

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

EFFECTO DE LA CONGELACION Y ALMACENAMIENTO
EN EL DETERIORO DE SUSPENSIONES DE
ALMIDON GELATINIZADO



CRISTINA FERRERO

TESIS DOCTORAL

1992

El presente trabajo de tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Químicas fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA), Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección de la Dra. Noemí E. Zaritzky.

A mis padres
A mi hermana
A mi tío Carlos

AGRADECIMIENTOS

Muy especialmente a la Dra. Noemí E. Zaritzky por su estímulo permanente y dedicación en la dirección del presente trabajo de tesis, por haber fomentado mi espíritu crítico, independencia de criterio y disciplina en el método científico, indispensables para encarar un trabajo de investigación.

A la Dra. Miriam N. Martino por haberme iniciado en las técnicas de observación microscópica y de sustitución a bajas temperaturas y especialmente, por sus valiosos aportes y constante respaldo en todos los temas desarrollados.

A la Dra. Alicia Califano por haberme iniciado en la técnica de calorimetría diferencial de barrido y por su siempre eficaz ayuda en el área de computación así como en el tratamiento estadístico de los datos del presente trabajo de tesis.

A la Dra. Alicia Chaves por su colaboración permanente en la parte estadística.

A los Ing. Néstor Serena, José Luis Alonso y Gustavo Mahli por su dedicación y apoyo técnico en el manejo de equipos, en particular, el de calorimetría diferencial de barrido.

Al Dr. Jorge Wagner y la Lic. Alba Navarro por su colaboración en el área de reología.

A los Sres. Vicente A. Valenti, Sergio Torres y Arturo A. Colavita por su permanente ayuda técnica.

Al Sr. Mario Petterini y Bqca. Cecilia B. Castels por su dedicación en el dibujo de las figuras del presente trabajo.

A la Sra. Teresa E. Quattrini por su eficiente desempeño en el tipeado final de la tesis.

A las Dras. Ruth Rosenstein y Leda Giannuzzi por haberme impulsado a emprender este trabajo de investigación y por su estímulo permanente a lo largo del mismo.

A mis padres, Alberto T. Ferrero y M. Alicia Monassa por su incondicional respaldo moral y material para que pudiera concretar este trabajo de tesis.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por los medios materiales puestos a disposición a través del CIDCA y las becas otorgadas.

A los docentes de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata por haber ayudado a mi formación científica y humana.

Muy en especial, a todos y cada uno de los compañeros del CIDCA, por la alegría compartida cuando todo salía bien y su apoyo y aliento ante las dificultades, por su amistad y constante colaboración, sin las cuales este trabajo de tesis no hubiera sido posible.

No cesaremos de explorar
y el final de todo nuestro explorar
será llegar al punto de partida
y conocerlo por primera vez.

(Thomas S. Eliot, 1888-1965)

INDICE

CAPITULO 1	PAGINA
INTRODUCCION	
1.1. Alimentos pre-cocidos congelados: Mercado Internacional	1
1.2. Composición de los sistemas a base de espesantes	2
1.3. Definición del sistema bajo estudio	3
1.3.1. Espesantes	4
1.3.1.1. Almidón	5
1.3.1.1.1. Estructura de la amilosa	6
1.3.1.1.2. Estructura de la amilopectina	9
1.3.1.1.3. Estructura del gránulo de almidón	9
1.3.1.1.4. Gelatinización del almidón	13
1.3.1.1.5. Gelificación y retrogradación	16
1.3.1.1.6. Concepto tradicional de retrogradación de almidón	18
1.3.1.1.7. Nuevos conceptos sobre gelificación y de pastas de almidón	20
1.3.1.2. Harina	23
1.3.2. Estabilizantes hidocoloides	24
1.3.2.1. Goma xántica	25
1.4. Congelación	28
1.4.1. Agua libre y ligada	28
1.4.2. Estructura del hielo	30
1.4.3. Cristalización del hielo	31
1.4.3.1. Nucleación	32
1.4.3.2. Crecimiento cristalino	35
1.4.3.4. Morfología de los cristales de hielo	37
1.4.4. Velocidad y tiempo de congelación de los alimentos	41
1.4.5. Equipos de congelación	43
1.5. Recristalización del hielo durante el almacenamiento congelado	45
1.6. Descongelación	47

1.7. Congelación y almacenamiento de pastas de almidón	47
1.8. Acción de los hidrocoloides en productos congelados	50
1.9. Objetivos	51

CAPITULO 2

MATERIALES Y METODOS DE CONGELACION

2.1. Preparación de suspensiones de almidón gelatinizado	53
2.2. Congelación y almacenamiento de las muestras	58

CAPITULO 3

PRODUCCION DE EXUDADO

3.1. Fenómeno de sinéresis en pastas de almidón	59
3.2. Metodología para la cuantificación de exudado	59
3.2.1. Congelación, almacenamiento y descongelación de las muestras	59
3.2.2. Fundamentos del método de cuantificación de exudado	60
3.3. Resultados y discusión	62
3.4. Consideraciones finales	70

CAPITULO 4

COMPORTAMIENTO REOLOGICO

4.1. Introducción	73
4.2. Comportamiento reológico de pastas de almidón gelatinizado	78

4.3. Materiales y métodos	79
4.3.1. Ensayos reológicos con viscosímetro rotacional	79
4.3.2. Preparación de las muestras	81
4.4. Resultados y discusión	81
4.4.1. Efecto de la velocidad de congelación en el comportamiento reológico de pastas de almidón gelatinizado	81
4.4.2. Efecto del almacenamiento congelado	90
4.4.3. Efecto de la velocidad de congelación en los parámetros m , n del modelo de Ostwald-De Waele	98
4.4.4. Comportamiento viscoelástico de los geles de almidón	101
4.5. Consideraciones finales	105

CAPITULO 5

CRISTALIZACION Y RECRISTALIZACION DEL HIELO

5.1. Introducción	107
5.2. Materiales y métodos	110
5.2.1. Preparación de las muestras	110
5.2.2. Observación microscópica: técnica de sustitución isotérmica a temperaturas bajo cero	110
5.2.2.1. Selección del fijador	112
5.2.2.3. Mediciones de recristalización	114
5.3. Resultados y discusión	115
5.3.1. Selección del fijador	115
5.3.2. Difusión del fijador	118
5.3.3. Tiempo de fijación de las muestras	122
5.3.4. Influencia de las condiciones de congelación y almacenamiento en la distribución de tamaños cristalinos en pastas de almidón de maíz y de harina de trigo sin y con agregado de estabilizante	125
5.3.4.1. Efecto de la velocidad de congelación	125

5.3.4.2. Recristalización de hielo en pastas de almidón de maíz y harina de trigo. Efecto de la temperatura de almacenamiento y del agregado de estabilizante	132
5.3.4.3. Modelado de la cinética de recristalización	149
5.3.4.3.1. Análisis de los errores inherentes a la técnica empleada	156
5.4. Consideraciones finales	158

CAPITULO 6

ANALISIS DE LA RETROGRADACION DEL ALMIDON POR CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE BARRIDO

6.1. Introducción	160
6.2. Materiales y métodos	162
6.2.1. Fundamento de la técnica de calorimetría diferencial de barrido (DSC)	162
6.2.2. Congelación, almacenamiento y descongelación de las muestras	165
6.3. Resultados y discusión	166
6.3.1. Entalpías de gelatinización	166
6.3.2. Efecto de la congelación y del almacenamiento congelado sobre la entalpía de retrogradación y rango de temperatura de transición	169
6.3.2.1. Influencia de la velocidad de congelación	169
6.3.2.2. Efecto del almacenamiento congelado sobre la retrogradación	173
6.3.2.3. Modelado del fenómeno de retrogradación	182
6.4. Consideraciones finales	190

CAPITULO 7

CONCLUSIONES	191
---------------------	------------

BIBLIOGRAFIA	200
---------------------	------------

CAPITULO 1

INTRODUCCION

1.1. Alimentos precocidos congelados: Mercado Internacional

Los alimentos preparados congelados han tenido en los últimos años una rápida y amplia expansión a nivel internacional (Tablas 1.1 a, b y c). Se define a éstos como aquellos alimentos congelados que mediante un tratamiento adecuado, incluyendo un proceso de preservación, han pasado todas las fases necesarias del procesamiento para ser consumidos directamente después de ser llevados a la temperatura adecuada (Paulus, 1977).

Tabla 1.1a. Mercado de comidas preparadas en Estados Unidos

	1987	1988	1989	1990	Variación(%)
Peso total(*)	6.136	6.415	6.626	6.773	10,4
Valor total(#)	12.278	13.357	14.396	15.063	22,7

(*) en millones de libras (#) en millones de dólares

Datos de ésta y siguientes tablas extraídos de Quick Frozen Foods (Octubre 1990)

Tabla 1.1b. Mercado de comidas preparadas en Europa

	1982		1987		1992		Variación(%)	
	P.T.	%(*)	P.T.	%	P.T.	%	1982-1987	1987-1992
Francia	24,0	22	79,4	26	138,6	28	+27	+12
Alemania Occ.	24,2	22	79,4	26	129,8	26	+27	+10
Reino Unido	59,6	56	147,8	48	224,0	46	+20	+9
Total	107,8	100	306,6	100	492,4	100	+23	+10

P.T.: peso total en millones de libras

(*) porcentaje sobre el total

Tabla 1.1c. Mercado de comidas preparadas en Japón

	1988	1989	Variación(%)
Peso total(*)	655.058	712.939	8,8
Valor total(#)	351.712	382.117	8,6

(*) en toneladas, (#)en millones de yens

La necesidad que tiene nuestro país de exportar productos alimenticios con mayor valor agregado hace imprescindible el estudio de las dificultades tecnológicas inherentes al procesamiento de esta clase de alimentos.

1.2. Composición de los sistemas a base de espesantes que integran los alimentos pre-cocidos congelados

Los alimentos preparados congelados suelen almacenarse a alrededor de -18°C ya que a esta temperatura, la mayor parte del agua contenida en el alimento está congelada, no se observa crecimiento microbiano y los cambios de calidad derivados de reacciones químicas (por ejemplo, oxidación de grasas) son mucho más lentos (Eichner, 1977). Debe recordarse, no obstante, que el daño que produce la congelación en la microestructura de un alimento precocido es mucho más marcado que en uno fresco.

Dentro de los alimentos preparados congelados se destacan los que tienen una base cárnea, de especial interés por ser nuestro país un tradicional exportador de carnes. Esta clase de alimentos preparados incluyen generalmente sistemas de cobertura (emulsiones con o sin espesantes u otros agregados) que resultan indispensables para proteger a los componentes sólidos de deshidrataciones y cambios químicos esperables para tiempos de almacenamiento prolongados. El uso de estos sistemas mejora considerablemente la aceptabilidad del alimento.

Sin embargo, los sistemas de cobertura son muy sensibles a los procesos de congelación y descongelación, presentando sinéresis (en aquellos casos en que han sido espesados con harinas y/o almidones) y coalescencia de glóbulos grasos. El resultado de estos fenómenos es el deterioro marcado de la estructura original acompañado por exudación de líquido y separación de fases, que disminuye la aceptabilidad del producto.

Sobre este tema, la literatura presenta diversas formulaciones, objeto en la mayoría de los casos de patentes; sin embargo es escasa la información acerca de los fenómenos físico-químicos que interpretan este comportamiento frente a procesos desestabilizantes como el de congelación-descongelación.

Este estudio está orientado a encarar dichos fenómenos.

1.3. Definición del sistema bajo estudio

Los sistemas de cobertura o salsas son básicamente emulsiones, y por lo tanto, desde el punto de vista termodinámico, se trata de sistemas inestables. En su formulación intervienen además de la fase dispersa (lípidos) y de la dispersante (agua o leche), sustancias que tienen acción espesante, estabilizante y emulsificante.

Tres son los factores principales que influyen en la estabilidad de una emulsión: la dimensión de las gotas de la fase dispersa, la tensión interfacial entre los dos líquidos y la viscosidad de la fase dispersante. La acción de emulsificantes sobre la interfase aceite/agua y la de los estabilizantes y espesantes sobre la fase dispersante tienden a impedir la separación de fases acentuada por el congelamiento (Andreotti y col., 1974).

Es necesario clarificar los términos espesante, estabilizante y emulsificante, ya que frecuentemente se los encuentra en la literatura como si fueran equivalentes.

Los espesantes actúan dando cuerpo al sistema al aumentar la viscosidad de la fase dispersante o continua. Los estabilizantes tienen como función mantener una condición homogénea durante el procesamiento térmico y el almacenamiento. Como los estabilizan-

tes (generalmente hidrocoloides) tienen una viscosidad propia influyen también en la consistencia, aumentándola ligeramente y superponiéndose en parte con las funciones del espesante. Por otro lado, como estas sustancias ayudan a estabilizar el balance entre agua y grasa en la emulsión también hay una ligera superposición de funciones entre el estabilizante y el emulsificante.

Los emulsificantes (lecitinas, proteínas, aislados de soja, mono y diglicéridos) tienen como función la de mantener constante la relación entre las fases grasa y acuosa, condición necesaria para lograr una emulsión estable. Si se utiliza más emulsificante que el necesario para mantener dicha proporción constante, este emulsificante adicional tendrá una influencia estabilizante superponiéndose así con la función del hidrocoloide (Kuchenbecker, 1986).

El presente trabajo de tesis centra su atención en el rol del espesante y del estabilizante durante los procesos de congelación y almacenamiento congelado por lo que nos detendremos en particular sobre sus respectivas estructuras.

1.3.1. Espesantes

Diversos autores (Hanson y col., 1951; Osman y Cummisford, 1959; Brunnek y Koptelova, 1970; Przybyl y col., 1983) han coincidido en señalar a los espesantes como causa principal del deterioro sufrido por el sistema durante el almacenamiento congelado.

Los espesantes usualmente utilizados son almidones o harinas de diverso origen. Otros hidrocoloides utilizados por la industria alimenticia son gomas, pectinas y gelatina. Por muchos años, los almidones fueron usados principalmente como espesantes básicos y fuente de carbohidratos. Actualmente también se emplean como estabilizantes, texturizantes, ligantes de agua o grasa y coadyuvantes de emulsificación. Los almidones no modificados han sido utilizados tradicionalmente en rellenos, salsas, confituras, etc.. Sin embargo, las comidas preparadas que incluyen en su formulación este tipo de almidones deben ser consumidas generalmente a las pocas horas de su preparación, ya que carecen de

la estabilidad deseada para un alimento procesado. Las características generalmente exigidas en estos casos son: resistencia a cambios de pH, viscosidad estable, tolerancia al procesamiento, buena textura, suficiente vida útil, capacidad de formar emulsiones estables. La elección del almidón adecuado puede conferir estas características.

En este sentido, una de las alternativas en la producción de alimentos refrigerados, congelados, o esterilizados ha sido la utilización de almidones modificados. Existen distintos tipos de modificaciones permitidas; las más comunmente usadas son: hidrólisis, oxidación, sustitución y entrecruzamiento (Luallen, 1985). Los sistemas espesados con este tipo de almidones pueden ser lo suficientemente estables como para que resulte innecesario adicionar un estabilizante a la formulación.

Las propiedades del almidón como espesante y los posibles cambios experimentados durante el procesamiento y almacenamiento de comidas preparadas en base al mismo requieren para su explicación, de un conocimiento de la estructura y composición del gránulo de almidón. Considerar la organización molecular del almidón puede facilitar la comprensión de las diversas propiedades texturales, y en particular, de uno de sus principales atributos: la capacidad de los gránulos para gelatinizar en agua caliente.

1.3.1.1. Almidón

Los gránulos de almidón están compuestos por dos polisacáridos: la amilosa, cadena lineal de unidades de anhidroglucosa enlazadas por uniones α -1,4 y la amilopectina, una molécula no lineal o ramificada, consistente en unidades de anhidroglucosa unidas por enlaces α -1,4 pero teniendo también uniones α -1,6 que generan así los puntos de ramificación (Figuras 1.1a y b). Los porcentajes de amilosa y amilopectina varían según el tipo y origen del almidón. Así, los almidones nativos de cereales contienen alrededor de 30 % de amilosa y 70 % de amilopectina. Los almidones céreos y los de alto contenido de amilosa (amilomaíz) son modificaciones genéticas constituídas por amilopectina casi pura en el

primer caso y un alto contenido de amilosa en el segundo (Tabla 1.2).

Tabla 1.2. Contenido de amilosa y amilopectina de almidones naturales. Rangos de temperatura de gelatinización.

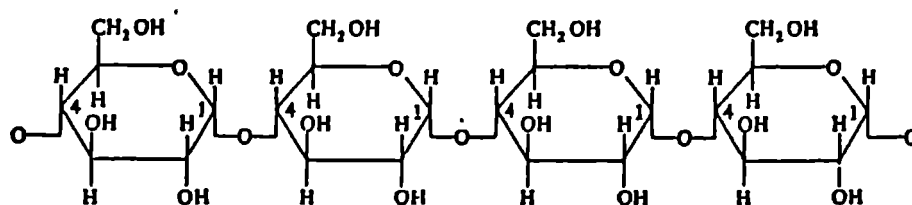
Fuente	amilosa(%)	amilopectina(%)	rango de temperatura de gelatinización(°C)
papa	23	77	61-71
mandioca	20	80	63-79
trigo	20	80	52-65
arroz	15-35	65-85	70-82
maíz	25	75	65-77
maíz céreo	0	100	65-80
amilomáiz	77	23	65-(*)

(*) no determinado

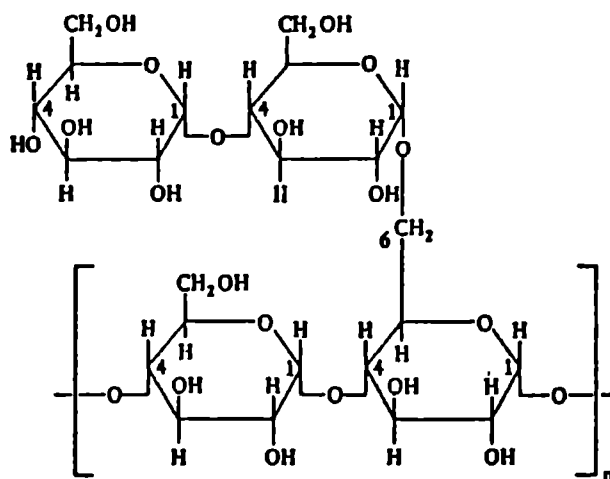
Datos de contenido de amilosa extraídos de Cheftel y Cheftel (1976). Datos correspondientes a entalpías de gelatinización extraídos de Eberstein y col. (1980).

1.3.1.1.1. Estructura de la amilosa

La naturaleza esencialmente lineal de la amilosa fue reconocida por primera vez hace más de 50 años por Meyer, Wertheim y Bernfeld obteniéndose más tarde pruebas aparentemente concluyentes de ello cuando se encontró que el polisacárido era cualitativamente convertido en maltosa por la acción de la β -amilasa, ya que sólo una cadena de residuos de glucosa sin modificar unidos por enlaces α -1,4, podía satisfacer esta observación (Banks y Greenwood, 1975).



a



b

Fig. 1.1. Estructura molecular del almidón. a) segmento de cadena de amilosa; b) segmento de molécula de amilopectina (Campbell y col., 1980)

Se trata de moléculas muy largas, de varios centenares de unidades de D-glucosa, que pueden alcanzar longitudes de hasta 4000 unidades (por ejemplo en papa), las que, aceptando el modelo helicoidal de Kreger pueden constituir una cadena de hasta 1.400 nm de largo (1,4 μ m). Banks y Greenwood (1975) confirmaron la presencia de por lo menos una fracción de amilosa completamente lineal. Los resultados de estos autores confirmaron la presencia de dos tipos de amilosa en el gránulo de almidón: uno conteniendo una barrera a la acción de la β -amilasa (grupos o uniones anómalos situados al azar) y otro completamente lineal constituido por residuos α -1,4.

Con respecto a la disposición que adquieren las moléculas de amilosa en solución acuosa, se han sugerido tres estructuras posibles que se esquematizan en la Fig. 1.2. El modelo (a) (enrollamiento al azar) carece por completo de una estructura terciaria. El (b) (propuesto por Holló y Szejtli) alterna secciones helicoidales de aproximadamente 120 unidades glucosídicas con tramos de enrollamiento al azar. Estos últimos otorgan la flexibilidad necesaria al conjunto. El modelo (c), finalmente, corresponde a la "hélice deformada" de Rao y Foster.



Fig. 1.2. Modelos propuestos para la molécula de amilosa en solución acuosa: (a) enrollamiento al azar; (b) hélice interrumpida; (c) hélice deformada (Banks y Greenwood, 1975)

Una de las características más importantes de la amilosa es su capacidad para formar complejos con yodo, quedando las moléculas de I₂ alineadas dentro la hélice. El patrón de difracción de rayos-X de este complejo es muy similar al exhibido por el almidón precipitado a partir de alcohol. Pronto se reconoció que las cadenas de ácidos grasos podían también ocupar el centro de la hélice de amilosa y dar un patrón de difracción similar al anterior. Los ésteres de ácidos grasos y surfactantes con cadenas de ácidos grasos en su estructura parecen complejarse de la misma manera. El uso de estos agentes disminuye la afinidad del almidón por el I₂ mostrando que están compitiendo por los mismos sitios (Banks y Greenwood, 1975).

1.3.1.1.2. Estructura de la amilopectina

Este polisacárido puede tener cadenas de hasta 26-30 unidades de D-glucosa unidas por enlaces α -1,6 a los puntos de ramificación, constituyendo éstos últimos un 4-5% de la estructura.

Se han propuesto tres modelos estructurales para la amilopectina: el laminar de Haworth, Hirst e Isherwood es el más simple (Fig. 1.3a); la estructura sugerida por Staudinger y Housemann en donde una cadena única sostiene todas las ramificaciones (tipo espina de pescado) (Fig. 1.3b) y la ramificada al azar (tipo árbol) propuesta por Meyer y Bernfeld (Fig. 1.3c). De los tres modelos, el de Meyer fue el consistente con los resultados de estudios enzimáticos posteriores (Banks y Greenwood, 1975). En la Fig. 1.3d se muestra una representación de la molécula de amilopectina, de acuerdo al modelo actualmente aceptado (ramificado al azar), según Gallant y Bouchet (1986).

