al.*, 2016; Sébastien *et al.*, 2014; Youssef *et al.*, 2009).

La relación del coeficiente $R_\theta / K \cdot c$ en función de la concentración c es lineal en regiones de baja concentración, con una pendiente proporcional a A_2 , y se desvía de la linealidad a mayores concentraciones. Los nuevos detectores de dispersión de luz permiten trabajar a bajas concentraciones donde la magnitud de A_2 es despreciable. La función de distribución $P(\theta)$ describe el decrecimiento de la intensidad de la luz dispersada con el incremento del ángulo. Está definida como la intensidad de la relación de la radiación dispersada con la radiación incidente.

$$P(\theta) = \left(\frac{R_\theta}{R_0} \right)_{c=0} \quad (3)$$

Para ángulos θ pequeños.

La función de distribución de las partículas se puede aproximar a:

$$\lim_{\theta \rightarrow 0} P(\theta) = 1 - \frac{16\pi^2}{3\lambda^2} * R_g^2 \sin^2(\theta/2)$$

Y, dado que $\mu = \frac{4\pi}{\lambda} \sin(\theta/2)$

$$\lim_{\theta \rightarrow 0} P(\theta) = 1 - \frac{\mu^2}{3} R_g^2 \tag{4}$$

Donde λ/λ_0 es la longitud de onda de la luz incidente en un solvente indicado, R_g^2 es el radio medio cuadrático, y μ es el vector de dispersión.

La función de correlación $P(\theta)$ nos predice el movimiento de las partículas dispersas con el tiempo, que siguen un movimiento Browniano. De una forma simplificada, en la dispersión de luz dinámica (QUELS), se puede entender este fenómeno de la siguiente manera: aquellas partículas grandes, cambian el ángulo de incidencia de la luz del láser con el tiempo de una forma tal que la periodicidad y frecuencia nos predice la cantidad y concentración de partículas en dispersión (ver figura 1.6).

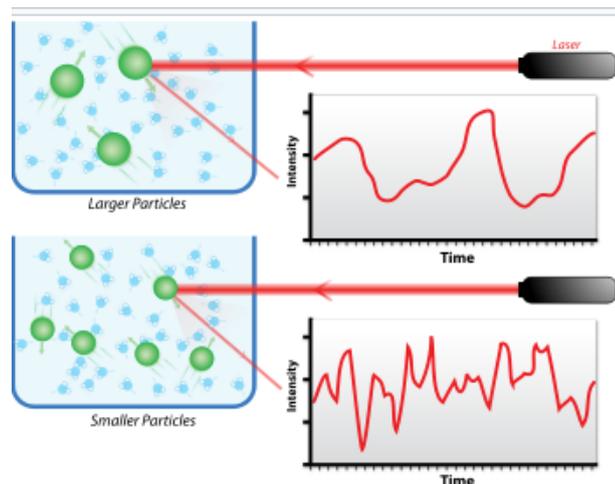


Figura 1-6: Descripción del movimiento browniano que ocasiona la función de correlación en los detectores de tipo light scattering (tomado de Chu, 2007)

La ecuación (4) nos muestra que al graficar $P(\theta)$ en función de $\sin^2(\theta/2)$, la dependencia es lineal, y proporcional al R_g . Esto nos muestra que al obtener el dato de R_g no se hace ninguna suposición de la forma o distribución de la partícula. El R_g describe la distribución de la masa alrededor del centro de gravedad. La relación del radio R_g con el radio de la molécula requiere asumir una forma para los varios tipos de moléculas (bobina al azar o *random coil*, esfera o bastón) y sustituir para obtener una función de distribución adecuada. Los datos experimentales pueden ser procesados usando diversos formalismos matemáticos: Debye, Zimm y Berry, que se obtienen de graficar $R_\theta/K.c$, $K.c/R_\theta$, $\sqrt{K.c/R_\theta}$ en función de $\sin^2(\theta/2)$ respectivamente. De acuerdo con Zimm (1948), la dependencia angular de la luz dispersada a una concentración tendiente a 0 puede expresarse combinando la ecuación (1) con la ecuación (4) para dar la expresión:

$$\left(\frac{K.c}{R_\theta}\right)_{c=0} = \frac{1}{M_w} + \frac{16\pi^2}{3\lambda^2} \cdot \frac{1}{M_w} R_g^2 \sin^2(\theta/2) \quad (5)$$

Esta ecuación (5) permite determinar M_w , A_2 , y el radio de giro R_g (Strelitzki & Reed, 1999; Podzimek, 2011). Al graficar $\left(\frac{K.c}{R_\theta}\right)_{c=0}$ en función de $\sin^2(\theta/2)$

la pendiente de esta relación al ángulo cero m_0 equivale a:

$$m_0 = \frac{16\pi^2}{3\lambda^2} \cdot \frac{1}{M_w} R_g^2 \quad (6)$$

Y la ordenada en el origen corresponde a $1/M_w$. El radio R_g promediado en z se calcula de la pendiente de la variación angular a la concentración cero:

$$R_z = \sqrt{\frac{3m_0\lambda^2 M_w}{16\pi^2}} \quad (7)$$

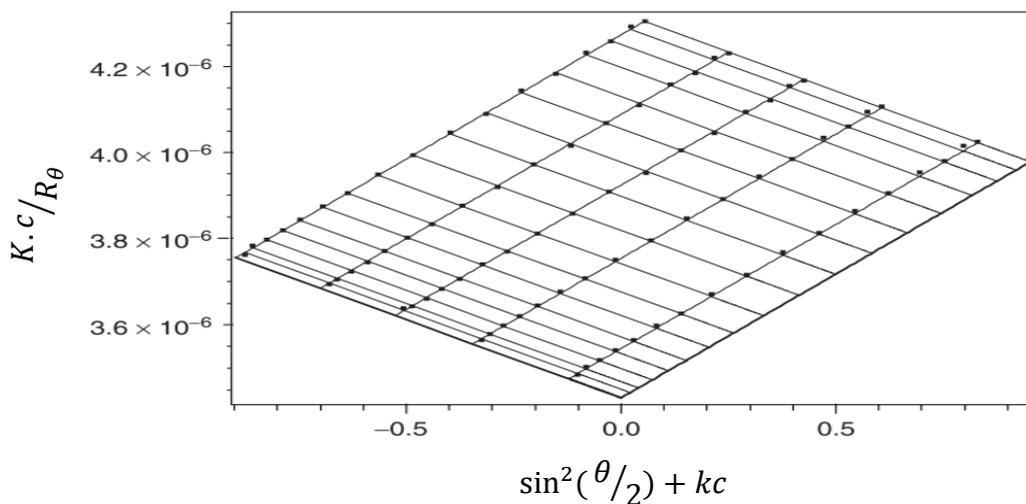


Figura 1-7: Modelo de gráfico de Zimm para el poliestireno NIST SRM 706. Tomado de Podzimek, 2011.

En la figura 1-6 se muestran 17 líneas puntos de la variación angular obtenida para cada nivel de concentración. Las líneas gruesas corresponden a la dependencia de la concentración y la dependencia angular a la concentración cero, utilizando la ecuación de Zimm, con THF como solvente, temperatura ambiente, luz polarizada a 690nm, $M_w = 291600 \pm 200$ g/mol, $R_z = 27,8 \pm 0.1$ nm; $A_2 = (4.33 \pm 0.04) \times 10^{-4}$ mol mL/g². Aunque el cálculo de R_z involucra M_w , el error en el cálculo de M_w debido a una estimación incorrecta del factor dn/dc genera un error proporcional en el factor m_0 que no afecta la estimación del R_z .

1.4.3. Caracterización de polímeros ramificados por dispersión de luz

La caracterización de polímeros ramificados como los galactomananos por HPLC/SEC/MALLS/RI requiere de una interpretación cuidadosa por la aparición de efectos tipo artefacto en la elución de SEC que deben ser revisados. Un primer acercamiento para determinar el grado de compactación de los polímeros en dispersión que eluyen de un sistema de poli-detección de este tipo es el gráfico de conformación. El gráfico de conformación relaciona el radio y las masas molares obtenidas a un volumen de elución dado por el perfil del HPLC/SEC/MALLS/RI. La diferencia en las pendientes de los diferentes polímeros es importante en la identificación de polímeros ramificados. Por ejemplo, la pendiente de 0.58 es típica de moléculas lineales en presencia de buenos solventes desde el punto de vista termodinámico (no tendientes a la agregación), mientras que una pendiente más baja (0.54) pueden indicar la presencia de cierto número de moléculas ramificadas. Es necesario recordar que el gráfico de conformación se basa en el formalismo utilizado (Zimm, Debye, Berry o *random coil*), y por tanto su exactitud depende de la certeza de los datos de distribución de peso molecular y radio de giro y particularmente de la exactitud de los métodos de procesamiento. Este tipo de análisis nos da información presuntiva que puede analizarse también por técnicas espectroscópicas y de simulación y modelado molecular (Bergamini *et al.*, 1995). A su vez, utilizando un viscosímetro diferencial o por estudio de

masas diferenciales a viscosidades límites se pueden obtener los parámetros de flexibilidad (L_p), que se obtienen a partir de modelos que incluyen la magnitud de la viscosidad intrínseca a diferentes valores de masa. El largo de persistencia es una magnitud que mide la flexibilidad del polímero y es la distancia espacial a la cual los monómeros no son mutuamente dependientes. El largo de persistencia para polímeros tiene una magnitud de 1 a 200 nm (Pitkänen *et al.*, 2017, Salvalaggio *et al.*, 2014, Robinson *et al.*, 1982).

La ramificación de cualquier tipo en los polímeros, manteniéndose constante el número de unidades, genera una reducción de las dimensiones moleculares, que puede representarse en términos de R_g , radio hidrodinámico o viscosidad intrínseca. La mayoría de los polímeros naturales tienen una estructura de ramificación al azar compuesta por diferentes masas molares, número de unidades de ramificación y diferentes largos y topologías. Cuando se realizan los ensayos de permeado por SEC, el factor que controla la separación es el volumen hidrodinámico de la estructura molecular en el solvente en dispersión. Es por esto que las moléculas que tienen un mismo volumen de elución luego de atravesar una columna tipo SEC son frecuentemente poli-dispersas respecto a la masa molar y características de ramificación. Además de este efecto, para muchos polímeros ramificados, existe una contribución adicional. En la figura 1-6 se muestra un gráfico de un polímero lineal y uno ramificado obtenido por SEC (Podzimek, 2001).

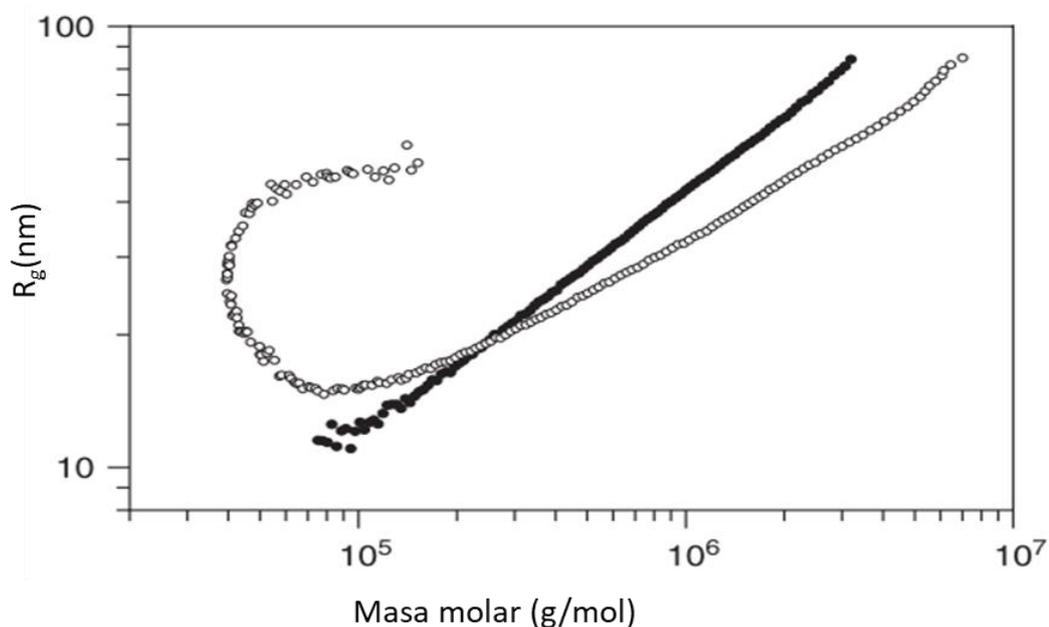


Figura 1-8: Gráfico de conformación de poliestireno determinado por SEC-MALS (●) para un poliestireno lineal y (○) para uno ramificado

Si se observa el gráfico para el polímero ramificado, existe una zona de menor masa molar cuyos radios pueden ser dos al mismo valor de masa molar. Este efecto es un artefacto, y es causado por una gran polidispersibilidad en las fracciones que eluyen en estos volúmenes. En cierto punto del cromatograma, el radio disminuye con el valor de masa molar, y a cierto punto las dos cantidades comienzan a aumentar con el volumen de elución. Este tipo de comportamiento es frecuente y más evidente con polímeros ramificados y entre ellos aquellos con un mayor número de ramificaciones. Este comportamiento se denomina efecto de anclaje o apelmazamiento (“*anchoring effect*”) y se representa gráficamente en la figura 1-7. Debido a este efecto, algunas moléculas grandes son retrasadas en su volumen de elución que correspondería a sus volúmenes

hidrodinámicos. Entonces, en este caso, las moléculas que eluyen son poli-dispersas y la suposición de mono-dispersión es incorrecta, no es correcto despreciar este efecto. Dentro de los parámetros relacionados a la descripción de la masa del polímero, el valor M_z es más sensible a la co-elución de moléculas grandes que fueron retenidas en el SEC. Este tipo de comportamiento se evidencia en la presencia de una cola ascendente en el cromatograma, y esta zona no debe ser utilizada para los cálculos de masa.

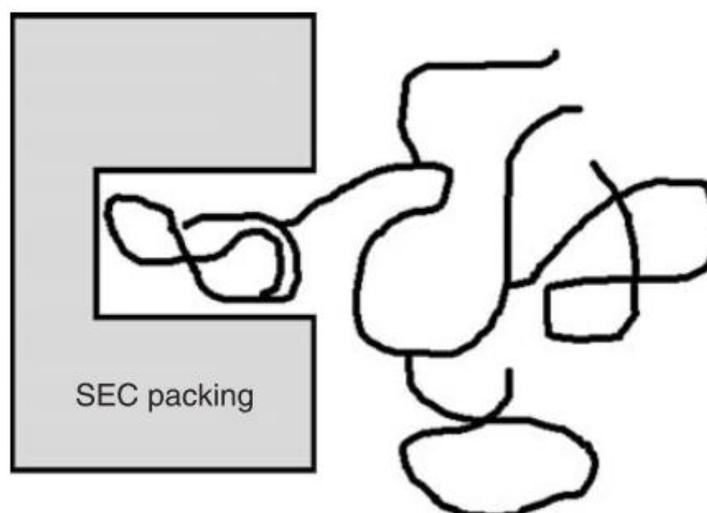


Figura 1-9: Representación gráfica del efecto de "anchoring" en columnas SEC

1.4.4. Determinación de viscosidad intrínseca y masa molar viscosimétrica

La masa molecular promedio de los polímeros se puede estimar mediante varias expresiones entre las que se encuentra la viscosidad intrínseca de los polímeros. La viscosidad intrínseca es una medida de la viscosidad a concentración tendiente a 0 y se relaciona a la masa promedio del polímero cuando no existe interacción polímero – polímero

(*hyperentanglements*) y también a la forma de la molécula. Se ha considerado a la viscosidad intrínseca como una propiedad fundamental para describir las propiedades básicas de un polímero (Salvalaggio *et al.*, 2014; Pitkanen *et al.*, 2017).

La determinación de la viscosidad intrínseca η puede describirse por la ecuación de Huggins (Ec.12) y Kraemer (Ec.13):

$$\frac{\eta_{sp}}{c} = [\eta] + k_H[\eta]^2 c \quad (12)$$

$$\frac{\ln \eta_r}{c} = [\eta] + k_K[\eta]^2 c \quad (13)$$

Donde k_H y k_K son las constantes de Huggins y Kraemer respectivamente, η_{sp} es la viscosidad específica, y c la concentración del polímero en dispersión (g/dL), y η_r es la viscosidad relativa (relación entre la viscosidad medida y la viscosidad del agua a la temperatura de medición). El valor k_H se obtiene de la pendiente del gráfico $\frac{\eta_{sp}}{c}$ vs c , mientras que k_K se obtiene de la pendiente del gráfico $\frac{\ln \eta_r}{c}$ en función de c (ver figura 1.9). Los valores de k_H son generalmente cercanos a 0,3 para buenos polímeros desde un punto de vista termodinámico, y aquellos valores en el rango 0,5 a 1 son típicas de pobres solventes (que presentan cierta agregación). Para polímeros dispersados en un buen solvente $k_K < 0$ y la diferencia entre ambas constantes $k_H - k_K$ tiene un valor de 0,5. Los formalismos clásicos de Huggins y Kraemer han sido utilizados para la caracterización de

polímeros, en particular de galactomananos (Busch *et al.*, 2014; Robinson *et al.*, 1982; Nwokocha & Williams, 2009, etc.).

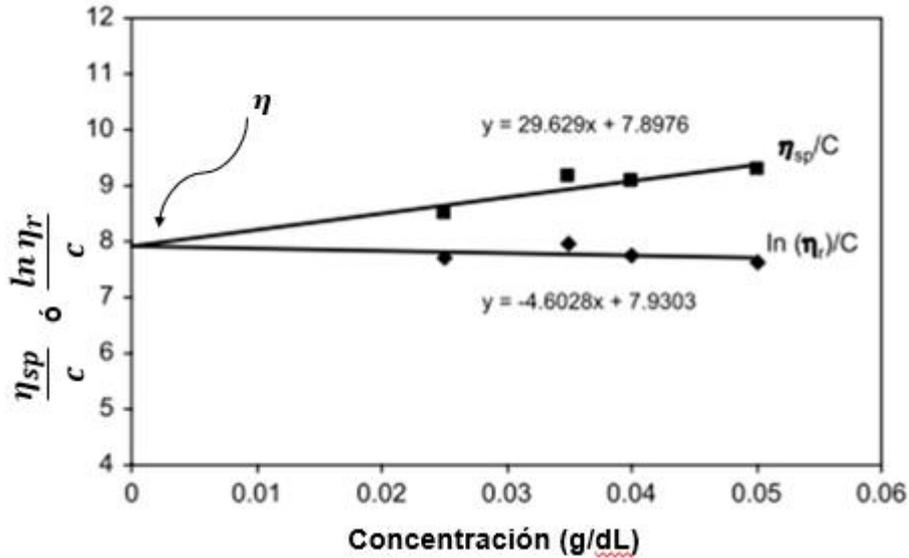


Figura 1-10: Representación típica de un gráfico con ecuaciones de Huggins & Kraemer (Tomado de Nwokocha & Williams, 2009).

Otro formalismo para la obtención de viscosidad intrínseca es el que postula Fedor para obtener la viscosidad intrínseca, (Ec. 14) (Nwokocha & Williams, 2016).

$$\frac{1}{2(\eta_r^{1/2}-1)} = \frac{1}{[\eta]c} - \frac{1}{c_m[\eta]} \quad (14)$$

Donde c es la concentración del polímero c_m es el factor de concentración que indica el límite máximo de la ecuación de Fedor.

La viscosidad intrínseca de moléculas alargadas y flexibles aumenta al aumentar el peso molecular promedio de las moléculas. La relación entre el peso molecular ponderado en viscosidad de las muestras y la viscosidad

intrínseca se relaciona mediante la ecuación de Mark-Houwink-Sakurada (MHS). (15)

$$\eta = K.M_v^\alpha \quad (15)$$

Los valores empíricos de la constante K y α se han obtenido en numerosos estudios (Salvalaggio *et al.*, 2014; Beer, 1999; Pollard, 2008) por diversas metodologías, pero sólo la multidetección por SEC acoplada a un viscosímetro diferencial logra obtener ambos parámetros simultánea e independientemente (Pollard, 2010).

Los parámetros de la ecuación de MHS para galactomananos han sido extensamente estudiados y según una revisión de Picout (2007) de los datos obtenidos en más de 25 años por diversos autores en muestras de diferentes galactomananos (Beer *et al.*, 1999; Picout *et al.*, 2001 & 2007; Robinson *et al.*, 1982 y Cheng *et al.*, 2002) no se ha encontrado diferencias significativas entre los parámetros, cuyas variaciones se encuentran dentro del error experimental. Es muy interesante que los parámetros no se modificaron significativamente en los galactomananos de diferentes orígenes (gomas guar, de algarrobo y tara) e incluso en otros polisacáridos como xilanos, con diferente composición de monosacáridos, pero un enlace similar en la cadena principal de monosacáridos. Esto arroja luz sobre el hecho de que el efecto de la geometría base de la cadena afecta su flexibilidad y este parecería ser el efecto fundamental en el valor de los parámetros y de lo que es más importante aún: la cadena principal y en particular del tipo de enlace repetido (estructura básica del polímero) ya que

condiciona la conformación espacial de estas moléculas en dispersión, sin que se modifique de manera apreciable según el número y patrón de sustituyentes (Picout *et al.*, 2007).

Una ventaja de la aplicación de la determinación de la viscosidad intrínseca en polímeros ramificados por este método clásico es que el efecto de anclaje o apelmazamiento (“*anchoring effect*”) en las columnas del SEC no es afectado en estas mediciones por la viscosimetría diferencial aplicada a MALS en modo *batch*. Asimismo, la utilización de muestras diluídas a muy bajo nivel de concentración logra limitar las interacciones polímero – polímero (“*hyperentanglements*”) y asegura la obtención de un parámetro clave para la comparación de polímeros diferentes.

1.5. Parámetros de fluencia en galactomananos

Los parámetros de fluencia de las dispersiones de hidrocoloides son fundamentales para poder determinar sus posibles aplicaciones en alimentos, y productos cosméticos y farmacéuticos. Como se ha mencionado anteriormente una propiedad fundamental de los galactomananos es la de aumentar la viscosidad de la dispersión en que se adicionan y esta propiedad genera la funcionalidad básica como espesante. Siendo la reología la ciencia del estudio del flujo y deformación de la materia, el conocimiento reológico permite describir entre otros, el comportamiento de fluencia de los materiales en un intervalo de esfuerzos de deformación, es decir que brinda la posibilidad de predecir cómo se

comportarán en condiciones de procesamiento, como ser bombeo, agitación mecánica y otros. Asimismo, en combinación con las pruebas texturales y sensoriales describe características que se pueden correlacionar con descriptores sensoriales vitales para el desarrollo y control de formulaciones cosméticas y alimentarias.

La viscosidad de los hidrocoloides presentes en un alimento o sistema similar es afectada por las propiedades de sus componentes estructurales, tanto de las partículas como de los polímeros en dispersión y por las condiciones de la estructura del producto (fase homogénea, gel o emulsión) y de las condiciones del procesamiento que afectan al comportamiento conformacional, la hidratación, agregación e hinchamiento. Además, los parámetros básicos de formulación como fuerza iónica, pH y temperatura modifican fuertemente el comportamiento reológico de una dispersión coloidal con una composición constante (Rao, 2007). La estructura de los alimentos y sistemas dispersos en general es el resultado de interacciones que abarcan un intervalo desde el nivel molecular ($<1 - 100\text{nm}$) al supramolecular (2×10^3 a 10^7 nm) (Clark & Ross-Murphy, 1987; Aguilera & Stanley, 1999). Las interacciones a un nivel molecular generan enlaces covalentes, puentes de hidrógeno, así como interacciones de tipo van der Waals. La comprensión de la estructura y comportamiento de los geles constituidos por biopolímeros es sumamente importante, pues lo que ocurre a nivel molecular causa comportamientos diferenciales notables a nivel supramolecular. En las dispersiones la estructura juega un rol muy

importante en la determinación del comportamiento reológico. Tanto las moléculas grandes como las partículas finamente divididas son consideradas materia coloidal y esto incluye a un intervalo dimensional de 10^{-9} a 10^{-6} m. Además de la dimensión microscópica y la distribución de tamaño que se pueden obtener por técnicas de dispersión de luz, rayos x, etc., en este tipo de sistemas la dimensión fractal se ha utilizado para caracterizar partículas de alimentos. La dimensión fractal indica el grado en que la imagen de un objeto se desvía de la regularidad y suavidad y afecta fuertemente a los fenómenos de hinchamiento, dispersión y agregación entre otros (Barbosa *et. al.*, 2005).

1.5.1. El parámetro crítico de superposición de cadenas c^*

Como se ha mencionado anteriormente los galactomananos tienen la propiedad de lograr un gran aumento de la viscosidad con el agregado de una baja proporción de polímero. Existe un parámetro que establece el valor de concentración límite al cual las cadenas de polímeros comienzan a solaparse y se pase de un régimen diluido a uno concentrado, el c^* . A bajas concentraciones, que corresponde a un régimen diluido, las cadenas de polímero se repelen entre sí y adoptan una configuración lo más extendida posible entre sí. La viscosidad intrínseca es una medida útil para comparar las viscosidades, luego de cierto valor c^* la concentración es tal que las cadenas empiezan a superponerse y adoptan una configuración en que, dada la cercanía entre las cadenas, se generan atracciones

específicas tipo Wan-der-Waals y puentes de hidrógeno (Couplan, 2014; Sworn, 2004). Esta conformación genera un estado no diluido en que la viscosidad aumenta marcadamente con la concentración. En la figura 1-10 se puede ver el efecto de la concentración en la viscosidad, el punto del cambio en la pendiente corresponde al c^* .

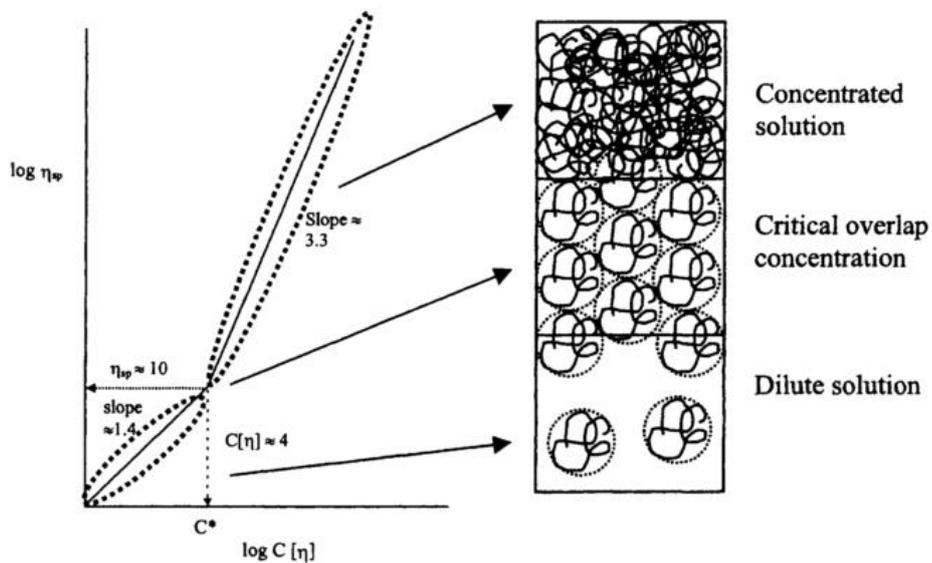


Figura 1-11: Relación concentración - viscosidad generalizada para cadenas de polisacáridos (tomado de Sworn et.al., 2004)

Como se puede ver en la figura 1-10, para valores menores a c^* la viscosidad de soluciones diluidas tiene un comportamiento donde $\eta \sim c^\alpha$, con un exponente experimental entre α 1.3 a 1.5. Cuando la concentración supera el valor crítico c^* la variación de la viscosidad con el polímero es mucho más pronunciada, con un exponente en el rango de 2.5 a 4.0 (Podzimek, 2011; Coupland, 2014; Sworn et. al., 2004). El valor c^* es importante para predecir las propiedades reológicas: a valores por debajo

del valor crítico c^* las soluciones tienden a comportarse como newtonianos, y por encima de este valor muestran un flujo pseudoplástico, con una viscosidad que disminuye a medida que el esfuerzo cortante aumenta. El valor de c^* se relaciona fuertemente con el volumen hidrodinámico: a mayor volumen hidrodinámico del polímero en ese solvente menor concentración es requerida para exceder la c^* . A su vez, existen varios factores que afectan el volumen hidrodinámico (V_h), al aumentar la rigidez de la cadena aumenta el V_h y la calidad del solvente afecta al volumen hidrodinámico. En un buen solvente las interacciones entre el polímero y el solvente son favorecidas. A su vez, los polímeros ramificados tienen una conformación más empacada a un mismo peso molecular promedio. Por ejemplo, la amilosa tiene una viscosidad intrínseca mayor que la de la amilopectina (Phillips & Williams, 2009).

El valor de c^* de muestras de galactomananos de fuentes del género *Prosopis* ronda los 0,14 g/dL (Busch *et.al*, 2015), 0,19g/dL (Nwokocha & Williams, 2016). La magnitud de c^* es variable, e incluso existen diferencias en un mismo tipo de producto dependiendo de la forma de obtención de los productos, pues las condiciones de extracción afectan las relaciones de longitud de la distribución de masa molecular y la proporción y distribución de residuos de galactosa, y su distribución, que afectan significativamente el V_h (Pollard, 2010; Salvalaggio *et.al.*, 2014).

1.5.2. Dependencia de la viscosidad con la concentración y el efecto cortante

La viscosidad es la resistencia a fluir de un material. Es una propiedad que entonces se puede determinar en condiciones de flujo. Para medir y describir precisamente el flujo de un material es necesario confinarlo, hacer que ocurra el flujo por medios mecánicos, medir la fuerza requerida para ello y convertir las fuerzas medidas a valores específicos que puedan ser comparados con otros (Rojas, 1999). El principio involucrado es el siguiente: imaginemos un plato cuadrado, metálico, anclado (para evitar su movimiento) y cubierto con una capa delgada de fluido de altura h . Ahora imaginemos otro plato del mismo tamaño que el primero, colocado sobre la superficie opuesta de la capa de fluido a una distancia h . Para deslizar el plato superior se debe aplicar sobre él una fuerza (Fig. 1.11).