1.3.1.1.3. Estructura del gránulo de almidón

El almidón es un material sólido con una densidad de aproximadamente 1,5 g/ml. Las plantas normalmente elaboran su almidón en forma de granos microscópicos (Sterling, 1978). Los gránulos

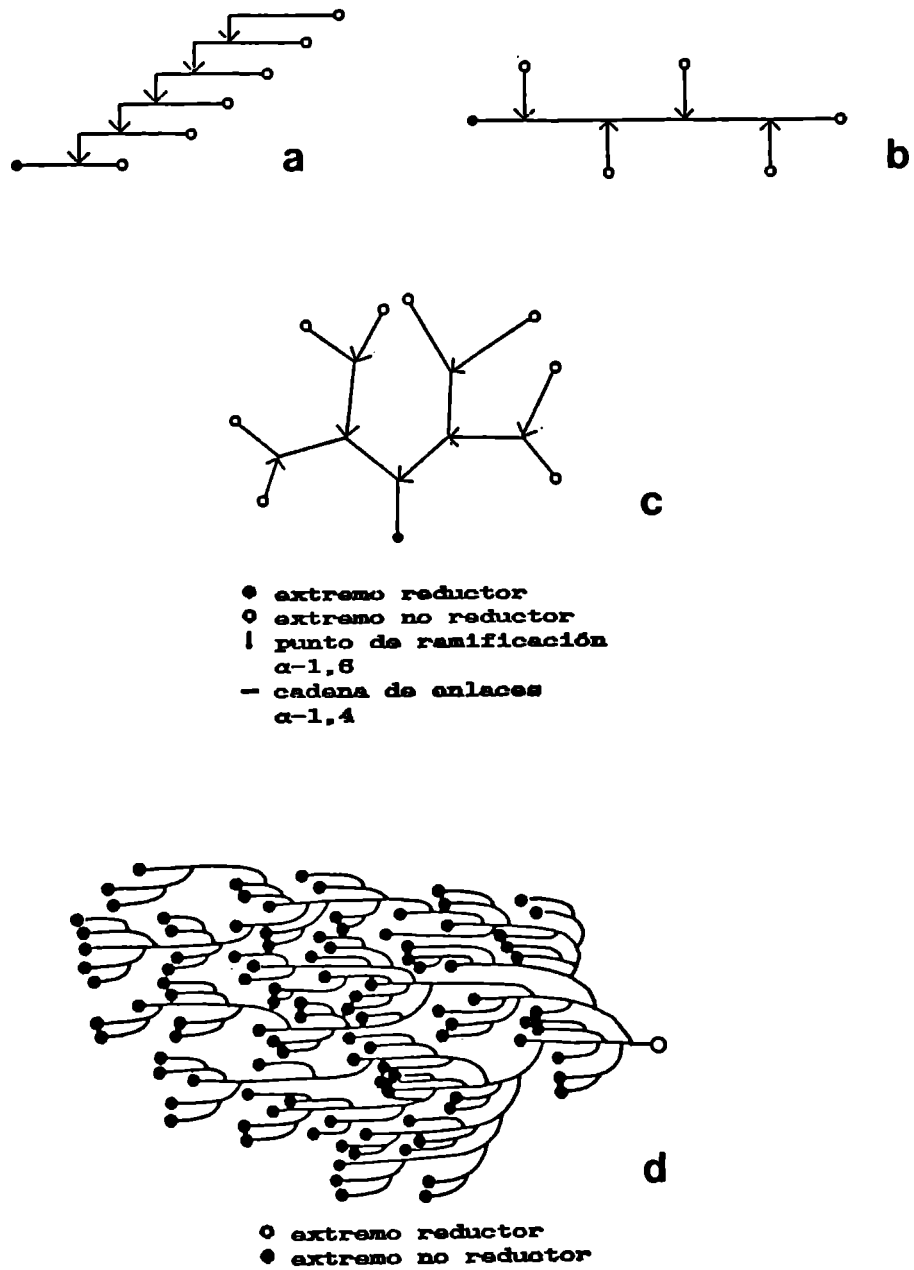


Fig. 1.3. Modelos propuestos para amilopectina: (a) estructura laminar; (b) de espina de pescado; (c) ramificada al azar (Banks y Greenwood, 1975). (d) Representación esquemática de la molécula de amilopectina (Gallant y Bouchet, 1986)

mismos varían considerablemente en forma (más o menos esférica) y tamaño (desde un diámetro de 2 μm hasta 175 μm según la procedencia) por lo que la fuente de almidón puede identificarse simplemente por su apariencia al microscopio.

Para una caracterización completa del gránulo de almidón, no basta con el análisis de la relación amilosa/amilopectina y el estudio de la estructura fina de los dos polisacáridos que lo conforman sino que además resulta imprescindible la comprensión de la forma en que las moléculas individuales están dispuestas dentro del gránulo.

Se considera al almidón como un material semicristalino desde los clásicos trabajos de Katz y sus colaboradores (Katz, 1928; Katz y Van Itallie, 1930). Como en los polímeros sintéticos, los polímeros naturales de alto peso molecular están organizados en regiones más o menos cristalinas establecidas por uniones puente de hidrógeno, y regiones amorfas. La extensión de la cristalinidad puede ser estimada directamente a partir de la intensidad de reflexión de rayos-X (Sterling, 1978). Mediante este método fueron distinguidos tres tipos de estructura cristalina en los gránulos de almidón intactos, cuyos espectros de difracción obtenidos fueron designados como A, B y C. El tipo estructural depende de la fuente botánica del almidón siendo el "A" característico de los cereales, el "B" de almidones de papa y maíz de alto contenido de amilosa (también observado en el almidón retrogradado) y el "C" típico de almidones de leguminosas (Figura 1.4).

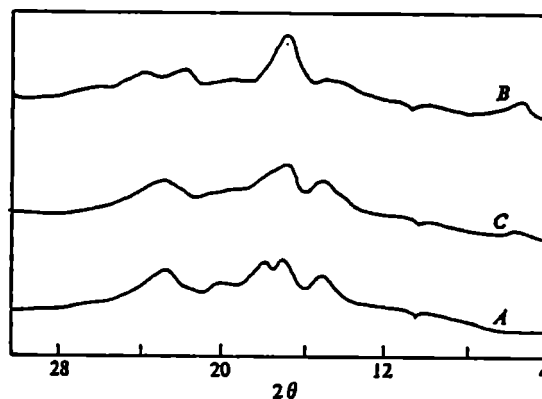


Fig. 1.4. Patrones de difracción típicos para almidones con espectro de rayos-X tipo A, B y C (Banks y Greenwood, 1975)

Los gránulos de almidón muestran birrefringencia bajo la luz polarizada, dando la característica Cruz de Malta. Son tanto semicristalinos como birrefringentes. Cabe aclarar que estos dos aspectos no están necesariamente relacionados. El hecho de que el almidón sea birrefringente implica únicamente que hay un alto grado de orientación molecular dentro del gránulo, sin referencia a ninguna forma cristalina.

Las moléculas de almidón se encuentran dispuestas con sus ejes longitudinales de manera perpendicular a la superficie del gránulo (Sterling, 1977). Debido a que las moléculas en cualquier región son esencialmente paralelas entre sí, el gránulo resulta birrefringente.

Asimismo, las moléculas forman capas o "lamellae" perpendiculares al eje de simetría del gránulo, siendo estas capas menos visibles en el almidón procedente de cereales que, por ejemplo, en el de papa. Estas capas no son evidentes en el gránulo deshidratado o no degradado. Según Banks y Greenwood (1975) este tipo de estratificación tendría su origen en un fenómeno similar al que se observa comunmente en la cristalización de polímeros sintéticos de alto peso molecular. Se piensa que el fenómeno es debido a un enrollamiento o retorcimiento de las fibrillas cristalinas durante el crecimiento de la esferulita a partir del núcleo primario, por acumulación de material en la superficie en expansión. El material que no puede acomodarse dentro de la estructura del cristal es empujado hacia afuera, a la zona fundida o a la solución. A medida que el cristal se expande tiende a ramificarse y el material no cristalino se deposita entre estas ramas. Así, la esferulita es semicristalina, ya que contiene tanto material amorfo como cristalino.

También es posible concebir que algunas moléculas largas de almidón radialmente dispuestas estén atravesando varias capas o "lamellae" mientras que otras terminan en un nivel dado. Otra alternativa es que la molécula de amilopectina pueda tener ramificaciones radiales desde la cadena principal en sentido más o menos paralelo a la cadena axial. Estas ramificaciones terminarían en un mismo nivel, dando así la definición de las características capas (Sterling, 1978).

1.3.1.1.4. Gelatinización del almidón

En presencia de suficiente cantidad de agua y bajo calentamiento hasta una temperatura adecuada, los gránulos de almidón nativo se hidratan irreversiblemente hasta llegar a un punto en que las fuerzas electrostáticas (puentes de hidrógeno) que mantienen juntos a los constituyentes moleculares del gránulo están tan debilitadas que se pierde la orientación molecular ordenada. La desaparición de la característica birrefringencia se toma usualmente como índice de este fenómeno. Dentro de un rango relativamente estrecho de temperatura (5 a 10°C) todos los gránulos de la población muestran estos cambios marcados en sus propiedades, fenómeno que se conoce bajo el nombre de gelatinización.

La gelatinización comienza en el hilum del gránulo y se extiende luego hacia la periferia del mismo. Ocurre antes en las zonas amorfas, debido a que los puentes de hidrógeno son más débiles en esas áreas (Dengate, 1988).

Existe una dependencia de la temperatura de gelatinización respecto a las proporciones relativas de amilosa y amilopectina: a mayor contenido de amilosa, más alta será la temperatura de gelatinización (Tabla 1.2). Esto se explicaría por las uniones más firmes que presentan entre sí las moléculas lineales de amilosa, respecto a las de la amilopectina.

El primer paso del proceso de gelatinización es la hidratación y deformación de los gránulos, que aumentan su volumen de 3 a 6 veces. La capacidad para polarizar la luz y difractar los rayos-X se pierde en esta etapa temprana. Aparece una cavidad central que aumenta su tamaño, incrementándose el volumen hasta 25-30 veces a medida que prosigue el calentamiento. Entonces, el gránulo hidratado colapsa y la suspensión es ahora completamente turbia y viscosa (Sterling, 1978).

En el transcurso de la gelatinización, las moléculas lineales de amilosa son expulsadas hacia la fase acuosa (Montgomery y Senti, 1958; Reeve, 1954) mientras que las ramificadas permanecen sin disolver.

La capacidad de hidratación del gránulo es función de la tem-

peratura y de la constitución genética. Los almidones con alto contenido de amilosa gelatinizan únicamente con dificultad. En estos casos es posible encontrar gránulos birrefringentes (no gelatinizados) aun después de 30 minutos de calentamiento a 95°C (Leach y col., 1959). Se puede suponer entonces que la hidratación está relacionada con el porcentaje de amilopectina (Waldt y Kehoe, 1959; Bear y Samsa, 1943).

El alcance de la gelatinización depende también de otros factores: daño mecánico del gránulo de almidón, presencia de agentes que aumenten o disminuyan la temperatura de gelatinización (azúcar, sales de sulfato y ioduros, tiocianatos respectivamente) (Sterling, 1978).

Bowler y col. (1980) mostraron que el aumento de volumen radial era limitado y existía una considerable hidratación tangencial de los gránulos durante la gelatinización. El rol de la amilosa aparece ligado a la restricción del aumento de volumen tangencial ya que éste procede más rápidamente una vez que la amilosa ha sido expulsada del gránulo.

Por ejemplo, el almidón de trigo muestra dos etapas de incremento de volumen atribuidas por Leach y col. (1959) a dos grupos de enlaces hidrógeno que se "relajan" a diferentes temperaturas. Una pequeña proporción ocurre entre 60 y 70°C e involucra la ruptura de enlaces débiles o fácilmente accesibles de sitios amorfos; un segundo incremento de volumen ocurre rápido entre 80 y 90°C involucrando la ruptura de enlaces más fuertes o sitios cristalinos menos accesibles.

Por tratarse de un verdadero proceso de fusión, se pueden emplear métodos calorimétricos, como el diferencial de barrido (DSC) para el seguimiento de la gelatinización, pudiéndose medir el calor endotérmico ΔH asociado al fenómeno. En la Fig. 1.5 se muestran las endotermas de gelatinización características para tres genotipos de maíz (céreo, normal y de alto contenido de amilosa).

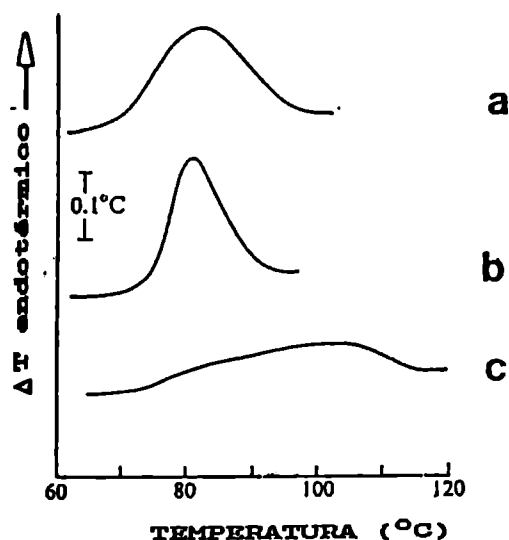


Fig. 1.5. Endotermas de gelatinización correspondientes a almidones de maíz (a) normal; (b) céreo y (c) de alto contenido de amilosa (Stevens y Elton, 1971)

La pasta recién preparada de almidón gelatinizado es una mezcla de gránulos hidratados y de fragmentos de gránulos que han colapsado, conjuntamente con moléculas dispersas coloidalmente y en solución (Olkku y Rha, 1978). Miller y col. (1973) señalaron la importancia del exudado de amilosa como factor contribuyente a la viscosidad total del sistema, mostrando que esta se hacía máxima después de transcurrida la mayor parte del incremento del volumen del gránulo. Según estos autores, el aumento de viscosidad se debe principalmente al exudado liberado de los gránulos que forma una red filamentosa entre ellos. A temperaturas elevadas, cuando la desintegración granular se hace más importante, la viscosidad disminuye, lo que explica el pico característico en la curva viscosidad - temperatura (Fig. 1.6). Otros autores (Evans y Haisman, 1979) han minimizado el rol de la amilosa como causa del aumento de viscosidad de las pastas de almidón gelatinizado dándole, en cambio, mayor importancia a la presencia de los gránulos hidratados no desintegrados.

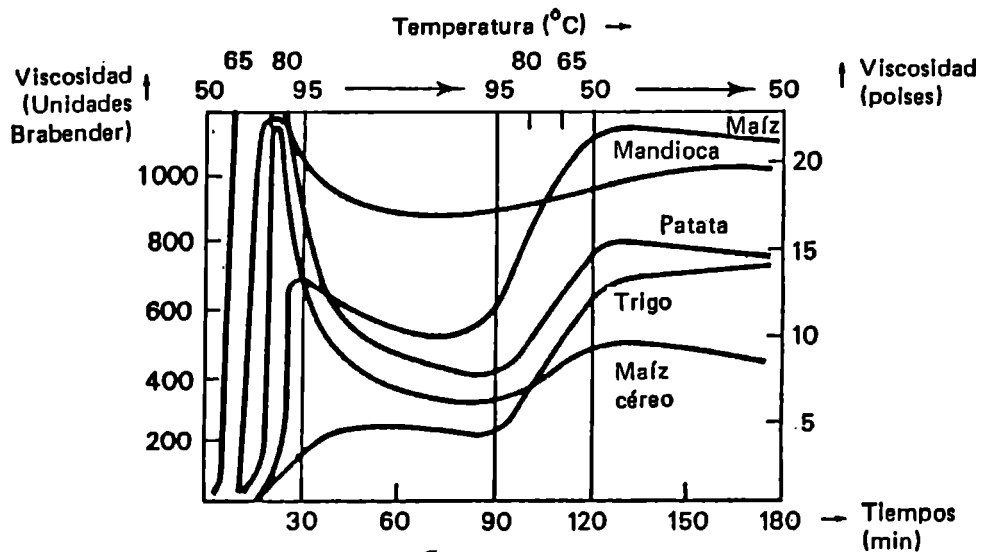


Fig. 1.6. Curva de viscosidad en función de tiempo y temperatura para distintas pastas de almidón (Cheftel y Cheftel, 1976)

1.3.1.1.5. Gelificación y retrogradación

Al enfriarse, las pastas de almidón gelatinizado adquieren - dependiendo de la concentración - la consistencia de un gel. Según Olkhu y Rha (1978), la amilosa es la principal responsable de la formación del gel aun en concentraciones tan bajas como 1,5 %. La formación de una estructura de gel está relacionada con la orientación paralela que pueden adquirir las moléculas de amilosa que forman uniones puente de hidrógeno entre sí. Los resultados de Ott y Hester (1965) describen dos funciones para la amilosa: una como componente de redes que atrapan el agua no absorbida y la otra como material ligante que "une" fragmentos o gránulos hinchados que no se hayan roto. A igualdad de otros factores, el grado de hidratación de los gránulos de almidón y el tamaño de los fragmentos parecen determinar la cantidad de amilosa necesaria para dar una estructura de gel firme, y de allí, la importancia del rol de este polisacárido.

El seguimiento de la gelificación por rayos-X evidencia los

cambios estructurales. Independientemente de la organización cristalina inicial aparece un patrón B. Sin embargo, como regla, la birrefringencia no es restablecida. A medida que transcurre el envejecimiento del gel éste se romperá, haciéndose más opaco y más rígido y a menudo exudando agua (fenómeno denominado sinéresis). En los productos de consistencia pastosa se formarán flóculos de precipitado opaco. Sumado a esto, el patrón de difracción de rayos-X se hará más fuerte. Estos fenómenos resumidos bajo el nombre de retrogradación significan de alguna manera un "retorno" al estado pre-gelatinizado. Sin embargo, el almidón retrogradado no puede ser nuevamente gelatinizado aunque sí resolubilizado o repectizado por calentamiento a altas temperaturas (Sterling, 1978).

La retrogradación aumenta con el almacenamiento prolongado, particularmente a bajas temperaturas (Schoch, 1965, 1968; Longton y Le Grys, 1981) pero la estabilidad no se alcanza ni siquiera después de 4 meses a 4°C. La estabilidad de los geles al proceso de congelación - descongelación es a menudo críticamente importante para la industria de la alimentación, particularmente debido a que la sinéresis puede ser tomada equivocadamente como evidencia de daño microbiano (Dengate, 1988).

La retrogradación es explicable en términos de cristalización de moléculas de almidón. Las cadenas macromoleculares de almidón, originalmente dispersadas por gelatinización, probablemente entran en contacto por retorcimiento al azar, enrollamiento y desenrollamiento y establecen puentes de hidrógeno entre ellas. Luego otros segmentos de las cadenas, que se han acercado, son más susceptibles de entrar en contacto entre sí una vez que los primeros enlaces han sido establecidos, concretándose más uniones que las que se rompen. Cuanto más largas las cadenas, mayor será el número de enlaces que las vincularán con sus vecinas. Por este mecanismo, la amilosa quedará más firmemente unida que la amilopectina. El agua que rodeaba originalmente al almidón dispersado será desplazada a medida que se forman los enlaces intermoleculares.

Durante mucho tiempo se atribuyó solamente a la amilosa el fenómeno de retrogradación. En la Fig. 1.7 se muestra un esquema

de Greenwood (1964) para explicar la diferencia entre gelación y retrogradación. Según Greenwood, la conformación de la amilosa en solución sería la causa de uno u otro fenómeno. En un caso (retrogradación), la molécula del polisacárido, al enfriarse lentamente, se alinea gradualmente mediante la formación de puentes de hidrógeno. Con el tiempo, tendría lugar la formación de micelas visibles y posteriormente, partículas insolubles. En cambio, un enfriamiento rápido conduciría a un gel. La amilopectina, según Greenwood, formaría soluciones extremadamente estables sin tendencia a retrogradar. Como veremos, estos conceptos vigentes hasta hace poco tiempo, han sido recientemente revisados.

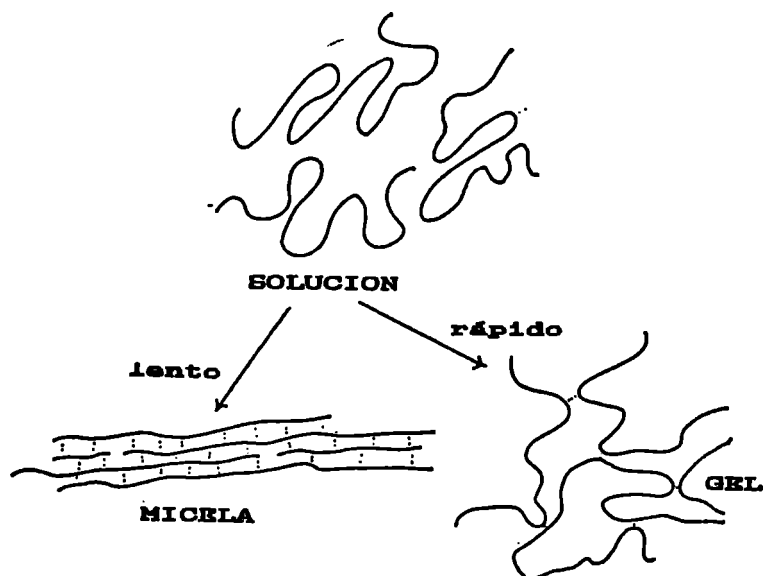


Fig. 1.7. Comportamiento de las moléculas de amilosa en solución ante diferentes velocidades de enfriamiento (Greenwood, 1964)

1.3.1.1.6. Concepto tradicional de retrogradación de almidón

El grado y extensión de la retrogradación dependerá tanto de factores intrínsecos como extrínsecos. Uno de los factores intrínsecos que afectan la retrogradación de sistemas de almidón-agua es la longitud de la cadena, pareciendo existir un largo de cadena óptimo para la retrogradación (Whistler, 1953). Así, las moléculas más pequeñas no se asocian completamente mientras que

las mayores tienen dificultades para alinearse con sus vecinas por tramos largos.

La linealidad es también importante ya que la presencia de ramificaciones tiene efecto inmediato sobre la retrogradación: la extensión más larga de enlace cristalino en una molécula de amilopectina está limitada a la longitud de la rama, es decir entre 26 y 30 unidades de glucosa. En esto residiría la causa de que se supusiera que la amilopectina retrograda en menor extensión que la amilosa y al hacerlo quede no tan firmemente enlazada como la amilosa (Lampitt y col., 1948).

Con respecto a los factores extrínsecos, los más importantes son temperatura, concentración, pH y tiempo..

El efecto de la temperatura no es consistentemente monotónico: la retrogradación es más rápida alrededor del punto de congelación del agua. En ese punto habría primero una disminución de la solubilidad y si la temperatura está por debajo de la de congelación, una lenta remoción de agua para participar en la formación de cristales de hielo dejando a las moléculas de almidón "desnudo" tiempo suficiente para agregarse y alinearse en dominios cristalinos. A temperaturas altas (mayores de 60°C) la retrogradación se vería impedida, presumiblemente, por movimiento de las moléculas y asociación más al azar. A temperaturas más bajas (-30°C y menos) el rápido congelamiento del agua probablemente no desnuda las moléculas de almidón en gran medida y tampoco da tiempo suficiente para orientarse en paralelo (Sterling, 1978). Como veremos, la explicación sobre cómo influye la temperatura en el fenómeno ha sido hoy también revisada (Slade y Levine, 1987).

Por otro lado, cuanto mayor es la temperatura alcanzada por la suspensión de almidón durante la gelatinización, más lenta es la velocidad de retrogradación o dicho de otra forma, mayor el grado de solubilización (Kalb y Sterling, 1961).

De acuerdo a Schoch (1941) la velocidad de retrogradación está relacionada con la concentración de almidón. Así la formación de una capa o "piel" en la superficie de las suspensiones de almidón gelatinizado se explicaría por la rápida deshidratación en esa zona, con el consiguiente aumento de concentración (Kerr,

1950). Aparentemente, el efecto de la concentración tiene un límite superior, relacionado con el número total de enlaces formados, por lo que a altas concentraciones se favorecería un perfecto alineamiento. Para una cantidad de agua del 50 % la intensidad obtenida del patrón B de difracción de rayos-X alcanza un máximo mientras que a 29 % o menos (altas concentraciones de almidón) se obtenía un patrón A. Con 29-30 % de agua el patrón era intermedio entre A y B (Hellman y col., 1954).

Kalb y Sterling (1962) informaron que el efecto de la variación de pH en la retrogradación dependía del procedimiento de ajuste de pH: si el pH era ajustado antes de la gelatinización, el máximo grado de retrogradación ocurría a pH=5, mientras que ajustado después de la gelatinización el máximo se encontraba a pH ácido (1,3-2,2).

1.3.1.1.7. Nuevos conceptos sobre gelificación y retrogradación de pastas de almidón

Si bien tradicionalmente, el fenómeno de retrogradación ha sido asociado con sólo uno de los polisacáridos constituyentes del almidón, la amilosa, trabajos más recientes (Miles y col., 1985; Slade y Levine, 1987; Morris, 1990) han demostrado el rol relevante que cumple la amilopectina.

Según Miles y col. (1985), la retrogradación del almidón consiste en dos procesos separables. Uno que involucra a la amilosa, térmicamente irreversible por debajo de los 100°C y que predomina en los estadios iniciales de la gelación y la retrogradación. En esta primera etapa habría una separación en dos fases, una rica y otra deficiente en polímero. La retrogradación de la amilosa ocurriría en la fase rica, antes de las 24 hs.. En una segunda etapa, relacionada con la cristalización de la amilopectina continúan los cambios iniciados en la primera: variación del módulo de elasticidad y aumento de la cristalinidad. Se trata de un fenómeno reversible por debajo de los 100°C, que tiene como consecuencia un aumento de la rigidez del gránulo de almidón gelatinizado, reforzando así la matriz de amilosa.

La amilosa por sí sola es capaz de formar geles en donde cada molécula participa a la vez de varias zonas cristalinas (Morris, 1990). Estas zonas cristalinas consisten en arreglos hexagonales de dobles hélices de seis vueltas de amilosa. La concentración crítica para la gelación de amilosa se encuentra en alrededor del 1 % p/p y no depende del largo molecular. La red puede desarrollarse en diferentes formas, dependiendo del tamaño de la molécula de amilosa. A pesos moleculares altos, el dificultoso acoplamiento lateral de las cadenas favorecería la formación de una red fina que se hace más gruesa con el tiempo, mientras que a pesos moleculares más bajos, que permiten una mayor asociación lateral de las dobles hélices, se producirían primero agregados gruesos que se unen luego para constituir una red.

De lo anterior se desprende que la permanencia de la estructura sería dada por la combinación de red amorfa con zonas cristalinas pudiéndose comparar el proceso global con una nucleación cristalina (formación de las hélices) seguida por crecimiento de los cristales (asociación lateral) (Fig. 1.8).

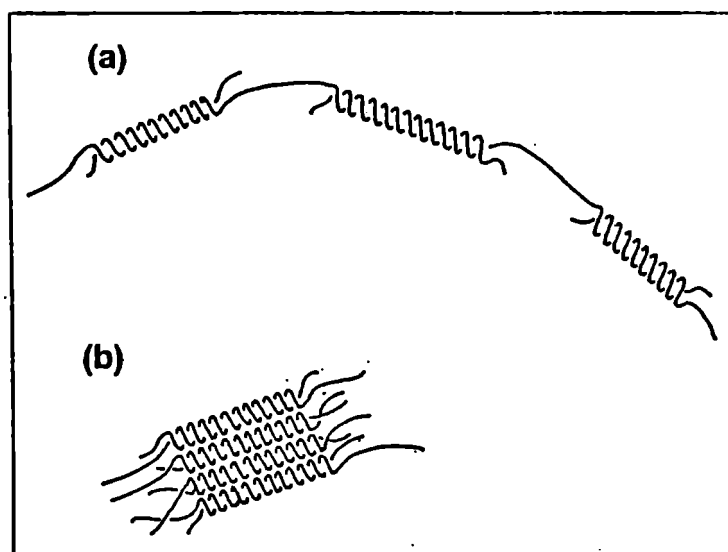


Fig. 1.8. Formación y asociación de dobles hélices: (a) formación de la hélice y elongación de la cadena; (b) asociación lateral de las regiones helicoidales (Morris, 1990)

La estructura del gel de almidón es más compleja ya que intervienen en ella los gránulos hidratados que "rellenan" la matriz interpenetrante de amilosa, aumentando la rigidez de la misma. Paralelo al aumento de rigidez del gel durante el almacenamiento, se produce un aumento de cristalinidad (patrón B de rayos-X). Si se calienta el gel hasta una temperatura de 95°C se revertirá parcialmente este aumento de la cristalinidad a valor original, que corresponde al gel de amilosa. Como esta cristalización reversible fue detectada en gránulos gelatinizados separados de la red de amilosa, se la asoció con la amilopectina (Miles y col., 1985). No es descartable por otro lado, un co-cristalización amilosa-amilopectina.

La gelatinización se puede considerar una fusión cristalina, en tanto que la retrogradación es una cristalización. Tradicionalmente se han tratado tanto la fusión como la cristalización como procesos de equilibrio. Recientes estudios demuestran que se trata en realidad de un proceso de no-equilibrio (que explica, por ejemplo, que a 4°C el almidón retrograde más que a temperatura ambiente)(Slade y Levine, 1987).

Estos autores han aplicado la teoría de volumen libre de William-Landel-Ferry al fenómeno de retrogradación, tratado como un proceso de no-equilibrio. Destacan particularmente la importancia de la temperatura de transición vítrea (T_g). Entre esta temperatura y la de fusión cristalina (T_m) el material permanece en un estado viscoso y hay suficiente movilidad de las cadenas para permitir la cristalización. La velocidad en que la misma ocurre, al no seguir una cinética tipo Arrhenius, dependerá de la magnitud de $\Delta T = T - T_g$. Por debajo de T_g , el material se encuentra en estado vítreo: el movimiento molecular es tan lento que la cristalización no ocurre en períodos finitos. Los geles de almidón son polímeros parcialmente cristalinos ya que contienen agua. El agua tiene un efecto plastificante ya que al aumentar la movilidad molecular reduce tanto T_g como T_m . La Fig. 1.9 muestra las curvas de nucleación y propagación de la cristalización dentro del rango $T_g - T_m$. La velocidad de cristalización tendrá un valor máximo a $T \approx 1/2(T_g + T_m)$, temperatura usualmente cercana a la am-

biente.

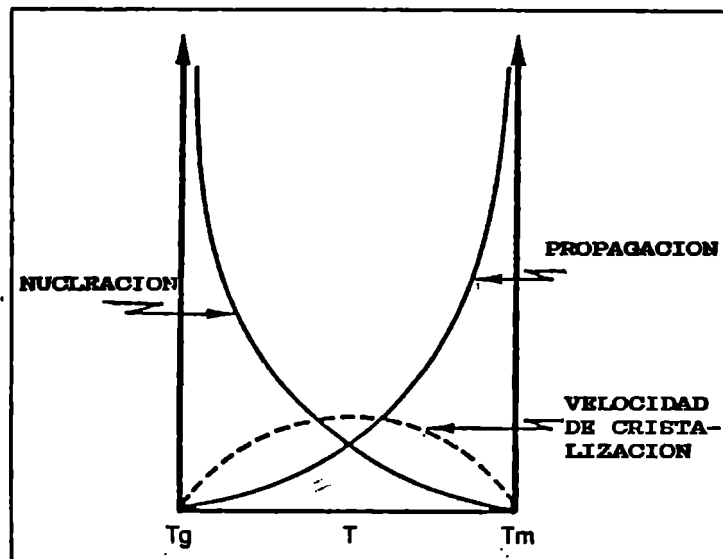


Fig. 1.9. Cinética de cristalización de polímeros parcialmente cristalinos (Morris, 1990)

1.3.1.2. Harina

La harina es el producto natural de la molienda del grano de cereal, una vez separada la cáscara y el germen. Por ello su composición incluye porcentajes más altos de proteína lípidos y sales minerales (alrededor de un 8 % de proteína y 1 % de lípidos en el caso de la harina de trigo).

Las propiedades de gelatinización de la harina se complican por la presencia y las propiedades de la proteína. Anker y Geddes (1944) mostraron que la sustitución de proteínas de gluten por un peso equivalente de almidón decrecía el pico de viscosidad pero que a iguales concentraciones de almidón la presencia de gluten aumentaba dicho pico. La proteína naturalmente presente en la harina incrementaba la viscosidad en un 15 % más que una cantidad equivalente de almidón.

1.3.2. Estabilizantes: hidrocoloides

Hidrocoloides o coloides hidrofílicos es la forma en que comúnmente se hace referencia a las gomas. Desde el punto de vista químico son polisacáridos de alto peso molecular, estimado en el orden de varios millones. Sus propiedades los hacen componentes texturales importantes en la formulación de sistemas alimenticios. Las gomas son solubles o dispersables en agua, produciendo espesamiento o gelificación al hidratarse.

Usualmente son clasificadas según su origen: el agar, furcellarén, carragenanos y alginatos se obtienen de algas marinas; la goma arábiga, karaya y tragacanto son exudados de plantas; la goma guar, de algarrobo y tara, a partir de semillas; la carboximetilcelulosa (CMC) y celulosa microcristalina son derivados de la celulosa; la goma xántica es un producto de fermentación microbiana; la gelatina, una proteína derivada del colágeno.

Las características de cada goma se basan en su capacidad de producir un aumento de viscosidad cuando se dispersan en agua. Debido a esta capacidad las gomas tienen una variedad de funciones en los alimentos: ligazón, cobertura, suspensión, estabilización, gelificación, emulsificación, espesamiento. Estas aplicaciones las hacen más útiles en alimentos farináceos, postres preparados, bebidas, postres congelados, confituras, aderezos y salsas, productos lácteos (Igoe, 1982).

Las propiedades funcionales de las gomas se relacionan con su composición, siendo los principales aspectos (Pomeranz, 1985):

a) Componentes moleculares: tipo de monómero (hexosas, pentosas, ácidos urónicos, etc) y configuración del anillo.

b) Grupos funcionales: tipo (carboxilos, ésteres sulfato, fosfatos, metilo, etc.), localización en la molécula y grado de sustitución.

c) Estructura: unión glicosídica, tipo de cadena que origina, grado de ramificación, grado de polimerización y distribución de unidades básicas

d) Conformación espacial: hélice, cinta, asociación, micela, etc.

Los tipos de uniones que gobiernan la formación de geles son

principalmente no covalentes, en particular son importantes los puentes de hidrógeno, las uniones iónicas y las fuerzas débiles del tipo dipolo - dipolo y Van der Waals; éstas últimas son especialmente útiles en las interacciones que desarrollan estos hidocoloides con las proteínas (Cherry, 1982).

1.3.2.1. Goma xántica

Se trata de un polisacárido extracelular que se obtiene de la fermentación de la glucosa por el microorganismo Xantomona campestris. Su composición se basa en un bloque que se repite, constituido por cinco unidades (Fig. 1.10a). La cadena principal se construye sobre dos unidades β -D-glucosa ligadas en 1-->4; hasta aquí esta cadena es idéntica a la celulosa. Las unidades restantes que constituyen las cadenas laterales son: una α -D-manosa, un ácido β -D-glucurónico y una α -D-manosa nuevamente; sobre la primera manosa puede haber una acetilación del carbono 6 y en la manosa terminal puede haber un piruvato en forma de acetal en los carbonos 4 y 6. Si bien la molécula es perfectamente regular en cuanto a la unidad básica descrita, la irregularidad consiste en el grado de acetilación y de piruvatación. Tanto el glucurónico como el pirúvico dan a la molécula un marcado carácter negativo.

La conformación espacial que adopta es una hélice cuyas ramificaciones se pliegan sobre el eje central ejerciendo un efecto protector, por lo que estas moléculas son altamente estables a los ataques enzimáticos. Las hélices están compuestas por cinco bloques que se repiten por vuelta (Fig. 1.10b) (Fiszman, 1989).

Se puede conseguir como sal de potasio, con el potasio sustituido en los grupos carboxilo. Como hay pocos grupos carboxilo en la molécula, en comparación con otras gomas como el alginato, la reactividad de la goma xántica es mínima. Esto se debe también en parte a la configuración física de la molécula. Debido a las cortas cadenas laterales, no puede entrecruzarse utilizando como puente iones divalentes ya que se hace difícil el alineamiento que sí ocurre en otros polisacáridos. Por encima de pH=10, la

goma xántica tiene tendencia a formar geles con Ca^{++} y otros iones polivalentes pero en este rango de pH no existen aplicaciones particulares en alimentos.

La goma xántica se disuelve fácilmente en agua fría o caliente para dar soluciones de alta viscosidad a bajas concentraciones. Las soluciones son más pseudoplásticas que las que se pueden obtener con cualquiera de las otras gomas disponibles, por lo que resulta un buen agente de suspensión aun a bajas concentraciones. Por otro lado, las soluciones son marcadamente resistentes al calor. Pueden mantenerse a elevadas temperaturas por periodos largos sin mayor cambio en la viscosidad. La presencia de sales mejora aún más la resistencia. También resulta completamente estable a las condiciones de congelación y a muy bajas concentraciones (0,1-0,2 %) contribuye sorprendentemente a la estabilización ante procesos de congelación-descongelación de muchos productos que también contienen almidón. Presenta también excelente tolerancia a los cambios de pH, disolviéndose a cualquier pH que pueda encontrarse en productos alimenticios. Es compatible con la presencia de la mayoría de los otros hidrocoloides, incluyendo el almidón. Aunque no es reactiva con la mayoría de las otras gomas, sí reacciona específicamente con la goma de algarrobo para dar un gel.

En cantidades pequeñas, del orden de 0,25 a 0,30 % mejora la estabilidad de emulsiones aceite/agua. Esta estabilidad existirá aun a altas temperaturas debido a la naturaleza pseudoplástica de las soluciones. Esta característica es probablemente la principal razón por la que la goma xántica es tan excelente estabilizante de emulsiones; no actúa de la misma manera que la mayoría de los emulsificantes.

En cantidades aun del orden del 0,1 % da mayor estabilidad ante la congelación y descongelación a los aderezos y salsas en base a almidón, con un marcado control de la sinéresis sin aumentar demasiado el cuerpo del sistema, y permaneciendo la viscosidad del producto terminado constante en un amplio rango de temperaturas (Rocks, 1971).

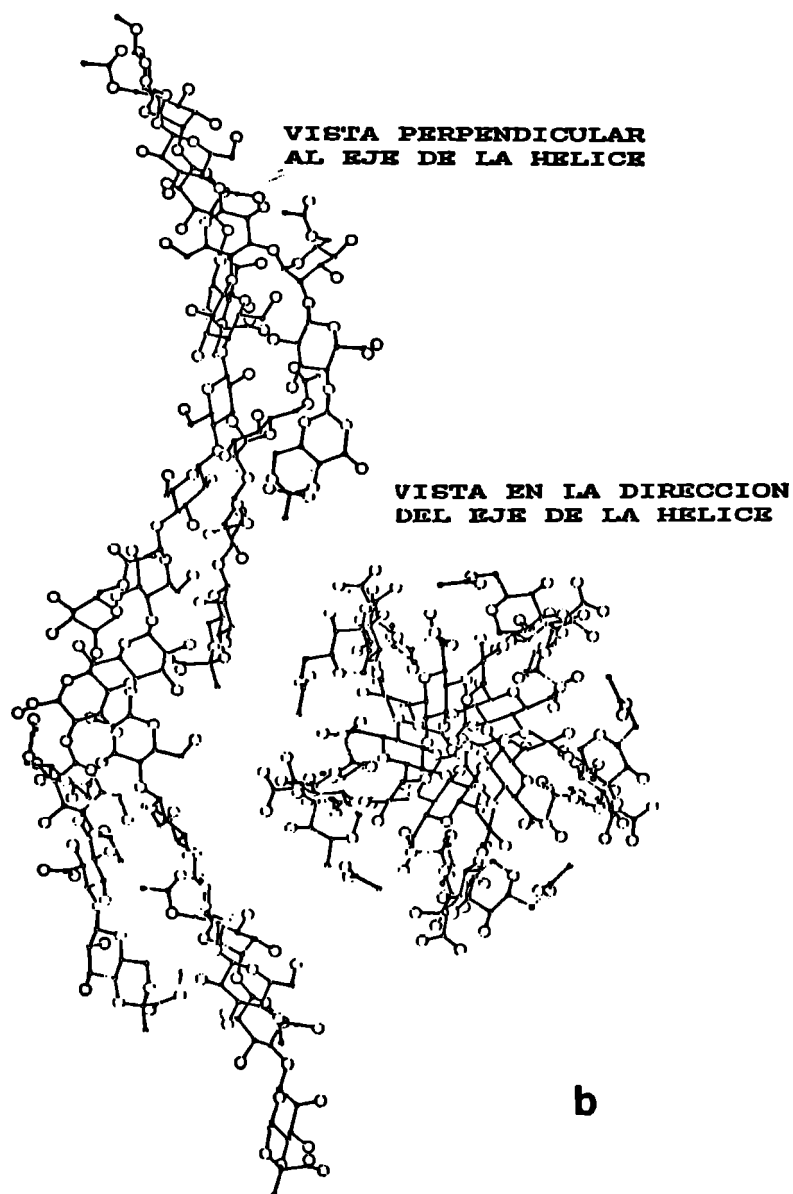
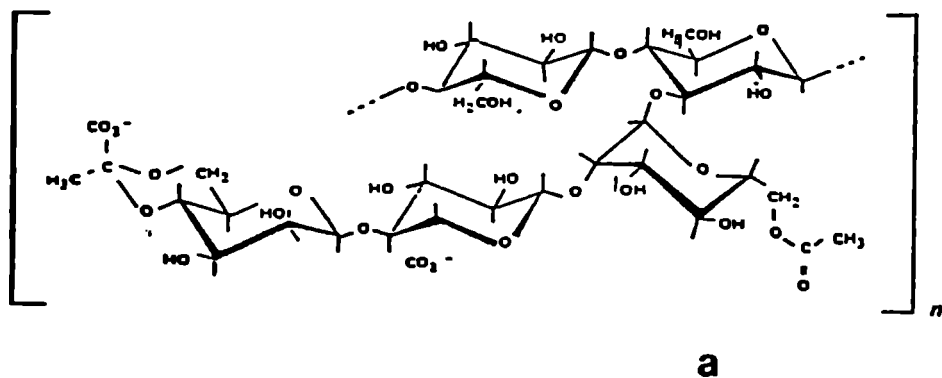


Fig. 1.10. Estructura de la goma xántica. (a) bloque molecular básico (Fizman, 1989); (b) conformación espacial (Glicksman, 1982)

1.4. Congelación

1.4.1. Agua libre y ligada

Existen varios factores que condicionan directa o indirectamente el proceso de solidificación del agua.

El agua en los sistemas biológicos está presente en dos formas, identificadas como "agua libre" y "agua ligada". La primera es la que permite el desarrollo de todos los procesos químicos, biológicos y enzimáticos, mientras que la segunda - que representa sólo del 2 al 5 % del total - está prácticamente fijada a las sustancias no volátiles del sistema mediante puentes hidrógeno y fuerzas de naturaleza electrostática. El agua "ligada" presenta de hecho propiedades distintas del agua libre; menor tensión de vapor, menor temperatura de congelamiento, distinta estructura y orientación molecular. Mientras que el agua pura congelada se dispone según un retículo hexagonal regular, el agua en una solución de hidrocoloides genera una estructura distorsionada.

Desde el punto de vista energético es más favorable para una molécula de agua la formación simultánea de varios puentes de hidrógeno que de uno solo, lo que hace posible la rápida constitución de grupos ordenados ("clusters"). Se trata de entidades estructurales que deben interpretarse de modo puramente estadístico y que se encuentran a un nivel energético más bajo que la molécula aislada (Fig. 1.11a) (Lerici, 1971).

La existencia de estos grupos ordenados puede dificultar la formación del retículo cristalino, lo que explica la facilidad con que es posible subenfriar el agua pura.

La presencia de un soluto provoca alteraciones de la estructura del agua en función de su naturaleza. En torno de un soluto polar existe una región (A) donde el agua no está ligada entre sí por puentes de hidrógeno sino al soluto por uniones de tipo electrostático. Su inmovilidad deriva del bajo nivel energético y entálpico, consecuencia de este tipo de unión.

En una región más lejana (B), las moléculas están sometidas a una interacción demasiado débil para provocar una orientación del momento dipolar pero suficiente para impedir la formación de

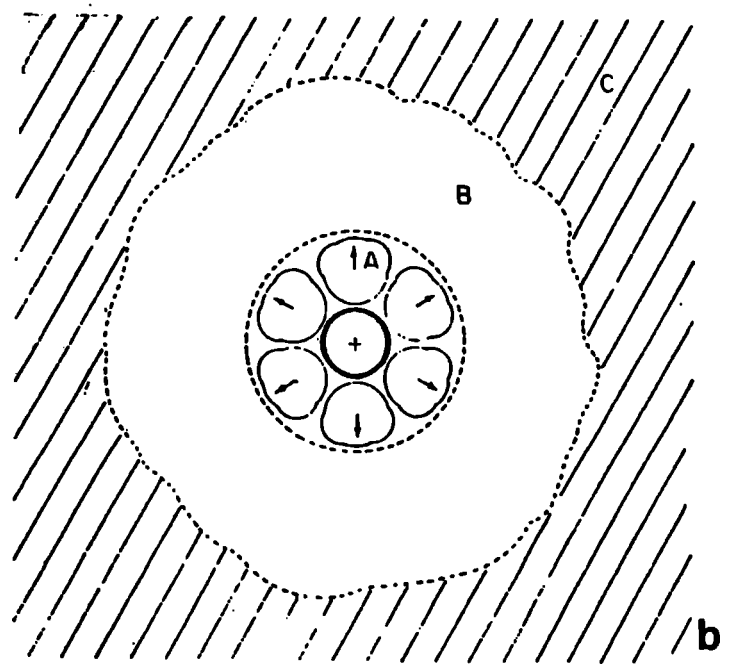
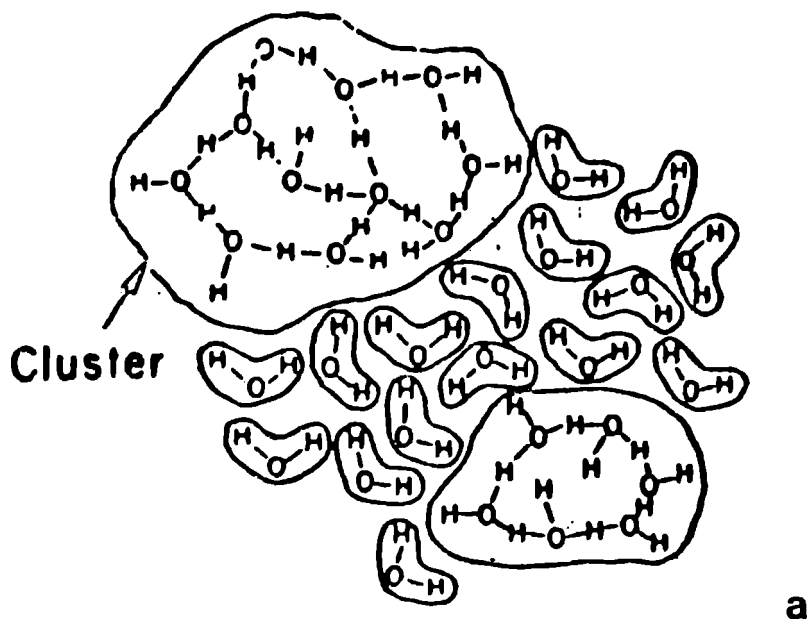


Fig. 1.11. (a) representación esquemática de la estructura del agua líquida; (b) representación esquemática de las regiones que se conforman en torno a un ión (Lerici, 1971)

"clusters". Esta región intermedia es, en la práctica, más desordenada que la de la región más lejana (C), correspondiente a las moléculas de agua que no reciben la acción del ión (Fig. 1.11b).

Muchas de las propiedades físicas de las soluciones de electrolitos son interpretadas teniendo en cuenta la situación de la molécula de agua respecto del campo electrostático creado por el ión. En particular, durante el congelamiento, las moléculas de agua pertenecientes a las regiones A y B no pueden participar libremente de la construcción o crecimiento de los núcleos de hielo, debiendo primero sustraerse a la influencia del campo creado por los iones que tienden a orientarlas a lo largo de una dirección incompatible con aquella prevista en el retículo cristalino del hielo. Esto se traduce en un obstáculo para la cristalización.

1.4.2. Estructura del hielo

La estructura del hielo puro ha sido determinada a partir de estudios que involucran rayos-X, difracción de neutrones y electrones, espectroscopía infrarroja y RAMAN.

La celda unitaria de hielo consiste de 4 moléculas con las siguientes dimensiones a 0°C: 7.37 Å a lo largo del eje C y 4.52 Å a lo largo del eje A. Hay varias formas de describir la celda unitaria del hielo, todas las cuales satisfacen los requerimientos mencionados. Las 4 moléculas por celda unidad están acomodadas de la siguiente manera: las 8 moléculas de las esquinas están cada una compartida por otras 8 celdas; las cuatro moléculas del borde están cada una compartida por otras 4 celdas y las moléculas internas no son compartidas. El número total de moléculas resultantes es $8/8 + 4/4 + 2 = 4$.