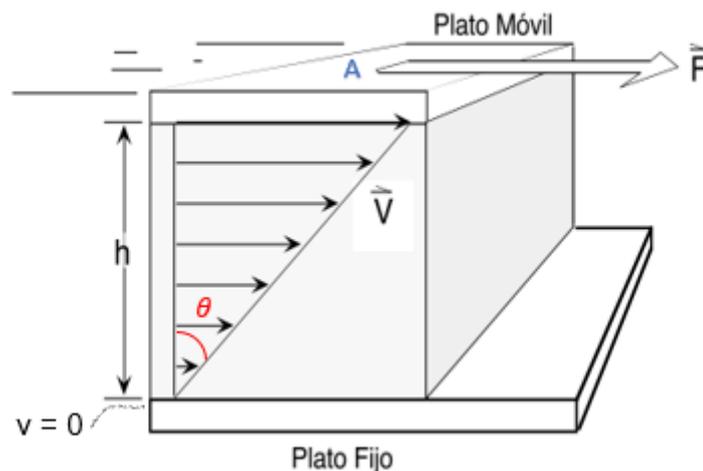


Figura 1-121: Modelo Fuerza de cizalla entre dos planos paralelos (adaptado de Rojas, 1999)

La fuerza requerida para mover el plato superior se relaciona con el área de contacto con la sustancia (A). Se denomina esfuerzo de corte (τ) al valor de fuerza total para lograr el movimiento por unidad de área. El esfuerzo cortante, corresponde a unidades de fuerza (N) por unidad de área, y por tanto toma unidades de N/m^2 (Pa) en el sistema métrico internacional. El grado de deformación que se genera en el fluido y es un tensor que se describe como $\tan \theta$ ó dx/h . La velocidad de deformación $\dot{\gamma}$ es definida como la velocidad relativa v (m/s) dividido la distancia h entre los platos (m) y también corresponde, o gradiente de velocidad, corresponde a $\dot{\gamma} = d \tan \theta / dt$. El gradiente de velocidad nos describe el cambio desde la velocidad = 0 (placa estática) hasta la velocidad v , y está correlacionado a las fuerzas viscosas del fluido que transmiten la velocidad entre las capas del fluido. En un líquido Newtoniano, el esfuerzo cortante τ es proporcional a la velocidad de deformación y la constante de proporcionalidad se denomina viscosidad (η):

$$\eta \dot{\gamma} = \tau \quad (16)$$

En general, luego de sobrepasar el parámetro límite de concentración c^* , en que las cadenas de los polímeros comienzan a asociarse entre sí, el comportamiento de estas dispersiones es pseudoplástico, es decir que a medida que el esfuerzo cortante aumenta la viscosidad de las soluciones disminuye. La ley más clásica para definir este comportamiento es la ley de potencia, que en su forma simplificada a esfuerzo cortante simple (o aquel

en que no hay distorsión de los planos del fluido) se representa como (Macosko, 1996):

$$\eta = m\dot{\gamma}^{n-1} \quad (17)$$

ó

$$\tau = k\dot{\gamma}^n \quad (17b)$$

Donde η es la viscosidad aparente, $\dot{\gamma}$ es el esfuerzo cortante en s^{-1} , y n^{-1} es el exponente y m es el índice de consistencia, que se modifica en función de la temperatura. Análogamente la ecuación 17b es muy usual para la determinación de los parámetros de la ley de potencia en curvas de flujo (Macosko, 1996, Couplan, 2014), en donde k representa el índice de consistencia y n el índice de comportamiento. En las condiciones de proceso de muchos líquidos poliméricos y dispersiones la ley de potencia es una buena aproximación al ajuste de datos experimentales de viscosidad en función de esfuerzo cortante (Macosko, 1996). Los fluidos con $n=1$ se consideran newtonianos, con $n<1$ pseudoplásticos (la mayoría) y en los casos en que la viscosidad aumenta al aumentar el flujo (menos frecuentes) ($n>1$) se consideran dilatantes. Sin embargo, esta ley no describe bien la zona de baja velocidad de cizallamiento: como n es usualmente menor que 1 (y especialmente en galactomananos que presentan dispersiones pseudoplásticas), a bajos esfuerzos cortantes la viscosidad η tiende a infinito cuando experimentalmente es usual observar que en ese intervalo la viscosidad se acerca a un valor η_0 . Algunos de los modelos que incluyen un segundo o tercer parámetro y que explican mejor

este comportamiento son el modelo de Cross y de Carreau, que relacionan la viscosidad aparente de la solución a la deformación característica ($\dot{\gamma}_0$) (por ejemplo, cuando $\dot{\gamma}$ es 1s^{-1}) y η_0 (viscosidad que corresponde a esta deformación). El modelo de Carreau (también conocido como modelo de Carreau – Yasuda) agrega los parámetros a y λ_c , siendo λ_c un parámetro indica el tiempo en que el comportamiento de la solución comienza a cambiar con el esfuerzo cortante.

El modelo de Cross:

$$\eta(\dot{\gamma}) = \eta_{\infty} + \frac{\eta_0 - \eta_{\infty}}{1 + (\dot{\gamma}/\dot{\gamma}_0)^{n-1}} \quad (18)$$

Y el modelo de Carreau (Yasuda *et al*, 1981)

$$\frac{\eta - \eta_{\infty}}{\eta_0 - \eta_{\infty}} = \frac{1}{[1 + (\lambda_c \dot{\gamma})^a]^{(1-n)/a}} \quad (19)$$

El modelo de Cross y Carreau ha descrito bien la dependencia con el esfuerzo cortante de soluciones acuosas de pectinas y de LBG (Lopes da Silva *et. al.*, 1992), solución de goma de mesquita (Yoo *et al.*, 1995) y otras gomas (Launay *et al*, 1986).

Esta dependencia se puede percibir claramente al visualizar el comportamiento asintótico de este modelo a bajos y altos valores de esfuerzos cortantes como se observa en la Fig. 1-12 para el modelo de Cross.

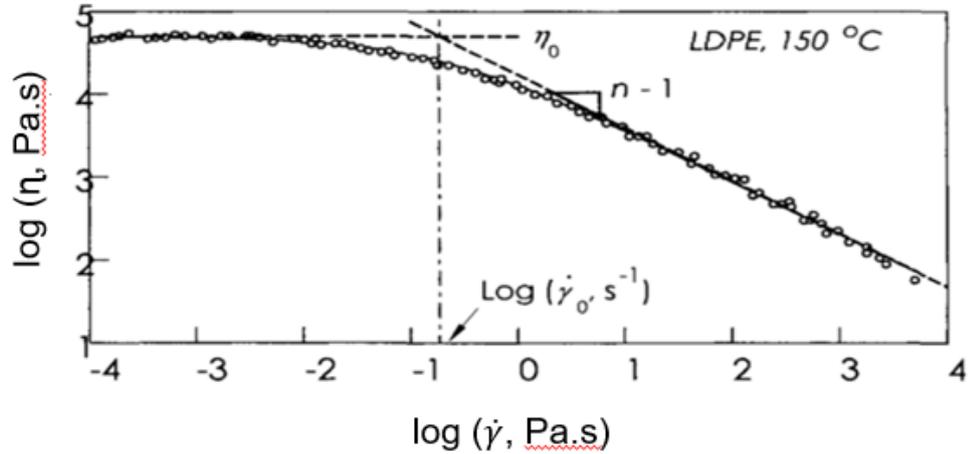


Figura 1-13: Modelo de Cross para LPDE (tomado de Laun, 1978) en Montgomery, 2012.

En la figura 1-12 las líneas punteadas muestran el comportamiento asintótico del modelo de Cross a bajos y altos esfuerzos cortantes. Cuando el esfuerzo cortante tiende a 0 la viscosidad tiende a η_0 y en la pendiente de la zona de esfuerzos cortantes tendiendo a $+\infty$, la pendiente es $(n-1)$ y la intersección de estas rectas es el esfuerzo de corte característico $\dot{\gamma}_0$.

De igual manera, el modelo general de Williamson ha sido aplicado a soluciones de polisacáridos y en particular a galactomananos, como los obtenidos de *Prosopis africana* y *Delonix regia* (Nwokocha *et al.*, 2016; Nwokocha *et al.*, 2017). Frecuentemente, la región de η_∞ no se observa y el parámetro η_∞ se ajusta a cero obteniendo el modelo de Ellis (Macosko, 1996). Análogamente, el modelo de Williamson es una simplificación del modelo de Carreau cuando el valor de η_∞ se aproxima a cero y el valor α

se estima en 1 (Montgomery, 2012; Nwokocha *et al.*, 2016). El modelo simplificado de Williamson tiene la expresión siguiente:

$$\frac{\eta}{\eta_0} = \frac{1}{1+(\tau\dot{\gamma})^N} \quad (20)$$

Donde η y η_0 son las viscosidades dependientes del esfuerzo cortante y la viscosidad a esfuerzos cortantes cero, respectivamente, y $\dot{\gamma}$, τ y N representan la velocidad de deformación, el tiempo de relajación de Williamson y el índice de Williamson, respectivamente.

2. OBJETIVOS

Objetivos

2.1. Objetivos generales

Caracterizar química y fisicoquímicamente la goma obtenida a partir del endospermo de semillas de *P. affinis*.

2.2. Objetivos específicos

Desarrollar una metodología adecuada para la obtención a escala de laboratorio de galactomananos de pureza definida a partir de las vainas de *P. affinis* y gomas comerciales. Estudiar el efecto de las condiciones de extracción en la pureza, rendimiento y características de los productos obtenidos.

Determinar la estructura química básica de las gomas obtenidas, confirmar los tipos de enlace y la proporción media de residuos de manosa y galactosa en los diferentes extractos.

Determinar el perfil de pesos moleculares de las gomas obtenidas y otros parámetros moleculares, definir su viscosidad intrínseca, y cómo se modifican en función de las condiciones de extracción.

Definir algunos parámetros básicos de fluencia de galactomananos en dispersión simple. Comparar las características reológicas en dispersión acuosa de los galactomananos obtenidos y aquellos obtenidos de materiales de referencia: gomas guar y de algarrobo,

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales y métodos

3.1. Material de referencia

Se utilizaron muestras de gomas comerciales: goma guar (Altrafine Gums, India) y goma de algarrobo (Wolf Canyon Pacific, Hong Kong). Las muestras comerciales fueron suministradas por la empresa Aromas y Sabores (Montevideo, Uruguay).

3.2. Material vegetal

Se recolectaron vainas maduras de *P. affinis* en marzo de 2014 a partir de un ejemplar individual tomado del bosque nativo en un área cercana a Paysandú (latitudes sur 32° 22' 49.3" y oeste 58° 03' 24.5") y fue nombrado como E37. La muestra fue autenticada por la Prof. Ma. Julia Bassagoda y se depositó una muestra de referencia en el Herbario de la Cátedra de Botánica de Facultad de Química, UdelaR, con el número MVFQ 4426. En las figuras 3-1 y 3-2 se muestra el monte de *P. affinis* y el mapa de las accesiones de *Prosopis* que incluye las zonas de recolección.

Materiales y métodos



Figura 3-1: Monte de *Prosopis affinis* en la zona de colecta



Figura 3-2: Dispersión geográfica de la variedad *Prosopis affinis* y zona de colecta de las muestras
(elaboración: Javier Lizarraga)

Materiales y métodos

3.3. Acondicionamiento de la muestra

Las vainas fueron clasificadas, los restos de polvo fueron eliminados con pincel y se secaron en estufa a 40°C por 72 horas. Las semillas se separaron manualmente de las vainas, obteniendo el rendimiento de esta operación por triplicado. En la Figura 3-3 se muestran algunas vainas de *P. affinis* que se utilizaron en el presente trabajo.



Figura 3-3: Vainas de Prosopis Affinis

3.4. Separación del endospermo

a) Para separar el endospermo, 20g de semillas se suspendieron en en agua a 100°C por 10 minutos, se enfriaron con agua corriente (20°C) y se hincharon en agua a temperatura ambiente por 10 minutos. Una vez que el endospermo se hidrata es posible separarlo con facilidad de la cubierta (testa), el cotiledón y el embrión, estas partes fueron separadas también.

Materiales y métodos

El endospermo así separado fue liofilizado y reservado hasta su uso posterior. Para la operación de separación del endospermo se realizaron pruebas preliminares mediante tratamiento con ácido sulfúrico (Cruz, 1999) y tratamiento con hidróxido de sodio según Rozycki (2007). Es importante destacar que estas pruebas no fueron satisfactorias para la separación del endospermo de *P. affinis*.

3.5. Extracción de los galactomananos

Para la extracción del endospermo, 10 g de endospermo liofilizado fue suspendido en 30 ml de etanol por 15 minutos para inactivar enzimas endógenas (Cruz, 1999; Cerqueira *et al.*, 2009), luego centrifugado a 3500 rpm y el sobrenadante fue concentrado por rotaevaporación hasta obtener una fracción etanólica (FE). Para lograr la solubilización de los galactomananos el endospermo así tratado fue luego suspendido en 40 ml de agua a temperatura ambiente por 24 horas con agitación. Luego se centrifugó a 3500 rpm por 15 min separando el pellet que corresponde al material no disuelto. El sobrenadante se trató con 150 ml de isopropanol para promover la floculación del polímero extraído y luego de ser centrifugado a 3500 rpm el precipitado fue liofilizado para obtener la fracción cruda de galactomanano de *P. affinis* (GMP_{1/RT}). El residuo de la extracción acuosa a temperatura ambiente (pellet) fue re-extraído en agua a 2 volúmenes de agua a 80°C por 3 horas. El extracto acuoso fue precipitado con 150 ml de isopropanol, centrifugado a 3500 rpm y el pellet

Materiales y métodos

se liofilizó para obtener una segunda fracción de galactomananos (GMP_{1/80C}). Las gomas comerciales guar (GG) y algarrobo (LBG) se sometieron al tratamiento anterior con fines comparativos, para dar las fracciones que se nombraron como GG_{1/RT}, LBG_{1/RT}, GG_{1/80C} y LBG_{1/80C}, para los materiales derivados a partir de GG y LBG a temperaturas ambiente y 80°C respectivamente. Una representación del proceso de extracción de las diferentes fracciones se presenta en la figura 3.4.

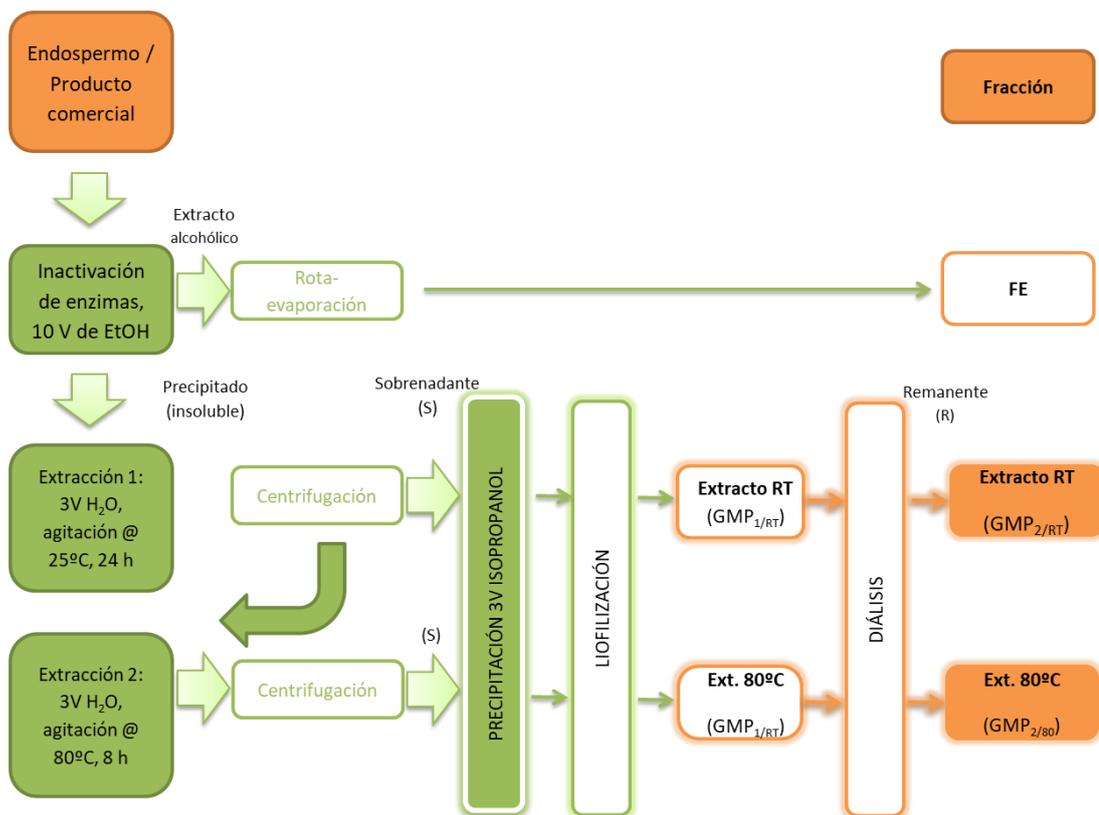


Figura 3-4: Diagrama de flujo representativo de la extracción de galactomananos a partir de endospermo de *P. affinis* y gomas comerciales

Materiales y métodos

3.6. Purificación de galactomananos

Los galactomananos obtenidos previamente (200 mg) fueron disueltos en agua y dializados contra agua Milli-Q por 24 h utilizando una membrana de celulosa con un corte de 12 kDa (Sigma D6191) y el retenido fue liofilizado. Los productos así obtenidos fueron nombrados como: GMP_{2/RT}, GMP_{2/80}, GG_{2/RT}, GG_{2/80C}, LBG_{2/RT} y LBG_{2/80} respectivamente de acuerdo con el material de partida utilizado. Se calculó un rendimiento en masa del proceso de diálisis en base a la masa inicial, en base seca.

3.7. Composición de monosacáridos

El análisis de monosacáridos se realizó basado en la técnica de Sawardeker (1965). Aproximadamente 1 mg de los extractos de *P. affinis* y de los materiales de referencia fueron hidrolizados en 400 µL de ácido trifluoroacético 2 M (Merck) a 100°C por 4 horas.

3.8. Análisis por Cromatografía en capa fina

Se realizaron cromatografías en capa fina de los productos de hidrólisis de los galactomananos en placas de sílica gel 60 (Machery Nagel) utilizando una mezcla de MeOH/ CHCl₃/EtOH/NH₄OH (42:17:25:17) como fase móvil, se secaron al aire y se rociaron con una solución de orcinol al 0,2% en EtOH/ H₂SO₄ (90:10), y se calentaron por 2 minutos a 110°C (Garófalo *et al.*, 2011). Se utilizaron estándares de D-galactosa y D-manosa (Applichem).

Materiales y métodos

3.9. Análisis de azúcares y determinación de relación manosa: galactosa

Los hidrolizados de las muestras (aprox. 2 mg) se disolvieron en agua (1 mL) y se analizaron por HPLC/DAD/RI en un equipo de cromatografía líquida Shimadzu 20A, utilizando una columna SUPELCOGEL™ Pb (300 x 7.8 mm, 9 µm de tamaño de partícula) a 85 °C, utilizando agua como fase móvil, con una velocidad de flujo de 0.5 mL/min y un volumen de inyección de 20 µL. Utilizando las mismas condiciones, se realizó una curva de calibración en el rango de 0,1 a 6,0 mg/L utilizando D-galactosa y D-manosa para la cuantificación de los monosacáridos presentes en las muestras hidrolizadas.

3.10. Análisis de metilación o de posición de unión

Las muestras de los galactomananos (0,5 -0,7 mg) se disuelven en DMSO previamente seco (1 ml) por agitación y sonicación a 10°C por 8 horas, y se trató según el método de Morelle & Michalski, 2007 con modificaciones menores para obtener los acetatos de alditol parcialmente metilados (PMAAs). Los PMAAs así obtenidos, se retomaron en etil-acetato y se analizaron por GC-MS en un equipo Shimadzu GCMS-QP2010 Ultra equipado con una columna Agilent HP-5 de dimensiones 30 m x 0,25 mm, y 0.25 µm de grosor del filme y en un GC-FID GC HP 5860 equipado con una columna idéntica HP5. Las muestras se inyectaron en modo manual (1 µL) utilizando el modo split, (1/50) con el inyector y el detector operando

Materiales y métodos

a 210 y 280°C, respectivamente. El programa de temperatura consistió en una meseta inicial de 2 minutos a 150°C, seguido por una rampa lineal de 4 °C/min hasta los 270 °C manteniéndose a esa temperatura por un minuto adicional. Se utilizó helio como gas portador, con una velocidad lineal de 40 cm/s a 200°C, con un retraso de solvente de 4 min. La adquisición del detector de masas se realizó en el intervalo de 50 a 400 m/z a un nivel de energía de ionización de 70 eV. Los componentes se identificaron utilizando derivados obtenidos análogamente desde lactosa (Merck) y gomas comerciales (GG y LBG) y los patrones de fragmentación principal se confirmaron comparando con los reportados por Jansson *et al.*, 1976.

3.11. Contenido proteico

El contenido proteico fue analizado por el método del ácido bicinconínico (QuantiPro™, Sigma), utilizando albúmina sérica bovina (BSA, Sigma) como estándar. Aproximadamente 0,5 mg de las muestras se suspendieron en 1 mL de buffer tartrato/ carbonato a pH 11,3. Se prepararon diluciones seriadas de una solución stock de BSA de 50 μL / mL para realizar la curva de calibración. Las muestras se mezclaron con el reactivo de ácido bicinconínico, se incubaron a 60°C por 60 min y se midió la absorbancia de las soluciones resultantes de este proceso de desarrollo de color a 562 nm en un espectrofotómetro Spectrum SP-UV 300 SRB.

Materiales y métodos

3.12. Espectroscopía de RMN

Los experimentos de RMN se realizaron en un espectrómetro Bruker AVANCE III 500 operando a las frecuencias de ^1H y ^{13}C 500,13 y 125,76 MHz, respectivamente. Las muestras de galactomananos (5-10 mg) se disolvieron en D_2O (0,5 mL), liofilizados, y re-disueltos en D_2O (0,7mL) con de 3-trimetilsilil propionato de sodio 2,2,3,3- d_4 (TSP) como estándar interno. Los experimentos, incluyendo ^1H , ^{13}C ^1H con supresión de H_2O , TOCSY con gradientes y espectros de HSQC mejorados por gradiente, se llevaron a cabo a 25 y 60°C utilizando secuencias de pulso estándar y parámetros provistos por el software del espectrómetro.

3.13. Experimentos de HPLC/SEC/MALLS/RI

Las mediciones de HPLC/SEC/MALLS/RI se realizaron en un equipo HPLC Shimadzu 7m100V equipado con una columna Agilent SEC 5 (300 mm x 7,8mm, 5 μm de tamaño de partícula, 300 Å de tamaño de poro), que se adosó a un sistema de multi-detección compuesto por un detector UV-Vis SPD-20A ajustado a 214 y 280 nm (Shimadzu), un refractómetro diferencial RID-10A (Shimadzu) y un detector de dispersión de luz láser multi-ángulo (MALLS) Dawn 8 (Wyatt Technology). La fase móvil utilizada para estos experimentos fue buffer fosfato a pH 6,8, y se utilizó una velocidad de flujo de 0,5 mL/min. Las muestras (1-5 mg/mL) fueron solubilizadas en el mismo *buffer* por agitación continua por 12 horas a temperatura ambiente y luego centrifugadas a 3.500 rpm por 10 min a 10°C, y filtradas a través de

Materiales y métodos

membrana de 0,45 μm de acetato de celulosa (Millipore), este paso ha sido reportado como crucial para evitar la agregación del polímero en los pasos subsecuentes (Salvalaggio *et al.*, 2014). Se realizaron inyecciones duplicadas de todas las muestras. Los datos obtenidos del SEC/MALLS/QUELS/IR se analizaron con el software ASTRA versión 6.1 (Wyatt Technology) para obtener valores del peso molecular ponderado en peso (M_w), ponderado en número (M_n), radio de giro, R_g y radio hidrodinámico (R_h) utilizando un dn/dc de 0,145 para los cálculos de M_w y M_n . Asimismo, se realizaron curvas de calibración con estándares de pululanos en el rango de 1×10^4 a 7×10^5 g/mol (Shodex P82).

3.14. Experimentos reológicos realizados en curvas de flujo (a esfuerzos de corte fijo)

3.14.1. Determinación de la viscosidad intrínseca y el peso molecular ponderado en viscosidad

Se prepararon soluciones de reserva (*stock*) por agitación de 0,2 g de gomas comerciales o galactomananos de *P. affinis* en 100mL de agua conteniendo azida de sodio (50 ppm) por 24 h a 500 rpm a temperatura ambiente (para los extractos RT) y a 40°C (para los extractos a 80°C). Para las determinaciones de viscosidad se utilizó un reómetro Anton Paar Physica MCR 301 con una configuración de cilindros concéntricos con geometría doble gap (DG 26.7). Se realizaron diluciones seriadas para

Materiales y métodos

obtener soluciones de concentraciones finales 0,1 a 0,01 g/dL y se equilibraron a 20°C por 2 minutos antes de realizar las mediciones (curvas de flujo). La viscosidad relativa, η_r , se calculó utilizando la ecuación de Fedor (ec. 14) y se testearon también las ecuaciones clásicas de Huggins y Kraemer (Busch *et al.*, 2015; Nwokocha *et al.*, 2016). La masa molecular promediada en viscosidad (M_v) de las muestras se calculó a partir de la viscosidad intrínseca utilizando la ecuación de MHS (ec. 15), utilizando una constante K de 6.0×10^{-4} y un α de 0,70 dL/g, de acuerdo con (Picout *et al.*, 2001).

3.14.2. Viscosidad dependiente del esfuerzo de cizalla

Los estudios de fluencia para determinar el comportamiento reológico de las dispersiones de galactomananos se realizaron en un reómetro Anton Paar Physica MCR 301. Las dispersiones de concentración 0,1 a 0,4% se prepararon por dispersión en solución de agua con azida de sodio 50 ppm a RT para los extractos RT y a 40°C para los extractos que se obtuvieron a 80°C. Se realizaron curvas de flujo fijando las velocidades de deformación entre 1 y 200 s⁻¹ y registrando los esfuerzos de corte aplicados para obtener dichas deformaciones con mediciones a 25 y 60°C y utilizando la geometría cilindros concéntricos con la sonda DG 26.7. Se realizó el ajuste de diferentes modelos dependiendo de la respuesta de la solución del polímero y la concentración: newtoniano, ley de potencia y ecuación de Cross-Williamson.

Materiales y métodos

3.15. Ensayos reológicos dinámicos

Para los ensayos dinámicos se realizaron dispersiones de concentraciones variables en el rango 0,05% a 0,4% preparadas como se explica en el apartado 3.15 y se efectuaron barridos de frecuencia. Los mismos consisten en un test oscilatorio en la que se aplican esfuerzos cortantes constantes y se varía la frecuencia de oscilación de los mismos recuperándose los módulos de almacenamiento (G') y pérdida (G''). Se trabajó en el intervalo 1 a 50 Hz, a una temperatura de 25°C, en el modo de adquisición que obtiene las variables módulo de almacenamiento y módulo de pérdida (Pa) en función de la frecuencia angular.

3.16. Análisis estadístico

Se utilizaron tres replicas para todas las estimaciones y se reportaron el promedio de los tres valores ± 2 desviaciones estándares. Cuando se indica, los resultados fueron analizados por análisis de varianza (ANOVA). Cuando los resultados de los análisis de varianza mostraron diferencias entre las medias se aplicó el test de Tukey para diferenciar cada media, con una confianza del 95%. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete Agricolae (de Mendiburu, 2016) implementado para el software estadístico R (version 3.3.1, The R Foundation).

4. RESULTADOS

Resultados

4.1. Rendimiento de extracción de goma de *P. affinis*

4.1.1. Determinación del porcentaje cuantitativo de semillas

La obtención de las semillas se realizó por triplicado a partir de 30 g de vainas. El rendimiento de semillas por vaina se presenta en la tabla 4-1. El porcentaje de rendimiento de semillas fue mayor al reportado por Rocycki (2007) para Algarrobo blanco (9.3%) y para Algarrobo negro (11,1%), y del máximo del intervalo obtenido en *Ceratonia siliqua* (11 al 18%) por Bouzouita *et al.*, (2007). En este punto cabe resaltar que hay un efecto tecnológico que dificulta la comparación, puesto que en el presente trabajo se realizó de manera manual y no por molienda, y es claro que en condiciones semi – industriales serán inferiores, pero sí serían indicativos de la posible de productividad del fruto. Dentro del género *Prosopis* también hay reportes de mayores rendimientos, en las variedades *Prosopis velutina* y *glandulosa* (Meyer, 1984, 25%, y de 32.25% en *Prosopis alba* (López Hernández *et al.*, 1985). Este rendimiento, así como la proporción de endospermo disponible, depende de la especie (Fernandes, 1995), pero además de las características de la región de cultivo: para la producción comercial de *C. siliqua*, Bouzouita *et al.* (2007) reportó una variabilidad de rendimiento de semilla del 11 al 18% dependiendo de la región de donde la muestra fue recogida. Estos autores explican que esta alta variabilidad está determinada por el origen geográfico que engloba un número de variables como ser la variabilidad

Resultados

genética, climática y condiciones de suelo que son algunos de los principales parámetros que explican las diferencias de rendimiento dentro de las mismas especies. Se debe tener en cuenta que en este trabajo la muestra utilizada corresponde a un árbol aislado, por lo que más estudios se deben realizar para evaluar el efecto del origen geográfico de las muestras en su productividad en semilla.

Artejo	82,8± 0,5%
Semilla	17,2± 0,5%

Tabla 4-1: Rendimiento de semilla extraída a partir de vainas de *P. affinis*

4.1.2. Separación de los componentes de la semilla y extracción del endospermo

Para el pelado de las semillas se probaron dos metodologías diferentes: adición de ácido sulfúrico concentrado por 15 minutos y suspensión de las semillas en agua a 100 °C por un intervalo de 10 minutos. El agregado de ácido sulfúrico no ablanda suficientemente las semillas, las cuales adquieren un aspecto tostado, pierden turgencia, pero quedan muy duras como para retirar la testa con facilidad. Sin embargo, el pelado por tratamiento con agua caliente fue muy efectivo: el endospermo capta agua y la testa pierde su dureza y se torna fácil de retirar. En la figura 4.1 A se pueden observar las partes de los componentes de la semilla separadas por este método. Se puede observar que el tratamiento con agua produce un hinchamiento

Resultados

(aumento de volumen) de la semilla, a la vez que la testa pierde su dureza característica. La fracción que capta más agua es el endospermo cuya humedad estando hidratado es de alrededor del 70%, mientras que los cotiledones hidratados alcanzan una humedad del 40%.

Diferentes métodos se han evaluado para extraer el endospermo, entre los cuales se encuentra la extracción ácida o alcalina. Vázquez *et al.* (1984) y Rocycki (2007), han propuesto el pelado por aplicación de una solución de hidróxido de sodio al 5%, luego un calentamiento de la muestra a 75°C por 10 minutos. Se ha reportado una mayor recuperación del endospermo en las extracciones en medio alcalino, pero el contenido de proteína de los extractos se duplica y disminuye la calidad del producto (Estevez *et al.*, 2004). Por esta razón se ensayaron dos métodos de pelado: uno por aplicación de ácido sulfúrico concentrado a dos intervalos de tiempo (5 y 10 minutos), y otro por inmersión en agua a 100°C por dos intervalos (5 y 10 minutos). Los mejores resultados se obtuvieron en la aplicación de agua a 100°C por 10 minutos. En el caso del ácido sulfúrico, si bien no fue efectivo para realizar el pelado de la semilla, fue muy efectivo para promover la germinación de la semilla.

Una vez realizado el pelado por tratamiento con agua caliente, se prosiguió con la separación manual de los componentes de la semilla: endospermo, cotiledones y germen, ya que en estas condiciones el producto está muy hidratado y facilita la tarea. En las figuras 4-1 B, C y D se pueden observar estos componentes. Las fracciones másicas

Resultados

obtenidas para cada componente se presentan en la tabla 4-2. La fracción de endospermo se determinó por diferencia. El endospermo fue liofilizado, lo que permite lograr una humedad inferior al 0,5% para lograr una correcta molienda del producto. En condiciones de humedad ambiente el endospermo absorbe humedad y se vuelve pegajoso. En estas condiciones se dificulta su molienda, lo que ya ha sido reportado (López Hernández *et al.*, 1985 y Meyer, 1984). Análogamente Roczycki (2007) utiliza un secado de la semilla hasta contener una humedad inferior al 4% previa a la realización de la molienda para evitar este problema.