La manera en que cada molécula de agua puede asociarse con otras cuatro (número de coordinación 4) es fácilmente visualizada considerando las moléculas no compartidas y sus cuatro vecinas cercanas (Fig. 1.12).

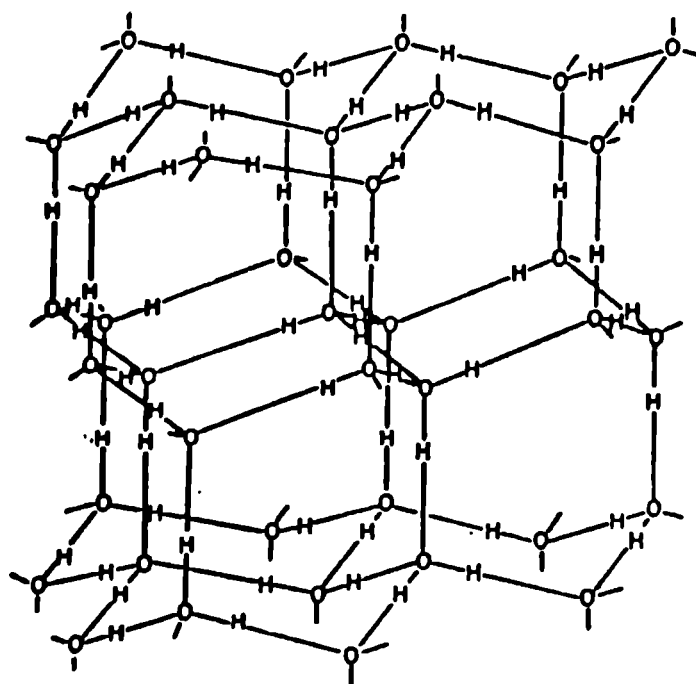


Fig. 1.12. Representación del retículo cristalino de hielo (I) (Lerici, 1971)

El hielo puede existir en 10 estructuras polimórficas cristalinas conocidas y también en un estado amorfo o vítreo de estructura más bien incierta. De las 11 estructuras, el hielo ordinario (I) es la única estable a presión normal a 0°C.

El hielo cúbico (Ic) y el vítreo son estables a presión normal sólo si la temperatura es suficientemente baja.

1.4.3. Cristalización del hielo

La cristalización es la formación de una fase sólida sistemáticamente organizada a partir de una solución, sustancia fundida o vapor. Este fenómeno consta de dos etapas: nucleación y crecimiento cristalino.

La nucleación es la combinación de moléculas en una partícula ordenada de tamaño suficiente para que subsista y sirva como

sitio de crecimiento cristalino.

El crecimiento cristalino es simplemente el agrandamiento del núcleo mediante la adición ordenada de moléculas. En un sistema policristalino, ambos eventos pueden ocurrir simultáneamente (Fennema, 1973).

1.4.3.1. Nucleación

Siempre que no se incorpore ni remueva calor del sistema, el agua y hielo puro pueden coexistir en equilibrio a 0°C. La remoción de calor hace que el agua se convierta en hielo sin necesidad de nucleación, y el sistema puede solidificar totalmente mientras la temperatura se mantiene constante o cercana a 0°C. Si el hielo está inicialmente ausente del sistema, el proceso de solidificación sigue un patrón distinto debido a que la nucleación debe preceder al crecimiento del cristal. Bajo enfriamiento, la temperatura de este sistema invariablemente debe descender por debajo de 0°C antes de la nucleación para que pueda tener lugar la solidificación posterior. Esto sugiere que se debe superar una barrera energética (energía de activación) antes de que ocurra la nucleación.

La barrera energética puede explicarse sobre la base de cambios en la energía libre que acompañan la nucleación. Una ecuación apropiada para este propósito es:

$$\Delta G = (4/3) \pi r^3 \Delta G_p + 4 \pi r^2 \sigma \quad (1.1)$$

donde ΔG es el cambio de energía libre que acompaña la formación de una partícula esférica ordenada, r es el radio de la partícula esférica ordenada, ΔG_p es la diferencia en energía libre entre las fases sólida y líquida en el grado de subenfriamiento bajo consideración y σ es la energía interfacial por unidad de área.

El primer término de la derecha es un término de "volumen" que es siempre negativo por debajo de 0°C (favorece a la nucleación) y se hace cada vez más negativo a medida que aumenta el radio de la partícula. Este término está relacionado fundamental-

mente a la energía libre que es liberada cuando se forman uniones hidrógeno durante la asociación de moléculas de agua en una partícula ordenada. En partículas muy pequeñas, la energía libre liberada por mol es significativamente menor que para partículas mayores, ya que una molécula de la superficie de una partícula con pequeño radio de curvatura tiene muchos vecinos para formar uniones hidrógeno.

El segundo término es un término de superficie, siempre positivo (desfavorable para la nucleación) y se hace cada vez más grande a medida que aumenta el radio de la partícula. Este término se refiere a la energía que debe adicionarse para formar la interfase hielo - agua.

Como los dos términos son de signo opuesto y como el término de energía superficial predomina cuando el radio de la partícula es pequeño, la función ΔG vs. r (Fig. 1.13) pasa por un máximo. Este máximo representa la energía libre de activación de la nucleación a la temperatura bajo consideración. Una partícula con el tamaño correspondiente al máximo ΔG se dice que tiene un radio "crítico" r^* ya que tiene igual probabilidad de crecer o desintegrarse. Las partículas con radio menor que el valor crítico se conocen como "embriones" o "gérmenes" y tienden a desintegrarse mientras que aquellas con radios mayores que el valor crítico se conocen como "núcleos" y tienden a crecer.

La formación de los primeros núcleos de hielo (nucleación homogénea) puede ser interpretada como debida a fluctuaciones estadísticas locales en la densidad y configuración del agua pura que llevan al posible encuentro de regiones con orientación y dimensión de tipo cristalino (por ser un fenómeno estadístico se explica, por ejemplo, que el agua presente en un recipiente de 100 ml difícilmente pueda permanecer líquida por debajo de -5°C mientras que en un dispositivo de diámetro de 0.1 cm puede alcanzar una temperatura de -24°C sin solidificar) (Lerici, 1971).

Chalmers (1977) arribó a una expresión para la velocidad de nucleación en términos de número de núcleos formados por unidad de volumen y tiempo de la siguiente forma:

$$I = A T \exp [-(B T e^2 / \Delta T^2 T)] \quad (1.2)$$

siendo A y B constantes que sólo dependen del sistema, $\Delta T = T_e - T$, el subenfriamiento y T_e , la temperatura de equilibrio.

Esta ecuación es de tipo estadístico y puede apreciarse que a mayor subenfriamiento, mayor será el número de núcleos formados por unidad de tiempo y volumen y que para iguales velocidades de enfriamiento, cuanto menor sea el volumen del sistema, mayor será el tiempo requerido para iniciar la nucleación.

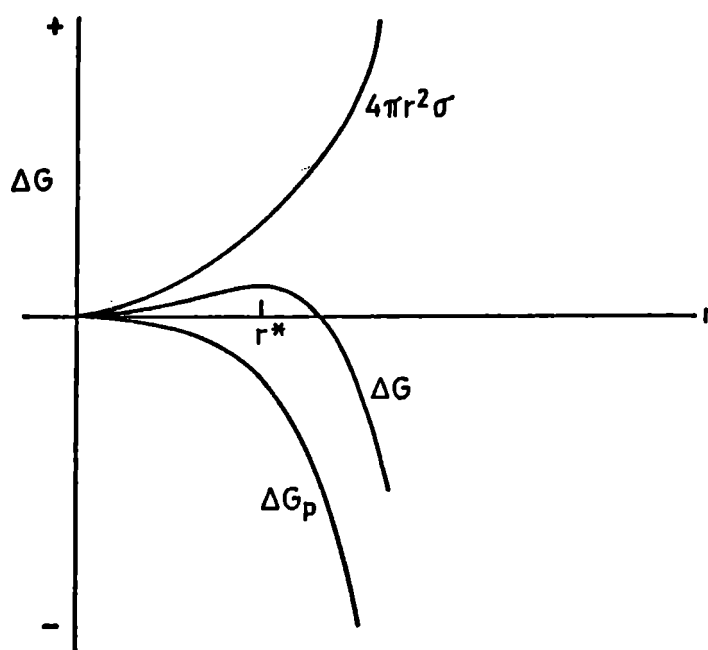


Fig. 1.13. Cambios de energía libre durante la nucleación (Chalmers, 1977)

La nucleación puede ser homogénea o heterogénea. Ambas requieren cierta energía de activación para producirse y se ven favorecidas por el subenfriamiento del sistema. La nucleación homogénea tiene lugar en sistemas puros y requiere grandes subenfriamientos para producirse. La heterogénea (que predomina en alimentos) ocurre en presencia de cuerpos extraños, llamados nucleantes, que disminuyen la energía de activación (E_a), requiriendo por este motivo subenfriamientos menores (Fennema, 1973).

De lo anterior concluimos que el carácter de la nucleación (tipo y número de núcleos por unidad de superficie que se forman)

está fuertemente influenciado por la velocidad de enfriamiento, temperatura y la naturaleza y concentración del soluto.

Si la velocidad está dentro de ciertos límites la molécula de agua tiene tiempo suficiente de disponerse de modo de completar el retículo cristalino mientras que un enfriamiento demasiado rápido provocará formaciones irregulares. El sólido que se forma en estas condiciones es llamado "vítreo" ya que puede considerarse sólo parcialmente cristalino. Un congelamiento rápido conduce a la forma cristalina de esferulita; con un congelamiento lento es posible observar toda la sucesión de formas (prisma hexagonal, estrella, roseta, etc.) que se van compenetrando para constituir finalmente un complejo homogéneo (Lerici, 1971).

1.4.3.2. Crecimiento cristalino

Una vez constituido el núcleo cristalino, comienza su crecimiento, proceso que a diferencia del anterior, sólo requiere un mínimo subenfriamiento. El desarrollo está gobernado esencialmente por (Lerici, 1971):

- a) la transferencia de materia
- b) la transferencia de calor

Con respecto a la primera, la velocidad con que la molécula de agua puede difundir a la superficie del cristal depende de una serie de factores tales como la difusividad del agua en el medio, el grado de agitación (natural o forzada) y la diferencia de densidad entre la zona próxima a la superficie de desarrollo y la zona lejana.

Por otra parte, la remoción de calor requiere un adecuado cambio térmico entre el sistema biológico sometido a congelación y el ambiente externo. El crecimiento de un solo cristal resultará por lo tanto, función de la conductividad térmica del sistema, del grado de mezclado, del gradiente de temperatura existente entre la superficie del cristal y una superficie alejada de ésta.

Si la transferencia de materia y de calor no actúan con la misma intensidad en todos los puntos de la masa involucrada al terminar el proceso se obtendrá una distribución irregular de

cristales en zonas de elevada densidad cristalina (alta nucleación) y otras donde pocos núcleos han podido crecer para formar un verdadero macrocristal (Lerici, 1971). Según Fennema (1973), el crecimiento de soluciones relacionadas con alimentos, involucra un control por transferencia de energía ya que las moléculas de agua son pequeñas, de gran movilidad y están presentes en abundancia salvo en las etapas finales donde cobra importancia la viscosidad del medio o cuando se enfrían piezas muy pequeñas a altas velocidades y bajas temperaturas.

No existe acuerdo acerca de si el crecimiento del cristal procede sólo mediante la adición de moléculas individuales o si mediante la adición simultánea de moléculas individuales y "clusters" previamente formados.

Los cristales presentan sitios defectuosos, que pueden ser puntuales (vacancias intersticiales, sustitución por impurezas) lineales (de borde o espiral) o de superficie (límite de grano). Estos defectos resultan favorables al crecimiento cristalino ya que previenen la formación de caras planas perfectas, generando sitios favorables para el crecimiento, que cobran importancia durante el crecimiento lento de los cristales. Cuando la velocidad de crecimiento es rápida los mecanismos de crecimiento que tienen en cuenta los defectos, cobran menos importancia. Esto es así porque muchas más moléculas se unen al cristal que las que pasan a la fase líquida aumentando así la probabilidad de que dos o más moléculas se orienten sin la ayuda de un defecto cristalino. Este proceso (nucleación bidimensional) facilita el crecimiento en dirección normal a la superficie y el cristal resultante exhibirá más probablemente superficies irregulares.

1.4.3.3. Tamaño cristalino

Resulta bien conocido el hecho de que la congelación rápida de alimentos u otro material de origen biológico produce cristales más pequeños y más numerosos que la congelación lenta del mismo tipo de especímenes (Fennema, 1973).

En la Fig. 1.14 se observa que en un sistema "no sembrado"

mantenido a una temperatura entre el punto de fusión y el punto N se formarán sólo unos pocos núcleos y cada uno crecerá extensamente. Esta situación corresponde a una lenta remoción de energía calórica (congelación lenta), en la cual la temperatura de la muestra permanece cercana a la temperatura de equilibrio sólido-líquido.

Por otro lado, si un sistema "no sembrado" es enfriado a una temperatura bien por debajo del punto N se formarán muchos núcleos y cada uno crecerá sólo hasta cierto límite. El tamaño cristalino final es por lo tanto inverso al número de núcleos.

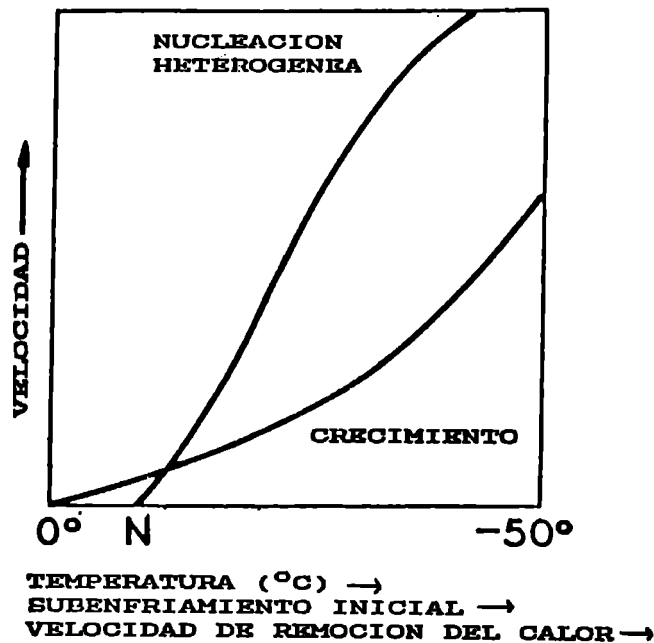


Fig. 1.14. Velocidades comparativas de nucleación y crecimiento cristalino del agua según la influencia del subenfriamiento y velocidad de remoción del calor (Fennema, 1973)

1.4.3.4. Morfología de los cristales de hielo

La apariencia externa o morfología de los cristales, individuales o agregados, es influida por cualquier factor que altere el flujo y posterior unión de la sustancia que cristaliza so-

bre la superficie del cristal. Alguno de estos factores son:

a) condiciones térmicas: grado y uniformidad del subenfriamiento o supersaturación, velocidad y temperatura de enfriamiento.

b) composición del medio de cristalización: naturaleza, concentración y distribución de solvente, solutos, membranas y componentes celulares.

c) condiciones de superficie: curvatura, proximidad de otros cristales, posición y características de las superficies limitantes.

d) características de crecimiento inherentes al cristal.

Tan pronto como se constituyen los núcleos, éstos comienzan a crecer por adición de moléculas sobre la interfase sólido-líquido. La velocidad de crecimiento cristalino se expresa en términos del respectivo avance de fase que es función del subenfriamiento y se puede expresar como:

$$R = B \Delta T^n \quad (1.3)$$

No obstante, habiendo sido definida una interfase sólido-líquido, hay diferentes alternativas de crecimiento de acuerdo a la distribución de temperatura por delante de ella.

Así, si consideramos una interfase agua-hielo, ambos en estado puro (Fig. 1.15a), se observará que con ese perfil de temperatura el crecimiento será estable, dando lugar a una interfase plana. Si por cualquier motivo apareciera una protuberancia en la interfase, el extremo más externo de la misma se encontraría menos subenfriado y crecería por lo tanto más lentamente que el resto de la interfase tendiendo a desaparecer.

Por otro lado, si la distribución de temperaturas en la proximidad de la interfase es la que muestra la Fig. 1.15b, el extremo de la protuberancia encontraría un mayor subenfriamiento y, de acuerdo a la ecuación (1.3) crecería más rápidamente que el resto de la interfase, avanzando más aún y alcanzando subenfriamientos mayores. El resultado será una interfase inestable con ramificaciones que se proyectan por delante de la interfase original. Este tipo de crecimiento es denominado crecimiento dendrí-

tico. La condición de inestabilidad surge del hecho de que la temperatura del líquido decrece a medida que nos alejamos de la interfase ($dT/dx < 0$).

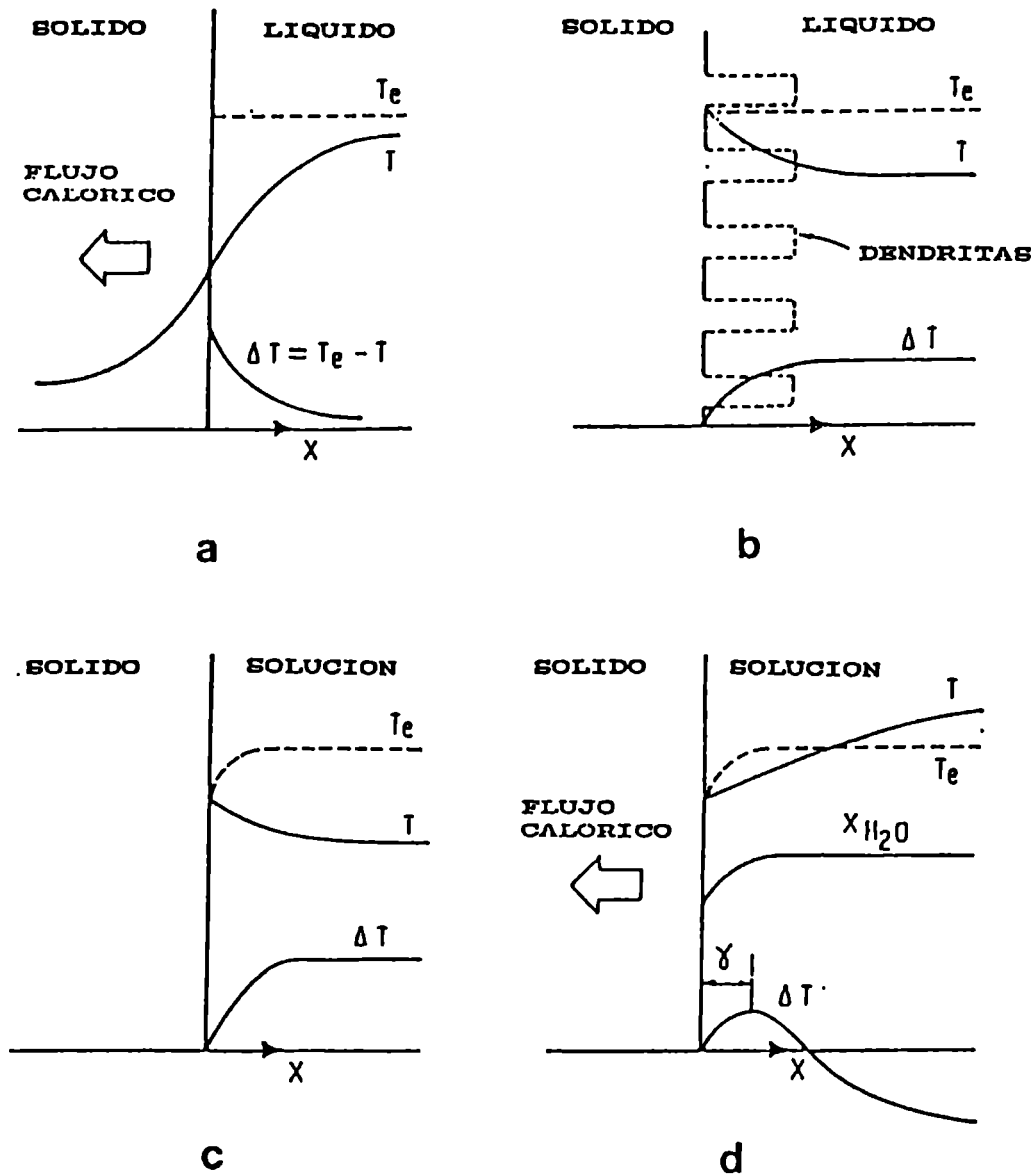


Fig. 1.15. Condiciones alternativas de crecimiento cristalino: (a) Crecimiento estable; (b) crecimiento de dendritas; (c) crecimiento de dendritas térmicas en solución; (d) crecimiento de celdas o dendritas celulares (Calvelo, 1981)

Este comportamiento es extensivo a las soluciones, siempre que los perfiles de temperatura y concentración por delante de la

interfase den lugar a un $d\Delta T/dx > 0$. En ambos casos, líquido puro o solución, el crecimiento es causado por lo que se conoce como subenfriamiento térmico (Fig. 1.15 b y c).

Aun cuando la temperatura aumente en la dirección de la fase líquida ($dT/dx > 0$), la acumulación del soluto por delante de la interfase generando un gradiente de concentración puede permitir la existencia de una zona de espesor γ donde $d\Delta T/dx > 0$ y las condiciones de inestabilidad hacen posible el crecimiento de celdas hexagonales adyacentes y estructuras ramificadas denominadas dendritas celulares. Este tipo de subenfriamiento se denomina constitucional (Fig. 1.15d).

A medida que avanzan ambas, celdas y dendritas celulares están sujetas a un mecanismo de selección donde prevalecen los cristales cuyo eje de máximo crecimiento coincide con la dirección del gradiente térmico.

En la Fig. 1.16 se muestra las tres áreas: a) de nucleación; b) de crecimiento dendrítico libre; c) de crecimiento de dendritas celulares o celdas.

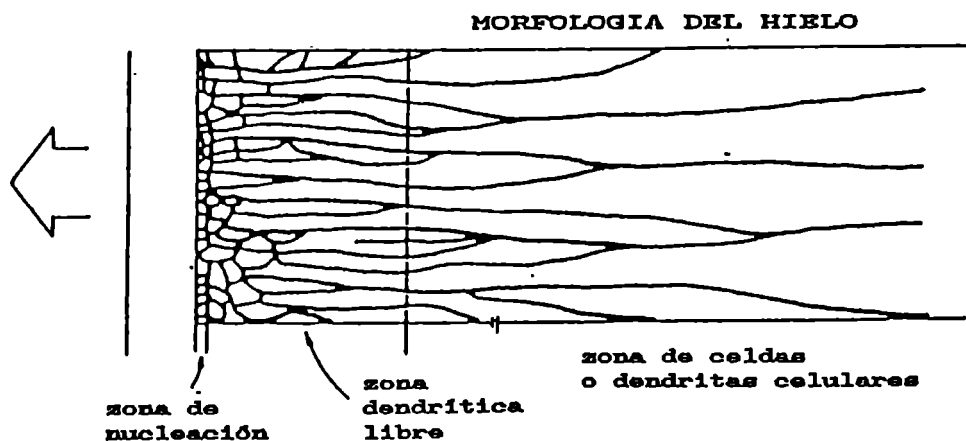


Fig.1.16. Morfología de los cristales de hielo durante las etapas iniciales de la congelación. La flecha indica el sentido del flujo calórico (Calvelo, 1981)

El grado de subenfriamiento determina el tipo de morfología cristalina que pueda encontrarse tanto en agua o soluciones acuosas, ya que no existen diferencias esenciales entre los hábitos de hielo formados a partir de una u otra (Macklin y Ryan, 1966). Bajo las condiciones de la Fig. 1.15a y bajas velocidades de congelación se presentarán superficies continuas y planas. Se trata de casos difíciles de obtener ya que la diferencia con respecto al punto de congelación no puede ser mayor de $0,6^{\circ}\text{C}$ (Lusena y Cook, 1953,1954; Williamson y Chalmers, 1967).