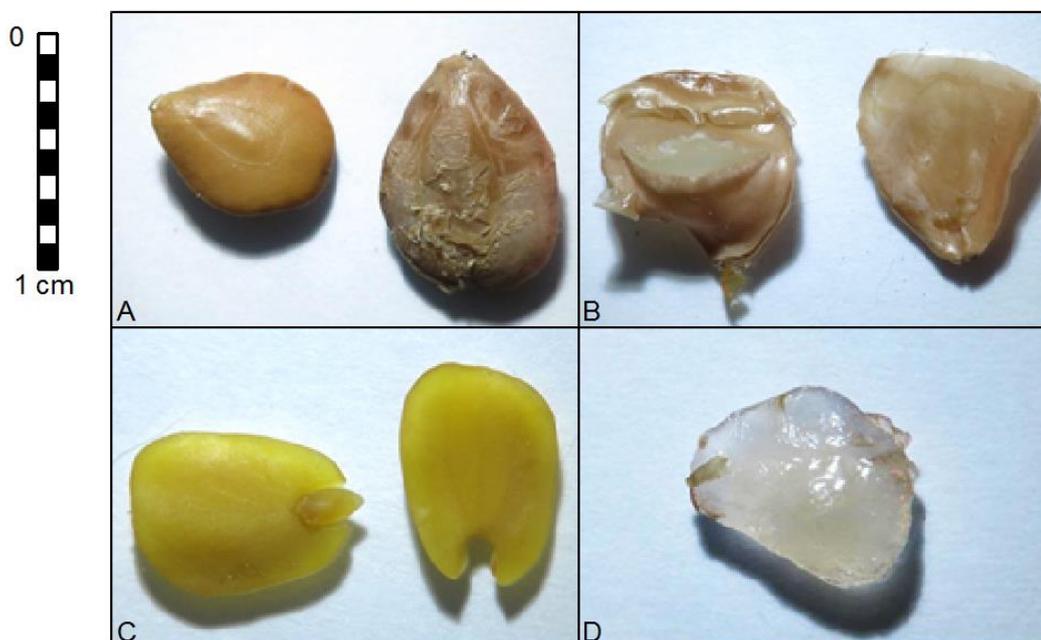


Figura 4-1: Partes de la semilla identificadas luego de la hidratación de la muestra (A: semilla sin hidratar y semilla hidratada, B: cáscara y endospermo hidratado, C: cotiledones y germen, D: endospermo hidratado)

Resultados

Componentes	Rendimiento (%)
Cáscara	34,9%
Cotiledones	48,8%
Germen	2,3%
Endospermo	14,0%
Total (semilla)	100,0%

Tabla 4-2: Composición porcentual de la semilla de *P. affinis*. (*) el cálculo de endospermo se realizó por diferencia de los restantes componentes de la semilla. () resultados presentados en base seca (g/100g)**

El endospermo representa el 14% de la semilla, un valor que se encuentra en el intervalo de los reportados en el género *Prosopis*: *P. pallida* (Chaires-Martínez *et al.*, 2008, y Bhatia *et al.*, 2013, *P. juliflora* (Bhatia *et al.*, 2013 y Estévez *et al.*, 2004), *P. ruscifolia* (Busch *et al.*, 2015). La variabilidad de los rendimientos es probablemente relacionada a las diferencias botánicas basadas en la especie (Fernandes *et al.*, 1995). Otras consideraciones respecto de las condiciones de extracción y composición se detallan en el punto 4.2.2.

4.2. Obtención del extracto (goma de *P. affinis*)

4.2.1. De la metodología de obtención de los galactomananos

El endospermo liofilizado se suspendió en etanol a 70 °C en una proporción 1:3 durante 15 minutos, para evitar la acción de hidrolasas (Cruz, 1999; Cerqueira, 2009), lo que también elimina componentes de

Resultados

bajo peso molecular solubles en etanol. Para la extracción de galactomananos el endospermo fue primeramente embebido en agua para lograr la solubilización de los galactomananos y luego estos fueron precipitados con isopropanol (Cruz, 1999). La fracción insoluble a temperatura ambiente se utilizó para obtener una segunda fracción de galactomananos solubles a alta temperatura. Para la solubilización en agua se probaron distintos métodos de agitación: sin agitación, con agitación magnética, con utilización de *mixer* y luego agitación magnética. El mejor rendimiento se obtuvo por agitación magnética, en el caso del *mixer* se quedaba material adherido al equipo que disminuye la recuperación y hace la operación menos reproducible. En la precipitación de la goma solubilizada se probó la precipitación de 50 mL de dispersión acuosa de endospermo con 2 volúmenes de etanol (Cerqueira *et al.*, 2008) y con 3 volúmenes de isopropanol (Cruz, 1999). La precipitación con isopropanol fue mucho más eficiente. Los rendimientos relativos de las recuperaciones obtenidas con uno y otro método se presentan en la tabla 4-3. En el caso de la utilización de etanol aún adicionando 10 volúmenes de etanol la recuperación fue inferior que la que se obtiene con isopropanol y además el aspecto de la goma extraída con isopropanol es menos coloreado. Los extractos así obtenidos tienen una pureza adecuada, comparable a las gomas comerciales. No se requirieron purificaciones adicionales, encontrando

Resultados

residuos de proteína sólo a nivel de trazas como se discutirá más adelante.

Método de precipitación	% (g/100g)	% relativo
Fracción precipitada con 2 V de etanol	0,04	2%
Fracción precipitada con 3V Isopropanol	2,49	98%
Total	2,53	100%

Tabla 4-3: Comparación de los rendimientos de la precipitación de galactomanano solubilizado en agua con 2 volúmenes de etanol y 3 volúmenes de isopropanol

4.2.2. De los rendimientos de extracción

El rendimiento de extracción de los galactomananos a partir del endospermo extraído se muestra en la Tabla 4-4. El rendimiento de la extracción fue diferente entre muestras según el Test de Anova aplicado a un nivel de significación del 5% ($p < 0,05$). Los detalles metodológicos para obtener estos y otros resultados estadísticos se encuentran en el Anexo 7.2. El rendimiento a temperatura ambiente (47%) fue levemente mayor que el reportado por Busch *et al.* (2015) en *P. ruscifolia* (42%). Por otro lado, en la literatura es común calcular el rendimiento en base a la cantidad de semilla que se utilizó para la extracción del endospermo. En el caso de *P. affinis*, el rendimiento en base a la semilla en base seca es de un 23% en el extracto a temperatura ambiente (RT) y un 7,9% en el extracto obtenido a 80 °C, con un total del 31% de galactomananos para ambas fracciones. El rendimiento así calculado no sólo depende de las condiciones morfológicas y de recolección (por ejemplo, la cantidad

Resultados

de endospermo presente en la semilla en la muestra), sino también del proceso de extracción en sí. El rendimiento es mayor al obtenido por Chaires-Martínez *et al.* (2008) para *P. pallida* (13-14% mediante extracción alcalina) y similar al obtenido por Bhatia *et al.* (2013) en *P. juliflora* (22% por extracción acuosa). Han sido reportados rendimientos de 24,9% y 17.7% para *P. chilensis* (Estevez *et al.*, 2004) y 19% para *P. ruscifolia* (Busch *et al.*, 2015) utilizando el método de extracción alcalina. La variabilidad de los rendimientos reportados está probablemente relacionada a las especies utilizadas (Fernandes *et al.*, 1995). El proceso de extracción por hinchamiento en agua caliente por períodos cortos seguidos por un remojo en agua a temperatura ambiente implica unas condiciones de extracción levemente ácidas que generan un producto de mejor calidad y por eso se encontró que este método es más adecuado para la extracción de los galactomananos.

Muestra	Y _{1, RT} (%)*	Y _{1,80} (%)*	Y _{1, Total} (%)
<i>Prosopis affinis</i>	46,6 ± 0.3 ^{b, c, d}	16,1 ± 0.4 ^a	63 ± 1
Guar gum	56 ± 4 ^d	38 ± 8 ^b	93 ± 4
Locust bean gum	45 ± 7 ^{b, c}	48 ± 7 ^{c, d}	93 ± 2

Tabla 4-4 Rendimientos de extracción y purificación de gomas a partir de endospermo de *P. affinis* y gomas comerciales.

***Rendimientos expresados en base seca, expresados como media ± D.S. Letras diferentes indican diferencia significativa en el post-test de Tukey al nivel de significación $p < 0,05$.**

Resultados

En la tabla 4-4 se puede observar también la proporción de galactomananos extraída a temperatura ambiente $Y_{1/RT}$ y $Y_{1/80}$. Los detalles del análisis estadístico aplicado se explican en el anexo 7.2.1. En *P. affinis*, la cantidad de galactomananos extraída a temperatura ambiente fue significativamente mayor que la extraída a alta temperatura, similarmente a lo reportado por Cruz (1999) en *P. pallida*. La cantidad de goma extraída a temperatura ambiente está relacionada con la solubilidad de los galactomananos extraídos en solución acuosa, lo que está influenciado por un número de factores tales como distribución de pesos moleculares (M_w), la proporción de residuos de galactosilos terminales y su patrón de distribución sobre la cadena de manosa, los que en conjunto juegan un papel importante en la solvatación del polímero (interacción polímero – solvente) y en la interacciones no covalentes polímero – polímero. La solubilidad a temperatura ambiente es una característica muy importante en la aplicación tecnológica de este tipo de productos, ya que permite una aplicación más económica al lograr solubilizarlos a temperatura ambiente y disminuir los costos de energía asociados al procesamiento del polímero.

Resultados

4.3. Composición de los extractos obtenidos: aspectos metodológicos

4.3.1. Optimización de hidrólisis para análisis de azúcares simples por HPLC reversa y GC-MS.

Los monosacáridos componentes de los galactomananos simples se encuentran unidos por enlace glicosídico. En condiciones ácidas y a elevada temperatura es posible hidrolizar este enlace. Los diferentes tipos de enlaces glicosídicos presentes en el galactomanano responden de forma diferente a las condiciones de hidrólisis en medio ácido. Sin embargo, condiciones excesivas de temperatura o combinación tiempo temperatura pueden dar lugar a reacciones de degradación y pérdida de monosacáridos.

En primer lugar, se realizó la hidrólisis empleando 1 mg TFA 2N, 120°C, durante 2h (Sawardeker *et al.*, 1965) y posteriormente se ensayaron condiciones más moderadas empleando el mismo ácido, pero disminuyendo la temperatura (100°C) y se utilizaron diferentes tiempos (1 h, 2h, 4h y 6h). Los productos de hidrólisis fueron analizados por TLC, como se reporta en la sección experimental, junto con patrones de trisacáridos (rafinosa), disacáridos (lactosa), hexosas (manosa y galactosa), pentosas (xilosa) y ácidos urónicos (ácido galacturónico).

Resultados

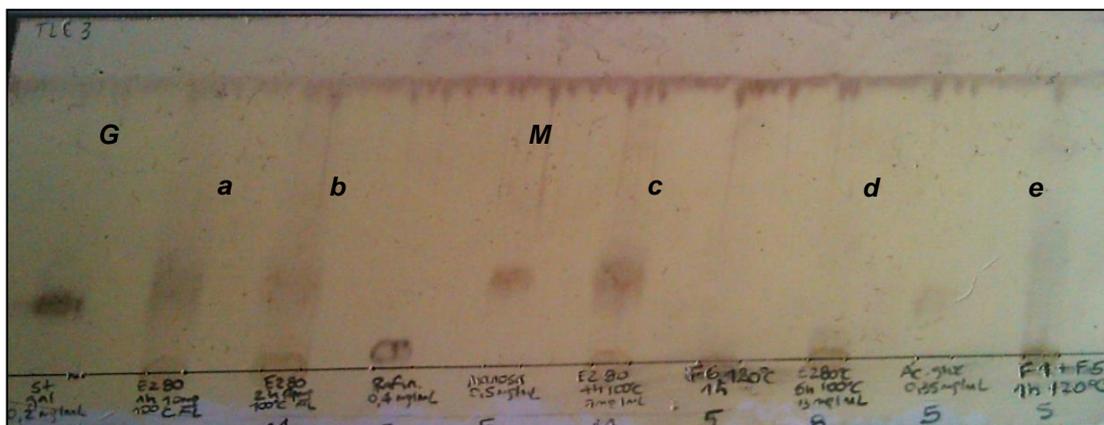


Figura 4-2: Seguimiento de optimización de tiempos de hidrólisis para el análisis de azúcares por TLC de productos de hidrólisis de $GMP_{1/80}$
a) hidrólisis con TFA 2N a 100°C por 1h, b) 2h, c) 4h, d) 6h, e) 1h a 120°C.
Estándares: G (galactosa) y M (manosa)

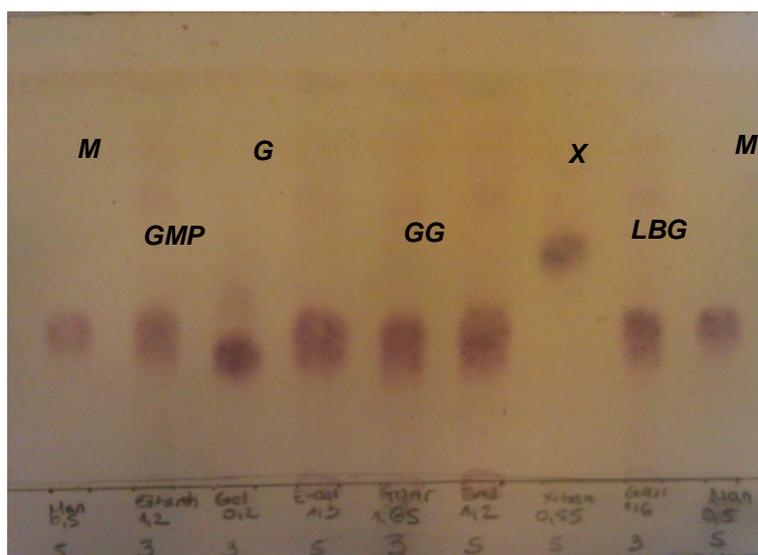


Figura 4-3: TLC de productos de hidrólisis de $GMP_{1/RT}$ y gomas guar y de algarrobo comerciales
Estándares: manosa (M), galactosa (G) y xilosa (M); muestras de gomas hidrolizadas (GMP, GG y LBG)

En la figura 4-2 se puede ver la hidrólisis de la muestra $GMP_{1/RT}$ a diferentes tiempos. El punto c, que corresponde con un tiempo de hidrólisis de 4 horas es el que tiene mayor concentración de las bandas

Resultados

correspondientes a manosa y galactosa, bien resueltas en este punto (M y G respectivamente). A su vez en el carril e (120 °C, 1h) se puede ver una acumulación en el punto de siembra. En este caso se interpreta como degradación de la muestra, porque no aparece la banda en la zona de hexosas ni de disacáridos o trisacáridos. En este caso la muestra además tiene un aspecto coloreado que sugiere la ocurrencia de caramelización. Las muestras comerciales respondieron de forma similar a las condiciones de hidrólisis. En base a los resultados anteriores, se seleccionó como metodología de hidrólisis la aplicación de 400 mg de TFA 2N a 100°C a 1-3 mg de muestra durante 4 horas. Un ensayo en estas condiciones para GMP y las gomas comerciales, junto a estándares de galactosa y manosa se presentan en la figura 4-3.

4.3.2. Determinación de la relación M: G en extractos de *P. affinis* y gomas comerciales purificadas

Este análisis se realizó por HPLC-RI empleando una columna de intercambio catiónico y agua como fase móvil como se explica en la sección 3.9. La determinación de relación manosa: galactosa se realizó mediante la utilización de curvas de calibración independientes para cada analito, y posteriormente se calculó la relación M: G. Para la obtención de las curvas de calibración se realizaron inyecciones de estándares de manosa y galactosa en el rango de 0,2 a 5,0 mg/ml. En este intervalo de concentraciones estudiado se encontró una respuesta

Resultados

lineal de la concentración de ambos analitos a la respuesta del detector RI. En la figura 4-4 se muestran dos de los cromatogramas utilizados en las curvas de calibración. Luego se mostrarán algunos cromatogramas de las muestras (extractos de *P. affinis* y extractos de gomas comerciales de diferentes grados de purificación). Las curvas de calibración utilizadas se presentan en el anexo 7.1.1. Con esta información se determinaron las concentraciones de manosa y galactosa para los extractos de *P. affinis* y de gomas comerciales.

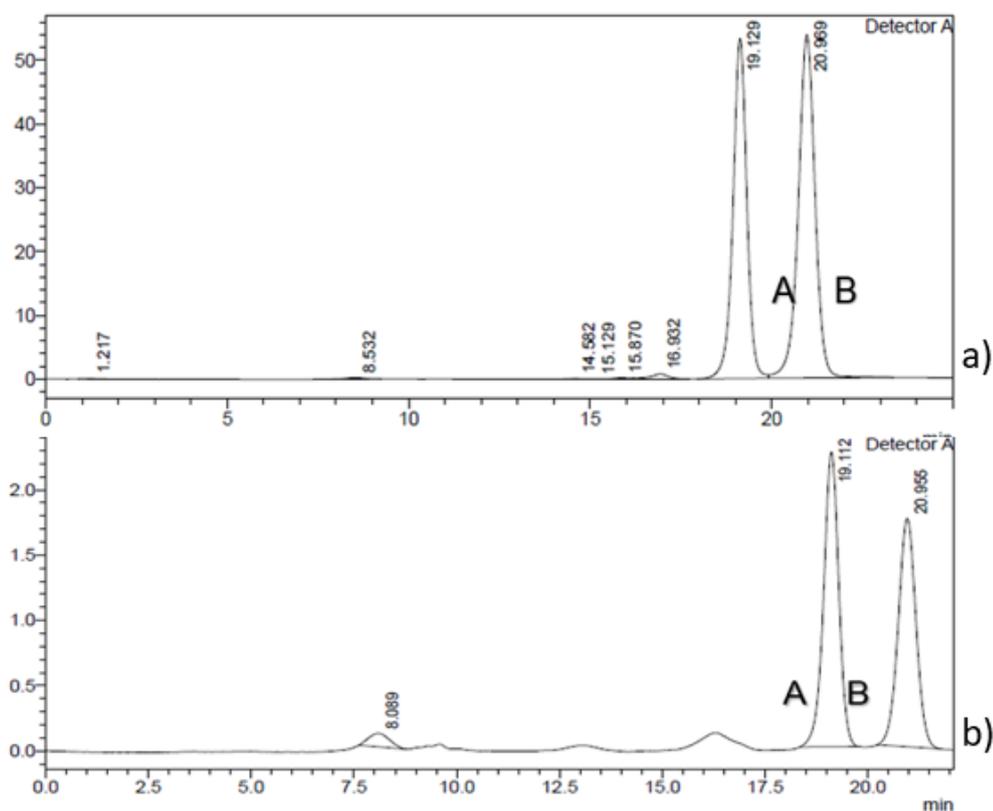


Figura 4-4: Algunos cromatogramas utilizados para la obtención de una curva de calibración de galactosa y manosa.

Estándares: a) 0,22mg/mL (galactosa) y 0,19mg/ml (manosa); b) 5,2mg/mL y 5,8mg/mL respectivamente. A y B representan a los picos de galactosa y manosa.

Resultados

En la figura 4-5 se muestra a modo de ejemplo un cromatograma de un extracto de GMP_{1/RT} hidrolizado con TFA 2N a 100 °C durante 4h, con detección de índice de refracción (4-5 a) y detección arreglo de diodos con cuantificación a una longitud de onda de 254 nm (4-5 b).

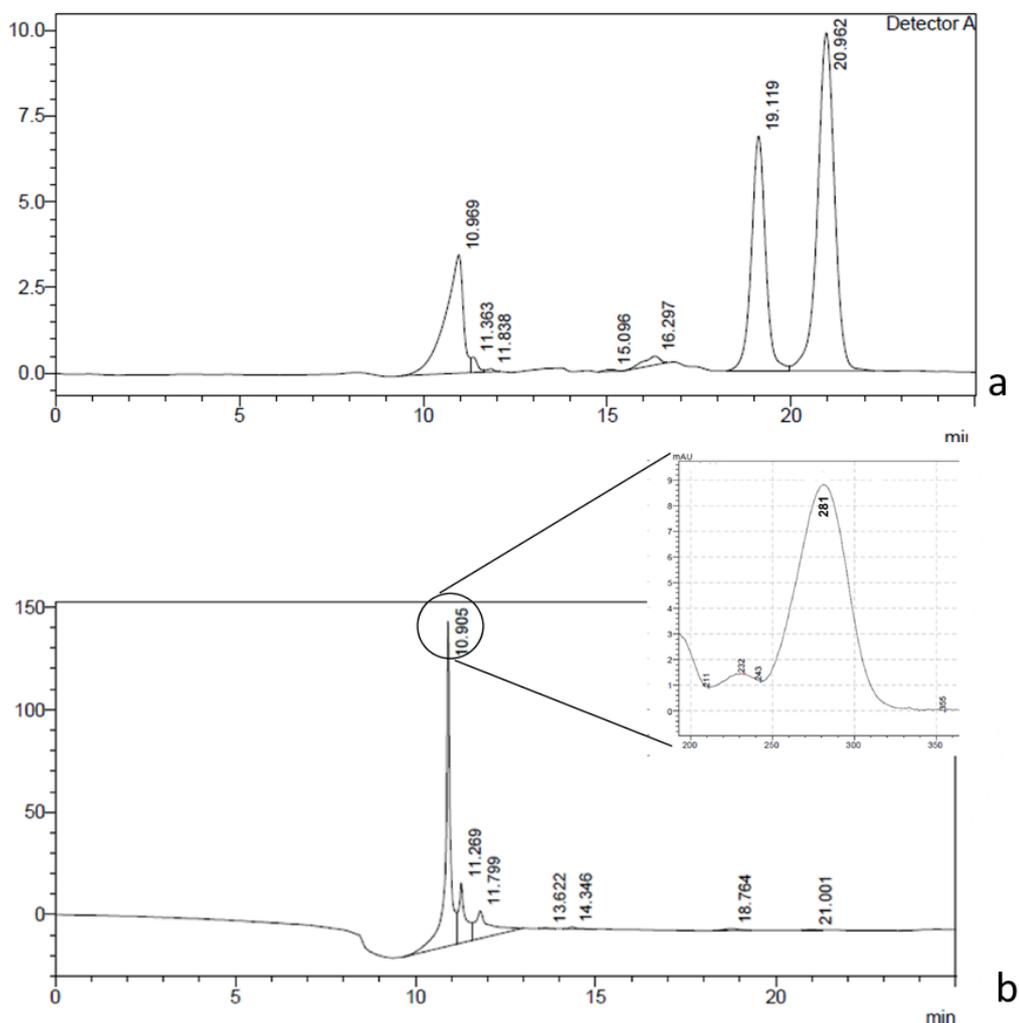


Figura 4-5: Cromatograma de extracto de GMP_{1/RT} hidrolizado a) detector RI, b) detector PDA, 254nm.

En la figura 4-5 a se observa un cromatograma de un extracto hidrolizado con TFA 2N. Los picos correspondientes a manosa y galactosa se observan a los mismos tiempos que en las muestras utilizadas como

Resultados

calibración. Aparece además un pico a los 11 minutos aproximadamente con una fuerte absorción en el UV. En la figura 4-5 b se puede observar un zoom en que se muestra que el pico mayor tiene un λ_{\max} de 281nm, que puede corresponder a compuestos condensados, es una impureza (el detector de índice de refracción como detector universal lo detecta, pero es en realidad un compuesto cromóforo). Fue encontrado también este pico en los estándares que se sometieron a hidrólisis por la misma metodología.

4.3.3. Contenido de proteína

El análisis de proteína se determinó por el método del ácido bicinconínico (QuantiPro™). La aplicación de este método tuvo la ventaja de su alta sensibilidad y por tanto la baja cantidad de muestra necesaria para realizar los ensayos. Para asegurar la representatividad de los datos se tomó como criterio la realización de 3 réplicas genuinas por muestra, y se aceptaron los resultados con una desviación estándar inferior al 5%. La curva de calibración se realizó utilizando soluciones de BSA en el rango de 0 a 50mg/ mL. Las muestras (aproximadamente 2 mg) se diluyeron en buffer tartrato-carbonato (pH 11,3) hasta alcanzar una concentración de 0,5-1 mg/mL dependiendo de la concentración de proteína presente en la muestra, utilizando el rango lineal encontrado (Abs < 1,7). La curva de calibración para proteína se incluye en el anexo 7.1.2.

Resultados

4.4. Composición de los extractos obtenidos de GM

En la tabla 4-4 se presenta la composición en azúcares totales y proteínas de las muestras analizadas, a distinto nivel de pureza: endospermo y gomas comerciales, gomas purificadas por precipitación (P1) y gomas purificadas por precipitación y diálisis (P2). No se encontraron diferencias significativas en el contenido total de azúcares entre las fracciones, ni en el contenido de proteínas. La pureza de los extractos está reflejada en el contenido total de azúcares, que está en un rango de 70-80%. Las gomas comerciales contienen aproximadamente un contenido proteico del 3-7% (Kawamura, 2008), y contenidos similares se encontraron en los productos comerciales evaluados. Sin embargo, el contenido de proteínas en los productos purificados por diálisis disminuyó a 1-2% para todas las muestras. Este resultado está en concordancia con los obtenidos por Bouzouita *et al.* (2007) y Cruz (1999) y, lo que es más importante refleja la efectividad de los procedimientos de purificación.

Resultados

Muestra	Extracto	Contenido de galactomanano (%m/m)	Contenido proteico (%m/m)
<i>P. affinis</i>	Endospermo	65 ± 4 ^{a,b}	4,3 ± 0,3 ^g
	GMP _{1/RT}	68 ± 3 ^b	1,1 ± 0,3 ^{b,c}
	GMP _{1/80}	67 ± 4 ^b	1,7 ± 0,1 ^{c,d}
	GMP _{2/RT}	79 ± 3 ^c	1,1 ± 0,3 ^{b,c}
	GMP _{2/80}	64 ± 3 ^{a,b}	0,3 ± 0,2 ^b
GG	Goma comercial	67 ± 3 ^b	3 ± 3 ^f
	GG _{1/RT}	78 ± 4 ^c	2,4 ± 0,8 ^{d,e}
	GG _{1/80}	65 ± 3 ^{a,b}	1,7 ± 0,8 ^{c,d}
	GG _{2/RT}	77 ± 1 ^c	1,7 ± 0,2 ^{c,d}
	GG _{2/80}	67 ± 3 ^b	1,3 ± 0,2 ^c

Tabla 4-5: Composición de los galactomananos estudiados

4.4.1. Análisis estructural de los galactomananos obtenidos

La composición de monosacáridos de los extractos obtenidos se presenta en la tabla 4-5. En todos los casos, no se detectaron otros monosacáridos que no fueran manosa y galactosa. Los análisis por TLC de las muestras hidrolizadas fueron consistentes con los resultados del HPLC-IR. De acuerdo con esta información y a la información bibliográfica disponible (Cruz,1999; Bhatia *et al.*, 2013; Busch *et al.*, 2015) se concluyó que las muestras estaban compuestas exclusivamente de galactomananos. Por otro lado, la relación de M: G obtenida mediante análisis de metilación por GC-FID fue consistente con los resultados de HPLC-RI en las muestras ensayadas. Tanto el cálculo de M: G por HPLC-RI como la determinación mediante derivatización y determinación por GC-FID (ver tabla 4-5) fueron concordantes y tuvieron

Resultados

una mejor resolución que aquellos que se determinaron por la integración de las áreas de señales del carbono anomérico, debido a la superposición de señales (no se informan los resultados de RMN por esta razón). Sébastien *et al.*, 2014 informa valores de M: G determinados por ambas técnicas que son comparables.

Sample	Extracto	Galactosa (%m/m)	Manosa (%m/m)	M: G (HPLC)	M: G (GC-FID)
<i>P. affinis</i>	<i>Endospermo</i>	S/D	S/D	1,1 ± 0,4 ^a	S/D
	<i>GMP_{1/RT}</i>	28	43	1,5 ± 0,1 ^{a,b}	S/D
	<i>GMP_{1/80}</i>	27	40	1,5 ± 0,1 ^{a,b}	S/D
	<i>GMP_{2/RT}</i>	29	46	1,6 ± 0,1 ^{a,b}	1,7
	<i>GMP_{2/80}</i>	23	37	1,6 ± 0,1 ^{a,b}	1,7
GG	<i>Goma comercial</i>	29	48	1,5 ± 0,1 ^{a,b}	S/D
	<i>GG_{1/RT}</i>	31	52	1,7 ± 0,1 ^{a,b}	S/D
	<i>GG_{1/80}</i>	22	39	1,9 ± 0,3 ^{a,b}	S/D
	<i>GG_{2/RT}</i>	30	50	1,7 ± 0,1 ^{a,b}	1,7
	<i>GG_{2/80}</i>	26	45	1,7 ± 0,1 ^{a,b}	1,7

Tabla 4-6: Composición de monosacáridos de galactomananos de *P. affinis* y extractos comerciales

Los resultados de los análisis de metilación se muestran en la tabla 4-6, que también respaldan la hipótesis de tener una estructura del tipo manosa a la que se le adicionan algunos galactosilos con frecuencia variable. Los PMAAs derivados de los galactomananos obtenidos a RT y 80°C tuvieron virtualmente idénticos patrones de fragmentación EI-MS, mostrando la presencia de 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metilgalactitol, 1,4,5-tri-O-acetil-2,3,6-tri-O-etilmanitol y 1,4,5,6-tetra-O-

Resultados

acetil-2,3-di-O-metilmanitol. Estos resultados permiten demostrar la presencia de tres tipos de azúcares: un residuo de galactosa terminal, residuos de manosa con unión en 4 y residuos de manosa unidos en 4 y 6 (la que está unida a una manosa y a una galactosa, además). Los PMAAs obtenidos a partir de los extractos puros de GG y LBG mostraron los mismos tipos de derivados (tabla 4-6). Por lo tanto, se respalda así la suposición de la presencia de un polímero compuesto por una cadena lineal (1→4) -manopiranosica como esqueleto con residuos de galactosilos en algunas de las posiciones C-6. Como era de esperar a partir de lo reportado en literatura (Chaubey & Kapoor, 2001; Cerqueira, *et al.*, 2011; Muschin & Yoshida, 2012), el análisis de ligamiento de GG y LBG mostraron el mismo tipo de residuos. Por otro lado, no se encontró evidencia que indique la presencia de ramificaciones con dos o más residuos de galactosilo, un patrón estructural recientemente propuesto en LBG por Muschin & Yoshida (2012). Asimismo, y en contraposición de lo que fue reportado por Sébastien *et al.*, 2014, el procedimiento de extracción del galactomanano no derivó a una variación significativa en el patrón de sustitución de los residuos de manosa, como se observa en la relación incambiada de M: G en los extractos RT y 80°C.

Resultados

Muestra	Residuo del monosacárido padre	T_r^a	Principales fragmentos (m/z) ^b
<i>P. affinis</i> (RT)	β -Mannopiranosilo con unión en C-4	11.5	55, 71, 87, 101, 117, 129, 161, 173, 233
	β -Manopiranosilo con unión en C-4 y C-6	13.6	59, 71, 87, 101, 117, 129, 145, 161, 205
	α -Galactopiranosil terminal	10.0	59, 71, 87, 101, 117, 129, 145, 161, 205
Goma Guar GG (RT)	β -Mannopiranosilo con unión en C-4	11.5	43, 71, 87, 101, 117, 129, 161, 173, 233
	β -Manopiranosilo con unión en C-4 y C-6	13.6	58, 71, 85, 101, 117, 127, 142, 161, 201, 261
	α -Galactopiranosil terminal	10.1	43, 71, 87, 101, 117, 129, 145, 161, 205
Goma de algarrobo LBG (RT)	β -Mannopiranosilo con unión en C-4	11.5	59, 71, 87, 101, 117, 129, 161, 173, 233
	β -Manopiranosilo con unión en C-4 y C-6	13.5	58, 71, 85, 101, 117, 127, 142, 161, 201, 261
	α -Galactopiranosil terminal	10.1	59, 71, 87, 101, 117, 129, 145, 161, 205

Tabla 4-7: Resultados de GC-MS de los acetatos de alditol de los galactomananos permetilados de *P. affinis* y productos comerciales.

^a Tiempo de retención (min). ^b Las masas corresponden a los productos de metilación-acetilación parcial (AAPMs)

Mientras el espectro ¹H RMN de GMP_{2/RT} en D₂O a 25°C muestra señales considerablemente ensanchadas, cuando se llevan a cabo los experimentos a 60°C se obtienen espectros con mejorada resolución (Fig 4-6 A). El doblete a 4,98 ppm y la señal de resonancia ancha a los 4,71 ppm corresponden a los protones anoméricos de residuos galactopiranosilos y mannopiranosilos, respectivamente. Siguiendo las conectividades de las señales anteriores en el espectro TOCSY es

Resultados

posible asignar las señales de resonancia de los protones del galactopiranosil H-4 (3,96 ppm), H-3 (3,90 ppm), y H-2 (3,79 ppm) (Fig. 4-7 B) y el H-5 (3,85 ppm) y H-6 (3.72 ppm). Con esta información y espectro HSQC (Fig. 4-7 C) todas las resonancias de los residuos de galactopiranosilos pueden ser asignados (Tabla 4-8). La limitada movilidad de la cadena principal de manano lleva a generar ensanchamientos en las señales de los residuos manopiranosilos, y virtualmente no se pueden observar correlaciones para estos en el espectro TOCSY. Sin embargo, fue posible asignar las resonancias de ^1H y ^{13}C para los dos tipos de manosa en el espectro HSQC (Fig. 4-6 c y tabla 4-8). Por ejemplo, a pesar de que los protones diasterostópicos H-6 de los residuos unidos en 4 de manopiranosilos no pueden ser distinguidos y aparecen como una simple correlación en el espectro HSQC (M6), estos núcleos llevan a dos correlaciones a desplazamientos químicos marcadamente diferentes en residuos unidos en 4,6 (M6'). Grandes cambios en los desplazamientos químicos fueron también observados para los protones H-4 y H-5 de los diferentes residuos de manopiranososa (M4 y M4', y M5 y M5').

Resultados

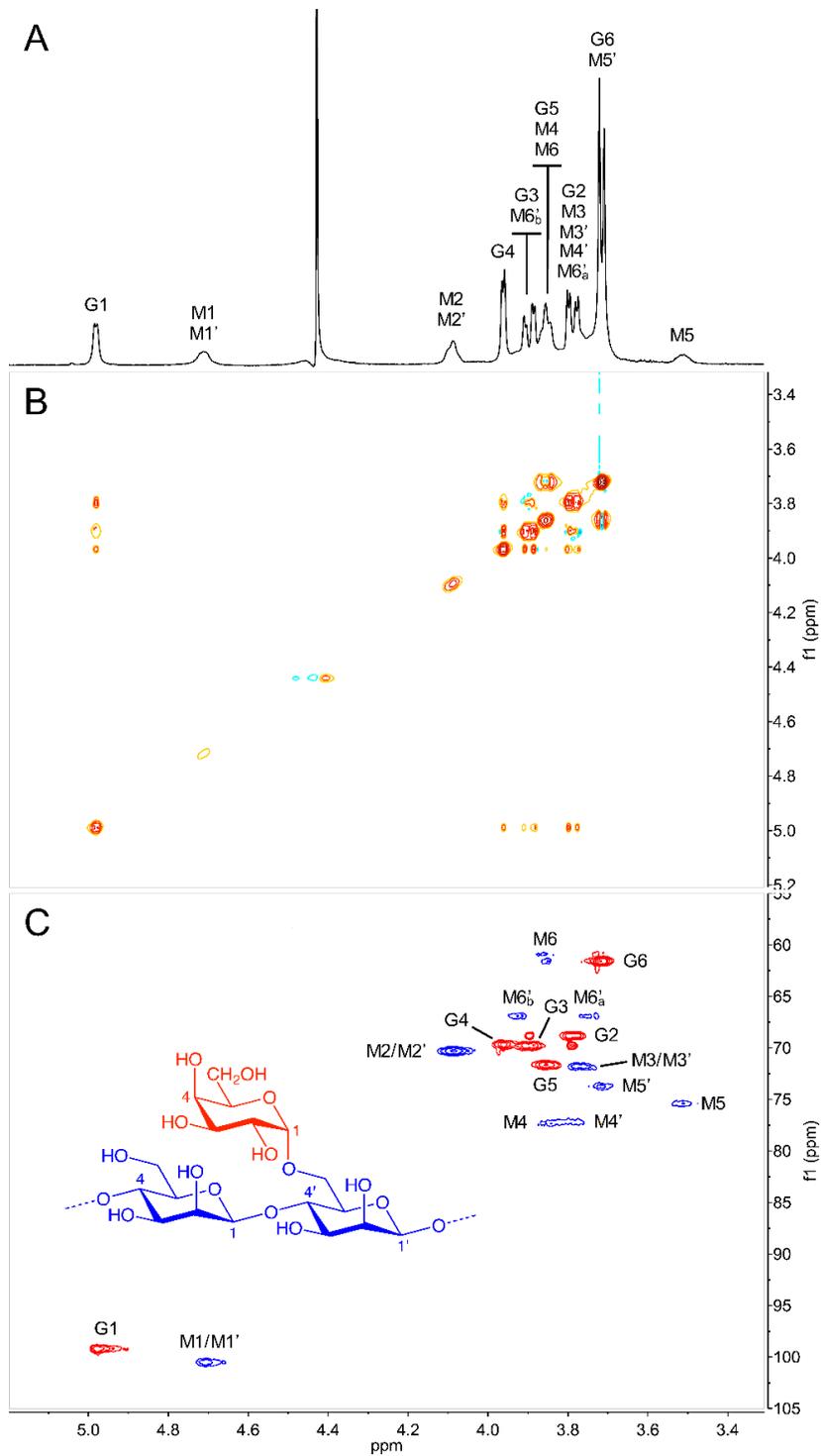


Figura 4-6: Espectros ^1H -1D NMR con supresión de agua (A), TOCSY (B), y espectro HSQC (C) de muestra de galactomananos de *P. affinis* GMP_{2/RT} a 60 °C. Las designaciones en A y C corresponden a protones de galactopiranosilos (G), manopiranosilos unidos en 4 (M) o residuos manopiranosilos unidos en 4,6. (M').

Resultados

Posición	Residuo					
	Gal-(1→		→4)-Man-(1→		→4,6)-Man-(1→	
	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C
1	4,98	99,2	4,71	100,5	4,71	100,5
2	3,79	68,8	4,09	70,3	4,09	70,3
3	3,90	69,8	3,77	71,8	3,77	71,8
4	3,96	69,7	3,84	77,3	3,79	77,2
5	3,85	71,7	3,51	75,5	3,71	73,8
6	3,72	61,6	3,86	60,9	3,92/3,75	66,9

Tabla 4-8: Datos de ¹H y ¹³C para galactomananos purificados de muestra GMP_{2/RT} en D₂O a 60 °C, usando como referencia interna TSP.

Análisis adicionales de los datos de RMN permitieron confirmar la estereoquímica de las uniones glicosídicas (Fig. 4-7). La constante de acoplamiento ³J_{HH} entre el H-1 del garactopiranosilo y los protones H-2 de 3,7 Hz, lo que es indicativo de un protón anomérico ecuatorial y por lo tanto una configuración anomérica α de la unión (1→6) (Muschin & Yoshida, 2012). Asimismo, el ¹J_{CH} entre el C-1 y el H-1 medido en el espectro acoplado HSQC fue de 171,4 Hz, un valor que también corresponde con un enlace tipo α. A pesar de que la resonancia del protón anomérico no está resuelta, e impide utilizar el acoplamiento ³J_{HH} al protón H-2 para establecer la estereoquímica relativa de los enlaces entre los residuos manopiranosícos, el ¹J_{CH} de 160,5 Hz para el carbono

Resultados

y el protón anomérico medido en el espectro acoplado HSQC permite indicar una configuración β del enlace (1 \rightarrow 4) (Bergamini, *et al.*, 1995; Petkowicz, *et al.*, 1998).

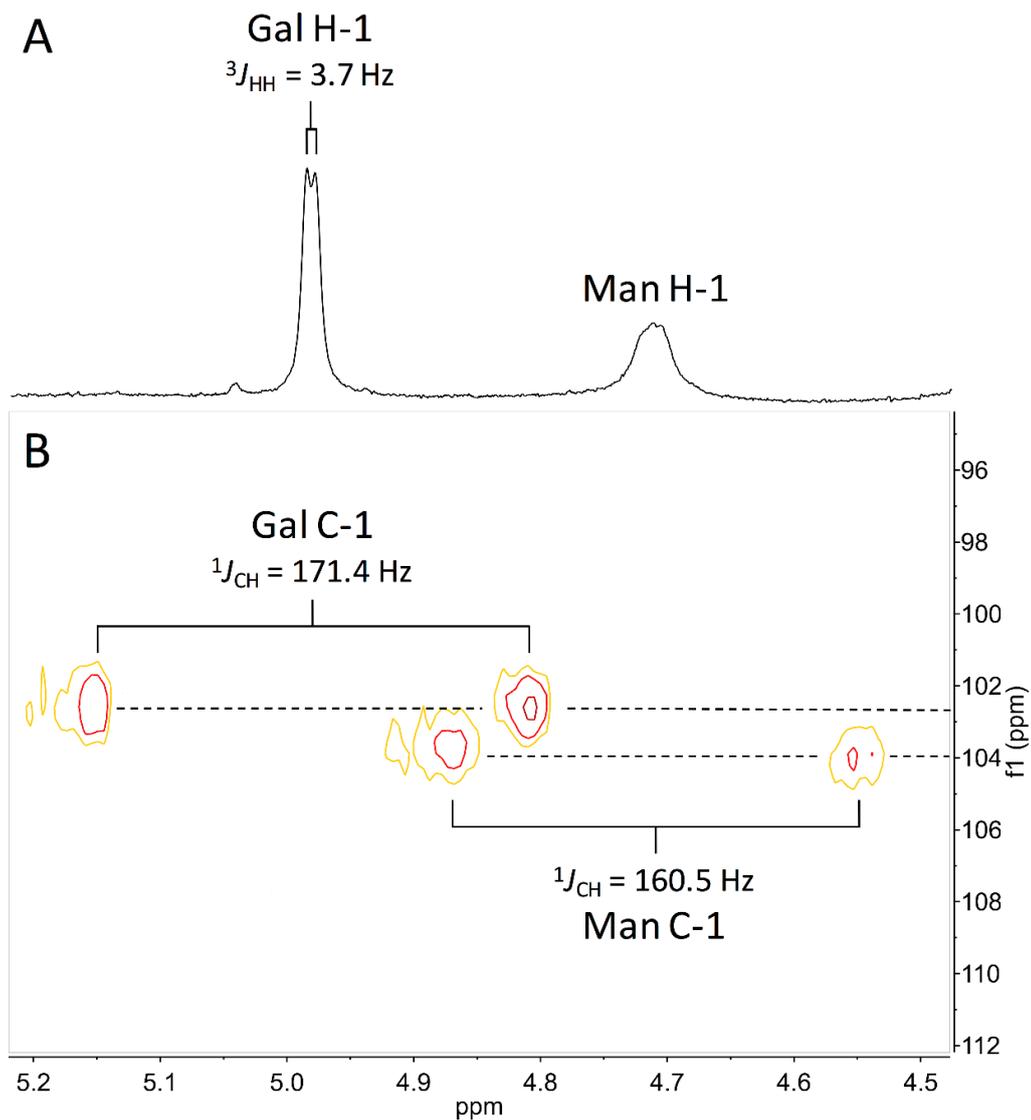


Figura 4-7: Expansión de la region anomérica del espectro monodimensional ^1H -RMN con supresión del pico de agua de muestra $\text{GMP}_{2/\text{RT}}$ registrada a 60°C (A), y HSQC acoplado obtenido para la misma muestra bajo las mismas condiciones experimentales (B).

Resultados

4.5. Relación manosa: galactosa

Ha sido postulado que la relación M: G determina muchas de las propiedades fisicoquímicas de los galactomananos, incluyendo su solubilidad, la viscosidad y características formadoras de gel de sus soluciones coloidales y sus interacciones sinérgicas con otros hidrocoloides (Dea *et al.*, 1986; Fernandes, 1995). La relación M: G medidas para las gomas de *P. affinis* fueron aproximadamente 1.5, tanto a RT como a 80°C (Tabla 4-5). Las relaciones de M: G para *P. affinis* fueron consistentes con datos reportados previamente en el género *Prosopis*: que va desde 1,2 para *P. juliflora* (Salvalaggio *et al.*, 2014) a 1,6 para *P. ruscifolia* (Busch *et al.*, 2015). La relación M: G encontrada para los extractos de GG fueron del orden reportado en literatura, que abarca 1,5 a 1,8 dependiendo del método de purificación y de la muestra comercial utilizada (Sébastien *et al.*, 2014; Busch, 2015). Mediante la aplicación de la técnica de ANOVA no se encontraron diferencias significativas entre las relaciones de *P. affinis* y los extractos de GG, independientemente de las condiciones de extracción. Como la relación M: G está directamente relacionada con el grado de sustitución de la cadena principal de manano, los galactomananos de *P. affinis* pueden ser considerados semejantes a aquellos encontrados en GG. Más aún, el hecho de que las diferentes condiciones de extracción tienen un impacto menor en la relación M: G de los galactomananos de *P. affinis* que en lo que se relata en la literatura para LBG, al igual de lo que sucede

Resultados

con el galactomanano de GG, evidenciaría que la cadena de manano estaría sustituida relativamente de forma regular a lo largo de la cadena. Por otro lado, el polisacárido de LBG tiene un patrón de sustitución heterogéneos que presenta regiones de la cadena principal de manano con escasas sustituciones. Por lo tanto, extractos con mayor proporción del polímero más rico en residuos sustituidos en galactopiranosilos son recuperados a TA, mientras que las fracciones menos solubles ricas en residuos de manosa sin ramificaciones (no sustituida) son recuperadas a altas temperaturas de extracción.

4.6. Distribución de peso molecular

En la tabla 4-8 se presentan el M_w , R_g , R_h , índice de polidispersidad (M_w/M_n) de los galactomananos extraídos calculados a partir de los datos de SEC/MALLS-QUELS/RI (Zimm, 1948). La masa molar obtenida a partir de los datos de dispersión de luz a 90° (MALLS 90°) en función del tiempo de elución y el índice de refracción (RI) diferencial de los galactomananos extraídos a RT de *P. affinis* son presentados en la Fig. 4-8. Asimismo, en la figura 4-9 se presentan los perfiles de elución de las gomas de *P. affinis* extraídas a RT y 80°C así como las de las gomas comerciales purificadas.

Resultados

Muestra	M_w (g/mol)	R_h (nm)	R_g (nm)	M_w/M_n	M_v (g/mol) _a	α^b
GMP _{2/RT}	$(1,6 \pm 0,2) \times 10^6$ a	$100,6 \pm 1,8$ d	$109,8 \pm 6,5$ c	$1,0 \pm 0,1$ a	$1,1 \times 10^6$	$0,40 \pm 0,01$
GMP _{2/80}	$(1,8 \pm 0,1) \times 10^6$ a	$81,9 \pm 1,8$ e	$98,5 \pm 3,0$ a	$1,1 \pm 0,1$ a	$1,2 \times 10^6$	$0,19 \pm 0,02$
GG _{2/RT}	$(1,6 \pm 0,1) \times 10^6$ a	$59,3 \pm 1,1$ a	$101,8 \pm 3,8$ b,c	$1,0 \pm 0,2$	$1,5 \times 10^6$	$0,27 \pm 0,01$
GG _{2/80}	$(1,2 \pm 0,2) \times 10^6$ a	$54,6 \pm 1,0$ a	$86,0 \pm 6,2$ a,b	$1,1 \pm 0,3$	SD	$0,22 \pm 0,02$
LBG _{2/RT}	$(1,2 \pm 0,2) \times 10^6$ a	$70,6 \pm 1,3$ c	$109,0 \pm 4,4$ c	$1,0 \pm 0,3$	SD	$0,27 \pm 0,01$
LBG _{2/80}	$(1,3 \pm 0,2) \times 10^6$ a	$78,1 \pm 2,0$ c	$84,6 \pm 7,0$ b,c	$1,0 \pm 0,1$	SD	$0,22 \pm 0,02$

Tabla 4-9: Parámetros obtenidos por SEC/MALLS-QUELS/RI para galactomananos de *P. affinis*, GG y LBG obtenidos por extracción acuosa.

Valores de M_v obtenidos utilizando la ecuación de MHS, y pendientes del gráfico de conformación. a Calculado utilizando valores de viscosidad intrínseca estimados con el gráfico de Fedor. b Obtenidos a partir de la relación log-log entre R_g y M_w .

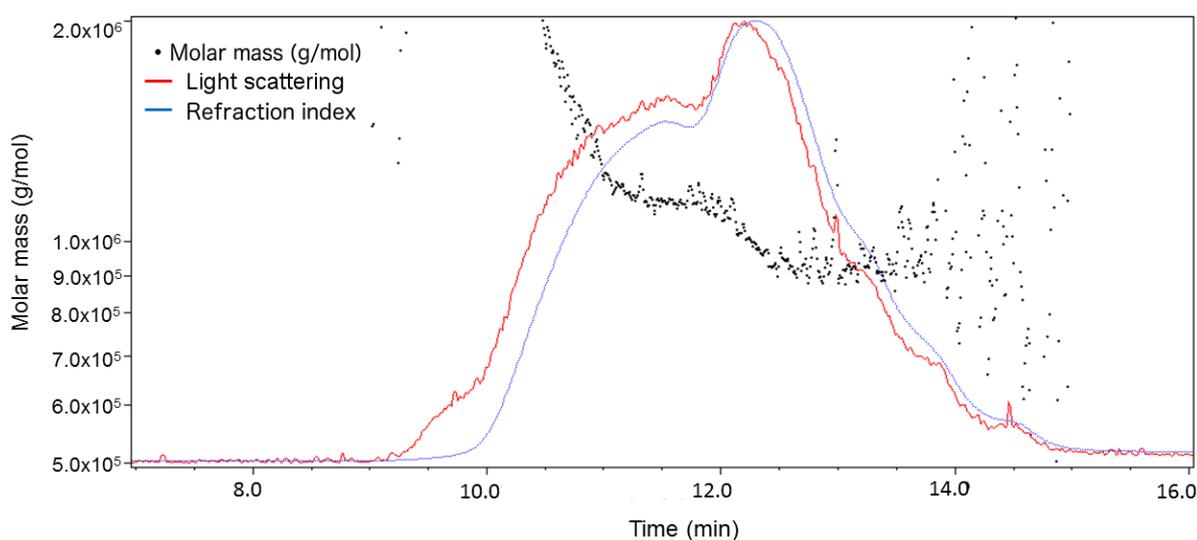


Figura 4-8: Perfiles de elución de SEC/MALLS-QUELS/RI de galactomananos de *P. affinis* extraídos a RT.

Resultados

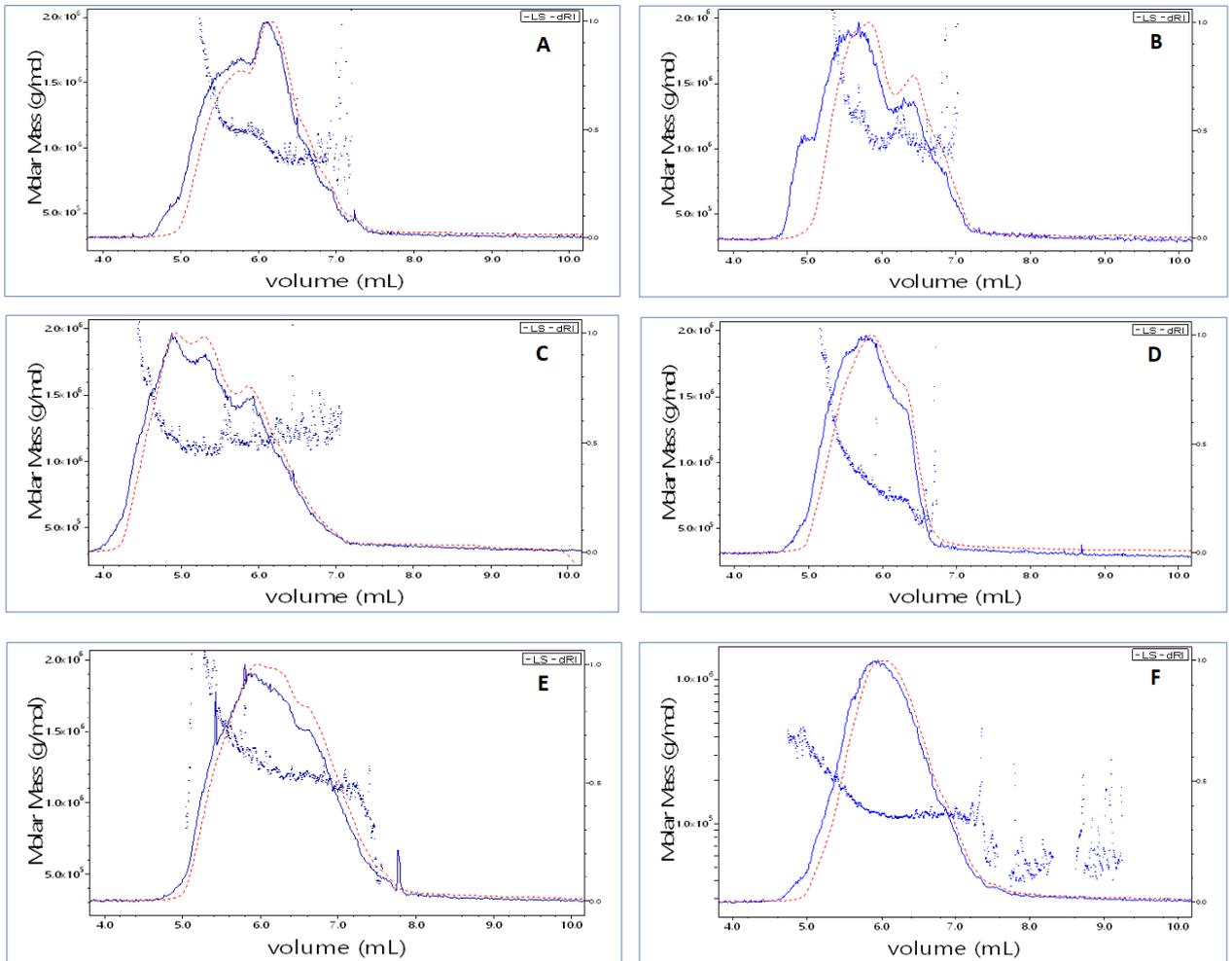


Figura 4-9: Comparación de los perfiles de distribución de peso molecular de galactomananos purificados a partir de *P. affinis* y gomas comerciales: GMP_{2/RT} (A), GMP_{2/80} (B); GG_{2/RT} (A), GG_{2/80} (B); LBG_{2/RT} (A), GBG_{2/80} (B);

El M_w de las diferentes muestras se encuentra en el mismo orden de aquellos reportados por Pollard *et al.*, (2010) para la subfamilia Fabaceae ($2-3 \times 10^6$ g/mol). El perfil de elución muestra al menos dos grupos de galactomananos con diferentes M_w que fueron co-extraídos. Es importante también señalar que el M_w disminuye al aumentar el volumen de elución, pero después de aproximadamente 12 minutos, el M_w comienza a aumentar con una tendencia no lineal. En este tipo de

Resultados

polisacáridos ramificados esto es probablemente causado por la interacción polímero – polímero (*hyperentanglement*) (Goycoolea *et al.*, 1995), un efecto de anclaje o debido al apelmazamiento (*anchoring effect*) que en algunos casos causa que moléculas grandes presenten volúmenes de elución mayores en la columna SEC a los que se esperaría basados en su R_h . No se observaron diferencias significativas en el M_w ni en la polidispersidad de las muestras obtenidas a RT o a 80 °C, lo que permite sugerir que la temperatura no tuvo un efecto significativo en la distribución de peso molecular de los galactomananos extraídos.

El valor de R_g obtenido para los galactomananos de GG está de acuerdo con los reportados por Picout *et al.* (2001). Para los dos parámetros descriptores del radio, R_g y R_h los mayores valores se obtuvieron para los galactomananos extraídos a RT (muestra $GMP_{2/RT}$), seguidos por aquellos obtenidos a partir de las extracciones a 80 °C para *P. affinis* y LBG (muestras $GMP_{2/80C}$ y $LBG_{2/80C}$, respectivamente). No se encontraron diferencias significativas entre los valores de R_h de $GG_{2/RT}$ y $GG_{2/80C}$. De igual manera, el R_h de $GMP_{2/80C}$ fue comparable al de $LBG_{2/80C}$. Por otro lado, los valores de R_h para galactomananos de *P. affinis* y LBG obtenidos a RT fueron significativamente mayores que aquellos determinados para sus productos de extracción correspondientes a 80°C, seguramente debido a la tendencia de estos

Resultados

polisacáridos a degradarse a altas temperaturas (Pollard, 2010; Salvalaggio *et al.*, 2014).

La relación log-log entre R_g y M_w , que indica el grado de compactación de los polímeros en solución y es conocida como el gráfico de conformación, fue calculada para las diferentes muestras. El gráfico de conformación se presenta para las distintas muestras ensayadas se presenta en la fig. 4-10. Como se muestra en la Tabla 4-9, las pendientes del gráfico de conformación (α) fueron similares en el caso de GG, indicando que los galactomananos obtenidos a partir de esta goma comercial a RT y 80°C presentaron en estas condiciones una conformación similar. Es interesante el hecho de que los valores de α fueron significativamente mayores para los galactomananos de *P. affinis* extraídos a baja temperatura (Tabla 4-8 y Fig. 4-10). Tomando en cuenta que las relaciones M: G de estas fracciones de polímeros fueron similares, las diferencias observadas en los gráficos de conformación indican que el patrón de sustitución juega un papel importante en su dispersión, y por tanto en su tendencia a la auto-asociación en solución acuosa. Estos resultados muestran que el grado de compactación de los extractos de galactomananos de *P. affinis* en frío y caliente se asemejan a aquellos obtenidos a partir de sus homólogos LBG, y que familias de galactomananos con propiedades similares a éste que se encuentran en gomas comerciales podrían ser obtenidos a partir de *P. affinis* dependiendo de las condiciones de extracción.

Resultados

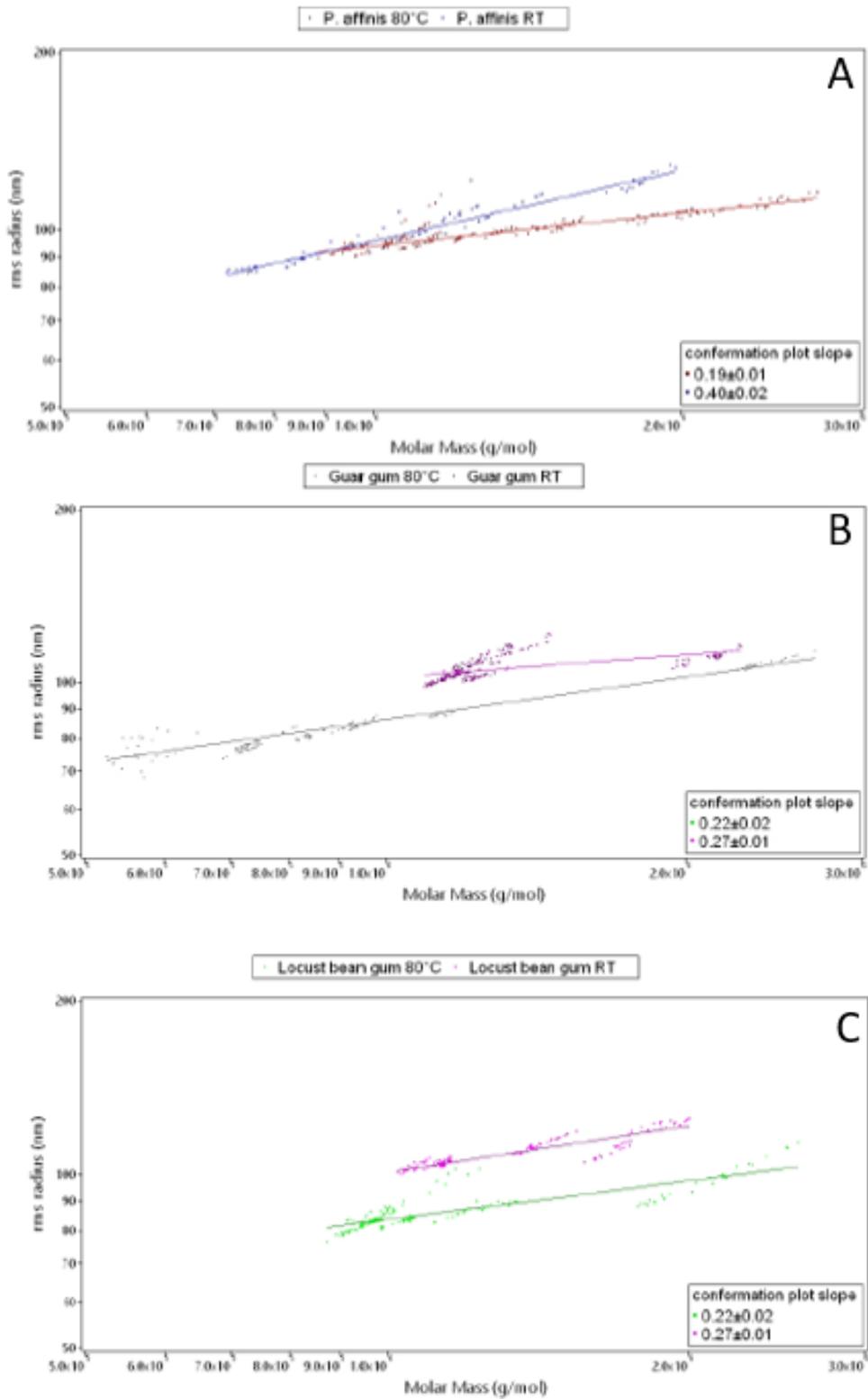


Figura 4-10: Gráfico de conformación rms radius (nm) en función del Mw para $GMP_{2/RT}$ y $GMP_{2/80}$ (A); $GG_{2/RT}$ y $GG_{2/80}$ (B); $LBG_{2/RT}$ y $GBG_{2/80}$ (C)

Resultados

4.7. Determinación de viscosidad intrínseca y estimación de M_v

La Fig. 4-11 muestra el gráfico de Fedor utilizado para determinar la viscosidad intrínseca (η) de galactomananos de *P. affinis*. Para las fracciones GMP_{2/RT} y GMP_{2/80C}, los valores de η estimados fueron 9.9 y 10.7 dL/g, con parámetros de concentración de Fedor (C_m) de 0,284 y 1.401 g/dL, respectivamente. La adecuación al modelo de regresión lineal de Fedor se presenta en el anexo 7.2.4. La viscosidad intrínseca de los polisacáridos de *P. affinis* están en el intervalo esperado para las especies de *Prosopis* (Rincón *et al.*, 2014; Busch *et al.*, 2015; Nwokocha & Williams, 2016) y comparables a los valores de GG obtenidos en el presente trabajo ((12,7 dL/g) y reportados en la literatura (10,3 a 12,7 dL/g) (Azero & Andrade, 2006; Goycoolea *et al.*, 1995). Los valores de viscosidad representados en el gráfico 4-11 fueron obtenidos mediante curvas de flujo, que se presentan resumidas a continuación (ver 4.8).

Resultados

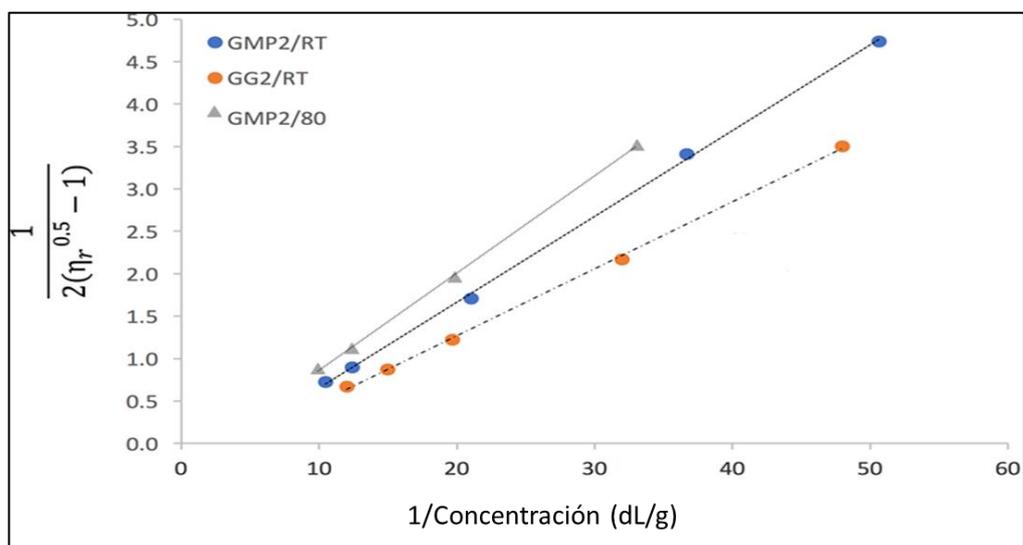


Figura 4-11: Gráfico de Fedor utilizado para la determinación de la viscosidad intrínseca de los galactomananos de *P. affinis* ($GMP_{2/RT}$ y $GMP_{2/80C}$) y GG ($GG_{2/RT}$)

El peso molecular ponderado en viscosidad (M_v) fue estimado a partir de la viscosidad intrínseca utilizando la ecuación de MHS con parámetros obtenidos para galactomananos de GG, LBG, y TG por Picout & Ross-Murphy (2007), y estos resultados se muestran en la Tabla 4-8. Los valores obtenidos en este trabajo estimados por este método fueron del mismo orden que los obtenidos con la técnica de SEC/MALLS-QUELS/RI y similares en valor a los reportados para GG (Dea & Morrison, 1975) y LBG (Sébastien *et al.*, 2014) y más aún en el rango esperado reportado en la revisión de Pollard, *et al.*, (2010) para la familia *Faboideae*. Este resultado era esperable, considerando que las bajas concentraciones de polímero empleadas en la medición de η aseguran la ausencia de asociaciones polímero-polímero. Esto hace de la viscosidad intrínseca un parámetro fundamental para la

Resultados

comparación de propiedades macromoleculares de polisacáridos (Salvalaggio *et al*, 2014; Pitkanen *et al.*, 2017), aún en la actualidad en que se han desarrollado nuevos métodos alternativos, como los del tipo SEC-MALLS que también se utilizaron en este trabajo.