Con subenfriamientos térmicos moderados (Fig 1.15b y c) o constitucionales (Fig. 1.15d) y velocidades de enfriamiento mayores ($15^{\circ}\text{C}/\text{cm}$) pueden obtenerse superficies continuas e irregulares de tipo dendrítico celular y simetría hexagonal (Holmes y col., 1957; Plaskett y Winegard, 1959; Tiller, 1964; Harrison y Tiller, 1963).

Con velocidades de enfriamiento grandes y bajas temperaturas (lo que generalmente se logra en especímenes pequeños) se obtienen interfases discontinuas. En alimentos congelados o especímenes de origen biológico de más de 1 cm^3 , teniendo en cuenta las velocidades de remoción de calor y subenfriamientos que pueden lograrse, sólo se encontrarán estructuras hexagonales (placas, estrellas, rosetas).

1.4.4. Velocidad y tiempo de congelación de los alimentos

La predicción y control del tiempo de congelación ha sido siempre de gran importancia en la industria como factor de influencia en la calidad del producto y además, porque dicho tiempo determina la capacidad de producción y por ende, la economía del proceso.

Por tratarse los alimentos de sistemas complejos, si bien la formación de los primeros cristales de hielo en la superficie del producto puede utilizarse para señalar el inicio de la congelación, no es posible definir con la misma claridad el punto final. Esto se debe a que el agua en un alimento no congela toda a la misma temperatura (Fig. 1.17). En condiciones de equilibrio y a

temperaturas inmediatamente por debajo del punto de congelación, siempre queda una cierta fracción de agua en estado líquido. Esta fracción se hace menor a medida que desciende la temperatura y pueden separarse mezclas eutécticas pero incluso a temperaturas comparativamente reducidas aún existe agua sin congelar.

De acuerdo a un criterio que toma como referencia la calidad del producto, se puede definir el tiempo de congelación como aquel requerido para que se forme la mayor cantidad de hielo en el mismo. Así, el Instituto Internacional del Frío (1972) define el tiempo de congelación nominal de un producto de dimensiones especificadas, a una temperatura inicial de 0°C, como el tiempo que tarda el centro térmico en alcanzar una temperatura 10°C por debajo del punto de congelación inicial. Se supone que en ese momento se consigue virtualmente la total formación de hielo. El centro térmico de una pieza es el punto que tiene la temperatura más alta al final del proceso de congelación.

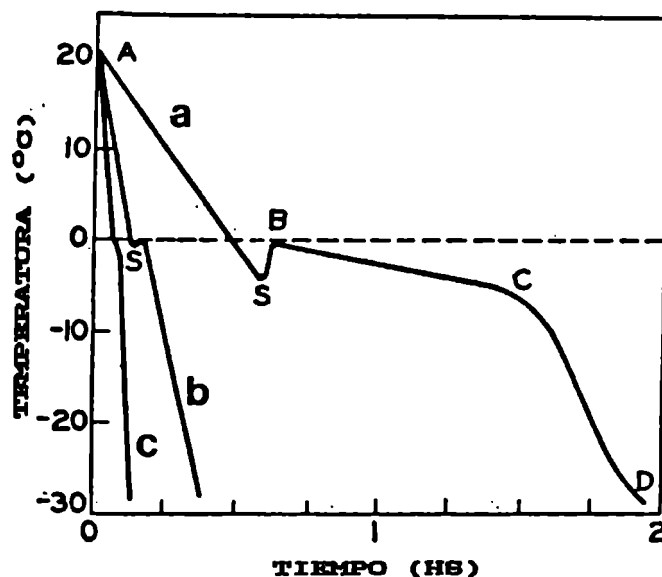


Fig.1.17. Esquema de curvas de congelación típicas de alimentos y materiales biológicos congelados a diferentes velocidades. La velocidad de enfriamiento aumenta de la curva (a) a la (c). S=subenfriamiento (Fennema, 1973)

Desde un punto de vista práctico, se puede definir el tiempo de congelación característico (t_c) como el tiempo que tarda un punto del alimento en pasar de la temperatura de inicio de congelación a -10°C , teniendo en cuenta que en un producto de regular tamaño las zonas en contacto con el medio refrigerante están sometidas a mayor velocidad local de congelación que las correspondientes al interior del mismo.

A partir de los tiempos de congelación pueden definirse velocidades globales de congelación, las que dependen no sólo de la masa de producto a congelar y sus propiedades térmicas (calor específico y conductividad térmica) sino también de la temperatura del medio refrigerante, del procedimiento de refrigeración y de la naturaleza del material constituyente del envase, si lo tuviera (Lawrie, 1974).

Según la definición del Instituto Internacional del Frio (1972) la velocidad media de congelación (V_c) es la relación entre la mínima distancia desde la superficie al centro térmico y el tiempo transcurrido entre que la superficie alcanza 0°C y el centro térmico 10°C menos que la temperatura inicial de congelación. Esta velocidad se expresa en cm/h y es la velocidad promedio de avance del frente del hielo durante la congelación.

1.4.5. Equipos de congelación

En la Tabla 1.3 se presentan las distintas velocidades de congelación que se pueden lograr con equipos de uso común en la industria (IFF, 1972).

Para la congelación de productos envasados para la venta, velocidades mayores que $0,5 \text{ cm/h}$ se consideran satisfactorias; para la congelación rápida individual (IQF), se deberían utilizar velocidades mayores que 5 cm/h .

Los equipos de congelación pueden clasificarse según que el medio de transferencia de calor sea: 1) gaseoso (cámaras, túneles, lecho fluidizado); 2) metálico (placas); 3) líquido (congelado por inmersión); 4) líquido a temperatura de cambio de fase (nitrógeno o freón).

Tabla 1.3. Velocidades y equipos de congelación

Tipo de congelación	Velocidad de congelación según IIR (cm/h)	Instalaciones
Lenta	0,2-0,5	Cámara estanca
Rápida	0,5-3,0	Túneles de frío, placas
Muy rápida	5-10	IQF, lecho fluidizado
Ultra-rápida	10-100	Rociado o inmersión en líquidos criogénicos

Mientras que las cámaras y túneles admiten toda clase de productos (con o sin envoltorio), en bloque o individuales, las placas y los congeladores por inmersión sólo aceptan productos envueltos y el nitrógeno líquido y freón sólo son usados para congelación individual.

Congelación mediante gases fríos: pueden realizarse en sistemas continuos (túneles, lecho fluidizado) o discontinuos (cámaras). Los congeladores discontinuos se usan sólo cuando la cantidad de material a congelar es reducida. Tienen la ventaja de que se pueden congelar alimentos de formas irregulares y además se lo puede hacer individualmente. Los problemas de transferencia de masa entre el fluido refrigerante y el alimento quedan limitados a la evaporación de humedad en los productos sin envasar. La principal desventaja radica en los menores coeficientes de transmisión del calor respecto a los congeladores de placa o inmersión. Las temperaturas del aire están generalmente entre -20 y -40°C y sus caudales pueden variar de 0,5 a 18 m³/s.

Cuanto mayor es la velocidad del aire, mayor es el coeficiente de transferencia de calor.

Congelación por contacto con un sólido frío: el producto es presurizado hidráulicamente entre placas de metal por las que circula líquido refrigerante. Las placas se montan en paralelo, en sentido horizontal o vertical; éste último caso es comúnmente usado para productos deformables sin envasar. Este tipo de congelación se sustenta en una muy buena transferencia de calor, que se refleja en menores tiempos de congelación siempre que el producto sea en sí mismo un buen conductor. Por otro lado, esta ventaja puede verse reducida en la medida en que se aumente el espesor del producto.

Congelación por inmersión en un líquido frío: presenta básicamente tres ventajas; pueden obtenerse elevados coeficientes de transmisión del calor entre el sólido y el líquido, hay una mayor versatilidad en cuanto a la forma del alimento pudiéndose congelar con igual facilidad alimentos de formas regulares o irregulares y permite efectuar congelación individual.

1.5. Recristalización del hielo durante el almacenamiento congelado

El control del tamaño y forma cristalinos sería relativamente fácil si los cristales una vez formados fueran estables. Desafortunadamente, son inestables, es decir, durante el almacenamiento congelado sobrellevan cambios metamórficos a los que denominamos en conjunto "recristalización". Este término incluye cualquier cambio en el número, forma, tamaño, orientación o perfección del ámbito de los cristales que sucede una vez que se ha completado la solidificación inicial.

La recristalización ocurre debido a que los sistemas tienden a un estado de equilibrio en el que la energía libre (G) sea mínima y el potencial químico se iguale entre todas las fases. La energía libre de una fase cristalina se hace mínima cuando su estructura es perfecta y su tamaño es infinito (carece de límites). En un sistema real esto se traduce como el tamaño y forma de

equilibrio que pueden alcanzar los cristales.

Existen distintos tipos de recristalización: a) iso-másica b) migratoria c) por aglomeración o adherencia d) inducida por presión y e) irruptiva. Las más comunes en alimentos son b) y c).

La recristalización iso-másica se refiere a cualquier cambio en la forma o estructura interna de un cristal individual que permita reducir el nivel de energía. Por ejemplo, ocurre cuando un cristal de forma irregular y con gran relación superficie/volumen (dendritas) asume una estructura más compacta.

La recristalización migratoria, también conocida como "crecimiento de grano" se basa en la tendencia que presentan los cristales más grandes de un sistema policristalino a crecer a expensas de los más pequeños. Como posibles mecanismos para que esto ocurra se pueden mencionar: fusión-difusión-recongelación o sublimación-difusión-condensación. El resultado es un incremento en el tamaño cristalino promedio, una disminución del número de cristales y de la energía superficial del conjunto de la fase cristalina. Los cristales más pequeños al tener una muy alta curvatura, no pueden unir moléculas de agua a su superficie tan firmemente como los grandes. Exhiben por lo tanto un punto de fusión más bajo y mayor solubilidad que los grandes.

La recristalización por aglomeración es la que se produce cuando cristales en contacto se unen para dar un cristal único, resultando así un incremento del tamaño cristalino medio, una disminución del número de cristales y de la energía superficial de la fase cristalina. Un mecanismo probable es el de difusión.

En el caso de la recristalización inducida por presión, crecen preferencialmente los cristales cuyos planos basales están alineados en la dirección de la fuerza aplicada, a expensas de otros con orientaciones desfavorables. La probabilidad de que ocurra este tipo de recristalización es mayor en especímenes grandes, en los que se pueden desarrollar grandes presiones durante la congelación.

Finalmente la recristalización irruptiva se produce cuando las condiciones de congelación llevan a un estado parcialmente no cristalino, que al sufrir un aumento de temperatura hasta un cierto punto crítico, permite la aparición abrupta de cristales.

En especímenes de alto contenido de agua y viscosidades iniciales bajas (la mayor parte de los alimentos) resulta poco probable que las velocidades usadas conduzcan a este tipo de estado, no completamente cristalino.

1.6. Descongelación

La descongelación de un alimento o material biológico es más lenta que la congelación. Si un cuerpo se descongela, el calor de fusión tiene que transmitirse por conducción a través de una capa de producto descongelado, mientras que en la congelación se transmitía a través de una capa de producto congelado. Como la conductividad térmica del agua es unas 4 veces menor que la del hielo y la difusividad térmica 8 veces menor, durante la descongelación la masa congelada llega rápidamente a una temperatura ligeramente inferior a 0°C pero a continuación la gran cantidad de calor necesario para la fusión sólo se transmite muy lentamente a través de la capa acuosa que se forma en el exterior. Durante todo este tiempo el producto permanece en torno a 0°C y esto no es favorable debido a que queda expuesto a concentraciones relativamente altas de solutos; se facilita la recristalización del hielo y el desarrollo de microorganismos psicrófilos. De esto se desprende que sea aconsejable una descongelación rápida.

1.7. Congelación y almacenamiento de pastas de almidón

Scharling en el año 1844 informaba que en un sistema conteniendo almidón que fuera sometido a un proceso de congelación y descongelación se producía una separación de solución clara y material de estructura esponjosa.

Hanson y col.(1951) estudiaron el efecto de diversos factores (homogeinización, tipo de espesante, temperatura de congelación, almacenamiento y descongelación) en la formulación y procesamiento de salsas blancas destinadas a comidas congeladas. Partiendo de una formulación básica (4,6 % de espesante, 4,6 % de

aceite vegetal hidrogenado, 90,2 % de leche descremada y 0,6 % de sal) efectuaron diversos ensayos almacenando a distintos tiempos y temperaturas. Adjudicaron al tipo de espesante el rol principal en la inestabilidad observada (producción de exudado y desarrollo de aspecto cortado o arenoso). El uso de almidones y harinas ricos en amilopectina minimizaba el deterioro, concluyendo los autores que la inestabilidad era causada por la retrogradación de la amilosa, de allí que el uso de almidones céreos podría evitar este efecto. Por otro lado, estos almidones o harinas presentaban la desventaja de tener una estructura extensible, poco adecuada para salsas.

En 1959, Osman y Cummisford corroboraron los resultados de Hanson y col. e indicaron también como principal factor de inestabilidad la retrogradación de la amilosa. Por otro lado demostraron que otros constituyentes naturales de las formulaciones, tales como proteínas de harina y de leche ejercían un efecto estabilizante, de allí que las salsas blancas preparadas a partir de harina de arroz céreo mostraran mayor estabilidad que las de almidón de arroz céreo frente a los procesos de congelación-descongelación.

Hood y Siefried (1974), usando almidones químicamente modificados demostraron que los cambios ultraestructurales ocurrían durante el almacenamiento congelado y que la magnitud de estos cambios dependía más de las fluctuaciones de temperatura que del tiempo de almacenamiento. Los cambios ultraestructurales fueron atribuidos por los autores a la retrogradación del almidón (principalmente de la amilosa aunque señalan también el rol de la amilopectina) y con ello se explicaba que el uso de almidón modificado químicamente, minimizara la sinéresis al evitar estéricamente el acercamiento de las cadenas lineales de amilosa.

Por otro lado, aunque mencionado en menor medida en la literatura, existiría otro fenómeno que influye en el deterioro de pastas congeladas lentamente. Schulze y col. (1964) informaron que durante la congelación de pastas de almidón en cámara a $-2/-3^{\circ}\text{C}$ se formaba un coacervato. Este fenómeno es coloidal, es decir independiente del tipo de partículas dispersas y no debe confundirse con la retrogradación. Se trata de la separación de un sol

en dos soles: uno más rico en material coloidal dispersado que el otro, observándose una masa esponjosa y un líquido claro en equilibrio. Tanto la amilosa como la amilopectina pueden dar lugar a la formación de coacervatos. El único requisito es que una apreciable fracción del almidón esté en estado coloidal y que se alcance una relación crítica agua-almidón. Esto último se logra durante la congelación lenta al separarse parte del agua como hielo.

Trabajos más recientes (Suzuki y col., 1977) han centrado su atención en las condiciones de congelación y el agregado de estabilizantes con el fin de obtener productos estables que puedan ser comercializables. Los estudios de estos autores demostraron que la cantidad de líquido separado así como los cambios de viscosidad eran menores cuando la congelación era rápida y que esto también influía en la conservación posterior a bajas temperaturas: el deterioro durante el período de almacenamiento congelado era menor en las muestras que habían sido congeladas rápidamente. El agregado de un hidrocoloide estabilizante (alginato de sodio) aunque minimizó el deterioro, no tuvo el efecto esperado.

Kikuchi e Izutsu (1981) trataron de obtener una salsa blanca estable en base a harina de trigo, reconociendo la formación de una estructura densa (agregada), como la descrita por Schulze, durante la congelación. Estos autores utilizaron velocidades de congelación lentas.

Un trabajo más reciente (Przybyl y col., 1983) trató de relacionar los cambios macroscópicos observados en salsas blancas congeladas con la formación de cristales de hielo. Estos autores utilizaron pastas de harinas, almidón de papa, amilosa y amilopectina, haciendo hincapié en el tratamiento térmico de las pastas y su influencia en la retención de agua por parte del sistema. Encontraron que cuanto mayor era la velocidad de congelación y descongelación, menor era el volumen de exudado. Confirmaron que la retrogradación era un fenómeno típico de los sistemas ricos en amilosa y que la homogeinización conducía a salsas más estables, así como un aumento de la cantidad de espesante en la formulación disminuía la producción de exudado.

Los estudios microscópicos de estos autores revelaron que

las muestras homogeneizadas preparadas a partir de harina de trigo y grasa mezclados previamente (roux) y congeladas a -25°C presentaban cristales más pequeños y uniformes, similares a muestras preparadas de la misma forma pero no homogeneizadas.

En general la literatura existente en torno a este tema se ha centrado siempre en la observación y cuantificación de los fenómenos macroscópicos (exudado, viscosidad, cambios estructurales) otorgándole un rol fundamental al espesante y al fenómeno de retrogradación, involucrado con el mismo. No obstante, son pocos los estudios que traten de relacionar los cambios observados no sólo a la retrogradación del almidón sino también a la formación de cristales de hielo durante la congelación y su posterior recristalización durante el almacenamiento.

1.8. Acción de los hidrocoloides en productos congelados

Según lo resumido por Shuman (1960), los hidrocoloides tendrían efecto sobre el crecimiento cristalino de tres maneras:

a. Si el hidrocoloide es compatible, puede unirse por sí mismo a la superficie del cristal, alterando así el crecimiento normal del cristal. Para que haya compatibilidad, los posibles puntos de formación de unión en el hidrocoloide, deben estar espaciados de tal forma que se adecúen dichos espaciamientos a los posibles sitios de formación de enlaces en el cristal. En el caso de enlaces iónicos, los puntos posibles de formación de la unión en el hidrocoloide serían grupos tales como los carboxilos. Así, estando negativamente cargados, tendrían que adecuarse a sitios cargados positivamente en el cristal. En el caso de enlaces hidrógeno, grupos tales como oxhidrilos en el hidrocoloide deberían adecuarse a las posiciones de los átomos de oxígeno u otros átomos convenientes en el cristal. Debido a la probable falta de compatibilidad en la mayoría de las combinaciones cristal-hidrocoloide, este efecto no es tan común como los otros.

b. Una segunda forma de acción es la competencia entre el hidrocoloide y el cristal por los bloques moleculares que pueden

constituir el cristal. El mismo término "hidrocoloide" indica la tendencia de estos materiales a ligar agua. El crecimiento de los cristales de hielo competiría con cualquier hidrocoloide en solución por las moléculas de agua. Por ejemplo, cada molécula de gelatina en solución puede bloquear 2500 moléculas de agua.

Un incremento de la viscosidad usualmente acompaña a la competencia. Las moléculas ligadas por el hidrocoloide no sirven ya como moléculas de solvente y por lo tanto la concentración de solutos se ve incrementada. El aumento de la viscosidad podría tener un efecto retardador por sí mismo en el crecimiento del cristal.

c. Una tercera acción es la combinación de los hidrocoloides con las impurezas que de otra manera afectarían el crecimiento del cristal. Por ejemplo, un hidrocoloide que se combine con Ca^{++} eliminaría su bien conocido efecto en la cristalización de azúcar.

Resumiendo, el efecto de los hidrocoloides sería triple:

- compatibilidad
- competencia
- combinación

Recientemente, trabajos de algunos autores (Budiaman y Fennema, 1986; Reid y col., 1987) han cuestionado la eficacia de los hidrocoloides para evitar la formación y recristalización del hielo en productos congelados, aunque todavía no hay pruebas concluyentes en uno u otro sentido.

1.9. Objetivos

Del punto anterior se desprende el rol fundamental del espesante y de los hidrocoloides en el proceso de deterioro sufrido por los sistemas a base de almidón gelatinizado destinados a platos preparados congelados, así como la importancia demostrada por las condiciones de congelación de los mismos.

En el presente trabajo se eligieron como sistemas de estudio pastas de almidón de maíz y de harina de trigo, dos de los espesantes universalmente utilizados para la formulación de sistemas

de cobertura y que, a diferencia de los almidones químicamente modificados son de fácil obtención. Los objetivos planteados fueron:

Desde un punto de vista básico:

- Estudiar las variaciones en la producción de exudado y comportamiento reológico (cambios macroscópicos) en suspensiones de almidón de maíz y de harina de trigo gelatinizados congelados a diferentes velocidades y almacenados a distintas temperaturas. Estos temas serán desarrollados en los Capítulos 3 y 4.

-Relacionar los cambios macroscópicos observados con los fenómenos de recristalización del hielo y retrogradación del almidón, cuyo estudio se desarrollará en los Capítulos 5 y 6, respectivamente.

-Estudiar el efecto del agregado de un estabilizante (hidrocoloide) con el fin de cuantificar su acción a nivel macroscópico y microscópico.

Desde un punto de vista tecnológico este estudio permitirá:

-Evaluar las ventajas de utilizar la incorporación de estabilizantes a las formulaciones de este tipo de sistemas frente al empleo de otras alternativas tecnológicas para lograr mayor vida útil del producto, tales como el uso de altas velocidades de congelación.

CAPITULO 2

**MATERIALES Y METODOS
DE CONGELACION**

2.1. Preparación de suspensiones de distintos tipos de almidón gelatinizado

Para el presente trabajo se utilizaron como espesantes almidón de maíz común comercial (Refinerías de Maíz S.A.) y harina de trigo 000 (Molinos Río de la Plata S.A.), con las especificaciones que se detallan en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1. Composición de los espesantes utilizados

	Almidón de maíz	Harina de trigo
agua	11,3	12,5-13
proteínas	0,3	9-11
lípidos	0,6	1,5
cenizas	0,3	0,6
fibras	-	0,6
amilosa/amilopectina (*)	25/75	25/75

Nota: valores expresados en % p/p en base húmeda salvo (*)

Datos provistos por Refinerías de Maíz S.A. y Molinos Río de la Plata S.A.

Para obtener una pasta de forma reproducible, varios factores deben ser cuidadosamente controlados durante el proceso de preparación, por ejemplo: temperatura inicial, velocidad de aumento de temperatura, máxima temperatura alcanzada, velocidad de agitación, tiempo de calentamiento, pH y calidad del agua utilizada (Härröd, 1989).

Se prepararon dos clases de pastas, con y sin agregado de goma xántica (hidrocoloide estabilizante). La goma xántica utilizada (Saporitti Hnos. S.A.C.I.F.) respondía a las siguientes especificaciones: humedad, 11%; cenizas, 9%; pH en solución al 1%, 7,0 viscosidad (solución al 1% en ClNa al 1%), 1400cps; contenido máximo de arsénico (como As), 3 ppm; contenido máximo de plomo y otros metales pesados (como Pb), 29 ppm.

Como dispersante se utilizó agua destilada, preparándose partidas de 400 g en recipientes cilíndricos de vidrio de 7 cm de diámetro y 10 cm de altura.

El método de preparación utilizado fue el siguiente:

a. suspensión en frío de 40 g de almidón en 360 gramos de agua destilada

b. calentamiento en baño termostatzado a $90 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 10 minutos con agitación mecánica permanente a 680 rpm mediante un huso helicoidal.

Las velocidades de calentamiento fueron de $17^{\circ}\text{C}/\text{min}$ al rango de temperatura más bajo (30 a 50°C) y $8^{\circ}\text{C}/\text{min}$ en el rango de gelatinización ($62\text{--}72^{\circ}\text{C}$). La mezcla alcanzó los 80°C en aproximadamente 6 minutos y permaneció a una temperatura promedio de 83°C durante 4 minutos. La temperatura fue medida en el centro y en el borde del batch mediante termocupla cobre-constantan registrándose la historia térmica por medio de un registrador Gilson N2 (Francia). El gradiente de temperatura hallado entre el borde y el centro del batch fue de 2°C . El tipo de agitación elegida para la preparación trató de satisfacer la necesidad de minimizar el gradiente de temperatura entre el borde y el centro del recipiente y el daño ocasionado a la suspensión.