4.8. Propiedades de fluencia de los galactomananos de *P. affinis*

Las propiedades de fluencia de *P. affinis* fueron analizadas de modo de obtener algunos datos preliminares del comportamiento en dispersión de los polímeros obtenidos. En este primer estudio se realizaron curvas de fluencia a diferentes niveles de velocidad de deformación con diferentes concentraciones. Con la información obtenida de las curvas de viscosidad por un lado se obtuvieron las viscosidades intrínsecas, para su comparación con referencias bibliográficas, y por otro lado se estimó el peso molecular viscosimétrico según la ecuación de MHS como se explica en el punto 3.14.

Por otro lado, en lo que respecta al comportamiento de la viscosidad con la temperatura, se realizaron curvas a temperatura ambiente y a 60°C para lograr un primer entendimiento del comportamiento de este polímero con la temperatura. Para realizar un ajuste correcto utilizando el modelo de Arrhenius, por ejemplo, se necesitaría completar otros ensayos que se realizarán a la brevedad y se incluirán en una próxima publicación. De estos primeros datos preliminares se pudo recabar sin embargo un comportamiento esperable

Resultados

con el cambio en la temperatura para este tipo de muestras (Busch, *et al.*, 2017, Nwokocha & Williams, 2016). En una segunda etapa se realizaron ensayos reológicos dinámicos (con una frecuencia de giro variable) para obtener la componente viscosa y elástica del polímero en solución a diferentes concentraciones.

4.8.1. Viscosidad dependiente del esfuerzo de cizalla (*Shear viscosity*)

Se obtuvieron curvas de flujo para los diferentes productos a distintas concentraciones, definidas gráficamente como la representación del esfuerzo cortante (τ) en función de la velocidad de cizallamiento ($\dot{\gamma}$), según el procedimiento que se describe en el apartado 3.15. Luego, se interpretó gráficamente, utilizando el modelo newtoniano (ecuación 16 $\eta\dot{\gamma} = \tau$) o de potencia (ecuación 17b: $\tau = k\dot{\gamma}^n$), dependiendo de la respuesta obtenida en las curvas de flujo. A modo de ejemplo, se presentan las curvas de flujo de *P. affinis* en el nivel de concentraciones de 0 a 0,1% (ver Fig.4-12). En este gráfico se puede observar que el comportamiento a bajas concentraciones es newtoniano. Se realizaron ajustes para ambos modelos, y el que mejor describe la curva es el newtoniano, con una regresión lineal con un nivel de significación al 5%. En la figura 4-12 se presenta a modo de ejemplo una curva de flujo de GMP_{1/RT} y la curva de ajuste del modelo Newtoniano.

Resultados

Los parámetros de ajuste de las curvas utilizadas para la determinación de viscosidad intrínseca se presentan en el anexo 7.2.5.

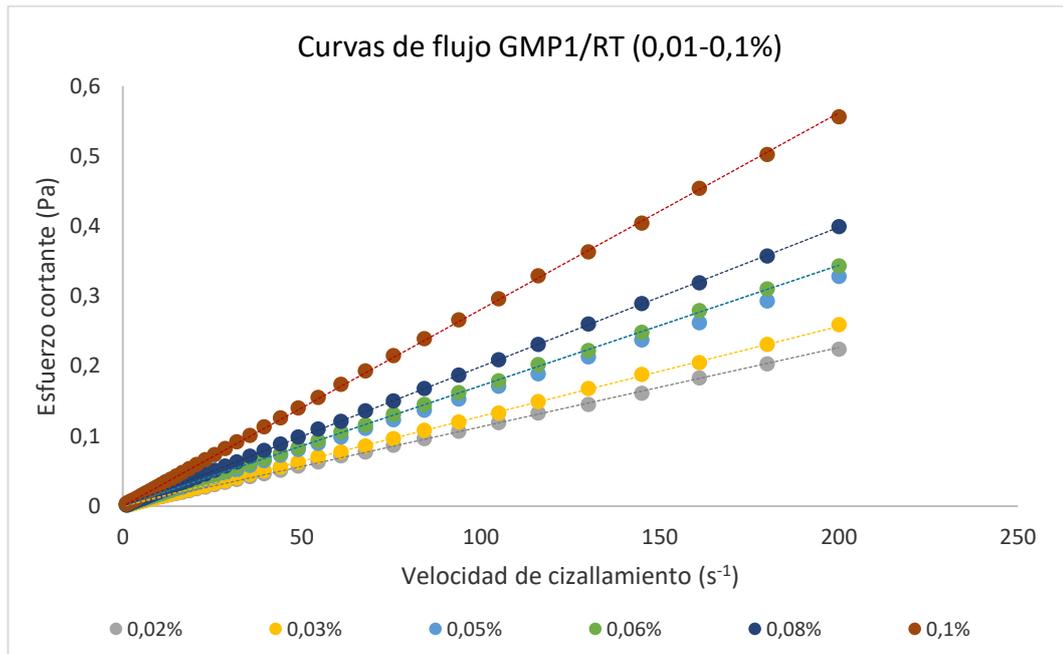


Figura 4-12: Curva de flujo para la obtención de viscosidades intrínsecas de muestras de *P. affinis* ($GMP_{1/RT}$). A cada curva obtenida se le superpone la regresión lineal obtenida (en punteado) (modelo Newtoniano).

Resultados

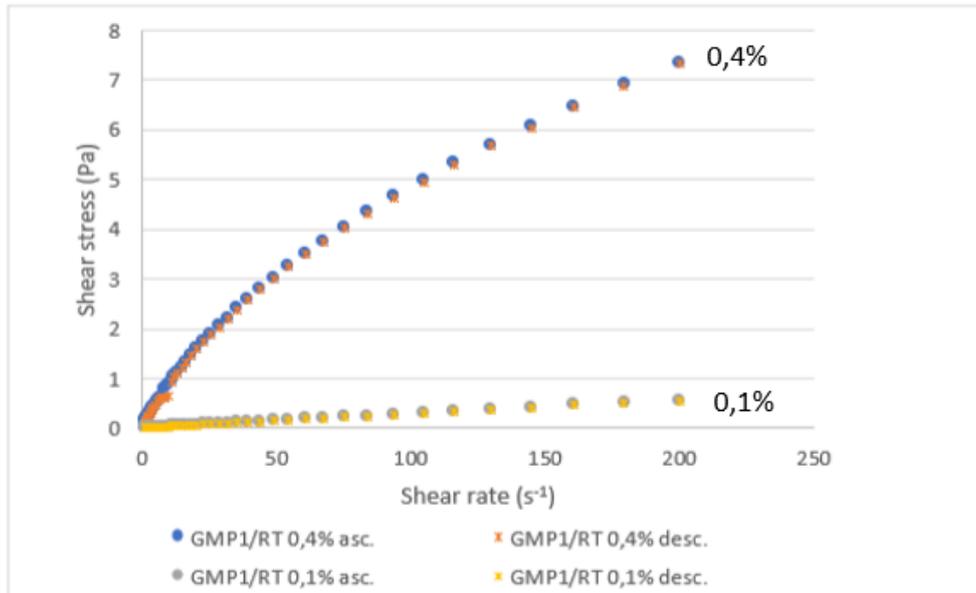


Figura 4-13: Curvas de flujo en modo ascendente y descendente para GMP1/RT

4.8.2. Determinación del valor de concentración de superposición de cadenas (c^*)

El parámetro c^* , la concentración a la cual las cadenas de polímero comienzan a entrelazarse, es un valor importante porque determina el límite del régimen diluido de las dispersiones del polímero. Una vez superado este valor, la viscosidad aumenta acusadamente en dispersiones de polímeros, especialmente cuando estos son galactomananos. El inicio del efecto de superposición de cadenas (*entanglement*) depende tanto del número de cadenas presentes (proporcional a la concentración) y al volumen que cada uno ocupa (proporcional a la viscosidad intrínseca), y por lo tanto se puede caracterizar por el parámetro adimensional de solapamiento de cadenas:

Resultados

$c.\eta$. Para polímeros con enrollamiento tipo bovina al azar (incluida la mayor parte de los polisacáridos utilizados como espesantes) sin importar el tipo de polímero, peso molecular o condiciones, la transición c^* ocurre a un valor de $c.\eta = 4$, donde la viscosidad de la solución es aproximadamente 10 veces la del agua (Harris, 1990). Sin embargo, para LBG y GG, la transición c^* ocurre a un menor grado de ocupación de espacio (aproximadamente $c.\eta \approx 2,5$; Podzimek, 2011; Harris, 1990). La interpretación más factible de este comportamiento fue expuesta por Harris, (1990): las concentraciones a las cuales las cadenas son forzadas a tomar contacto entre sí se dan de la misma manera que se presentan en cualquier otro proceso de superposición (*entanglement*) pero se encuentran aumentadas en este caso por asociaciones cadena-cadena, análogamente a lo que ocurre en el estado sólido.

En la figura 4-14 se puede observar el gráfico de viscosidad específica en función del parámetro de superposición de cadenas $c.\eta$ en modo log-log para dispersiones de *P. affinis* ($GMP_{1/RT}$ y $GMP_{1/80}$), y los valores obtenidos se presentan en la tabla 4-9. El cambio de pendiente de la regresión lineal representa el parámetro $c^*.\eta$, que determina la transición del régimen diluido al semi-diluido. Este parámetro muestra la concentración a la cual las cadenas de polímero comienzan a interaccionar entre sí, además de continuar interaccionando con el solvente. El parámetro c^* a RT fue de 0,094 g/dL y 0,076g/dL a 80°C, algo menores a los informados para *P. ruscifolia* (0,14 g/dL, Busch,

Resultados

2015), y en *P. africana* (0,186 g/dL, Nwokocha & Williams, 2016), y el valor de $c.\eta$ fue similar al reportado por Busch, 2015. Es decir que los galactomananos de *P. affinis* comienzan un comportamiento asociativo a menor concentración comparativamente que goma guar, por ejemplo. En las mismas condiciones, se determinó el valor para esta última, con un mayor valor de transición $c.\eta$. Es interesante señalar que en el caso de *P. affinis*, el valor de radio hidrodinámico tanto para las fracciones RT y 80°C es cercana al doble de las obtenidas en goma guar (Vilaró *et al.*, 2018), y por tanto en los extractos *P. affinis* cuyo volumen hidrodinámico es mayor, y es por tanto consistente con un menor valor de concentración límite del encontrado en GG. Asimismo, los valores obtenidos en las mismas condiciones para goma guar (muestra GG_{2/RT}) son casi idénticos a los obtenidos por Wientjes, 2000 en una fracción de goma guar de M_w con un valor de 1500 kD, análoga a la GG_{2/RT} ($1,6 \times 10^6$, Vilaró *et al.*, 2018).

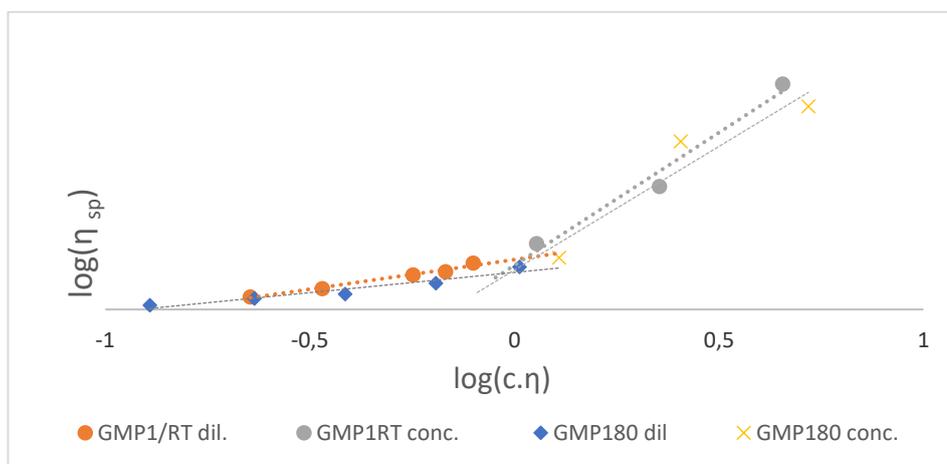


Figura 4-14: Determinación del parámetro de superposición de cadenas c^*

Resultados

Muestra	Pend. < c*	Pend. > c*	c.η	η (dL/g)	C* (g/dL)
GMP _{1 RT}	0,4	2,0	1,1	11,3	0,094
GMP ₁₈₀	0,3	1,9	1,0	12,8	0,076
GG _{2/RT}	0,6	1,8	1,4	12,7	0,111
GG 150 kD (Wientjes <i>et al.</i> , 2000)			1,6	11,2	0,130
VG (Busch, 2015)	1,7	4,7	1,1	7,6	0,140
<i>P. africana</i> (Nwokocha, 2016)	1,4	4,4	2,2	11,6	0,186

Tabla 4-10: Cálculo de parámetro de concentración crítica

4.8.3. Estudio de tixotropía de las soluciones

Para realizar los ensayos de comportamiento reológico se estudiaron las curvas de flujo en un rango rango velocidad de deformación de 1 a 200 s⁻¹ en un modo creciente y decreciente para todas las dispersiones ensayadas, en concentraciones de 0,01 a 0,4%, de modo de poder evidenciar algún comportamiento tixotrópico. En la figura 4-15 se muestra la curva de esfuerzo cortante para una solución de GMP_{1/80} al 0,4% en que se realizó este ensayo. Por otro lado, las curvas de flujo se realizaron en el modo ascendente / descendente, para analizar la existencia de tixotropía en las dispersiones en estos intervalos de concentración. Por citar un caso en la figura 4-13 se muestran dos curvas de flujo de una muestra de GMP_{1/RT} a concentración baja (0,1%) y media (0,4%). En la figura se puede observar que no se evidencia tixotropía: las curvas ascendente y descendente se superponen. El comportamiento de la dispersión de media concentración es pseudoplástico y la de baja concentración tiene un comportamiento newtoniano: aún en el régimen concentrado no se presenta tixotropía.

Resultados

Este comportamiento es esperable en soluciones de galactomananos, como ha sido reportado por Busch *et al.*, 2017, Nwokocha & Williams y Bourriot, 1999).

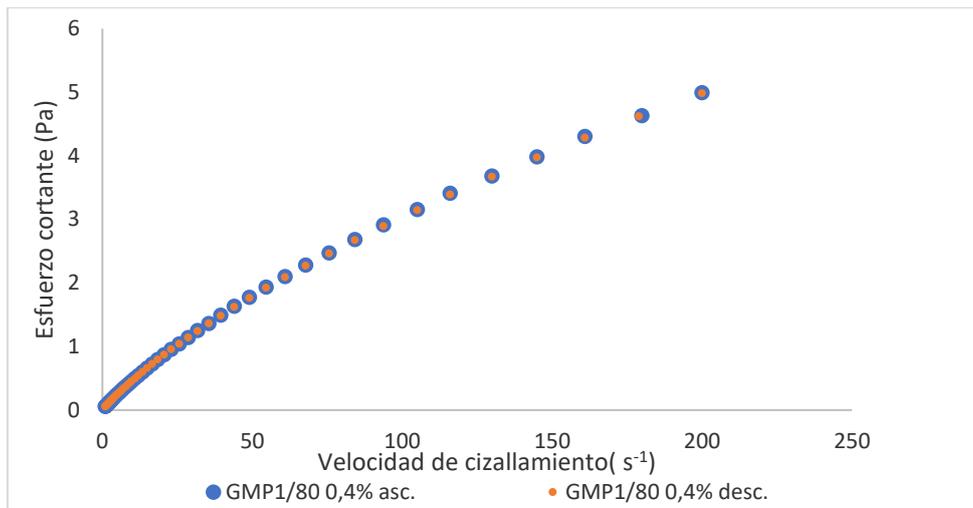


Figura 4-15: Análisis de flujo en modo creciente - decreciente para dispersiones de GMP al 0,4%.

Las curvas de flujo ascendente y descendente que se muestran en la figura 4-15 se realizaron en las condiciones más exigentes: a la mayor concentración de las utilizadas en estos ensayos. Un comportamiento similar se obtuvo en todas las demás curvas ensayadas, encontrando un comportamiento no dependiente del tiempo de aplicación del esfuerzo cortante sin importar si el fluido se comportara como pseudoplástico (como en el caso de la figura 4-15) o Newtoniano, como en las curvas muy baja concentración utilizadas para la determinación de viscosidad intrínseca (ver anexo 7.2.4). En ninguna de las concentraciones estudiadas se evidenció tixotropía. Un fluido no tixotrópico muestra una

Resultados

superposición de las curvas de flujo que se obtienen a una velocidad de cizallamiento creciente y decreciente. Por el contrario, en un fluido que presente un comportamiento dependiente del tiempo se puede observar la ocurrencia de histéresis, que se presenta como un área significativa entre ambas curvas (a mayor el área entre ambas curvas mayor el comportamiento de histéresis presente en la muestra). Los cambios en el comportamiento reológico con el tiempo y en particular la tixotropía se relaciona con modificaciones en la estructura interna del fluido. Las interacciones en forma de fuerzas de van der Waals son modificadas dinámicamente y ocasionan cambios temporales en las características microscópicas del material, y por consecuencia en sus condiciones de flujo (Benchabane & Bekkour, 2008). El comportamiento de la goma de *P. affinis*, se asemeja al de goma guar o de algarrobo y a otros de fuentes no tradicionales como *P. ruscifolia* (Busch *et al.*, 2017), *P. africana* (Nwokocha & Williams, 2016). Especialmente, la ausencia de tixotropía en las dispersiones de *P. affinis* muestra que son dispersiones que se mantienen estables respecto del esfuerzo cortante, por lo que el flujo en un proceso productivo en el caso de avanzar a usos industriales se lograría tener un comportamiento predecible, pues su estructura no se dañaría considerablemente como ocurre con otros aditivos de este tipo. Esta propiedad le confiere al producto una cualidad especialmente importante en productos utilizados en las formulaciones como espesantes o co-gelificantes.

Resultados

4.8.4. Comportamiento viscoso en comparación a fuentes comerciales y grado de purificación

En las figuras 4-16 y 4-17 se pueden observar las curvas de flujo de *P. affinis* y aquellas purificadas a partir de muestras comerciales. En la figura 4-16 y 4-17 se realizó un esquema en condiciones de viscosidad baja (0,1% y media 0,4%). En este caso se puede observar que los valores de viscosidad se asemejan a aquellos encontrados en otras especies en condiciones similares, por ejemplo en *P. africana* a una concentración de 0,4 g/dL η_0 es informada como 0,1618 Pa.s (Nwokocha & Williams, 2016), y en GMP1/RT fue de 0,101 Pa.s. Asimismo, las curvas de flujo se asemejan a las encontradas en *P. ruscifolia* (Busch, *et al.*, 2015 y 2017).

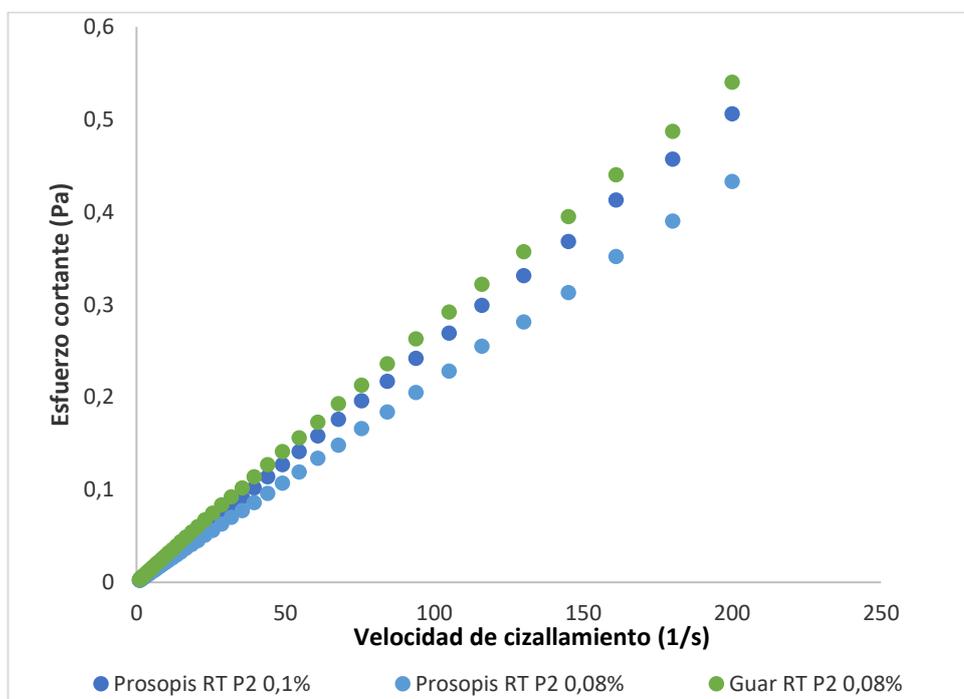


Figura 4-16: Comparación de curvas de flujo de soluciones al 0,1%

Resultados

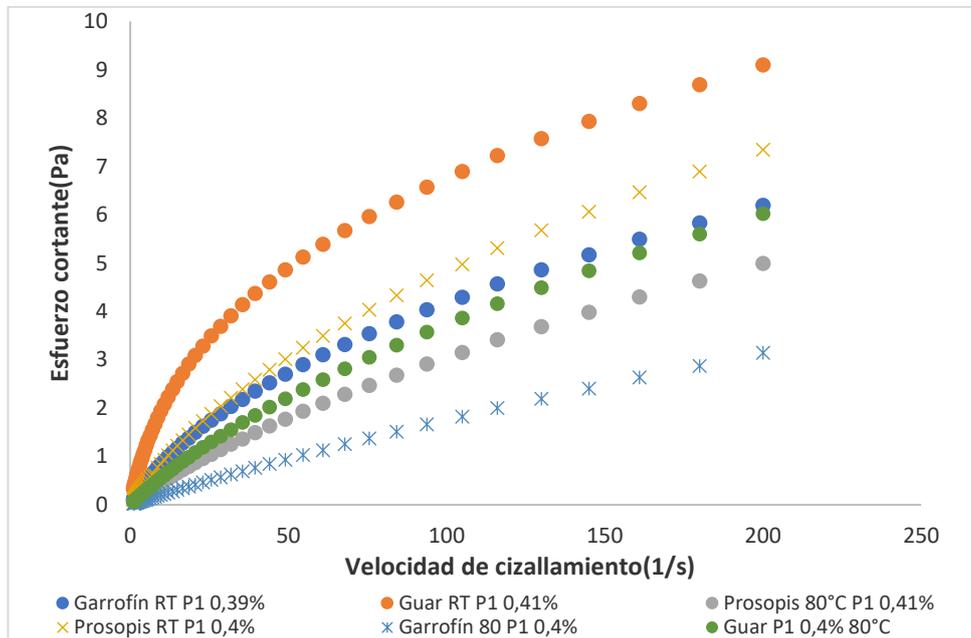


Figura 4-17: Comparación de viscosidad de soluciones al 0,4%

También se estudió el comportamiento reológico de soluciones similares de productos con diferentes grados de purificación. En la figura 4-18 se muestran las curvas de flujo de soluciones de GMP_{1/80} y GMP_{2/80}. En este caso, y en todos los ensayos, se encontró un menor nivel de viscosidad aparente en las soluciones más purificadas que en aquellas con un menor nivel de purificación, un resultado inicialmente no esperado. Este comportamiento se observó en todas las soluciones estudiadas, ya sea de muestras comerciales como de GMP. Si bien al purificar las muestras el nivel de carbohidratos totales permanece relativamente constante, en el proceso de purificación de los extractos se eliminan no solamente azúcares de menor peso molecular sino proteínas (ver tabla 4.4). Por el tamaño de corte de la membrana de

Resultados

corte, estas serían péptidos de menos de 12 kDa. Asimismo, se realizó la hipótesis de si este cambio pudiera deberse no a un cambio composicional de las muestras sino a variables del proceso. En este caso, la purificación se realizó por dilución a muy bajas concentraciones y agitación por varias horas en un erlenmeyer que contiene el saco de diálisis. No se consideraron estas condiciones de proceso suficientemente severas como para ocasionar dicho cambio. Sin embargo, el paso subsecuente de liofilización a baja presión y temperatura sí podría ser determinante como proceso adicional aplicado al producto, y debería ser estudiado como parámetro en conjunto con otros ensayos, para poder concluir correctamente al respecto de este punto. Las condiciones de liofilización fueron de -45°C por 48 horas, similares a las que reporta Salehi & Kashaninejad., (2014). En este trabajo la disminución de la viscosidad respecto al método de secado por liofilización a -40°C por 48 horas fue significativo, pero en una magnitud muy limitada que no podría explicar este comportamiento. Otra posibilidad para explicar este comportamiento puede radicar en la composición química diferente de los extractos. Salehi *et al.*, 2014 también indica que la presencia de oligosacáridos, compuestos fenólicos y sales inorgánicas como factores que aumentan la viscosidad general de la solución. Otra causa podría ser deberse a la degradación (pérdida de peso molecular de los polisacáridos. Salvalaggio *et al.*, (2014) muestra cierto grado de degradación de muestras que conllevan a una

Resultados

reducción del Mw, pero en condiciones mucho más exigentes (24 y 48 horas), que las condiciones de extracción utilizadas. Finalmente, como primera hipótesis a partir de estas observaciones en estas condiciones las interacciones polisacárido – péptidos u otros compuestos asociados que son eliminados mediante la diálisis puedan explicar fundamentalmente este fenómeno.

El estudio de las matrices proteína – polisacárido en sistemas ternarios han sido revisados por diversos autores (Tolstoguzov *et al.*, 1986 y 1971; Morris, 1990; Drohan, *et al.*, 1997; Rodríguez, *et al.*, 2011). Debido a las dispersiones con presencia conjunta de polisacáridos y proteínas, por razones termodinámicas pueden ocurrir varios efectos que son la separación de fases, la inversión o interacción mutua y éste último efecto tiene significativas consecuencias texturales (Morris, 1990). En el caso de sistemas que contengan polisacáridos aniónicos, éstos se tornan incompatibles a valores de pH por encima del punto isoeléctrico y factores como la fuerza iónica son fundamentales en el comportamiento de los sistemas (Tolstoguzov *et al.*, 1986, 1991). Los galactomananos por su estructura química que no posee grupos ionizables los posiciona como un sistema ideal para comprender este tipo de asociaciones.

El caso de la interacción de polisacáridos neutros con proteínas no ha sido vastamente estudiado. Sin embargo, en el artículo de Bourriot *et al.*, (1999) se estudió la interacción utilizando como modelo

Resultados

dispersiones de goma guar y caseína. Ya había sido propuesto que los galactomananos pueden interaccionar con proteínas, por ejemplo, con las proteínas lácteas (Ambrose, 1935; Dea & Morrison, 1975). En soluciones de goma guar al 0,2%, el agregado de 1% de caseína cambió marcadamente el comportamiento del polisacárido, ya que la viscosidad de la solución y su carácter pseudo-plástico aumentaron y se observó también que con el agregado de un 3% de caseína este efecto fue aún más marcado, apareciendo incluso un efecto tixotrópico no observado previamente en las soluciones de goma guar (Bourriot *et al.*, 1999). Perissutti *et al.*, (2002) encontraron también un marcado aumento de la viscosidad en sistemas galactomanano – leche descremada.

Desde de un punto de vista teórico, el fenómeno de aumento de la viscosidad y a su vez de aumento de la componente elástica G' de las soluciones de galactomanano con agregado de proteína estudiado por Bourriot *et al.*, (1999) fue fundamentado en las observaciones de microscopía de fuerza atómica y les permitieron postular que en este caso el comportamiento reológico de la dispersión de este sistema mixto está gobernado por una red de caseína floculada, donde el galactomanano contribuye de menor manera a la reología del sistema floculado (un fenómeno de separación de fases). Algún proceso de separación de fases podría explicar el marcado aumento de viscosidad que podemos ver en las soluciones menos purificadas y con un mayor contenido de proteína.

Resultados

En todas las soluciones de *P. affinis*, GG y LBG se encontró un efecto sinérgico entre la cantidad de proteína presente en la muestra y la viscosidad aparente de las soluciones ensayadas. Desde un punto de vista tecnológico, sería más ventajoso desde un punto económico la utilización de productos menos purificados que permitieran un mayor aumento de viscosidad. Asimismo, sería interesante estudiar el agregado de proteínas o la interacción de los galactomananos en matrices más complejas que contengan proteínas en su formulación.

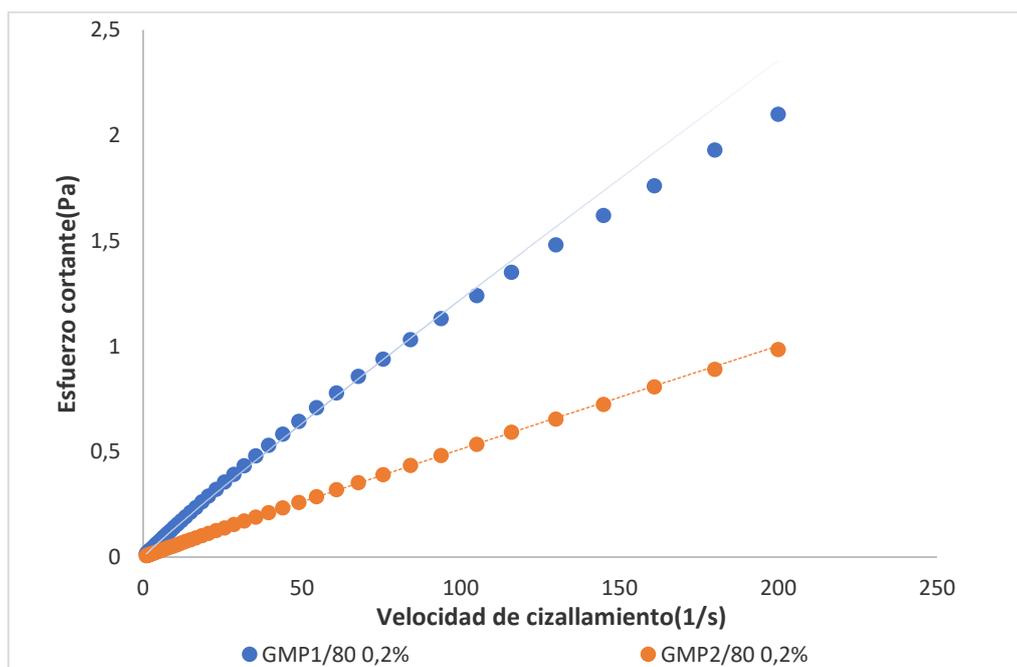


Figura 4-18: Comparación de curvas de fluencia según el grado de purificación

4.8.5. Comportamiento con la temperatura

Los perfiles de viscosidad para soluciones al 0,2% se estudiaron a las temperaturas de 25 y 60°C y se presentan en la figura 4-19. La viscosidad a bajos niveles de cizallamiento disminuyó a medida que la

Resultados

temperatura aumentó. El aumento de la viscosidad a bajas temperaturas ya ha sido atribuidas a un aumento del tiempo de relajación de los entrelazamientos moleculares (Nwokocha & Williams, 2016). En futuros trabajos se determinará la energía de activación utilizando el modelo de Arrhenius, como ya ha sido realizado por Nwokocha & Williams (2016), Rincón *et al.*, (2014) y Busch *et al.*, (2018).