El proceso de gelatinización fue seguido con microscopio de luz polarizada (Leitz Ortholux II con cámara Leitz Vario Orthomat, Leitz, Alemania) para verificar que todos los gránulos hubieran perdido la característica Cruz de Malta (Fig. 2.1). El grado de gelatinización final fue tal que todos los gránulos perdieron su birrefringencia, aumentaron su volumen y se rompieron parcialmente, pero sin llegar a perder su identidad (Fig. 2.2a). Este grado de gelatinización corresponde a una zona cercana al máximo de viscosidad posible para este tipo de pastas ya que coexisten gránulos semidesintegrados con la amilosa liberada al medio. Dado que el modelo bajo estudio es de aplicación directa en la industria de comidas preparadas como parte integrante de los sistemas de cobertura a los que se hizo referencia en el Capítulo 1, se realizaron ensayos para verificar si el grado de

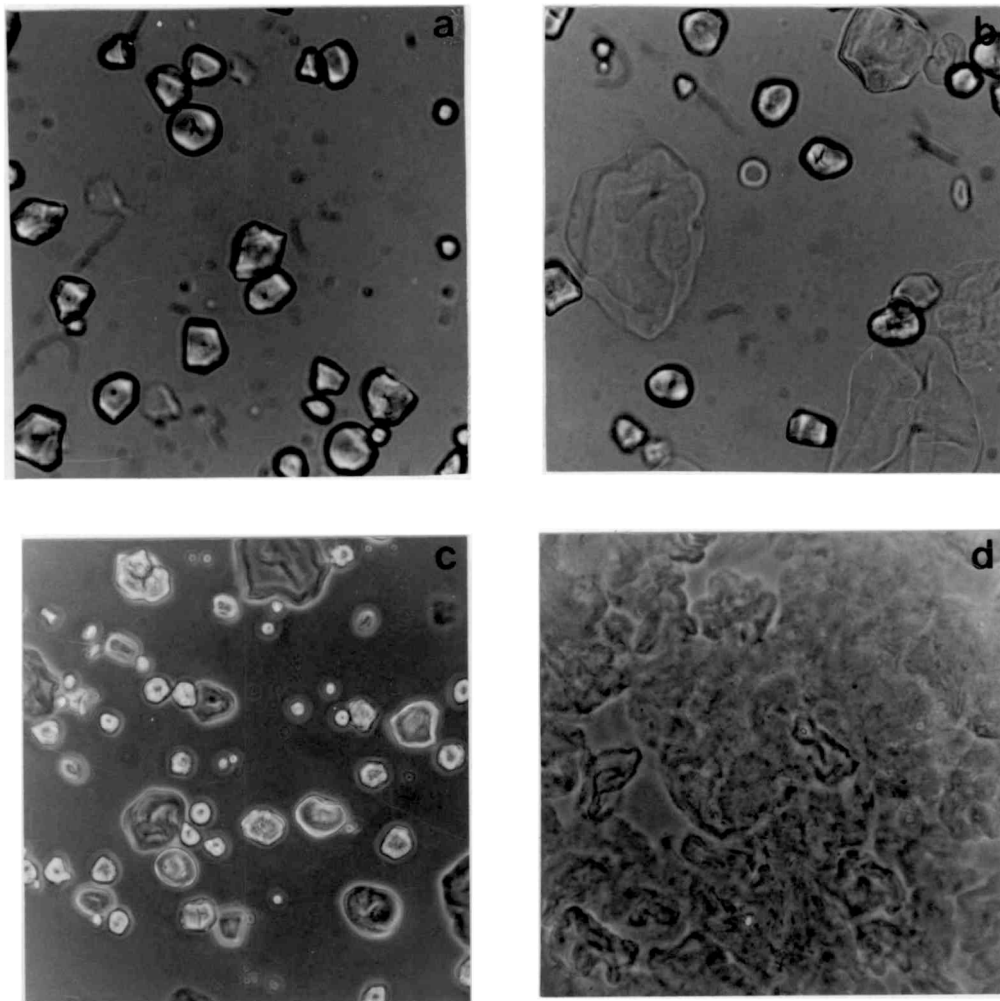


Fig. 2.1. Secuencia de gelatinización de una suspensión de almidón de maíz (10 % p/p).

(a) sin gelatinizar (60°C); (b) y (c) parcialmente gelatinizado (65°C); (d) totalmente gelatinizado (75°C)

(a) y (b): micrografías tomadas con luz polarizada. (c) y (d): micrografías obtenidas con contraste de fases. \longleftrightarrow = 20 μ m

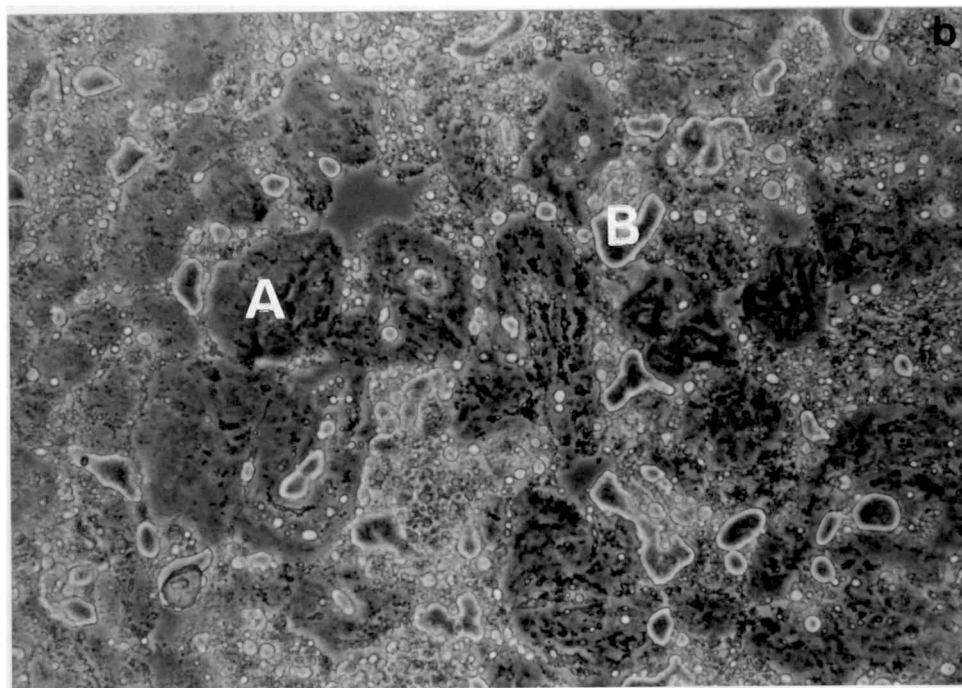


Fig. 2.2. Comparación del estado del gránulo de almidón en el sistema modelo almidón-agua (a) y en un sistema de cobertura completo (b) correspondiente a una misma concentración de espesante (10 % p/p). A: gránulo de almidón; B: glóbulo de grasa.

Micrografías obtenidas en contraste de fases. $\text{---} \text{---} \text{---} = 25 \mu\text{m}$.

gelatinización del almidón en el sistema completo era similar al obtenido en el sistema almidón - agua. En la Fig. 2.2b se muestra una micrografía correspondiente a una salsa blanca (10 % almidón de maíz, 10% aceite vegetal parcialmente hidrogenado, 80 % leche descremada) cuya concentración de espesante es igual a la del modelo utilizado. En ella se puede apreciar el estado de los gránulos de almidón que, como en el sistema modelo, han perdido su birrefringencia y se encuentra semidesintegrados.

En todos los casos la concentración de espesante fue del 10 % p/p ($\pm 0,3$). Para estimar las pérdidas de agua durante la preparación se realizó un control de concentración sobre cada partida mediante determinaciones de extracto seco. Para estas determinaciones se utilizó una balanza Mettler LP 16 provista de una unidad infrarroja de secado sobre una balanza PE300 con impresora GA44 (Mettler Instrumente AG, CH-8606 Grefensee, Suiza).

Las pastas de harina de trigo se prepararon en idénticas condiciones pero el tiempo total de preparación fue de 25 minutos para lograr el mismo grado de gelatinización que en el caso de pastas de almidón de maíz, y por lo tanto a un grado similar de desintegración granular. En este caso, las velocidades de calentamiento fueron de 17°C/min entre 30 y 50°C, 8,3 °C entre 50 y 62°C y 3,3°C/min entre 62 y 78°C, siendo el rango de gelatinización de la harina de 52 a 78°C. La mezcla alcanzó los 80°C en 8 minutos y fue mantenida a una temperatura promedio de 83°C durante 17 minutos.

En el caso de las pastas con agregado de hidrocoloide, se eligió la concentración del mismo (0,3 % p/p) de acuerdo a lo recomendado en literatura (Kuchenbecker, 1986) y a las especificaciones adjuntadas por los distribuidores. El procedimiento seguido fue el siguiente:

- a. suspensión de la goma xántica (1,2 gramos) en tres cuartas partes del total de agua a utilizar (aproximadamente 270 ml)
- b. disolución del hidrocoloide mediante calentamiento (no más de 40°C) con agitación constante durante 15 minutos hasta lograr una solución clara y homogénea
- c. suspensión del almidón o harina en el resto del agua ob-

teniéndose una pasta homogénea a la que fue incorporada la suspensión anterior

d. preparación de la pasta como en los casos anteriores con un tiempo de calentamiento de 10 a 25 minutos según que el espesante fuera almidón o harina de trigo

El orden seguido en esta preparación fue determinado de acuerdo a ensayos previos, en donde se verificó que el mayor grado de homogeneidad del sistema, relacionado con una total disolución de la goma xántica, se obtenía suspendiendo a ésta previamente e incorporándola a la pasta almidón-agua.

2.2. Congelación y almacenamiento de las muestras

Los detalles del procedimiento de congelación de las muestras serán dados en los capítulos correspondientes ya que cada muestra fue adecuada en tamaño y cantidad al ensayo para la que estuviera destinada. Todas las congelaciones fueron controladas con termocuplas de cobre-constantan y los datos registrados con un equipo Datalogger Fluke 2240C (USA).

De las curvas de temperatura en función del tiempo se obtuvieron las velocidades de congelación expresándolas según las definiciones del Instituto Internacional del Frío dadas en el primer capítulo.

Las congelaciones fueron realizadas en cámaras a distintas temperaturas (-20 y -80°C), de aire estanco, y cámara Deware con N₂ líquido para realizar congelaciones por inmersión. Para las descongelaciones se utilizaron: 1) cuarto climatizado a 20°C (± 0,5°C) y 2) baño termostático Haake F3 (Alemania) de temperatura regulable, con precisión de décima de grado. Los almacenamientos se realizaron en cámaras de -5, -10 y -20°C (±0,5°C), sometidas a controles periódicos de temperatura durante todo el tiempo en que se prolongaron los ensayos.

CAPITULO 3

PRODUCCION DE EXUDADO

3.1. Fenómeno de sinéresis en pastas de almidón

El fenómeno de sinéresis es uno de los que más atención ha recibido en el estudio de pastas de almidón. Es indispensable, para la comprensión adecuada de este fenómeno, el conocimiento de la microestructura del sistema. Muchas proteínas y polisacáridos tienen la capacidad de formar geles que pueden retener hasta un 99 % de agua. En la estructura gelificada final se considera que el agua posee diversos grados de movilidad. La mayor o menor facilidad que ésta tenga para "escapar" de la masa del gel depende de numerosos factores, entre ellos se puede mencionar: la naturaleza química del polímero, el tipo de red formada, las condiciones de hidratación y de enfriamiento, la presencia de solutos, etc.

El mecanismo que produce la sinéresis no es del todo conocido. La formación del gel conlleva un cierto grado de agregación, pero si éste continúa más allá de cierto punto podemos encontrar-nos ante dos situaciones: si las interacciones son uniformes en toda la masa, se producirá contracción acompañada por expulsión de agua; si predominan las interacciones localizadas se formará una estructura gruesa y también disminuirá la capacidad de retención de agua (Hermansson, 1986).

En particular, nos interesa la expulsión de agua que se produce tras el proceso de congelación-descongelación de un gel de almidón.

El objetivo del presente capítulo fue analizar el efecto de la velocidad de congelación y el agregado de hidrocoloide en la producción de exudado a partir de geles de almidón de maíz y harina de trigo.

3.2. Metodología para la cuantificación de exudado

3.2.1. Congelación, almacenamiento y descongelación de las muestras

Las pastas utilizadas fueron preparadas en la forma descrip-

ta en el Capítulo 2. A los efectos de comparar los resultados con los de un almidón genética y químicamente modificado de uso recomendado para alimentos congelados, se prepararon pastas de almidón Polar Gel N°5 (Amaizo, USA) de la forma descripta para el almidón de maíz común. En el caso del almidón de maíz común y harina de trigo se prepararon pastas con y sin agregado de hidrocoloide estabilizante (goma xántica).

Se pesaron alicuotas de 5 gramos de pasta en dispositivos cilíndricos de plástico, de fondo removible, de 2,5 cm de diámetro. El espesor de las muestras resultó de 1,5 cm. Cada muestra fue congelada en dicho dispositivo, en forma individual y envuelta en Parafilm con el objeto de evitar deshidrataciones durante el almacenamiento congelado.

Las velocidades de congelación ensayadas fueron: 0,3 cm/h ($t_c=150$ minutos); 0,6 cm/h ($t_c=65$ minutos) y 270 cm/h ($t_c= 0,03$ minutos) clasificables como congelación lenta (cámara), rápida (túnel) y ultra-rápida (líquido criogénico) respectivamente. Las primeras se lograron en cámaras de -20 y -80°C respectivamente; la tercera por inmersión en N_2 líquido.

El monitoreo de las condiciones de congelación se efectuó según lo descripto en el Capítulo 2. Las muestras fueron congeladas hasta una temperatura final de -20°C , estabilizadas durante 12 hs a esa temperatura y trasladadas a cámaras de almacenamiento a -5 , -10 y -20°C . La cuantificación del líquido exudado se realizó en las muestras recién congeladas, y a la primera, cuarta y octava semana de almacenamiento congelado. La descongelación en todos los casos se realizó en cámara climatizada a 20°C . Al respecto se tomaron en cuenta, estudios de Chan y Toledo (1976) quienes informaron la ausencia de efecto de la velocidad de descongelación sobre la capacidad de retención de agua del gel.

3.2.2. Fundamentos del método de cuantificación de exudado utilizado

Los métodos comunes para la medición de la capacidad de retención de agua se basan en la aplicación de una fuerza externa

como presión, centrifugación o succión capilar de un material poroso en contacto con la muestra. La cantidad de agua liberada dependerá de las condiciones experimentales y estas tienen, por lo tanto, que ser cuidadosamente consideradas en cada caso. El factor más importante es mantener un mínimo grado de deformación posible durante la medición. Las deformaciones pueden ocasionar cambios estructurales en el material que alteren su capacidad de retener agua. Por ejemplo, al aplicar fuerzas de centrifugación altas o presiones, las estructuras débiles pueden romperse completamente durante la medición y en tales casos se obtiene información acerca de las subfracciones formadas más que de la estructura como un todo (Hermansson, 1986).

En este sentido, el método de succión capilar por contacto de la muestra con un medio poroso adecuado es uno de los que menos manipulación involucra. En el presente trabajo, se utilizó una modificación del método "Blotter" diseñado para derivados de tomate (Baidón y col., 1987). Cada muestra descongelada fue desmoldada -mediante remoción del fondo del envase- sobre un cuadrado de papel de filtro Whatman N°1 de 15 cm de lado, previamente secado en estufa hasta peso constante, dejándola en contacto durante un minuto. Se midió el avance del anillo de humedad, tomado como índice de sinéresis; los resultados se expresaron según:

$$\% \text{ de exudado} = \frac{D - D_1}{D_0} \times 100 \quad (3.1)$$

donde D: diámetro del halo formado por una muestra congelada y descongelada en las condiciones descriptas; D₁: diámetro del halo formado por la muestra sin congelar; D₀: diámetro del halo al iniciarse el contacto con el papel de filtro.

Los diámetros equivalentes de los halos se midieron con un analizador de imágenes Morphomat 30 (Zeiss, Alemania). Se define como diámetro equivalente el de un círculo de igual superficie que la del halo formado. Los ensayos se realizaron por triplicado y se expresaron las medidas en mm.

Los factores a analizar fueron: velocidad de congelación, tiempo y temperatura de almacenamiento, agregado de estabilizante. Los resultados fueron sometidos a un análisis de varianza y la significación estadística de las diferencias se determinó mediante un test de menor diferencia significativa (LSD) con un nivel de 95 % de confianza.

3.3. Resultados y discusión

En la Figura 3.1 se puede observar el efecto de la velocidad de congelación y el agregado de hidrocoloide sobre la producción de exudado en pastas de almidón de maíz y de harina de trigo. El resultado observado fue diferente según el sistema analizado. En el caso de pastas de almidón de maíz, la congelación por inmersión en N₂ líquido produjo un porcentaje de exudado que no presentó diferencia significativa ($P = 0,05$) con el observado en muestras congeladas rápido (0,6 cm/h) mientras que las muestras congeladas lentamente (0,3 cm/h) produjeron cantidades significativamente mayores.

En cambio, en el caso de las pastas en base a harina de trigo, no se hallaron diferencias significativas entre los niveles de exudado obtenidos a través de congelación rápida o lenta pero sí resultó significativamente inferior el exudado correspondiente a congelación en N₂ líquido (33 % menos). Se observa que bajo las tres velocidades de congelación utilizadas, los niveles de exudado obtenidos para las pastas de harina fueron menores que los correspondientes a las de almidón de maíz, lo que puede relacionarse con una mayor retención de líquido por parte de los gels de harina debido a la presencia de proteína.

Las proteínas son capaces de ligar grandes cantidades de agua mediante la formación de uniones puente de hidrógeno entre los grupos polares de las cadenas laterales y las moléculas de agua. Los grupos funcionales de las proteínas que intervienen en este tipo de uniones son: carboxilo, amino, imidazol, carbonilo, sulfhidrilo, hidroxilo y guanidina (Sosulski, 1977).

La capacidad de retención de agua es una de las propiedades

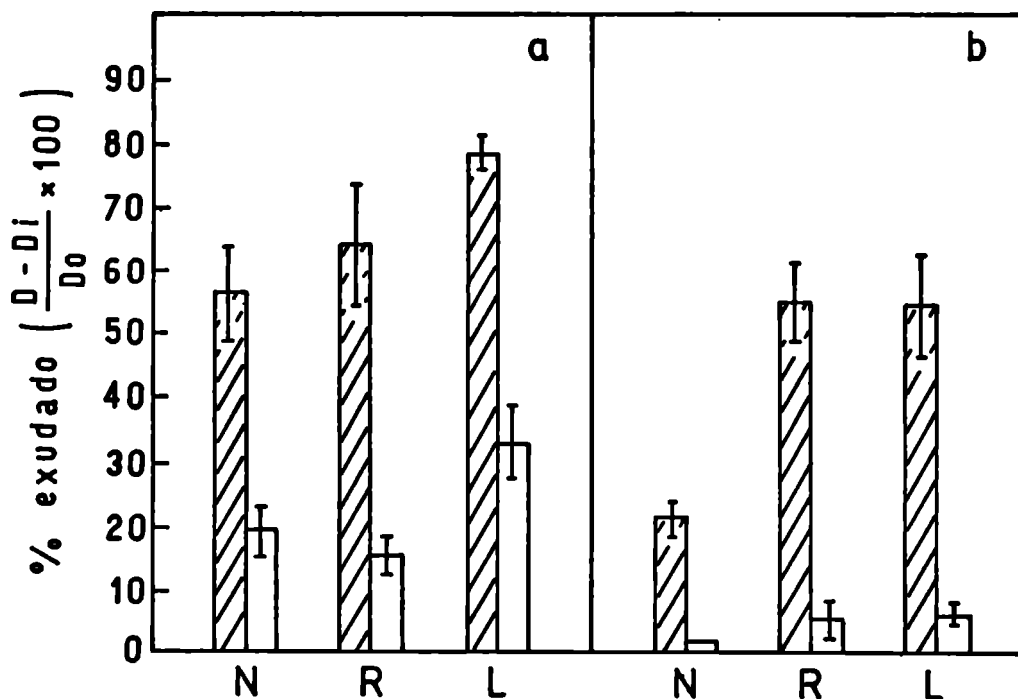




Fig. 3.1. Efecto de la velocidad de congelación y el agregado de goma xántica en la producción de exudado en pasta de almidón de maíz (a) y harina de trigo (b). N = congelado por inmersión en N₂ líquido (270 cm/h). R = congelado a 0,6 cm/h. L = congelado a 0,3 cm/h.  sin goma xántica  con goma xántica. Las barras indican los errores standard

funcionales de las proteínas que incide en su comportamiento durante el procesado y almacenamiento de productos alimenticios, afectando la calidad y aceptación de los mismos. En particular, es bien conocida la capacidad de hidratación de las principales proteínas de la harina (gliadina y glutenina) (Pomeranz, 1985). Esta característica juega un rol fundamental en alimentos como pan y salsas. En los primeros trabajos sobre estabilidad de salsas blancas congeladas (Hanson y col., 1951; Osman y Cummisford, 1959) ya se había reportado una menor separación de líquido en aquellas preparadas en base a harina de trigo respecto a las formuladas con almidón.

En todos los casos, el agregado de goma xántica como estabilizante, condujo a una marcada disminución de la sinéresis. En particular, para las pastas de harina, la presencia combinada del hidrocoloide y la proteína tiene como consecuencia una muy baja producción de exudado (menor o igual al 5 % en todos los casos).

En la Fig. 3.2 se pueden comparar los resultados de exudado obtenidos a dos temperaturas de almacenamiento usuales (-10 y -20°C) y dos tiempos (1 y 8 semanas) para muestras de almidón de maíz común y harina de trigo sin agregado de estabilizante congeladas ultra-rápido y rápido y con agregado de hidrocoloide congeladas rápido y lento. Se muestran además los resultados obtenidos para pastas de almidón modificado Polar Gel a dos velocidades de congelación: rápida y lenta. No se han representado los valores de exudado correspondientes a pastas con goma xántica congeladas por inmersión en N₂ líquido ya que no presentaron diferencia significativa respecto a las pastas con estabilizante congeladas rápido.

Se observa que, en el caso de las pastas de almidón, los niveles de exudado aumentan a tiempos largos de almacenamiento pero, en aquellos casos en que se incorporó goma xántica y se mantuvo la temperatura de almacenamiento a -20°C, el incremento en la producción de exudado no fue significativo tras ocho semanas. Las pastas de almidón almacenadas a -10°C no presentaron, aun a la octava semana de almacenamiento, una producción de exudado significativamente diferente a las almacenadas a -20°C.

Las pastas de harina de trigo mostraron a tiempos largos, un

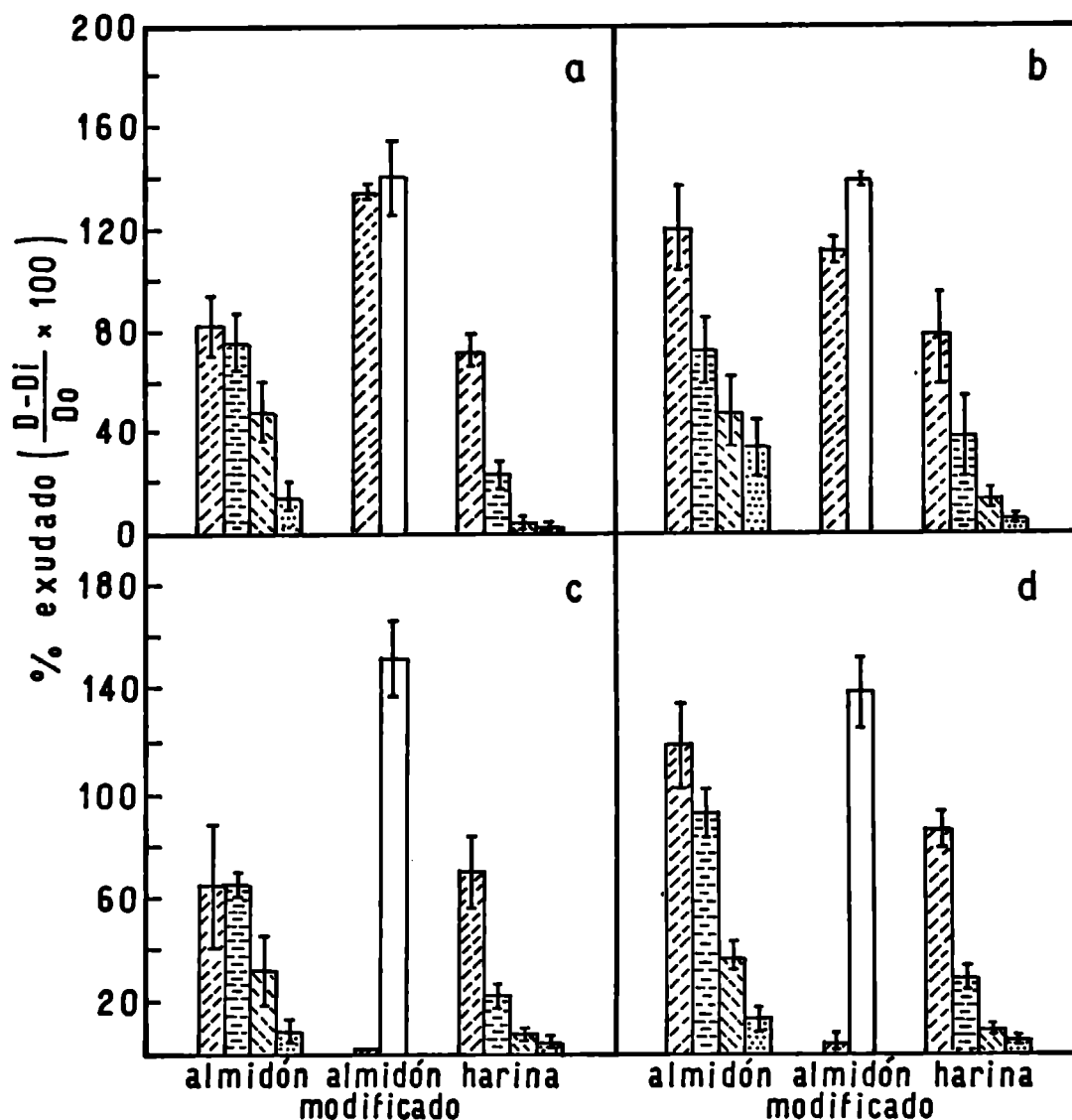







Fig. 3.2. Producción de exudado en pastas de almidón de maíz común y harina de trigo (con y sin agregado de estabilizante) y almidón de maíz modificado Polar Gel congelados a distintas velocidades y almacenados (a) 1 semana a -10°C ; (b) 8 semanas a -10°C ; (c) 1 semana a -20°C ; (d) 8 semanas a -20°C .  congelado a 270 cm/h, sin agregado de goma xántica.  congelado a 0,6 cm/h, sin agregado de goma xántica.  congelado a 0,3 cm/h, sin agregado de goma xántica.  congelado a 0,6 cm/h con agregado de goma xántica.  congelado a 0,3 cm/h con agregado de goma xántica. Las barras indican los errores standard.

menor grado de separación de fases que las de almidón de maíz. A la octava semana de almacenamiento se encontraron diferencias significativas entre el porcentaje de exudado producido por pastas almacenadas a -10°C respecto a las pastas almacenadas a -20°C , lo que parece indicar una mayor incidencia de la temperatura de almacenamiento en la sinéresis de las pastas de harina en comparación con las espesadas con almidón de maíz. Asimismo, el agregado de hidrocoloide permitió obtener, en ambos casos, pastas con niveles muy bajos de producción de exudado inclusive a tiempos largos de almacenamiento.

Las pastas preparadas en base a almidón modificado Polar Gel, (a pesar de ser un producto importado recomendado para alimentos congelados) presentaron, tras una semana de almacenamiento a -10°C , valores de exudado muy altos (1,4 veces el valor inicial). Estos valores superan notablemente los obtenidos para pastas de almidón de maíz y harina con estabilizantes para el mismo tiempo y temperatura de almacenamiento. En este sentido no se halló ventaja, desde el punto de vista de la producción de exudado, en el empleo de Polar Gel como espesante frente, por ejemplo, a la utilización combinada de altas velocidades de congelación (inmersión en N_2 líquido) y almidón de maíz común o harina de trigo cuando la temperatura de almacenamiento utilizada fue de -10°C .

A -20°C , los resultados obtenidos con pastas de Polar Gel (congelado rápido) son comparables a los de pastas de harina con estabilizante congeladas a la misma velocidad (inferiores a 10 %) pero los valores correspondientes a pastas congeladas a baja velocidad son mucho más altos aun a la primera semana de almacenamiento que los obtenidos en los otros casos. De aquí se desprende que la baja velocidad de congelación, así como la temperatura de almacenamiento empleada, afectan notablemente la capacidad de retención de agua del Polar Gel.

En la Fig. 3.3 se comparan los porcentajes de exudado para pastas de almidón de maíz con y sin estabilizante, congeladas a dos velocidades (rápido y lento) y almacenadas a distintas temperaturas (-5 , -10 y -20°C). El análisis de varianza efectuado a cada tiempo de almacenamiento confirmó que los valores de exudado

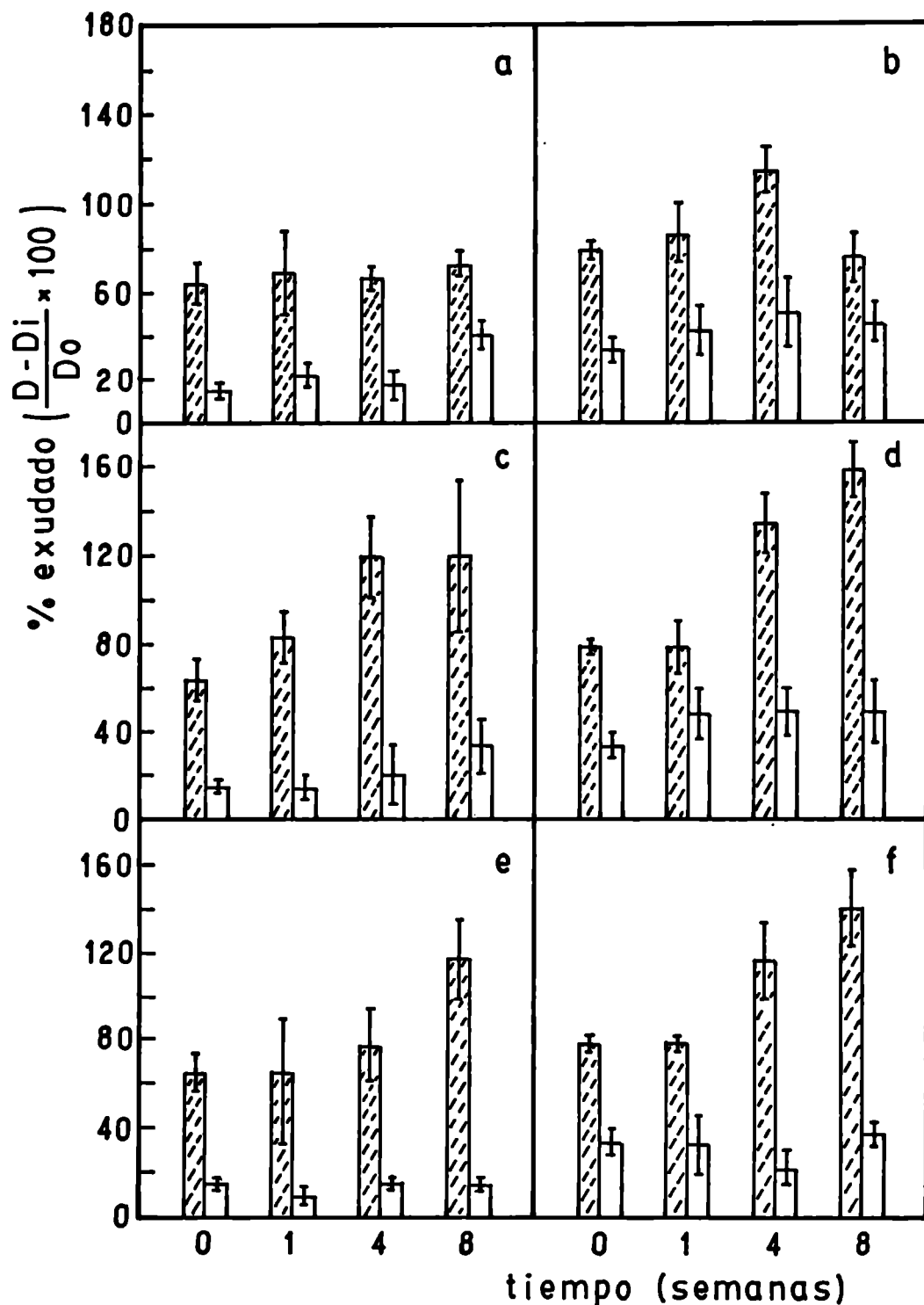


Fig. 3.3. Producción de exudado en función de tiempo y temperatura de almacenamiento de pastas de almidón de maíz común con y sin agregado de estabilizante, congeladas a distintas velocidades.

(a), (c) y (e) congeladas a 0,6 cm/h y almacenadas a -5, -10 y -20°C, respectivamente.

(b), (d) y (f) congeladas a 0,3 cm/h y almacenadas a -5, -10 y -20°C, respectivamente.

▨ sin agregado de goma xántica □ con agregado de goma xántica.
Las barras indican los errores standard.

correspondientes a muestras congeladas a distintas velocidades mantienen entre sí diferencias significativas a lo largo de todo el almacenamiento congelado. Resultados en el mismo sentido fueron obtenidos para salsas blancas congeladas por Suzuki y col. (1977) quienes demostraron que la cantidad de líquido separado era menor cuando la congelación era rápida y que esto también influyó en la conservación posterior a bajas temperaturas: el deterioro durante el período de almacenamiento congelado era menor en las muestras que habían sido congeladas rápidamente.

El agregado de estabilizante, como se observa en la Figura y que fue corroborado por el análisis de varianza, resultó un factor de incidencia significativa.

La menor producción de exudado encontrada en las muestras almacenadas a -5°C se debe a la formación de una estructura porosa tipo esponja. Como ya fuera descrito por otros autores (Schulze y col. 1964, Suzuki y col. 1977), esta estructura aparece cuando se emplean bajas velocidades de congelación, pero es importante recalcar que las muestras congeladas rápido, que no presentaron los mencionados cambios durante la congelación en sí, desarrollaron la estructura tipo microesponja durante el almacenamiento a -5°C . No fue así con las muestras congeladas por inmersión en N_2 líquido o aquellas que tenían estabilizante. En los casos en que se produjo este cambio de estructura durante el almacenamiento a -5°C , los niveles de exudado fueron menores que los obtenidos a temperaturas más bajas de almacenamiento (-10 y -20°C). Una posible explicación es que este tipo de matriz (microesponja), al retener el agua más firmemente por capilaridad, reduce los niveles aparentes de exudado. En este caso, la cuantificación del líquido exudado no sirve como parámetro de deterioro ya que, aunque el sistema ha sufrido un cambio en su textura que lo hace inaceptable, los niveles aparentes de exudado se mantienen bajos.

Por otro lado, no se encontró una diferencia significativa en la producción de exudado para muestras almacenadas a -10 y -20°C . Las muestras que habían sido congeladas lentamente presentaron mayores niveles de exudado que las sometidas a congelamiento rápido.

En cuanto a los cambios de textura, si bien sólo durante el almacenamiento a -5°C se formó la estructura tipo esponja, se observaron otro tipo de cambios bajo las otras condiciones. Las pastas sin hidrocoloide almacenadas a -10 ó -20°C presentaban una textura más granulosa que las que tenían hidrocoloide. Estas, además de no desarrollar esponjosidad a ninguna de las temperaturas de almacenamiento ensayadas, tenían una consistencia más suave y homogénea.

Los resultados del almacenamiento a distintas temperaturas para pastas de harina de trigo se muestran en la Fig. 3.4. Al igual que en el caso de las pastas de almidón, el desarrollo de una estructura tipo esponja a -5°C (con excepción de las pastas congeladas en N_2 líquido y aquellas con goma xántica) condujo a valores aparentes de exudado menores que los esperados. El análisis de varianza dio como resultado un efecto muy significativo del agregado de estabilizante y la existencia de una interacción entre éste y el factor temperatura de almacenamiento.

En aquellos casos donde se había incorporado goma xántica, al no formarse la estructura tipo esponja, las muestras almacenadas a -5°C , produjeron una cantidad significativamente mayor de exudado que las conservadas a -10 ó -20°C lo que mostró que el efecto del mencionado hidrocoloide tiene poca incidencia cuando las temperaturas de almacenamiento son altas.

Chan y Toledo (1976) relacionaron la capacidad de retención de agua con los cambios físicos ocurridos durante la congelación. Estos autores observaron que la mayor disminución en la capacidad de retención de agua ocurría durante el cambio de fase en sí y no en el enfriamiento previo o posterior atemperado. El cambio estructural observado por ellos y otros autores (Schulze y col., 1964; Suzuki y col., 1977; Kikuchi e Isutzu, 1981) -formación de una estructura porosa tipo microesponja- fue atribuido por Chan y Toledo a la retrogradación del almidón sugiriendo que la fase más severa de este fenómeno tenía lugar simultáneamente con la formación de cristales de hielo, influyendo el largo del período de cambio de fase y la manera en que tenía lugar la formación de los cristales. Por otro lado, no hallaron un efecto significativo de las condiciones de congelación sobre el grado de

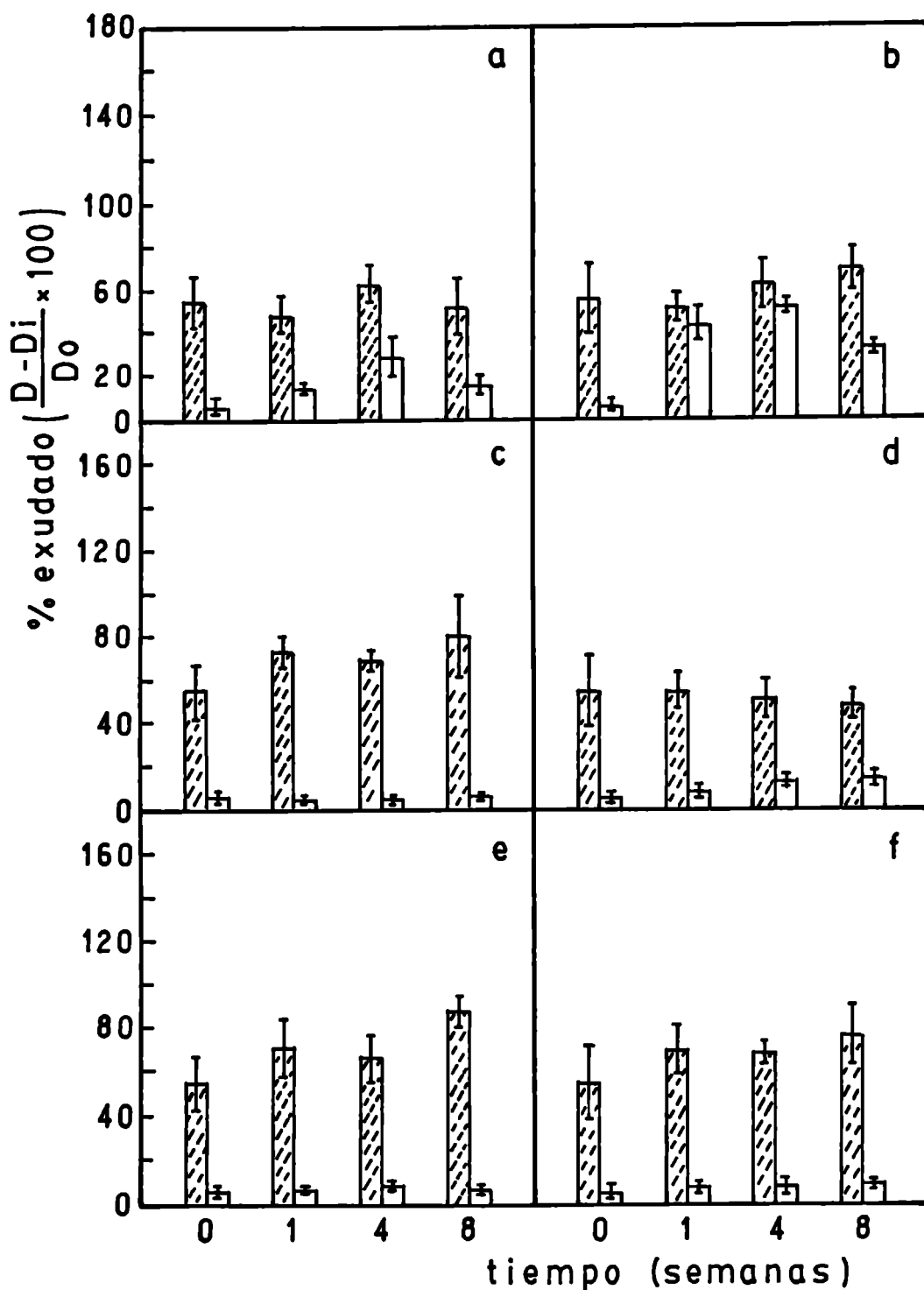


Fig. 3.4. Producción de exudado en función de tiempo y temperatura de almacenamiento de pastas de harina de trigo con y sin agregado de estabilizante, congeladas a distintas velocidades.

(a), (c) y (e) congeladas a 0,6 cm/h y almacenadas a -5, -10 y -20°C, respectivamente.

(b), (d) y (f) congeladas a 0,3 cm/h y almacenadas a -5, -10 y -20°C, respectivamente.

▨ sin agregado de goma xántica □ con agregado de goma xántica.

Las barras indican los errores standard.

sinéresis producido llegando a la conclusión que la dinámica de la retrogradación durante el estadio inicial de la formación de los cristales de hielo en geles de almidón sería la clave a tener en cuenta.

Otros autores (Przybyl y col., 1983; Poulsen y Jakobsen, 1983) también relacionaron el tamaño cristalino con el grado de sinéresis producido, aunque existen referencias bibliográficas (Kikuchi, 1981; Schulze y col., 1964) que explican la separación de fases como un cambio de dispersión del gel o fenómeno coloidal, que se genera con el uso de bajas velocidades de congelación.

3.4. Consideraciones finales

Como se desprende de lo descrito en el presente capítulo el efecto de la velocidad de congelación es de suma importancia en el mantenimiento de las cualidades texturales de las pastas de almidón gelatinizado. Bajas velocidades conducen a mayores niveles de producción de exudado o bien formación de una estructura de microesponja que tornan inaceptables a las pastas de almidón y de harina. La congelación por inmersión en N₂ líquido contribuye a mantener durante el almacenamiento congelado niveles de exudado más bajos que utilizando otras velocidades. Por otro lado, resulta importante la elección de la temperatura de almacenamiento: bajas temperaturas conducen a una menor producción de exudado pero además evitan cambios estructurales indeseables, como el desarrollo de la mencionada estructura esponjosa. A -5°C, temperatura de almacenamiento que representa un ejemplo de abuso térmico, salvo en el caso de las muestras congeladas ultra-rápido o las estabilizadas con hidrocoloide se pierde la textura original.

Como alternativa, el empleo de goma xántica, un hidrocoloide estabilizante, permite flexibilizar las condiciones de congelación pudiéndose incluso utilizar con buenos resultados bajas velocidades. No obstante, resulta aconsejable el almacenamiento a bajas temperaturas ya que a -5°C la acción del hidrocoloide no resulta tan eficaz.

Desde el punto de vista de obtención de una mínima sinéresis, la harina es mejor espesante que el almidón ya que retiene mejor el agua -probablemente por la presencia de proteína- y aun en malas condiciones de congelación se obtienen niveles más bajos de exudado que con las pastas de almidón. El Polar Gel (almidón química y genéticamente modificado) no presentó ventajas pues se observó mayor cantidad de exudado a altas temperaturas de almacenamiento. Sólo fue comparable a los resultados obtenidos con las combinaciones almidón o harina con goma xántica cuando se utilizaron altas velocidades de congelación y una temperatura de almacenamiento suficientemente baja.

La relación entre los fenómenos que ocurren a nivel molecular (retrogradación del almidón, formación y recristalización de hielo) con el grado de sinéresis y los cambios texturales observados durante la congelación y el almacenamiento congelado (formación de microesponja, desarrollo de granulosis) será encarada en siguientes capítulos.

CAPITULO 4
COMPORTAMIENTO REOLOGICO

4.1. Introducción

El estudio de las propiedades de flujo de los sistemas alimenticios es de suma importancia desde el punto de vista de la calidad organoléptica y su procesamiento.

Un cuerpo se deforma cuando la aplicación de una fuerza altera su forma o tamaño. Se dice que fluye cuando su grado de deformación cambia continuamente con el tiempo. En reología un cuerpo ideal puede clasificarse como elástico, plástico o viscoso dependiendo del tipo de deformación que sobrelleva bajo la aplicación de una fuerza: un cuerpo elástico se deformará mientras dure la aplicación, uno plástico sufrirá una deformación permanente y uno viscoso, fluirá. Los cuerpos de materiales reales combinan todas estas propiedades reológicas en grados diversos (Shoemaker y Figoni, 1984).

En el caso de fluidos viscosos una de las ecuaciones constitutivas más utilizadas es el modelo de Ostwald-De Waele o ley de la potencia:

$$\tau = m D^n \quad (4.1)$$

donde τ = esfuerzo de corte (Pa), D =gradiente de velocidad (s^{-1}), m = índice de consistencia y n = índice de comportamiento de flujo.

Esta ecuación se emplea a menudo para describir el comportamiento reológico de polímeros fundidos y ha demostrado un buen ajuste sobre todo en el campo de altos gradientes de velocidad. Con un exponente $n=1$ esta ecuación se convierte en la ecuación constitutiva de los fluidos newtonianos.

Valores de n menores que 1 se relacionan con un comportamiento de tipo pseudoplástico llamado también de viscosidad estructural. Valores de n mayores que 1 describen un comportamiento tipo dilatante (sistemas que muestran un aumento de viscosidad al aumentar el gradiente de velocidad). El primero es bastante frecuente en sistemas alimenticios: la viscosidad disminuye cuando se eleva el gradiente de velocidad. Muchos sistemas como emulsio-

nes o dispersiones, cuando se encuentran en reposo presentan sus partículas (gotas, cadenas de polímeros) altamente desordenadas. Ello ocasiona una gran resistencia interna al flujo lo que se traduce en una alta viscosidad. Con un gradiente de velocidad creciente, las partículas contenidas en el líquido, es decir, la fase dispersa, se orientan en la dirección del flujo, fluyendo más fácilmente, por lo que la viscosidad disminuye.

Por otro lado, las propiedades reológicas pueden depender del tiempo, reflejando la naturaleza de la estructura del sistema y pudiendo deberse a tixotropía, viscoelasticidad o ambas (Cheng y Evans, 1965; Harris, 1972).

La respuesta de un sistema depende de la relación entre la magnitud de la fuerza que se aplica y la de las fuerzas interparticulares e intermoleculares que definen su estructura. La dependencia con el tiempo es la manifestación de las distintas velocidades de un mismo proceso de transformación y su detección depende de la velocidad a la que se desarrolla dicho proceso, de la rapidez de respuesta y de la técnica experimental que se utilice para su medida (Rha, 1978).