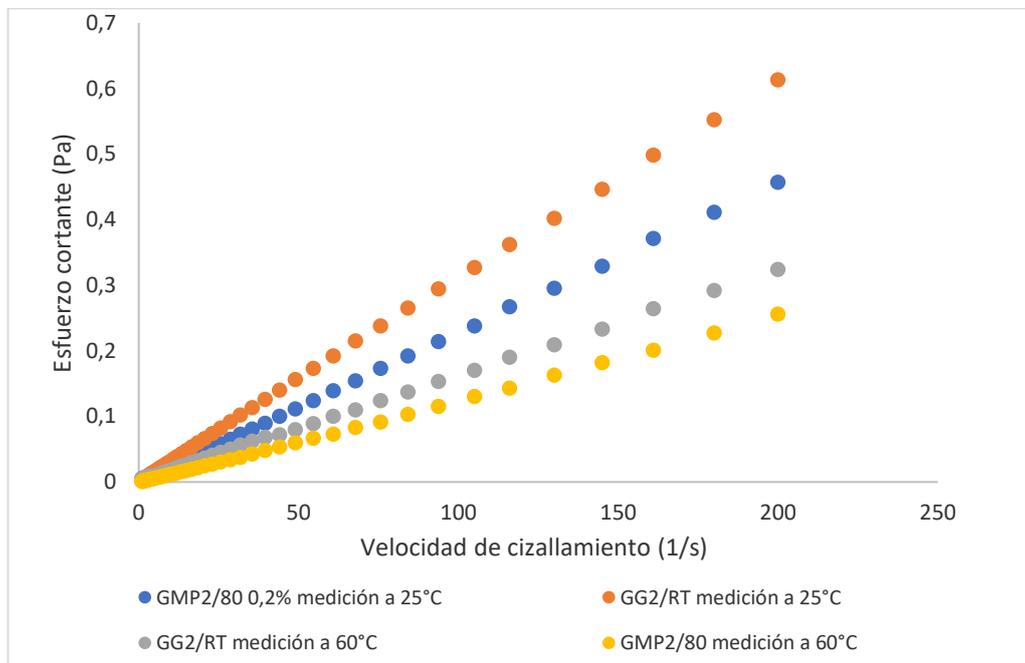


Figura 4-19: Efecto de la temperatura en la viscosidad aparente en soluciones de GMP y GG 0,2%

4.8.6. Dependencia de la viscosidad con la concentración y la magnitud de la velocidad de cizallamiento

Como se explicó en la revisión bibliográfica, en los polímeros, especialmente del tipo polisacárido (Lopes da Silva *et al.*, 1992; Yoo *et al.*, 1995; Launay *et al.*, 1986) se observan 3 regiones diferentes: una región de esfuerzos cortantes bajos en que la viscosidad se mantiene

Resultados

constante con la velocidad de deformación η_0 , una región de comportamiento de ley de potencia, o pseudoplástico, y una tercer región, que se ve a esfuerzos cortantes muy elevados, donde el efecto “*thinning*”, o sea el acoplamiento de las cadenas, logra una alineación tal que el comportamiento es newtoniano, es decir que no varía con el esfuerzo cortante (ver figura 1-11). De la representación gráfica de log viscosidad vs log esfuerzo cortante se puede observar que a bajos valores de esfuerzo cortante la viscosidad aparente toma valores iguales a η_0 y a medida que el esfuerzo cortante aumenta la viscosidad disminuye hasta un valor de viscosidad asintótico η_∞ . El modelo de Carreau – Yasuda (Yasuda *et al*, 1981) toma en cuenta estos dos parámetros (capítulo 3, ecuación 19).

Análogamente, el modelo de Cross - Williamson es una simplificación del modelo cuando el valor de η_∞ se aproxima a cero y el valor a se estima en 1. En la Figura 4-20-a) se presentan los perfiles de viscosidad para las gomas extraídas a partir de *P. affinis* y gomas comerciales. El ajuste de estas curvas al modelo de Williamson (ecuación 20) se puede observar en la tabla 4-10, y se representa gráficamente en la figura 4-20 b), donde η y η_0 son las viscosidades dependientes del esfuerzo cortante y la viscosidad a cero esfuerzos cortantes respectivamente y $\dot{\gamma}$, τ y N representan el tiempo de relajación de Williamson y el índice de Williamson respectivamente.

Resultados

Los polisacáridos ensayados presentan un comportamiento típico de polisacáridos en solución, con una región de *plateau* Newtoniano (Nwokocha & Williams, 2016 y 2014, Wang *et al.*, 1997). La viscosidad de las soluciones de *P. affinis* aumenta con el aumento de concentración, como indica el valor η_0 (0,015 a 0,101 Pa.s a 0,2 y 0,4% de concentración, respectivamente). Un aumento similar del valor η_0 se encontró en las dispersiones de LBG. El tiempo de relajación aumentó al aumentar la concentración (0,002s a 0,011s) en todas las muestras ensayadas. El tiempo de relajación está relacionado con la velocidad de cizallamiento crítica ($\dot{\gamma}_{crit} = 1/\tau$) que marca el inicio del comportamiento pseudoplástico. Tanto las magnitudes de η_0 como de τ fueron comparables a las reportadas por Nwokocha & Williams, (2016) en *P. africana*. Las soluciones en estos niveles de concentración (0,2 al 0,4%) no mostraron un comportamiento Newtoniano, y el índice de Williamson N se encontró entre 0,62 a 0,89, que es una medida de la pseudoplasticidad de las soluciones. El valor N se hace 0 para un fluido Newtoniano, y se aproxima a la unidad para fluidos pseudoplásticos.

Resultados

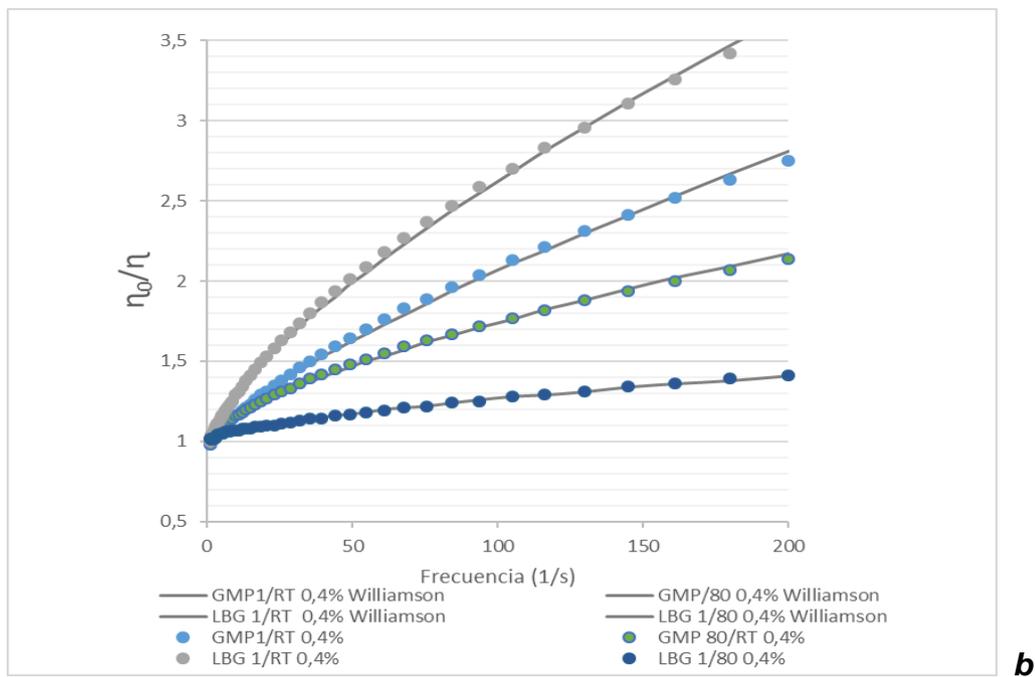
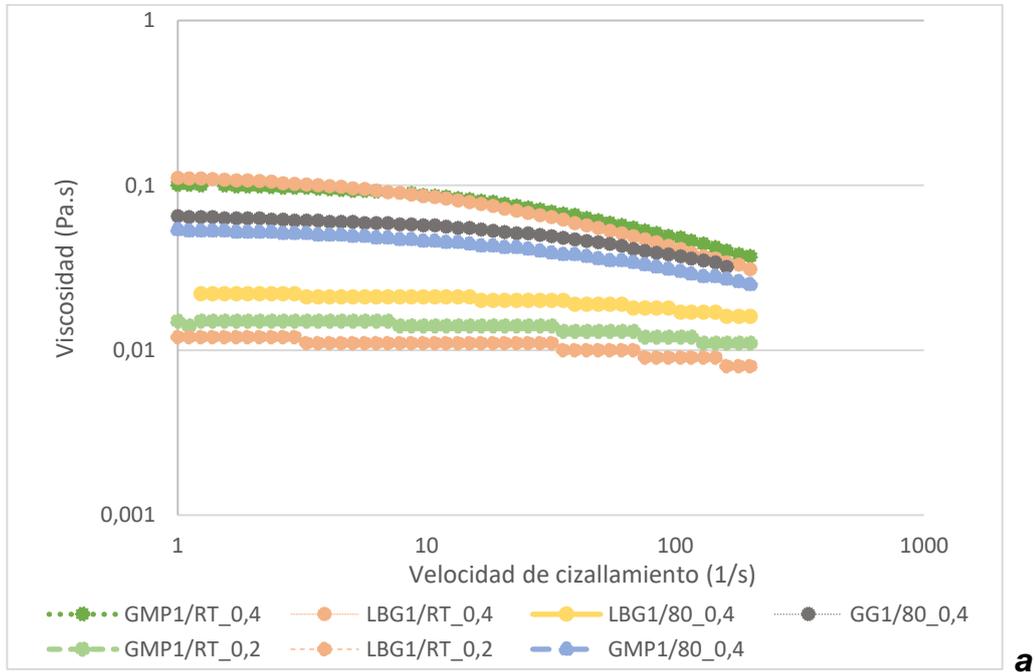


Figura 4-20: Perfiles de viscosidad - cizallamiento a diferentes concentraciones para gomas de *P. affinis* y comerciales
(a) Ajuste del modelo de Williamson para las gomas de GMP_{1/RT} y LBG_{1/RT}. Modelo de

$$\text{Williamson: } \frac{\eta}{\eta_0} = \frac{1}{1+(\tau\dot{\gamma})^N}$$

Resultados

Muestra	η_0 (Pa.s)	N*	CM Error	Sigma	AIC	BIC	τ (s)	E.E.	N	E.E.
GMP1/RT 0,4%	0,101	47	0,001	0,027	-203	197,683	0,011***	8,6E-05	0,760***	0,009
GMP1/RT 0,2%	0,015	50	5,1E-05	0,007	-348	342,600	0,002***	4,3E-05	0,89***	0,01
GMP1/ 80 0,4%	0,053	50	3,9E-04	0,020	-246	240,347	0,006***	7,0E-05	0,663***	0,008
GMP1/80 0,2%	0,015	49	3,6E-05	0,006	-359	353,315	0,002***	3,5E-05	0,84***	0,01
LBG1/RT 0,4%	0,111	50	0,002	0,039	-178	172,403	0,020***	2,2E-04	0,761***	0,008
LBG1/RT 0,2%	0,012	50	3,3E-05	0,006	-370	364,488	0,002***	2,9E-05	0,682***	0,006
LBG1/80 0,4%	0,022	48	2,5E-05	0,010	-368	-362,11	1,2E-03***	2,5E-05	0,620***	0,006
GG1/80 0,4%	0,065	47	5,9E-05	0,008	-321	315,152	0,006***	3,4E-05	0,700***	0,004

Tabla 4-11: Parámetros del modelo de Williamson para GMP_{1/RT}, LBG_{1/RT}
N* número de datos, * corresponde al ajuste de modelo con $p < 0,0001$**

4.8.7. Ensayos reológicos dinámicos

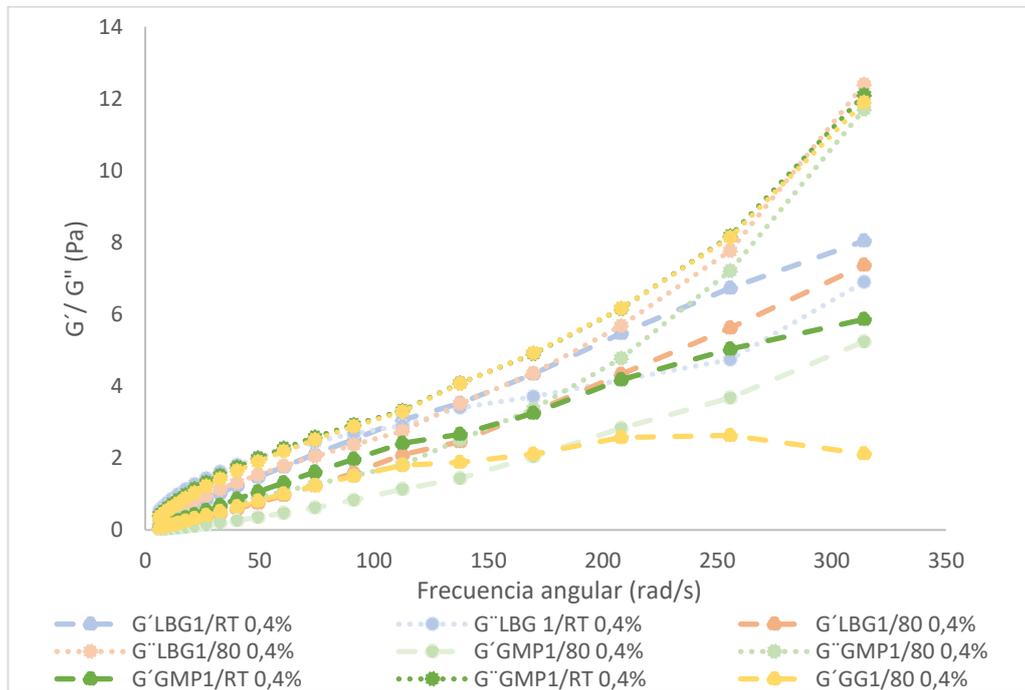


Figura 4-21: G' y G'' como función de la frecuencia angular para muestras de *P. affinis* y muestras comerciales al 0,4% a 25°C.

Resultados

Algunos de los ensayos dinámicos realizados se presentan en el gráfico 4-21, particularmente aquellos realizados a una concentración de 0,4%. A una concentración de polímero del 0,4%, el valor del módulo de pérdida (G'') fue mayor que el valor del módulo de almacenamiento (G') a todas las frecuencias angulares de las muestras de *P. affinis* ($GMP_{1/RT}$ y $GMP_{1/80}$) y de GG, mostrando a esta concentración un comportamiento totalmente viscoso. Un resultado similar fue obtenido por Nwokocha & Williams (2016) con extractos de *P. africana* al 0,5%. Este es un comportamiento típico que se presenta en soluciones por debajo de la concentración crítica de superposición. Por otro lado, la muestra de $GMP_{1/RT}$ tuvo una curva de G'' muy similar a la respuesta exhibida por goma guar, aunque la componente elástica de goma guar cae muy fuertemente luego de un valor de frecuencia angular de 200 rad/s.

Este comportamiento hace que la goma de *P. affinis* presente mayor estabilidad frente a aumentos del esfuerzo de corte que la de GG ensayada. Por otro lado, en el caso de la goma de algarrobo, la muestra $LBG_{1/RT}$ al 0,4% tuvo un comportamiento viscoso a menores frecuencias angulares ($G'' > G'$) y luego de una frecuencia crítica (ω_{crit}) de 109 rad/s prevaleció el comportamiento elástico. Este es un comportamiento típico de las soluciones donde se sobrepasa el valor del parámetro de superposición de cadenas (Ren *et al.*, 2003; Nwokocha & Williams, 2016).

5. CONCLUSIONES

Conclusiones

En la goma extraída de las semillas de *P. affinis* se encuentra un galactomanano, que presenta una relación de M:G de aproximadamente 1,5 y que estructuralmente está compuesto por un esqueleto de manano unido por enlaces β -(1→4) adornados con residuos de galactósidos unidos por uniones del tipo α -(1→6).

Desde el punto de vista de su distribución de peso molecular, los galactomananos aislados son heterogéneos y poli-dispersos y poseen un alto peso molecular, con un M_w de aproximadamente $1,5 \times 10^6$ Da, que se pudieron calcular por dos metodologías diferentes: por HPLC/SEC/MALLS/RI y por viscosimetría y estimación matemática utilizando la ecuación de MHS. Ambas metodologías fueron convergentes en los resultados obtenidos, aún respondiendo a metodologías de ensayo muy diversas y con mecanismos químicos y fisicoquímicos muy distantes entre sí.

La viscosidad intrínseca de los galactomananos aislados resultó similar a las de gomas comerciales (GG) y de otras fuentes no tradicionales ya reportadas como *P. ruscifolia*.

Los galactomananos que fueron extraídos a alta temperatura exhibieron un mayor grado de compactación, lo que evidencia que en esas condiciones existió una mayor proporción de asociaciones del tipo polímero– polímero sobre las del tipo polímero– solvente.

Conclusiones

Desde un punto de vista reológico, se pudo ajustar el comportamiento a esfuerzos cortantes crecientes en un rango de concentraciones amplio con el modelo de Williamson, lo que evidencia un comportamiento del tipo pseudoplástico con un índice N que varía en función de la concentración de las soluciones y es una medida de la pseudoplasticidad de las dispersiones. En general los galactomananos aislados a partir de *P. affinis* son comparables con aquellos encontrados en gomas comerciales de fuentes tradicionales y que dadas las propiedades fisicoquímicas encontradas se puede postular que su utilización en diversos productos es auspiciosa, desde formulaciones de liberación controlada a productos alimentarios que promuevan beneficios para la salud. Aún más este nuevo biomaterial puede ser aislado a partir de una fuente no tradicional abundante que está actualmente disponible en la región sur de Sudamérica, por lo que puede ser un candidato ideal para la producción sostenible en la región. El conocimiento de sus propiedades fisicoquímicas y reológicas, así como un avance en los conocimientos agronómicos de producción de la especie son factores clave para pensar en una aplicación comercial real y ventajosa de este producto

6. BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

Achi, O. K., & Okolo, N. I. (2004). The chemical composition and some physical properties of a water-soluble gum from *Prosopis africana* seeds. *International Journal of Food Science and Technology*, 39, 431–436.

Aguilera J.M. & Stanley, D.W. (1999). *Microstructural Principles of Food Processing and Engineering*, Aspen Publishers Inc., Gaithersburg, MD.

Aguilera, M. & Kessler, H. G. 1989. Properties of mixed and filled dairy gels. *Journal of Food Science*, 54, 1213-1221.

Alves Soares, C. E. (2009). Caracterização estrutural e potencial da galactomanana de *Adenantha pavoniva* L. como matéria-prima para produção de filmes comestíveis bioativos. Tesis doctoral. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, Brasil.

Alzate, L., Arteaga, D., & Jaramillo, Y. (2011). Evaluación de usos potenciales del desecho del fruto del algarrobo (*HYMENAEA COURBARYL* L) -cáscara y semillas- como conservante natural para alimentos. *Revista Lasallista De Investigación*, 8, 90–95.

Ambrose, A.S., U.S. Patent 1,991,189 (1935). *Extracting casein from milk*. Chemical Abstract, 29, 2255 (1935).

Azero, E. G., & Andrade, C. T. (2006). Characterization of *Prosopis juliflora* Seed Gum and the effect of its Addition to κ -Carrageenan Systems. *Journal of the Brazilian Chemistry Society*, 17, 844–850.

Azero, E. & Andrade, C. (2002). Testing procedure for galactomannan purification. *Polymer Testing*, 21, 551–556.

Baker, C., & Whistler, R. (1975). Distribution of d-galactosyl groups in guaran and locust bean gum. *Carbohydrate Research*, 45, 237–243.

Barbosa-Cánovas, G., Ortega-Rivas, E., Juliano, P., & Yan, P. (2005). *Food powders. Physical Properties, Processing, and Functionality*. (G. Barbosa Cánovas, Ed.). New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.

Barkalow, D.; Zyck, D. & Soto, M. U. S. Patent 2, 006,024,425, Feb 2, 2006.

Bayarri, S., Chuliá, I., & Costell, E. (2010). Comparing κ -carrageenan and an inulin blend as fat replacers in carboxymethyl

Bibliografía

cellulose dairy desserts. Rheological and sensory aspects. *Food Hydrocolloids*, 24,578 - 587.

Beer, M. U., Wood, P. J., & Weisz, J. (1999). Simple and rapid method for evaluation of Mark-Houwink-Sakurada constants of linear random coil polysaccharides using molecular weight and intrinsic viscosity determined by high performance size exclusion chromatography: Application to guar galactomannan. *Carbohydrate Polymers*, 39(4), 377–380.

Benchabane, A., & Bekkour, K. (2008). Rheological properties of carboxymethyl cellulose (CMC) solutions. *Colloid and Polymer Science*, 286,1173 – 1180.

Bennadji, Z. (2010). Avances y perspectivas del proyecto “Diversificación y caracterización de especies arbóreas multipropósito”. *Serie de Actividades de Difusión N° 625*, , 51-57. *Inia Tacuarembó*.

Bennadji, Z., Ferreira, F., Castillo, D., & Alfonso, M. (2014). Desarrollo de estrategias para la valorización de la flora arbórea nativa del Uruguay: De la bioprospección a la biorefinería. *Revista INIA*, 39,57-61.

Bennadji, Z.; Alfonso, M.; Aquino, D.; Núñez, P.; Rodríguez, F. & González, W. (2011). Presentación de los ensayos de diversificación de especies (algarrobo y pecan) instalados sobre areniscas. *Serie de Actividades de Difusión N° 661*, 17-21. *Inia Tacuarembó*.

Bennadji, Z.; Alfonso, M.; Núñez, P.; González, W. & Rodríguez, F. (2012). Potencial de uso del algarrobo como especie forestal multipropósito en el Uruguay. *Revista INIA*, 29, 38-42.

Bennadji, Z.; Puppo, M.; Alfonso, M.; Resquín, F.; Núñez, P. & Rodríguez, F.; (2008). Potencial de uso del pecan como especie multipropósito en Uruguay. *Revista INIA*, 14, 42- 45.

Bergamini, J.-F., Boisset, C., Mazeau, K., Heyraud, A., & Tavel, F. R. (1995). Conformational behaviour of oligo-galactomannan chains inferred from NMR spectroscopy and molecular modelling. *New Journal of Chemistry*, 19, 115-127.

Bhatia, H., Gupta, P. K., Soni, P. L., & Division, C. (2013). Extraction, purification and characterization of a galactomannan from *Prosopis Juliflora* (sw.) dc. Seed polysaccharides. *International Journal of Science, Environment and Technology*, 2(4), 708–724.

Bibliografía

Bourbon, a. I., Pinheiro, A. C., Ribeiro, C., Miranda, C., Maia, J. M., Teixeira, J. a., & Vicente, a. a. (2010). Characterization of galactomannans extracted from seeds of *Gleditsia triacanthos* and *Sophora japonica* through shear and extensional rheology: Comparison with guar gum and locust bean gum. *Food Hydrocolloids*, *24*, 184–192.

Bourriot, S., Garnier, C., & Doublier, J. L. (1999). Phase separation, rheology and microstructure of micellar casein-guar gum mixtures. *Food Hydrocolloids*, *13*, 43–49.

Bouzouita, N., Khaldi, a, Zgoulli, S., Chebil, L., Chekki, R., Chaabouni, M., & Thonart, P. (2007). The analysis of crude and purified locust bean gum: A comparison of samples from different carob tree populations in Tunisia. *Food Chemistry*, *101*, 1508–1515.

Buckeridge, M. S., Panegassi, V. R., Rocha, D. C., & Dietrich, S. M. C. (1995). Seed galactomannan in the classification and evolution of the *Leguminosae*. *Phytochemistry*, *38*, 871–875.

Buckeridge, M.; Tíne, M. Dos Santos, H. & De Lima, D. (2000). Polissacarídeos de reserva de parede celular em sementes. Estrutura, metabolismo, funções e aspectos ecológicos. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, *12*, 137-162.

Burkart, A. (1976). A monograph of the genus *Prosopis* (*Leguminosae* subfamily *Mimosoideae*). (Part 1 and 2). Catalogue of the recognized species of *Prosopis*. *Journal of the Arnold Arboretum*, *7*, 219-249 & 450-525.

Burkart, A., & Simpson, B.B. (1977). The genus *Prosopis* and annotated key to the species of the world. In B.B. Simpson (Ed.), *Mesquite: Its Biology in Two Desert Ecosystems* (pp. 201-215). Pennsylvania: Dowden, Hutchinson & Ross Inc.

Busch, V. M., Kolender, A. A., Santagapita, P. R., & Buera, M. P. (2015). Vinal gum, a galactomannan from *Prosopis ruscifolia* seeds: Physicochemical characterization. *Food Hydrocolloids*, *51*, 495–502.

Busch, V., Delgado, J., Santagapita, P., Wagner, J., & Buera, M. (2017). Rheological characterization of vinal gum, a galactomannan extracted from *Prosopis ruscifolia* seeds. *Food Hydrocolloids*, *74*, 333–341.

Cerqueira, M. A., Pinheiro, A. C., Souza, B. W. S., Lima, Á. M. P., Ribeiro, C., Miranda, C., ... & Vicente, A. a. (2009). Extraction,

Bibliografía

purification and characterization of galactomannans from non-traditional sources. *Carbohydrate Polymers*, 75, 408–414.

Cerqueira, M. A., Souza, B. W. S., Simões, J., Teixeira, J. a., Domingues, M. R. M., Coimbra, M. a., & Vicente, A. a. (2011). Structural and thermal characterization of galactomannans from non-conventional sources. *Carbohydrate Polymers*, 83(1), 179–185.

Chaires-Martínez, L., Salazar-Montoya, J. A., & Ramos-Ramírez, E. G. (2008). Physicochemical and functional characterization of the galactomannan obtained from mesquite seeds (*Prosopis pallida*). *European Food Research and Technology*, 227(6), 1669–1676.

Chaubey, M., & Kapoor, V. P. (2001). Structure of a galactomannan from the seeds of *Cassia angustifolia* Vahl. *Carbohydrate Research*, 332(4), 439–44.

Cheng, Y.; Brown, K. M. & Prud'homme, R. K. (2002). Preparation and characterization of molecular weight fractions of guar galactomannans using acid and enzymatic hydrolysis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 31, 29-35.

Chu, B. (2012). *Laser light scattering: basic principles and practice*. 2nd edition. San Diego: Academic Press, Inc.

Clark, A. H. & Ross-Murphy, S. B. (1987). Structural and mechanical properties of biopolymer gels. *Advances in Polymer Science*, 83, 57-192.

Couplan, J. N. (2014). *An Introduction to the Physical Chemistry of Food*. (D. R. Heldman, Ed.). New York: Springer.

Cruz, G. (1999). Production and characterization of *Prosopis* seed galactomannan. Thesis for the degree of Doctor of Technical Sciences. Swiss Federal Institute of Technical Sciences, Zurich. 113 p.

Cunha, P. L. R., Vieira, Í. G. P., Arriaga, Â. M. C., de Paula, R. C. M., & Feitosa, J. P. A. (2009). Isolation and characterization of galactomannan from *Dimorphandra gardneriana* Tul. seeds as a potential guar gum substitute. *Food Hydrocolloids*, 23, 880–885.

Daas, P. J., Schols, H. A., & de Jongh, H. H. (2000). On the galactosyl distribution of commercial galactomannans. *Carbohydrate Research*, 329, 609–19.

Bibliografía

Daas, P., Grolle, K., van Vliet, T., Schols, H., & De Jong, H. (2002). Toward the recognition of structure–function relationships in galactomannans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 4282–4289.

Dakia, P., Wathelet, B. & Paquot, M. (2010). Influence de la teneur en galactosesur les interactions moléculaires et sur les propriétés physico-chimiques desgalactomannanes en solution. *Biotechnology Agronomy Society Environment*, 14, 213–223.

Dakia, P. A., Blecker, C., Robert, C., Wathelet, B., & Paquot, M. (2008). Composition and physicochemical properties of locust bean gum extracted from whole seeds by acid or water dehulling pre-treatment. *Food Hydrocolloids*, 22, 807–818.

Davis, a L., Hoffmann, R. A., Russell, a L., & Debet, M. (1995). ¹H- and ¹³C-NMR characterization of the digalactosylmannopentose liberated from legume seed galactomannan by beta-mannanase action. *Carbohydrate Research*, 271, 43–54.

de Man, J. (1999). *Principles of Food Chemistry*. (D. Heldman, Ed.) Third edition. New York: Springer.

de Mendiburu, F. (2016). *Agricolae: Statistical procedures for agricultural research.R package version 1.2-4*. <https://CRAN.R-project.org/package=agricolae>.

De Oliveira Salvalaggio, M. (2010). Galactomananas de sementes de espécies brasileiras: caracterização físico-química e por espalhamento de luz (Tesis de Maestría) Universidad Federal de Paraná, Brasil.

Dea, I. C. M., Clark, A. H., & McCleary, B. V. (1986). Effect of molecular fine structure of galactomannans on their interaction properties. The role of unsubstituted sides. *Food Hydrocolloid*, 1, 129–140.

Dea, I. C. M.; McKinnon, A. A. & Rees, D. A. (1972). Associations of like and unlike polysaccharides: Mechanism and specificity in galactomannans, interacting bacterial polysaccharides, and related systems. *Journal of Molecular Biology*, 68, 153-172.

Dea, I.C.M. & Morrison, A. (1975). Chemistry and Interactions of Seed Galactomannans. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 31, 241-312.

Bibliografía

Debye, P. en McIntyre & Gomick (1964), F. Eds 1, *Light Scattering from Dilute Solutions*, Gordon and Breach, New York, pp 139-147.

Douiare, M., & Norton, I. T. (2013). Designer colloids in structured food for the future (short survey). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93,3147-3154.

Drohan, D., Tziboula, A., Mc Nulty, D., & Horne, D.S. (1997). Food Hydrocolloids, 11, 101-107.

Echevería, R. D. (2010). *Monitoreo de los Recursos Forestales - Inventario Forestal Nacional - Resumen de Resultados - Etapa I*. Montevideo: Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca.

Efentakis, M., & Kouttis, A. (2001). Release of furosemide from multiple unit and single unit preparations containing different viscosity grade of sodium alginate. *Pharmaceutical Development and Technology*, 6, 91.

Egorov, A. V, Mestechkina, N. M., & Shcherbukhin, V. D. (2003). Determination of the Primary and Fine Structures of a Galactomannan from the Seed of *Gleditsia triacanthos f. inermis L.* *Applied Biochemistry and Microbiology*, 39, 398–402.

Egorov, A. V., Mestechkina, N. M., & Shcherbukhin, V.D. (2004). Composition and structure of galactomannan from the seed of *Gleditsia ferox Desf.* *Applied Biochemistry and Microbiology*, 40, 314–318.

Estévez, A. M., Sáenz, C., Hurtado, M. L., Escobar, B., Espinoza, S., & Suárez, C. (2004). Extraction methods and some physical properties of mesquite (*Prosopis chilensis* (Mol) Stuntz) seed gum. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84, 1487-1492.

Farahnaky, A., Askari, H., & Bakhtiyari, M. (2010). Rheology of Balangu Shirazi (*Lallemantia royleana*) seed gum: a high viscosity thickening agent. En P. A. Williams y G.O. Phillips (Eds.), *Gums and Stabilisers for the Food Industry* 15 (pp. 190-200). Royal Society of Chemistry Publishing. Cambridge, United Kingdom.

Felker, P. (1981). Uses of tree legumes in semiarid regions. *Economic Botany*, 35, 174-186.

Fernandes de Souza, C. (2009). Galactomanana de sementes de *Caesalpinia ferrea* var. *ferrea*: estrutura, modificação química e

Bibliografía

caracterização de propriedades. Tesis de Maestría, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, Brasil.

Fernandes, P. B. (1995). Influence of galactomannan on the structure and thermal behavior of xanthan/galactomannan mixtures. *Journal of Food Engineering*, 24, 269-283.

Fernandes, P. B., Gonçalves, M. P & Doublier, J. L. (1991). A rheological characterization of Kappa-carrageenan/galactomannan mixed gels: a comparison of locust bean gum samples. *Carbohydrate Polymers*, 16, 253–274.

Ffolliott, P. F. & Thames, J. L. (1983). Recolección, manipuleo, almacenaje y pretratamiento de las semillas de *Prosopis* en América Latina. FAO. Roma, Italia.

Figueiredo, A. (1983). Extração, identificação e características do polissacarídeo da semente de algarobeira (*Prosopis juliflora* DC). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 3, 82-89.

Figueiro, S., Goes, J., Moreira, R., & Sombra, a. (2004). On the physicochemical and dielectric properties of glutaraldehyde crosslinked galactomannan–collagen films. *Carbohydrate Polymers*, 56, 313–320.

Flory, P. J. (1953). Principles of polymer chemistry. Ithaca: Cornell University Press.

Fox, J. E. (1997). Seed gums. En *Thickening and gelling agents for food* (pág. 262–283). Chapman & Hall, New York, Springer.

Frez, C., (2001). Composición química de la goma de semilla de algarrobo (*Prosopis chilensis* (Mol.) Stuntz) y proporción de galactomananos. Trabajo de grado, Facultad de Medicina. Universidad de Valparaíso. Valparaíso, Chile.

Frez, C., (2001). Composición química de la goma de semilla de algarrobo (*Prosopis chilensis* (Mol.) Stuntz) y proporción de galactomananos. Trabajo de grado, Facultad de Medicina. Universidad de Valparaíso. Valparaíso, Chile.

Galán, A. G., Corrêa, A. D., Abreu, P. De, Fatima, M. De, & Barcelos, P. (2008). Caracterización química de la harina del fruto de *Prosopis spp.* procedente de Bolivia y Brasil. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 58, 309–315.

Bibliografía

Galera, F. (2000). Los algarrobos: Las especies del género *Prosopis* (algarrobos) de América Latina con especial énfasis en aquellas de interés económico. Graziani Gráfica. Córdoba, Argentina. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/006/AD314S/AD314S00.HTM>

Ganter, J. L. (1991). Estudos dos carboidratos de sementes de *Mimosa scabrella*(bracatinga) - Análise estrutural dos oligossacarídeos e propriedades reológicas da galactomanana. Tesis Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, Brasil.

Garófalo, L., Vazquez, D., Ferreira, F., & Soule, S. (2011). Wheat flour non-starch polysaccharides and their effect on dough rheological properties. *Industrial Crops and Products*, 34, 1327-1331.

Garros-rosa, I., Reicher, F., Petkowicz, C. L. O., Sierakowski, M. R., & Moreira, R. A. (2006). Characterization of the Galactomannans from *Parkinsonia Aculeata* Seeds and their Application on Affinity Chromatography. *Polímeros*, 16, 99–103.

Goycoolea, F. M., Morris, E. R., & Gidley, M. J. (1995). Viscosity of galactomannans at alkaline and neutral pH: Evidence of “hyperentanglement” in solution. *Carbohydrate Polymers*, 27,69-71.

Grasdalen, H., & Painter, T. (1980). NMR studies of composition and sequence in legume-seed galactomannans. *Carbohydrate Research*, 81, 59–66.

Gutiérrez de Gotera, O., Añez de Servodio, O. & León de Pinto, G., El Kader, D., & Molina, E. (2007). Análisis fisicoquímico y estructural del polisacárido de la goma de semilla de *Leucaena leucocephala*. *Scientific Journal of the Experimental Faculty of Sciences*, 15, 481–487.

Harris, P. (1990). *Food gels*. En: E. Morris (Ed.), *Mixed polymer gels* (pp. 315). London: Elsevier Applied Science.

Icht, S. & Maayan, S. (2008). Detergent printed film. US Patent: 2008/0242572 A1, (0010, 0038, 0041, 37), February 2, 2008.

Iijima, M.; Hatakeyama, T. & Hatakeyama, H. (2012). Effect of side chain on thermal properties of galactomannan polysaccharides. *15th International Congress on Thermal Analysis and Calorimetry*.

Igoe, R. S., Gelling composition containing xanthan-carob gums, carboxymethylcellulose-for use in food compositions containing fruit juice and milk or cream. UK Patent 1 485 112, Merck & Co. Inc., 1977^a.

Bibliografía

Igoe, R. S., Palatable milk and fruit juice composition incorporating a thickener comprising xanthan gum, locust-bean gum and carboxymethyl-cellulose. US Patent 4046925, Merck & Co. Inc., 1977^b:

Ishurd, O., Kermagi, A., Zgheel, F., Flefla, M., Elmabruk, M., Yalin, W., Kennedy, J.F. & Yuanjiang, P. (2004). Structural aspects of water-soluble galactomannans isolated from the seeds of *Retama raetam*. *Carbohydrate Polymers*, 58, 41–44.

Izydorczyk, M., & Biliaderis, C. (1996). Gradient ammonium sulphate fractionation of galactomannans. *Food Hydrocolloids*, 10, 295–300.

Jansson, P. E., Kenne L., Liedgren H., Lindberg B., & Lonngren J. (1976). A practical guide to the methylation analysis of carbohydrates. *Chemical Communications / University of Stockholm*, 8, 38-72.

Jian, H., Cristhian, C., Zhang, W., & Jiang, J. (2011). Influence of dehulling pretreatment on physicochemical properties of *Gleditsia sinensis* Lam. gum. *Food Hydrocolloids*, 25, 1337–1343.

Joshi, H., & Kapoor, V. P. (2003). Cassia grandis Linn. f. seed galactomannan: structural and crystallographical studies. *Carbohydrate Research*, 338(18), 1907–1912.

Kawamura, Y. (2008). Compendium of food additive specifications. Part 2: Guar gum: Chemical and technical assessment. In *69th joint FAO/WHO expert committee on food additives (JEFCA)*. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).

Keating, B. A., Hill, C. A. S., Sun, D., English, R., Davies, P., & McCue, C. (2013). The water vapor sorption behavior of a galactomannan cellulose nanocomposite film analyzed using parallel exponential kinetics and the Kelvin-Voigt viscoelastic model. *Journal of Applied Polymer Science*, 129, 2352–2359.

Koocheki, A., Taherian, A. R., Razavi, S. M. A., & Bostan, A. (2009). Response surface methodology for optimization of extraction yield, viscosity, hue and emulsion stability of mucilage extracted from *Lepidium perfoliatum* seeds. *Food Hydrocolloids*, 23, 2369–2379.

Kumar, R., Patil, M. B., Patil, R. S., & Paschapur, M. S. (2009). Evaluation of *Abelmoschus esculentus* mucilage as suspending agent in paracetamol suspension. *International Journal Pharmaceutical Technology and Research*, 1, 658–665.

Bibliografía

- Laun, H. M. (1978) Description of the non-linear shear behaviour of a low-density polyethylene melt by means of an experimentally determined strain dependent memory function. *Rheology Acta*, 17, 1-15.
- Launay, B., Doublier, I. L. & Cuvelier, G. 1986. Flow properties of aqueous solutions and dispersions of polysaccharides, en *Functional Properties of Food Macromolecules*, eds. J. R. Mitchell and D. A. Ledward, Capítulo 1, págs. 1-78, Elsevier Applied Science Publishers, London.
- Lazaridou, A., Biliaderis, C., & Izydorczyk, M. (2000). Structural characteristics and rheological properties of locust bean galactomannans: A comparison of samples from different carob tree populations. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81, 68–75.
- Lombardi, S. C. & Ramalho-Mercê, A. L. (2003) Properties of complexes of galactomannan of *Leucaena leucocephala* and Al³⁺, Cu²⁺ and Pb²⁺. *Bioresource Technology*, 89, 63-73.
- Lopes da Silva, J. A. L., Goncalves, M. P. & Rao, M. A. (1992). Rheological properties of high-methoxyl pectin and locust bean gum solutions in steady shear. *Journal of Food Science*, 57, 443-448.
- López Hernández, J.; Adris, J.; Fernández de Rank, E. & Monserrat, S. (1985). Obtención de mucílago a partir de algarrobo (*Prosopis alba*). *La Alimentación Latinoamericana*, 155, 62 - 64.
- López-Franco, Y.L., Cervantes-Montaño, C.I., Martínez-Robinson, K.G., Lizardi, Mendoza & Robles-Ozuna, L.E. (2013). Physicochemical characterization and functional properties of galactomannans from mesquite seeds (*Prosopis* spp.). *Food Hydrocolloids*, 30, 656-660.
- Macosko, C. (1996). *Rheology: Principles, Measurements and Applications*. *Powder Technology* (Vol. 86). New York: Wiley-VCH, Inc.
- Malgas, S., van Dyk, S. J., & Pletschke, B. I. (2015). β -Mannanase (Man26A) and α -galactosidase (Aga27A) synergism - A key factor for the hydrolysis of galactomannan substrates. *Enzyme and Microbial Technology*, 70, 1–8.
- Manzi, A., Ceredo, A., & Shoolery, J. (1986). High resolution ¹³C-N.M.R. spectroscopy of legume seed galactomannans. *Carbohydrate Research*, 148, 189–197.

Bibliografía

Mao C. F. & Chen J. C. (2006). Interchain association of locust bean gum in sucrose solutions: an interpretation based on thixotropic behavior. *Food Hydrocolloids*, 20, 730- 739.

Mathur, V., & Mathur, N. K. (2005). Fenugreek and other lesser known legume galactomannan-polysaccharides: Scope for developments. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 64,475–481.

McCleary, B. (1979). Enzymic hydrolysis fine structure, and gelling interaction of legume seed d-galacto-d-mannans. *Carbohydrate Research*, 71, 205–230.

McCleary, B., Clark, A., Dea, I., & Rees, D. (1985). The fine structures of carob and guar galactomannans. *Carbohydrate Research*, 139, 237–260.

McCleary, B.V.; Amado, R.; Warbel, R. & Neukom, H. (1981). Effect of galactose content on the solution and interaction properties of guar and carob galactomannans. *Carbohydrate Research*, 92, 269-285.

Meyer, D. (1984). *Processing, utilization and economics of Mesquite pods as a raw material for the food industry* (doctoral thesis). Zurich Swiss Federal Institute of Technology.

Mikkonen, K. S., Rita, H., Helén, H., Talja, R. A., Hyvönen, L., & Tenkanen, M. (2007). Effect of polysaccharide structure on mechanical and thermal properties of galactomannan-based films. *Biomacromolecules*, 8, 3198–3205.

Monteiro, S. R., Rebelo, S., da Cruz e Silva, O. A. B., & Lopes-da-Silva, J. (2013). The influence of galactomannans with different amount of galactose side chains on the gelation of soy proteins at neutral pH. *Food Hydrocolloids*, 33, 349–360.

Morelle, W., & Michalski, J.-C. (2007). Analysis of protein glycosylation by mass spectrometry. *Nature Protocols*, 2, 1585-1602.

Morris, E. R. (1990). *Mixed polymer gels*. In P. Harris (Ed.), *Food gels* (pp. 291–359). London: Elsevier.

Muschin, T., & Yoshida, T. (2012). Structural analysis of galactomannans by NMR spectroscopy. *Carbohydrate Polymers*, 87, 1893-1898.

Navarro, D. A, Cerezo, A. S., & Stortz, C. a. (2002). NMR spectroscopy and chemical studies of an arabinan-rich system from the

Bibliografía

endosperm of the seed of *Gleditsia triacanthos*. *Carbohydrate Research*, 337(3), 255–63.

Nwokocha, L. M., & Williams, P. A. (2009). Isolation and rheological characterization of *Mucuna flagellipes* seed gum. *Food Hydrocolloids*, 23, 1394–1397.

Nwokocha, L. M., & Williams, P. A. (2014). Solution properties of *Brachystegia eur-ycoma* seed polysaccharide. In P. A. Williams, & G. O. Phillips (Eds.), *Gums and Stabilizers for the Food Industry 17: The Changing Face of Food Manufacture: The Role of Hydrocolloids* (pp. 123-138). Cambridge, United Kingdom: Royal Society of Chemistry.

Nwokocha, L. M., & Williams, P. A. (2016). Solution characteristics and thermorheology of *Prosopis africana* seed polysaccharide. *Food Hydrocolloids*, 56, 201–206.

Nwokocha, L. M., Williams, P. A., & Yadav, M. P. (2017). Physicochemical characterisation of the galactomannan from *Delonix regia* seed. *Food Hydrocolloids*. [In Press, Corrected Proof](#). DOI: 10.1016/j.foodhyd.2017.02.016.

Oleynikov, D. N., & Rohin, A. V. (2010). Galactomannan from the seeds of chinese honey locust (*Gleditsia sinensis* Lam.). *Applied Biochemistry and Microbiology*, 46, 103–107.

Painter, T., Gonzalez, J., & Hemmer, P. (1979). The distribution of d-galactosyl groups in guaran and locust bean gum: New evidence from periodate oxidation. *Carbohydrate Research*, 69, 217–226.

Panegassi, V.; Serra, G. & Buckeridge, M. (2000). Potencial tecnológico do galactomanano de sementes de faveiro (*Dimorphandra mollis*) para uso na indústria de alimentos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 20,115-124.

Pasiecznik, N. M., Harris, P. J. C., & Smith, S. J. (2004). *Identifying Tropical Prosopis Species. A Field Guide*. Coventry: Hydra Publishing.

Perissutti, G. E., Bresolin, T. M. B., & Ganter, J. L. M. S. (2002). Interaction between the galactomannan from *Mimosa scabrella* and milk proteins. *Food Hydrocolloids*, 16, 403–417.

Petkowicz, C. L. O., Reicher, F., & Mazeau, K. (1998). Conformational analysis of galactomannans: from oligomeric segments to polymeric chains. *Carbohydrate Polymers*, 37, 25–39.

Bibliografía

Petkowicz, C. L. O., Reicher, F., & Mazeau, K. (1998). Conformational analysis of galactomannans: from oligomeric segments to polymeric chains. *Carbohydrate Polymers*, 37, 25-39.

Petkowicz, C. L. O., Schaefer, S., & Reicher, F. (2007). The mannan from *Schizolobium parahybae* endosperm is not a reserve polysaccharide. *Carbohydrate Polymers*, 69, 659–664.

Phillips, G., & Williams, P. A. (2009). *Handbook of hydrocolloids* (2nd edition). Woodhead Publishing Limited. Cambridge, UK.

Picout, D. R., & Ross-Murphy, S. B. (2007). On the Mark-Houwink parameters for galactomannans. *Carbohydrate Polymers*, 70, 145-148.

Picout, D. R., Ross-Murphy, S. B., Errington, N., & Harding, S. E. (2001). Pressure cell assisted solution characterisation of polysaccharides I: Guar gum. *Biomacromolecules*, 2, 1301-1309.

Picout, D. R., Ross-Murphy, S. B., Jumel, K., & Harding, S. E. (2002). Pressure cell assisted solution characterization of polysaccharides. 2. Locust bean gum and tara gum. *Biomacromolecules*, 3, 761–767.

Pinheiro, A. C., Bourbon, A. I., Rocha, C., Ribeiro, C, Maia, J. M, Gonçalves, M. P., Teixeira, J. A. & Vicente, A. A. (2011). Rheological characterization of K-carrageenan/galactomannan and xanthan/galactomannan gels: Comparison of galactomannans from non-traditional sources with conventional galactomannans. *Carbohydrate Polymers*, 83, 392-399.

Pinto-Vieira, I. G.; Pereira-Méndez, F. N.; Gallão, M. I. & Sousa de Brito, E. (2007) NMR study of galactomannans from the seeds of mesquite tree (*Prosopis juliflora* (Sw) DC). *Food Chemistry*, 101, 70-73.

Pitkänen, L., Aseyev, V., Laine, C., Tuomainen, P., & Tenkanen, M. (2017). Size-exclusion chromatography of xylan derivatives—the critical evaluation of macromolecular data. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 1–7. Accepted for publication. DOI 10.1007/s00216-017-0424-5.

Podzimek, S. (2011). *Light scattering, size exclusion chromatography, and asymmetric flow field flow fractionation: Powerful tools for the characterization of polymers, proteins, and nanoparticles*. Danvers: Wiley & Sons.

Podzimek, S., Vlcek, T. & Johann, C. (2001). Characterization of branched polymers by size exclusion chromatography coupled with

Bibliografía

multiangle light scattering detector. I. Size exclusion chromatography elution behavior of branched polymers. *Journal of Applied Polymer Science*, 81, 1588.

Pollard, M. A., & Fischer, P. (2006). Partial aqueous solubility of low-galactose-content galactomannans-What is the quantitative basis? *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 11, 184–190.

Pollard, M. A., Eder, B., Fischer, P., & Windhab, E. J. (2010). Characterization of galactomannan isolated from legume endosperms of *Caesalpinioideae* and *Faboideae* subfamilies by multidetection aqueous SEC. *Carbohydrate Polymers*, 79, 70-84.

Pollard, M. A., Kelly, R., Fischer, P. A., Windhab, E. J., Eder, B., & Amadó, R. (2008). Investigation of molecular weight distribution of LBG galactomannan for flours prepared from individual seeds, mixtures, and commercial samples. *Food Hydrocolloids*, 22, 1596–1606.

Prajapati, V. D., Jani, G. K., Moradiya, N. G., & Randeria, N. P. (2013). Pharmaceutical applications of various natural gums, mucilages and their modified forms. *Carbohydrate Polymers*, 92, 1685–1699.

Rao, M. A. (2007). Food Engineering Series. *Rheology of Fluid and Semisolid Foods - Principles and Applications*. (G. V. Barbosa-Cánovas, Ed.) (Second). New York: Springer.

Razavi, S.M.A. & Karazhiyan, H. (2009). Flow properties and thixotropy of selected hydrocolloids: experimental and modelling studies. *Food Hydrocolloids*, 23, 908-912.

Reed, W. F. (1995). Data evaluation for unified multi-detector size exclusion chromatography – molar mass, viscosity, and radius of gyration distributions. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 196, 1539 – 1575.

Rees (1972), D. A.; Shapely polysaccharides. The eight Colworth Medal Lecture. *Biochemical. Journal*, 126, 257-273.

Ren, Y., Ellis, P. R., Sutherland, I. W., & Ross-Murphy, S. B. (2003). Dilute and semi- dilute solution properties of an exopolysaccharide from *Escherichia coli* strain S61. *Carbohydrate Polymers*, 52,189-195.

Rincón, F., Muñoz, J., Ramírez, P., Galán, H., & Alfaro, M. C. (2014). Physicochemical and rheological characterization of *Prosopis juliflora* seed gum aqueous dispersions. *Food Hydrocolloids*, 35, 348–357.

Bibliografía

- Robinson, G. E. Y., Ross-murphy, S. B., & R-morris, E. (1982). Viscosity molecular weight relationships, intrinsic chain flexibility and dynamic solution properties of Guar. *Carbohydrate Research*, 107, 17–32.
- Rocycki, S. D. (2007). Evaluación de las características reométricas de hidrocoloides obtenidos de semillas de *Prosopis* sp (algarrobos). Tesis de Maestría, Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.
- Rodríguez Patino, J. M., & Pilosof, A. M. R. (2011). Protein-polysaccharide interactions at fluid interfaces. *Food Hydrocolloids*, 25, 1925–1937.
- Rojas, O. (1999). *Cuaderno FIRP, S520B*. Introducción a la Reología. *Universidad de Los Andes*, 2, 24.
- Salehi, F. & Kashaninejad, M. (2014). Effect of Different Drying Methods on Rheological and Textural Properties of Balangu Seed Gum. *Drying Technology*, 32, 720–727.
- Salvalaggio, M. D. O., Freitas, R. A. De, Franquetto, E. M., Koop, H. S., & Silveira, J. L. M. (2014). Influence of the extraction time on macromolecular parameters of galactomannans. *Carbohydrate Polymers*, 116, 200–206.
- Saura-Calixto, F., Bravo-Clemente, L., Goñi-Cambrodón, I., & Martín-Carrón, N. (1999). Fibra dietética conteniendo galactomananos. En Oficina Española de Patentes y Marcas. Número de publicación: 2 136 038. España.
- Schorsch, C., Gamier, C. & Doublier, J. (1997). Viscoelastic properties of xanthan/ galactomannan mixtures: Comparison of guar gum with locust bean gum. *Carbohydrate polymers*, 34, 165-175.
- Schuppner, H. R. Jr, Heat reversible gel and method. Australian Patent 401434 (1967).
- Sébastien, G., Christophe, B., Mario, A., Pascal, L., Michel, P., & Aurore, R. (2014). Impact of purification and fractionation process on the chemical structure and physical properties of locust bean gum. *Carbohydrate Polymers*, 108, 159–68.
- Secouard, S.; Grisel, M. & Malhiac, C. (2007). Flavour release study as a way to explain xanthan–galactomannan interactions. *Food Hydrocolloids*, 21, 1237-1244.

Bibliografía

Sermour, F. R., & Knapp, R. D. (1980). Structural analysis of α -D-glucans by ^{13}C -nuclear magnetic resonance, spin-lattice relaxation studies. *Carbohydrate Research*, 81, 67–103.

Sierakowski, M. R.; Milas, M.; Desbrières, J. & Rinaudo, M.; (2000). Specific modifications of galactomannans. *Carbohydrate Polymers*. 42, 51-57.

Sittikijyothin, W., Torres, D. & Gonçalves, M. P. (2005). Modelling the rheological behaviour of galactomannan aqueous solutions. *Carbohydrate Polymers*. 59, 339–350.

Strelitzki, R., & Reed, W. F. (1999). Automated batch characterization of polymer solutions by static light scattering and viscometry. *Journal of Applied Polymer Science*, 73, 2359–2368.

Suárez, C. (2003). Utilización de dos métodos en la extracción húmeda de mucílago de algarrobo (*Prosopis chilensis* (Mol.) Stuntz). Memoria Ingeniero Agrónomo. Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. Santiago, Chile.

Sworn G (2004) Hydrocolloid thickeners and their applications. In: Philips GO, Williams PA (eds) *Gums and Stabilizers for the Food Industry*, vol 12. RSC Publishing, Oxford, pp 13–22.

Tayal, A., Pai, V. B., Khan, S. A., & Carolina, N. (1999). Rheology and Microstructural Changes during Enzymatic Degradation of a Guar - Borax Hydrogel. *Macromolecules*, 17, 5567–5574.

Tolstoguzov, v.B. (1986) En J.R. Mitchell & D.A. Edward (Eds.), *Functional properties of food macromolecules* (pp. 385-415). London: Elsevier.

Tolstoguzov, .B. (1991) Functional properties of food proteins and role of protein- polysaccharide interaction. *Food Hydrocolloids*, 4, 429-468.

Valdés Martínez, S. E. (2006). Hidratos de carbono, en *Química de los alimentos*. Director Badui Dergal, S. Pearson Educación, México.

Varki, A. R. D. Cummings, Aebi, M., Packer, N., Seeberger, P., (2015) Symbol Nomenclature for Graphical Representations of Glycans. *Glycobiology*, 25, 1323-1324.

Vázquez, M.; Valenzuela, E. & Canales, H. (1984). A method to obtain mucilage from algarrobo seeds. FAO. The current state of knowledge on *Prosopis tamarugo*. *Papers presented at the*

Bibliografía

International Round Table on Prosopis tamarugo Phil. (Arica, Chile, June: 11 - 15). Disponible en <http://www.fao.org/docrep/006/ad316e/AD316E17.htm#ch4.1>

Vieira, Í. G. P., Mendes, F. N. P., Gallão, M. I., & de Brito, E. S. (2007). NMR study of galactomannans from the seeds of mesquite tree (*Prosopis juliflora* (Sw) DC). *Food Chemistry*, 101, 70–73.

Vilaró, P., Bennadji, Z., Budelli, E., Moyna, G., Panizzolo, L., & Ferreira, F. (2018). Isolation and characterization of galactomannans from *Prosopis affinis* as potential gum substitutes. *Food Hydrocolloids*, 77, 711–719.

Vilela, A. E. & Ravetta, D. A (2005). Gum exudation in South-America species of *Prosopis L.*(Mimosaceae). *Journal of Arid Environments*, 60, 389-395.

Vries, J (2004), Hydrocolloid gelling agents and their applications, *Gums and Stabilisers for the Food Industry*, 12, 23-31.

Wang, Q., Ellis, P. R., Ross-Murphy, S. B., & Burchard, W. (1997). Solution characteristics of the xyloglucan from *Detarium senegalense Gmelin*. *Carbohydrate Polymers*, 33,115-124.

Wielinga, W. C. (2009). Galactomannans. In G. O. Phillips, & P. A. Williams (Eds.), *Handbook of hydrocolloids* (2nd ed.). (pp. 228-251) Cambridge: Woodhead Publishing.

Wientjes, R. H. W., Duits, M. H. G., Jongschaap, R. J. J., & Mellema, J. (2000). Linear rheology of guar gum solutions. *Macromolecules*, 33, 9594–9605.

Wu, Y., Li, W., Cui, W., Eskin, N. a. M., & Goff, H. D. (2012). A molecular modeling approach to understand conformation–functionality relationships of galactomannans with different mannose/galactose ratios. *Food Hydrocolloids*, 26, 359–364.

Wyatt, P. J. (1993). Light scattering and the absolute characterization of macromolecules, *Analytica Chimica Acta*, 272, 1-40.

Yaich, H., Garna, H., Besbes, S., Barthélemy, J.-P., Paquot, M., Blecker, C., & Attia, H. (2014). Impact of extraction procedures on the chemical, rheological and textural properties of ulvan from *Ulva lactuca* of Tunisia coast. *Food Hydrocolloids*, 40, 53–63.

Bibliografía

Yasuda, K.; Armstrong, R. C. & Cohen, R. E. (1981). Shear flow properties of concentrated solutions of linear and star branched polystyrenes. *Rheology Acta*, 20, 163-178.

Yoo, B., Rao, M. A. & Steffe, F. (1995). Yield stress of food suspensions with the vane method at controlled shear rate and shear stress. *Journal of Texture Studies*, 26, 1-10.

Youssef, M. K., Wang, Q., Cui, S. W., & Barbut, S. (2009). Purification and partial physicochemical characteristics of protein free fenugreek gums. *Food Hydrocolloids*, 23, 2049–2053.

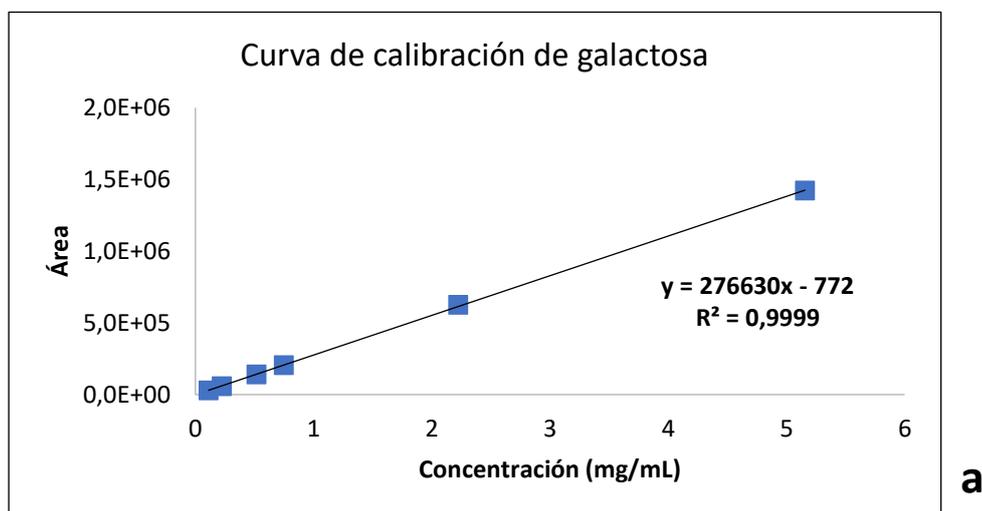
Zimm, B. H. (1948). Development of Zimm's methods for analysis of angular dependence. *Journal of Chemical Physics*, 16, 1093–1099.

7. ANEXO

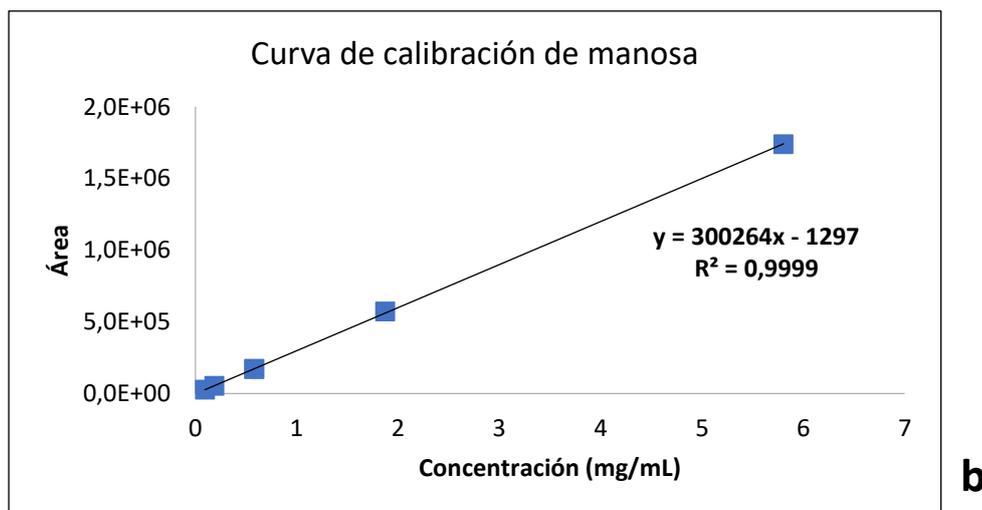
7.1. Calibraciones utilizadas

7.1.1. Determinación de galactosa y manosa

Para la determinación por HPLC, el tiempo de retención para la galactosa fue $19,12 \pm 0,01$ y para la manosa $20,97 \pm 0,01$ minutos. Utilizando las áreas de estos picos en el rango de 0,2 a 5,0 mg/ml se construyeron curvas de calibración, que se muestran a continuación.



a



b

Figura 7-1: Curvas de calibración de concentración de galactosa (a) y manosa (b) respectivamente

Anexo

7.1.2. Determinación del contenido de proteínas

La regresión lineal utilizada para la cuantificación de proteína se muestra a continuación.

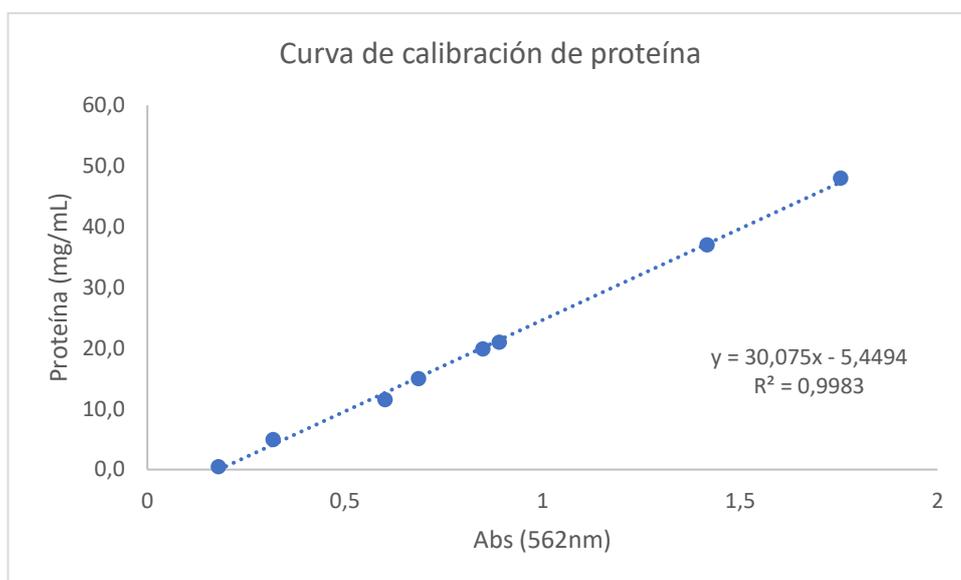


Figura 7-2: Curva de calibración de proteína por el método BCA.