Los fluidos que presentan una disminución limitada de la viscosidad con el tiempo, al aplicar repentinamente un esfuerzo cortante, se denominan tixotrópicos. Su viscosidad disminuye hasta que se alcanza un valor mínimo para un gradiente de velocidad constante dado (estado "sol"). Una sustancia tixotrópica no sólo se fluidifica en función del tiempo de cizallamiento, sino que recupera su estructura de gel tras un período de reposo típico para cada sustancia (tiempo de regeneración). En la Fig. 4.1a se ejemplifica un comportamiento tixotrópico típico: al no coincidir la línea ascendente (I) con la descendente (II), queda delimitada entre ambas una superficie de histéresis la que según Shoemaker y Figoni (1984) es indicativa del grado de ruptura estructural. El lazo de histéresis resultante depende de la historia previa de corte y tanto del grado de cambio en el gradiente de velocidad como del valor máximo de dicho gradiente, por lo que la relación entre el área y los parámetros del material suele ser compleja. En la Fig. 4.1b vemos que al aplicar un gradiente de velocidad creciente, la viscosidad disminuye (I) debido a la destrucción de

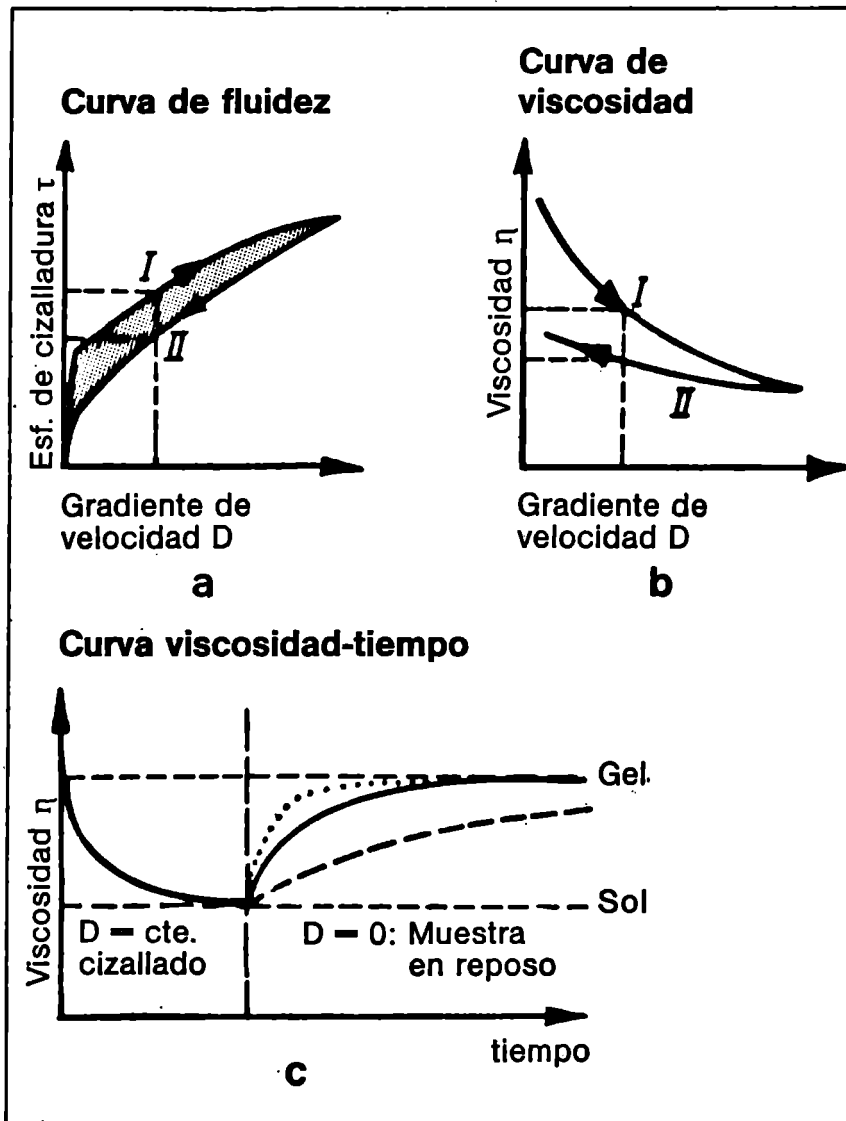


Fig. 4.1. Representación gráfica de la tixotropía (Schrama, 1984)

la estructura original y por el aumento de orientación molecular. En la segunda parte del ensayo (II) la viscosidad aumenta menos de lo que disminuyó en la primera y a $D=0$ no alcanza el valor original.

La explicación se resume gráficamente en la Fig. 4.1c: en la primera fase, un gel se transforma rápidamente en sol por cizallamiento constante; en la segunda se transforma de nuevo el sol en gel. La estructura tixotrópica puede tardar mucho tiempo en regenerarse completamente, pero una regeneración parcial puede ocurrir en segundos o minutos.

Por otra parte, las sustancias con comportamiento reopéctico, a la inversa del tixotrópico, muestran un aumento de viscosidad en función del tiempo de cizallamiento. En el caso de las sustancias reopécticas, la curva descendente transcurre por encima de la curva ascendente. Este tipo de sustancias es menos frecuente que el tixotrópico. Muchos casos catalogados como de comportamiento reopéctico tienen explicación en cambios físicos o químicos que ocurren durante la medición (por ejemplo, gelificación o pérdida de disolvente por evaporación) (Schramm, 1984).

Los fluidos denominados viscoelásticos recobran parcialmente la forma original al cesar el esfuerzo cortante pero, se trata de una respuesta no instantánea resultante de una conducta en parte elástica, típica de los sólidos y en parte viscosa, característica de los líquidos.

El comportamiento viscoelástico aparece después de una deformación o tensión. Cuando la tensión es pequeña, la teoría viscoelástica permite relacionar las propiedades reológicas fundamentales a la estructura en reposo. Si se sale de esta zona viscoelástica lineal puede ocurrir una ruptura estructural y la interpretación basada en la viscoelasticidad se hace difícil.

Muchos sistemas alimenticios, así como otros materiales con propiedades de flujo tiempo-dependientes presentan comportamientos complejos, que algunos autores han definido como tixoviscoelásticos, es decir, de un fluido viscoelástico que sobrelleva una ruptura estructural (Cheng y Evans, 1965; Harris, 1972). Para caracterizar el comportamiento tiempo-dependiente de estos sistemas deben considerarse tanto los cambios estructurales como el fenó-

meno de viscoelasticidad. La medición bajo un cizallamiento constante permite la cuantificación de la ruptura estructural solamente y no de la viscoelasticidad; sin embargo, el efecto viscoelástico aparecerá cada vez que se produzcan arranques o detenciones del viscosímetro. La Fig. 4.2 ilustra este comportamiento: las regiones A-B y C-D representan el comportamiento viscoelástico y B-C indica la ruptura estructural (Figoni y Shoemaker, 1981).

La agudeza del pico en el punto B depende del gradiente de velocidad empleado.

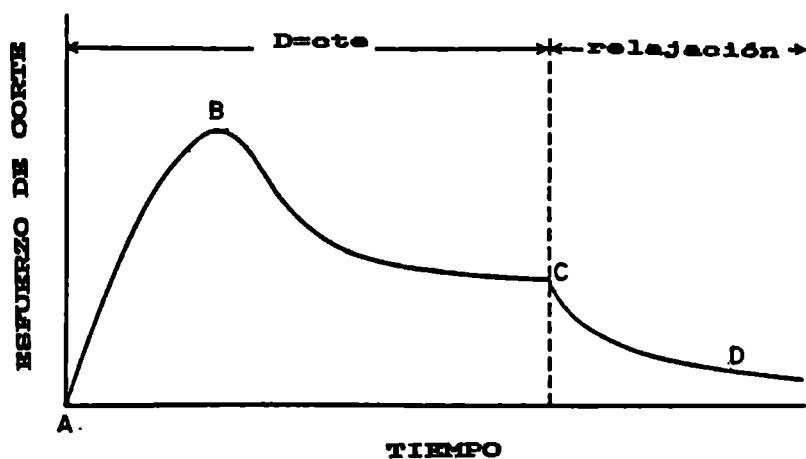


Fig. 4.2. Comportamiento de flujo de un sistema viscoelástico que sobrelleva ruptura estructural. Las regiones AB y CD representan la conducta viscoelástica, la región BC representa la ruptura estructural durante la aplicación de un gradiente de velocidad constante (Figoni y Shoemaker, 1981).

4.2. Comportamiento reológico de pastas de almidón gelatinizado

Dos factores contribuyen al comportamiento reológico de las pastas de almidón: los gránulos hidratados dispersos y la red de amilosa en solución. A temperaturas por debajo de 100°C y en ausencia de agitación mecánica vigorosa, los gránulos de almidón de contenido de amilosa normal conservan su identidad. Para estos sistemas, el incremento en la viscosidad de la suspensión respecto a la del medio dispersante sólo se relaciona con la fracción de volumen ocupado por las partículas. La forma y deformabilidad de las partículas pueden también ser factores importantes. Según Ellis y col. (1989), tanto la hidratación de los gránulos como la amilosa solubilizada contribuyen a la viscosidad observándose que a altas fracciones de volumen, las suspensiones acuosas de los gránulos hidratados se comportan según la ley de la potencia. El grado de hidratación depende de la velocidad de calentamiento (particularmente en el caso del gránulo de trigo) y de la temperatura.

Evans y Haisman (1979), estudiando el comportamiento reológico de pastas de diversos tipos de almidón gelatinizado (hasta 10% p/p), encontraron que a altos gradientes de velocidad (7 a 1142 s⁻¹) todos los sistemas probados se comportaban, en buena aproximación, como fluidos que obedecen a la ley de la potencia.

Si bien existen numerosos trabajos en literatura que analizan el comportamiento de las suspensiones gelatinizadas de almidón (Evans y Haisman, 1979; Bagley y Christianson, 1982; Christianson y Bagley, 1983; Ellis y col., 1989; Härröd 1989a, 1989b, 1989c), así como los cambios en sus propiedades viscoelásticas durante el almacenamiento (Wong y Lelievre, 1982; Roulet y col., 1990) son escasos los trabajos sobre el comportamiento reológico de pastas de almidón congeladas y descongeladas.

El objetivo del presente capítulo fue estudiar el cambio en las propiedades reológicas de pastas de almidón gelatinizado sometidas a congelación y almacenamiento congelado y del agregado de estabilizante en dicho comportamiento (modificación en la viscosidad y comportamiento reológico). Asimismo, se analizó el comportamiento viscoelástico de las pastas congeladas.

4.3. Materiales y métodos

4.3.1. Ensayos reológicos con viscosímetro rotacional

En el presente trabajo se utilizó un viscosímetro Haake Rotovisco RV2 (Alemania), provisto de un sistema termostático Haake F3 y un programador Haake PG142. Como sistema de medición se utilizó un sensor del tipo MVIP (cilindros coaxiales con superficies perfiladas) cuyas especificaciones son las siguientes:

Radio interno del rotor: 20,04 mm

Radio del estator: 21 mm

Altura del rotor: 21 mm

Volumen de muestra: 40 cm³

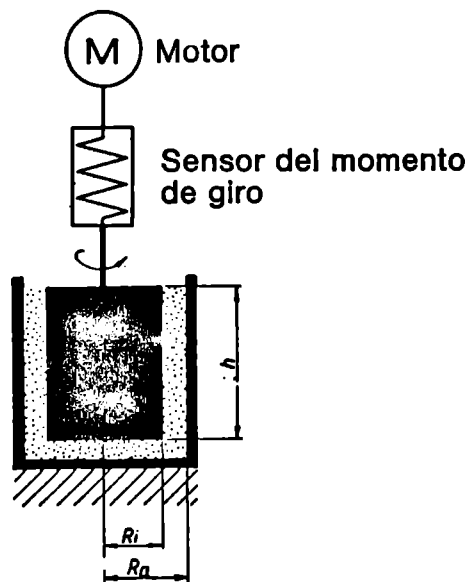


Fig. 4.3. Sistema de medición de cilindros coaxiales tipo Searle (Schramm, 1984)

El viscosímetro rotacional utilizado es de sistema Searle; éste tipo de sistema se basa en dos cilindros coaxiales, de los cuales el interno (rotor) gira con un número de revoluciones constante o variable según el programa, provocando el flujo de la muestra que se encuentra en la ranura anular entre los dos cilindros. El cilindro exterior, llamado generalmente vaso de medición o estator, permanece en reposo. La resistencia del líquido cizallado es proporcional al momento de giro dependiente de la viscosidad. Entre el motor y el eje del cilindro interior está colocado un elemento de medición del momento de giro -normalmente un resorte de acero que se torsiona- (Fig 4.3). Esta torsión es una medida directa de la viscosidad de la sustancia estudiada. Aunque el principio Searle presenta limitaciones cuando se efectúa la medición de líquidos de viscosidad muy baja tiene la ventaja de que puede cubrir, no obstante un amplio rango de viscosidades y permite además un fácil atemperado de la muestra dado que el cilindro externo no gira.

En los ensayos realizados, se registró el torque obtenido para variaciones de velocidad de rotación entre 0 y 1024 s^{-1} en sentido ascendente durante tres minutos, con constancia a máxima velocidad durante un minuto y en sentido descendente con el mismo gradiente y tiempo. Las mediciones se efectuaron a $60,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Es importante destacar que el comportamiento reológico sólo se puede representar adecuadamente cuando los ensayos se efectúan con programas de gradientes de velocidad lentamente ascendentes o descendentes. Bajo estas condiciones se da tiempo suficiente para que se produzca el esfuerzo de corte correspondiente a cada gradiente de velocidad preseleccionado.

A partir de las curvas reológicas obtenidas, se calcularon las viscosidades aparentes a determinadas velocidades de corte (512 , 768 y 1024 s^{-1}) y los valores de los parámetros n y m de la ec.(4.1) utilizándose para esto último la zona de la curva correspondiente a altos gradientes de velocidad (500 - 1024 s^{-1}). Para la obtención de los parámetros fue necesario multiplicar los valores de torque y la velocidad de rotación por constantes características de la geometría del sistema de medida.

Para el estudio del comportamiento viscoelástico, se registró el torque obtenido en función del tiempo a velocidad de rotación constante (32 s^{-1}) con una velocidad de carta de $0,2 \text{ cm/s}$.

4.3.2. Preparación de las muestras

Las pastas preparadas según lo descrito en el Capítulo 2 fueron separadas en alícuotas de 50 g colocados en recipientes cilíndricos de plástico de $4,5 \text{ cm}$ de diámetro y $7,0 \text{ cm}$ de alto. Las pastas fueron dejadas enfriar hasta temperatura ambiente, se cubrió la parte superior de cada recipiente con Parafilm y se congelaron a distintas velocidades obteniéndose los siguientes valores: 216 cm/h ($t_c = 0,19 \text{ min}$) por inmersión en N_2 líquido; $0,8 \text{ cm/h}$ ($t_c = 135 \text{ min}$) en cámara estanca de -80°C (congelación rápida, equivalente a las condiciones en túnel o placa); $0,3 \text{ cm/h}$ ($t_c = 405 \text{ min}$) en cámara estanca de -20°C (congelación lenta).

Las muestras se llevaron en todos los casos hasta temperatura final de -20°C , se dejaron estabilizar a esa temperatura 12 hs. y luego se almacenaron en cámaras a -5 , -10 y -20°C .

Se realizaron mediciones a las 1, 2, 4, 8 y 12 semanas de almacenamiento congelado efectuándose la descongelación en baño termostático a 60°C permaneciendo en el mismo de 30 a 45 minutos. Las muestras fueron vertidas en el vaso de medición del viscosímetro, previamente termostaticado, con la menor manipulación posible. Las mediciones fueron efectuadas luego de un período de estabilización de tres minutos a 60°C .

4.4. Resultados y discusión

4.4.1. Efecto de la velocidad de congelación en el comportamiento reológico de pastas de almidón gelatinizado

En la Fig. 4.4 se muestran las curvas reológicas de τ en función de D obtenidas para pastas de almidón de maíz sin agregado de goma xántica, sometidas a distintas velocidades de congela-

ción.

En todos los casos, tanto para pastas de almidón de maíz como de harina de trigo, podemos distinguir dos zonas en las curvas reológicas: a gradientes de velocidad menores de 500 s^{-1} , el comportamiento se relaciona fuertemente con la viscoelasticidad de la pasta, ya sea por la formación de una estructura tipo esponja o por la presencia de goma xántica. Como ocurre con otros sistemas alimenticios (Bourne, 1982), la reodestrucción que ocurre a gradientes de velocidad mayores acerca el comportamiento al de un fluido pseudoplástico, que obedece a la ley de la potencia.

Como se observa en la Fig. 4.4, la congelación por inmersión en N_2 líquido (b) no altera significativamente el comportamiento reológico de la pasta, que es pseudoplástico en todo el rango y ligeramente tixotrópico, como el del sistema sin congelar. Al mismo tiempo, se observa que cuanto más lento se congela, el pico de viscoelasticidad (que aparece a bajos gradientes de velocidad) es más notorio. El caso más crítico es el de la congelación lenta (d) en que no sólo se observa un pico agudo (relacionable con la viscoelasticidad) sino que además, la rama descendente de la curva regresa por arriba, comportamiento que se puede relacionar con una mayor separación de la fase acuosa, que produce una concentración de la pasta por eliminación de líquido.

Evans y Haisman (1979) encontraron que el líquido sobrenadante obtenido por centrifugación de los preparados de almidón gelatinizado tenía muy baja viscosidad (aunque el contenido de sólidos fuera alto) sugiriendo de esta manera que el material externo a los gránulos tiene poco efecto sobre la reología de las suspensiones. En el mismo sentido, Christianson y Bagley (1983) informaron que la viscosidad dependía sólo del volumen ocupado por los gránulos hidratados, ya que no hallaron efecto de la red filamentosa que se forma en torno al gránulo gelatinizado. Una separación de líquido durante la medición podría generar de este modo una fase de viscosidad muy baja, que al reconstituirse luego a gradientes de velocidad más altos genera a su vez un aumento de la viscosidad, explicándose así la rama descendente que retorna al origen por arriba de la ascendente que se observa en la Fig. 4.4.

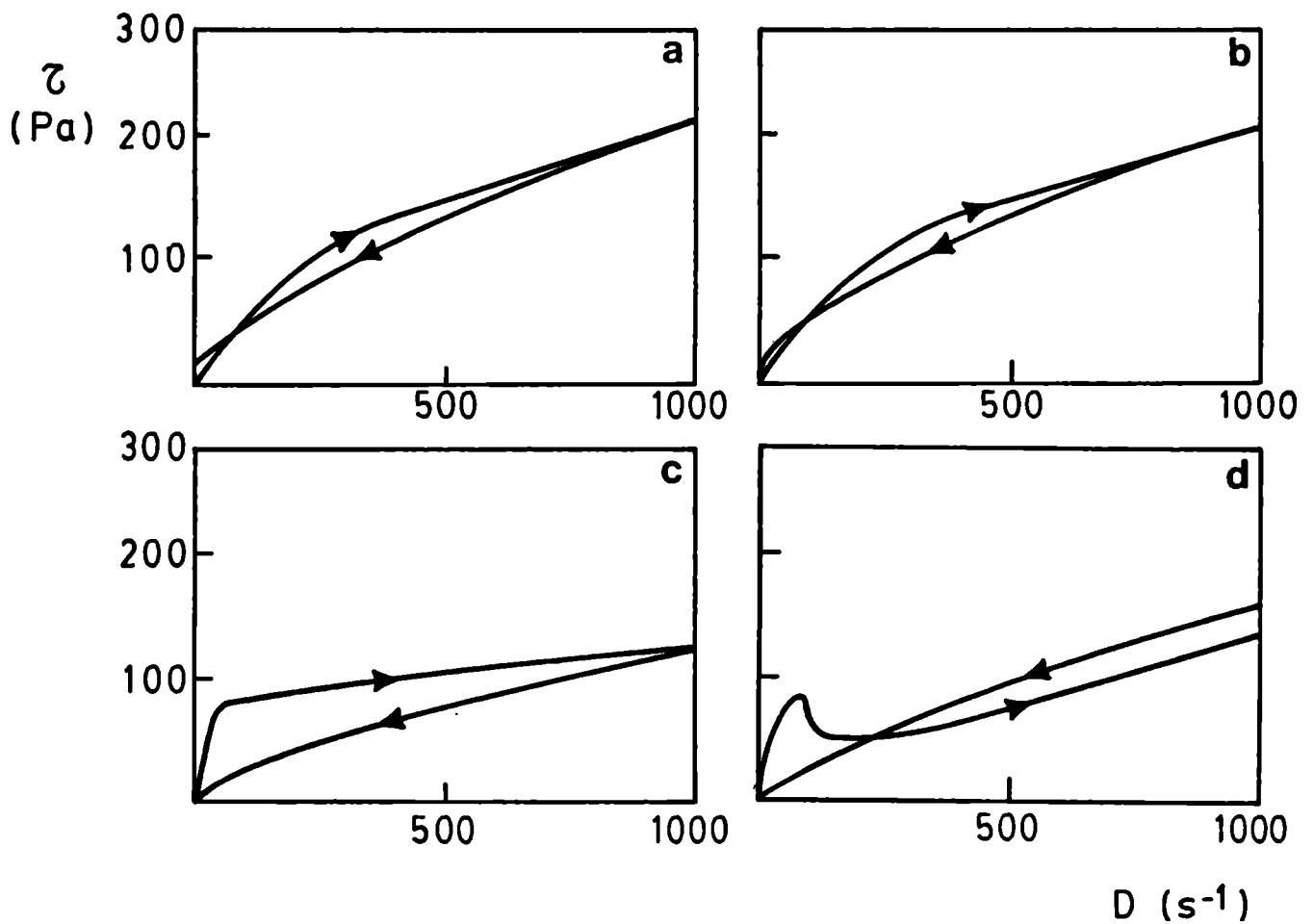


Fig. 4.4. Curvas de esfuerzo de corte vs. gradiente de velocidad correspondientes a pastas de almidón de maíz 10 % p/p congeladas a distintas velocidades y sin congelar. (a) sin congelar; (b) congelada ultra-rápido (216 cm/h); (c) congelada rápido (0,8 cm/h); (d) congelada lento (0,3 cm/h)

Härröd, basándose en estudios reológicos para pastas de almidón de distintas concentraciones y preparadas con distintos métodos enunció como hipótesis que la magnitud del esfuerzo de corte controlaba los cambios estructurales y por lo tanto, también el tipo de dependencia con el tiempo. Esta hipótesis explicaría los comportamientos complejos e inclusive mixtos (tixotrópicos-reopécticos, según la zona de la curva) que se observan en este tipo de sistemas. Por otro lado, el incremento del área encerrada entre las ramas ascendente y descendente se puede relacionar con un mecanismo de reodestrucción -es decir con una estructura que es fácilmente destruida por una acción mecánica (Seves y Croce, 1966; Härröd, 1989c) y que se correlaciona con un valor residual relativamente alto de esfuerzo de corte después de la detención del rotor (Härröd, 1989c). El hecho de que existe destrucción de una estructura se refleja en que ésta no vuelve a manifestarse si se realiza un segundo ciclo sobre la misma muestra (Seves y Croce, 1966). La congelación, como ya se vio en el Capítulo 3, produce cambios estructurales importantes, que se manifiestan en formación de estructura esponjosa o granulosa según la velocidad empleada. La primera parte de las curvas de las Fig 4.4 c y d indican que se produce una destrucción de estructuras de tipo viscoelástico generadas durante la congelación y que en estrecha relación con ello se produce un fuerte incremento del comportamiento tixotrópico de las pastas.

En la Fig. 4.5 se han representado, a modo de ejemplo las curvas de viscosidad aparente en función del gradiente de velocidad ($0-1024 \text{ s}^{-1}$) correspondientes a pastas de almidón de maíz sin congelar y congeladas a distintas velocidades. Se observa que la viscosidad aparente disminuye con el aumento de gradiente de velocidad, comportamiento característico de los fluidos pseudoplásticos. Se observa también que las pastas congeladas lentamente presentaron una menor viscosidad aparente (a cada gradiente de velocidad) respecto de las congeladas a velocidades más altas.

En la Fig. 4.6 se observa el efecto del agregado de goma xántica sobre el comportamiento reológico de las pastas de almidón gelatinizado. Hasta valores de $D = 500 \text{ s}^{-1}$, predomina el efecto viscoelástico, relacionado con la presencia del estabiliz-