7.2. Análisis estadístico

7.2.1. Análisis de varianza para la comparación de los rendimientos de extracción (Y_1)

El modelo que se utilizó fue la comparación a un factor:

$$\text{Rendimiento} = \text{Rendimiento} + \text{Muestra}$$

Anexo

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1870,77	5	374,15	60,45	<0,0001
Muestra	1870,77	5	374,15	60,45	<0,0001
Error	37,13	6	6,19		
Total	1907,91	11			
Test:Tukey	Alfa=0,05	DMS=9,90108			
Error:	6,1892	gl:	6		

	Muestra	Medias	n	E.E.		
	P. affinis 80	16,05	2	1,76	A	
	Guar gum 80	37,75	2	1,76	B	
	Locust bean gum RT	44,7	2	1,76	B	C
	P. affinis RT	46,1	2	1,76	B	C D
	Locust bean gum 80	48,2	2	1,76	C	D
	Guar gum RT	55,55	2	1,76	D	

Tabla 7-1: Análisis de Varianza y post-test de Tukey al 0,05% para el rendimiento de extracción.

7.2.2. Análisis de varianza para la composición de extractos:

Para realizar la comparación de los extractos se utilizaron los siguientes modelos que incluyen la muestra original (*P. affinis*, GG o LBG), y la purificación utilizada para cada muestra. Los resultados se presentan como el modelo con interacción (sample*purification step), según el paquete Agricolae (Mendiburu, 2016). Cuando el resultado de varianza arrojó diferencias ($p < 0,05$) se utilizó un Post-test de Tukey al 5% de incertidumbre para diferenciar las medias.

A) Para el contenido total de azúcares el modelo utilizado fue:

$$Total\ sugar\ content = \mu_{sugar\ content} + Sample + Purification\ Step + Sample * Purification\ step$$

```
> anovasugar<-aov(Sugar~Fuente+Purificación+Fuente*Purificación)
> summary(ANOVAsugar)
```

Anexo

	GL	Sum Sq	Mean Sq	F	p-valor	Pr(>F)
Fuente	2	34.1	17.05	5.964	0.0124	*
Purificación	4	565.5	141.37	49.447	1.83e-08	***
Fuente:Purificación	8	519.6	64.95	22.717	4.74e-07	***
Residuos	15	42.9	2.86			

Referencia de significancia: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 '' 1

Tabla 7-2: Análisis de varianza para el contenido de azúcares totales (grados de libertad; suma de cuadrados, mínimos cuadrados, valor de Fisher y p-valor)

El análisis de residuos confirma homocedasticidad y buen ajuste del modelo gaussiano, como se muestra a continuación en la Fig. 7.1.

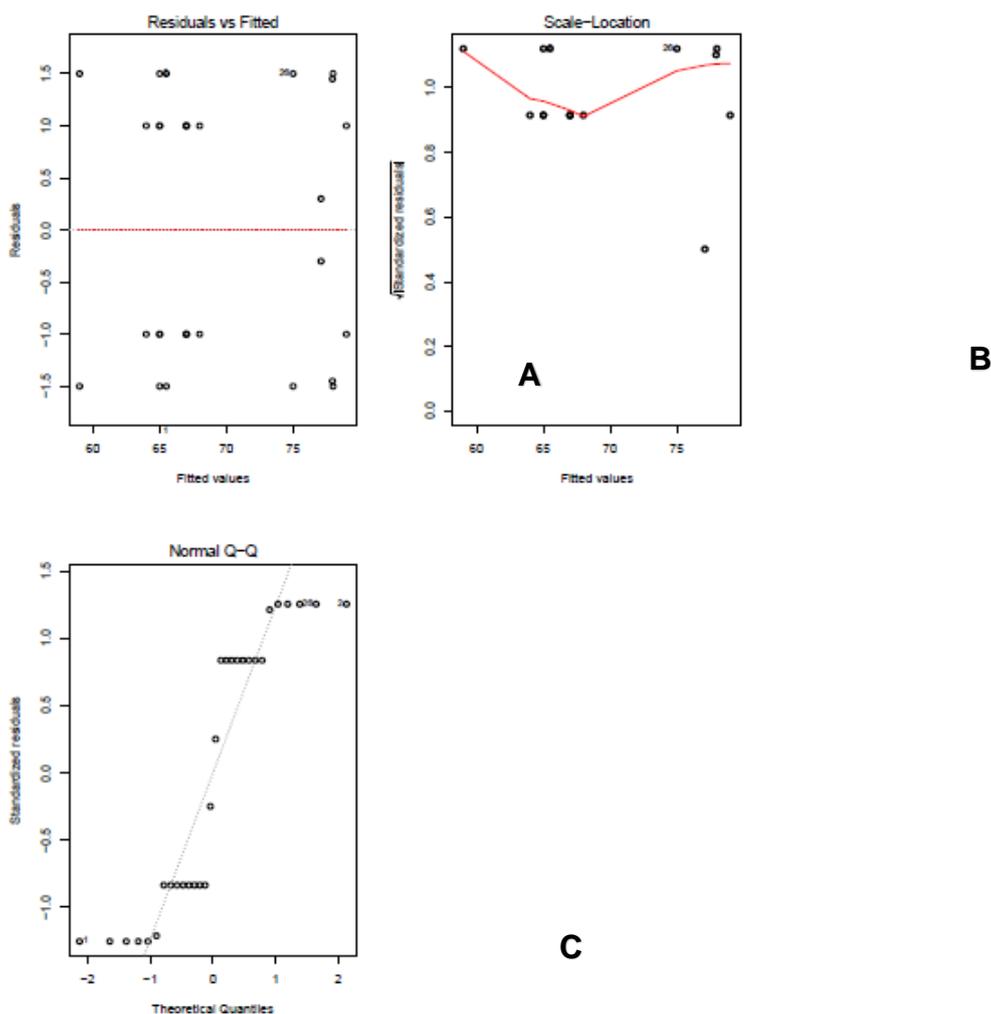


Figura 7-3: Gráficos de residuos para el ANOVA de azúcares totales.

Anexo

A) residuos vs predichos, B): residuos studentizados y C) Q-Q plot (ajuste al modelo Gaussiano)

Anexo

B) Para el contenido total de proteínas el modelo utilizado fue:

$$Total\ protein\ content = \mu_{protein\ content} + Fuente + Purificación + Fuente * Purificación$$

```
> anovaprotein<-aov(Protein~Fuente+Purificación+Fuente*Purificación)
> summary(anovaprotein)
```

	GL	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Fuente	2	0.725	0.362	7.983	0.00486 **
Purificación	4	22.639	5.660	124.690	8.83e-11 ***
Fuente: Purificación	7	4.088	0.584	12.867	3.95e-05 ***
Residuos	14	0.635	0.045		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1					

Tabla 7-3: Cuadro de Varianza para el contenido de proteínas.
(grados de libertad; suma de cuadrados, mínimos cuadrados, valor de Fisher y p-valor)

Anexo

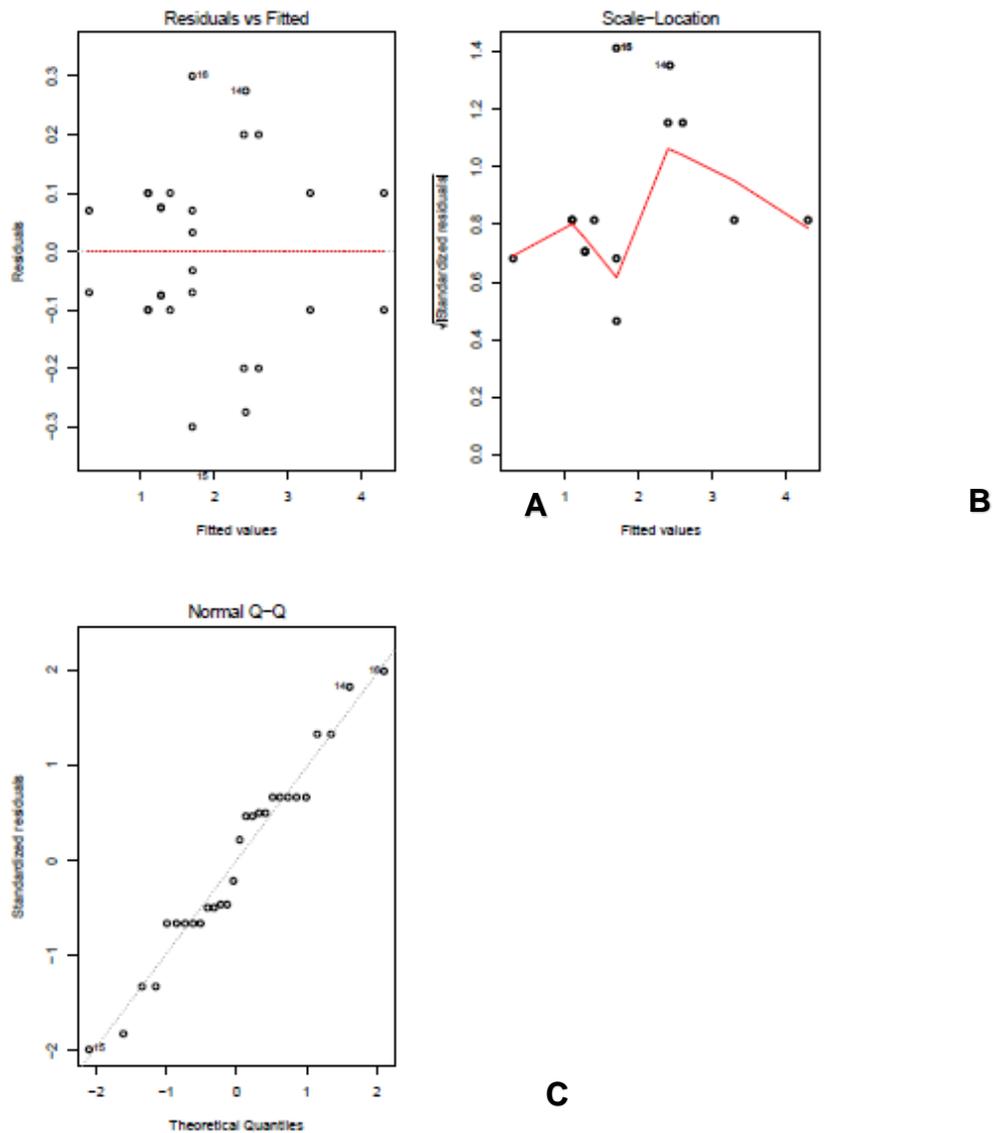


Figura 7-4: Análisis de residuos para el ANOVA del contenido de proteínas

C) Para la relación galactosa – manosa el modelo utilizado fue:

$$\frac{\text{Galactose}}{\text{Manose}} = \mu_{\text{gal-man ratio}} + \text{Fuente} + \text{Purificación} + \text{Fuente} * \text{Purificación}$$

```
> anovagalman<-aov(galman~Fuente+Purificación+Fuente*Purificación)
> summary(anovagalman)
```

Sin embargo, en este caso no se encontró significativo el efecto de la purificación ni su interacción (ver tabla 7.3 -A). Es por esto que se simplificó

Anexo

el modelo utilizando solamente el efecto muestra que involucra la fuente (GG, LBG o P. affinis y la purificación). (tabla 7.3-B).

$$\frac{\text{Galactose}}{\text{Manose}} = \mu_{\text{gal-man ratio}} + \text{Muestra}$$

```
> anovagalman<-aov(galman~Muestra)
> summary(anovagalman2)
```

	GL	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
Muestra	2	0.6327	0.3163	8.869	0.00224 **	
Purificación	4	0.3147	0.0787	2.206	0.1176	
Fuente: Purificación	8	0.2573	0.0322	0.902	0.5393	
Residuos	15	0.5350	0.0357			

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1						A
	GL	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
Muestra	2	0.6327	0.3163	7.715	0.00224 **	
Residuos	27	1.1070	0.0410			

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1						B

Tabla 7-4: Cuadro de Varianza para la relación galactosa - manosa (modelo a dos factores con interacción (A); modelo a un factor(B))

Se presentan los análisis de residuos para verificación de supuestos: heterosticidad y normalidad en el modelo seleccionado.

Anexo

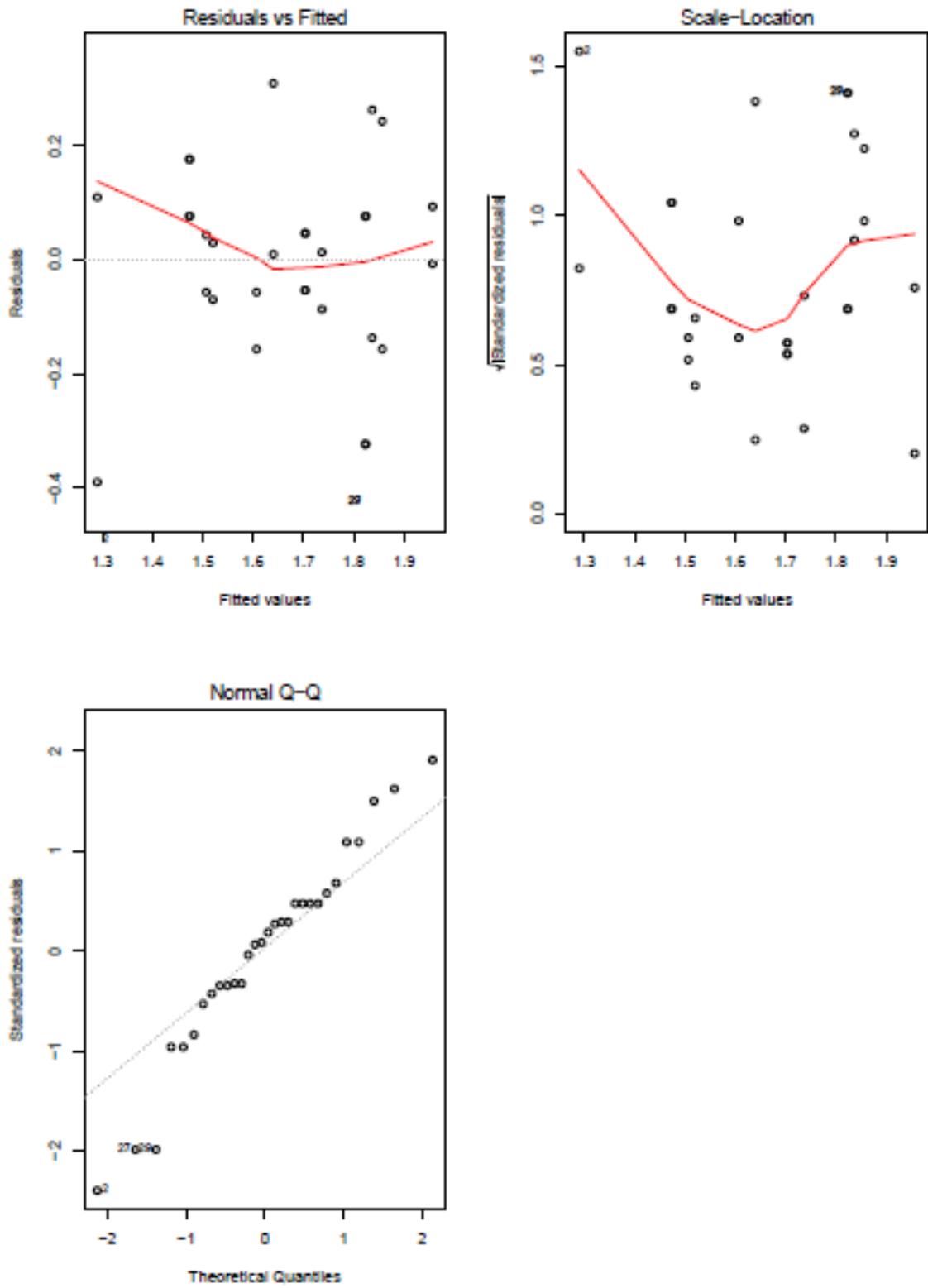


Figura 7-5: Análisis de residuos para el ANOVA de la relación manosa:galactosa en el modelo a un factor

Anexo

7.2.3. Análisis estadístico de los resultados de parámetros moleculares (R_g)

El modelo para el análisis de varianza elegido fue a un factor:

$$R_g = R_g + Muestra$$

```
> anovagalman<-aov(galman~Muestra)
> summary(anovagalman2)
```

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Radio de giro (nm) (Zimm)	12	0,98	0,97	2,4

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1745,94	5	349,19	69,81	<0,0001
Muestra	1745,94	5	349,19	69,81	<0,0001
Error	30,01	6	5		
Total	1775,95	11			

Tabla 7-5: Análisis de varianza para el radio de giro (Zimm)

El análisis de varianza mostró diferencias entre las muestras. El post-test de Tukey se muestra a continuación:

```
> TukeyHSD(pruebaanova, "Samples:Purification" ,ordered = TRUE)
```

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=8,90088		Error: 5,0019 gl: 6	
Muestra	Medias	n	E.E.
GMP2/80	79	2	1,58 A
GG 2/80	79,9	2	1,58 A
GMP2/RT	92	2	1,58 B
LBG 2/80	95,98	2	1,58 B
GG 2/RT	97	2	1,58 B
LBG 2/RT	114,9	2	1,58 C

Tabla 7-6: Test de Tukey para el R_g (Zimm)

Anexo

7.2.4. Estimación de viscosidad intrínseca

En la figura 4-11 se presenta la estimación de la prueba de Fedor. A continuación, se presenta el análisis de la regresión, intervalos de confianza y prueba de ANOVA para el ajuste del modelo lineal, así como los parámetros obtenidos (tabla 7.7).

Análisis de regresión lineal (A)						
Muestra	Variable	N	R ²	R ² Aj	AIC	BIC
GG2/RT		5	0,9993	0,9990	-15,4	-16,6
GMP2/RT	1/(2*(nr ^{0.5} -1))	5	0,9993	0,9991	-11,8	-12,9
GMP2/80		6	0,9996	0,9994	-13,4	-15,3

Coeficientes de regresión y estadísticos asociados (B)						
Muestra		Est.	E.E.	LI (95%)	LS (95%)	p-valor
GG2/RT	const	-0,31	0,04	-0,42	-0,20	0,0031
	pendiente	0,079	0,001	0,075	0,083	<0,0001
GMP2/RT	const	-0,36	0,05	-0,51	-0,21	0,0047
	pendiente	0,101	0,002	0,096	0,106	<0,0001
GMP2/80	const	-0,28	0,03	-0,43	-0,13	0,0148
	pendiente	0,115	0,001	0,108	0,122	0,0002

Cuadro de Análisis de varianza (C)						
	F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
GG2/RT	Modelo.	5,446	1	5,446	4066	<0,0001
	1/concentración	5,446	1	5,446	4066	<0,0001
	Error	0,004	3	0,001		
	Total	5,450	4			
GMP2/RT	Modelo.	11,971	1	11,971	4287	<0,0001
	1/concentración	11,971	1	11,971	4287	<0,0001
	Error	0,008	3	0,003		
	Total	11,980	4			
GMP2/80	Modelo.	4,27	1	4,27	4690	0,0002
	1/concentración	4,27	1	4,27	4690	0,0002
	Error	0,0018	2	0,0009		
	Total	4,2716	3			

Tabla 7-7: Análisis de regresión del modelo de Fedor : ajuste del modelo (A), coeficientes de regresión e intervalos de confianza (B) y análisis de varianza (C)

Anexo

Del análisis de regresión lineal, se revisó la proporción de variación de la $1/(2*(nr^{0.5}-1))$ explicada y se muestra también los criterios AIC y BIC (Akaike y Bayesiano) que penaliza por número de estimadores. Luego se calcularon los coeficientes con sus errores estándares de estimación, y los intervalos de confianza para estos parámetros (B) así como el valor de T para probar que los parámetros valen 0. Como todos los parámetros dan dentro de la incertidumbre, se aceptan. En el análisis de varianza (C) se testea la ausencia de regresión como hipótesis, que es rechazada en todos los casos ($p < 0,05$).

Una vez estimada la regresión para el modelo linealizado, se obtienen los parámetros de la ecuación, siendo la viscosidad intrínseca la inversa de la pendiente de este gráfico, y se calcula el valor límite de concentración C_m a partir de la constante que es igual a $(1/\eta \cdot c_m)$.

Los valores de viscosidad utilizados para construir el modelo de Fedor se obtuvieron de las curvas de flujo ascendentes, utilizando un modelo newtoniano. Los coeficientes de las regresiones utilizadas para GMP1/RT se muestran a continuación, a modo de ejemplo.

Concentración (g/dL)	Pendiente	R ²
0,10	0,0028	0,9998
0,07	0,002	1,0000
0,06	0,0017	0,9999
0,05	0,0016	1,0000
0,03	0,0013	0,9999
0,02	0,0011	0,9990

Tabla 7-8: Regresión viscosidades en régimen diluido para GMP_{1/RT}

Anexo

7.2.5. Curvas de flujo utilizadas para el cálculo de viscosidad intrínseca

Algunas curvas de flujo utilizadas en el cálculo de viscosidad intrínseca se presentan a continuación.

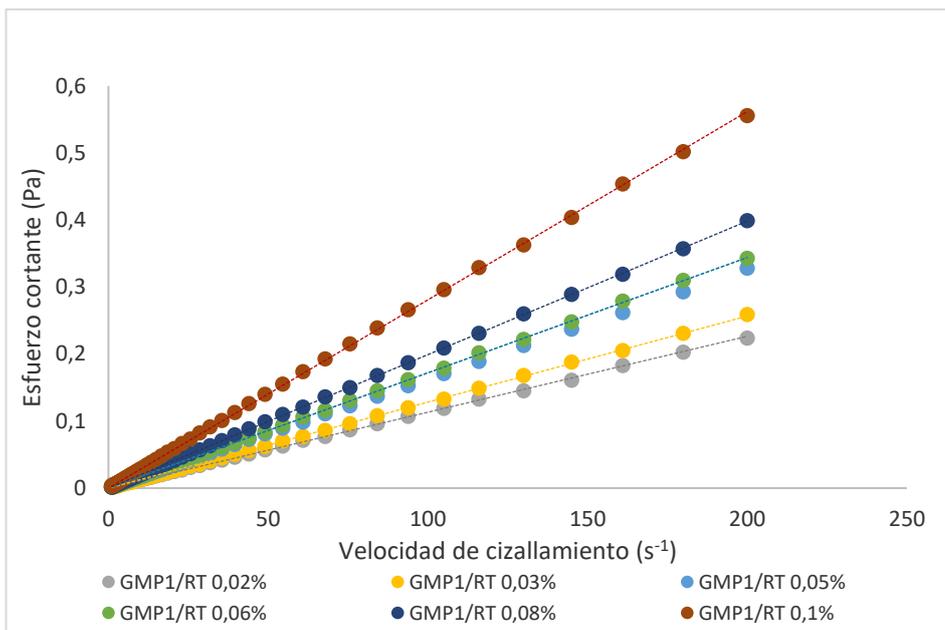


Figura 7-6: Curvas de flujo $GMP_{1/RT} < 0,1\%$

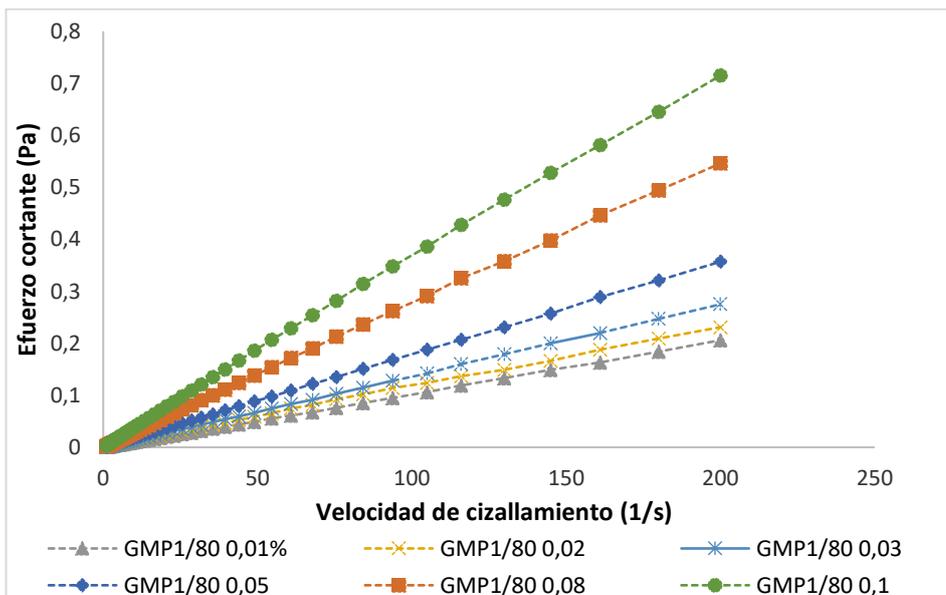


Figura 7-7: Curvas de flujo $GMP_{1/80} < 0,1\%$

Anexo

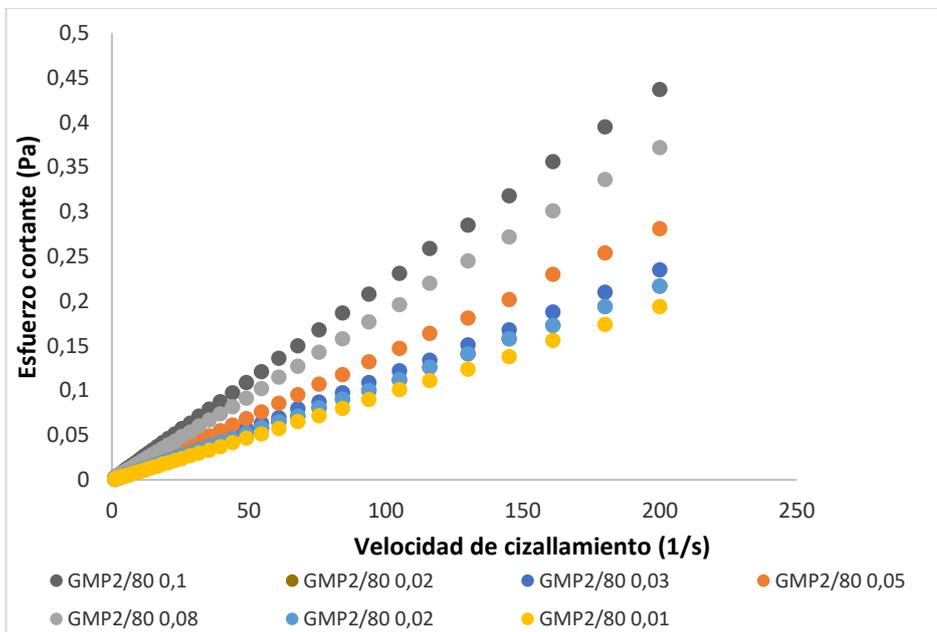


Figura 7-8: Curvas de flujo GMP_{2/80} < 0,1%

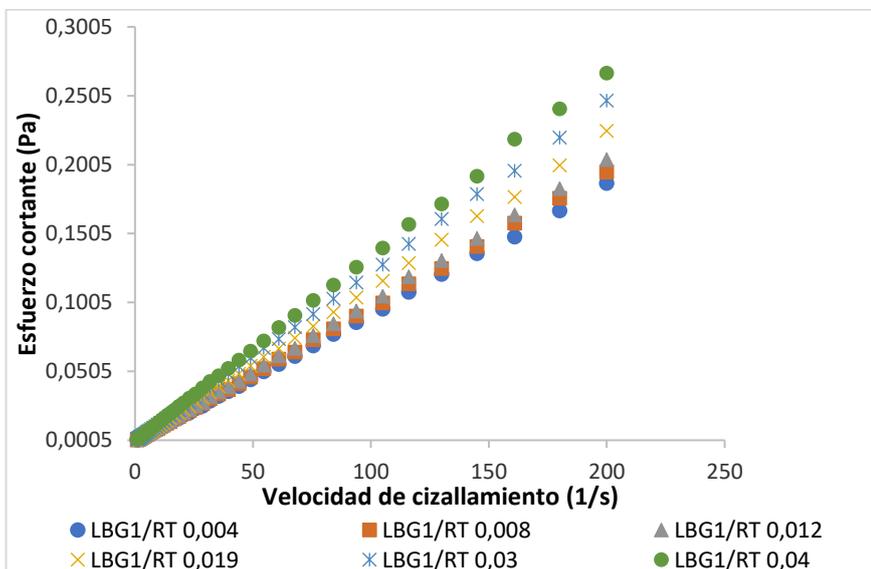


Figura 7-9: Curvas de flujo LBG_{1/RT} < 0,1%

Anexo

7.3. Análisis de azúcares por metilación – GC-MS

7.3.1. Extractos de *Prosopis affinis* RT

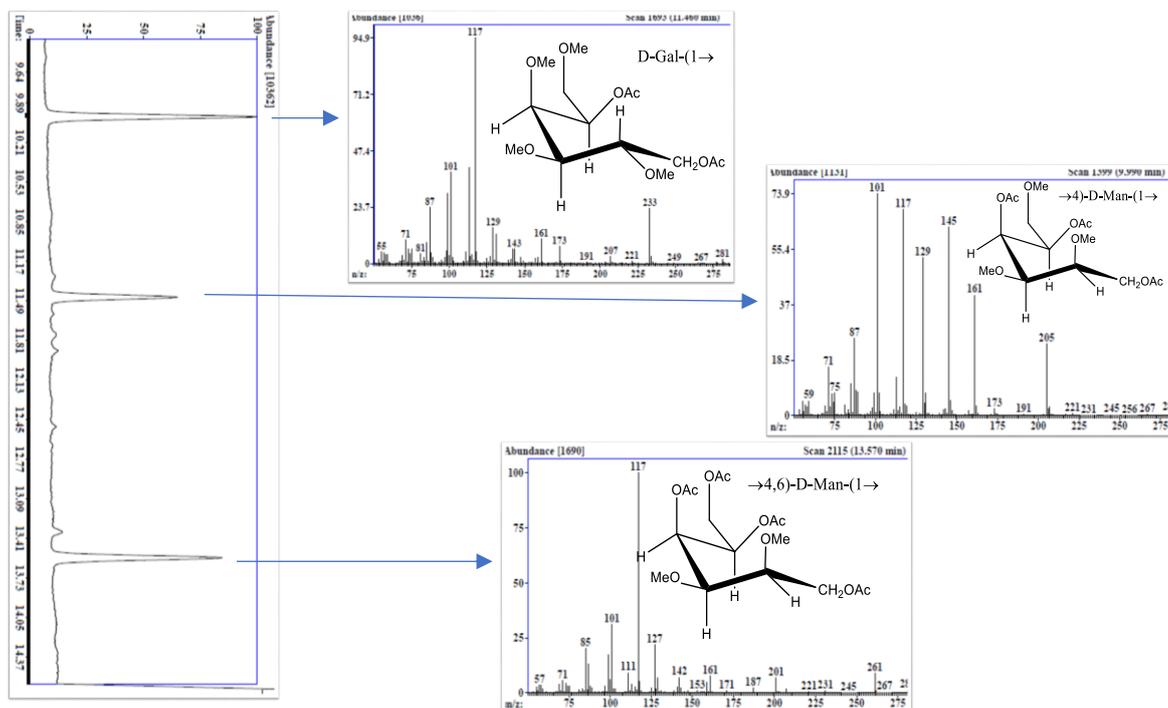


Figura 7-10: Análisis de metilación, cromatografía GC-MS de los PMAAs obtenidos del extracto $GMP_{2/RT}$: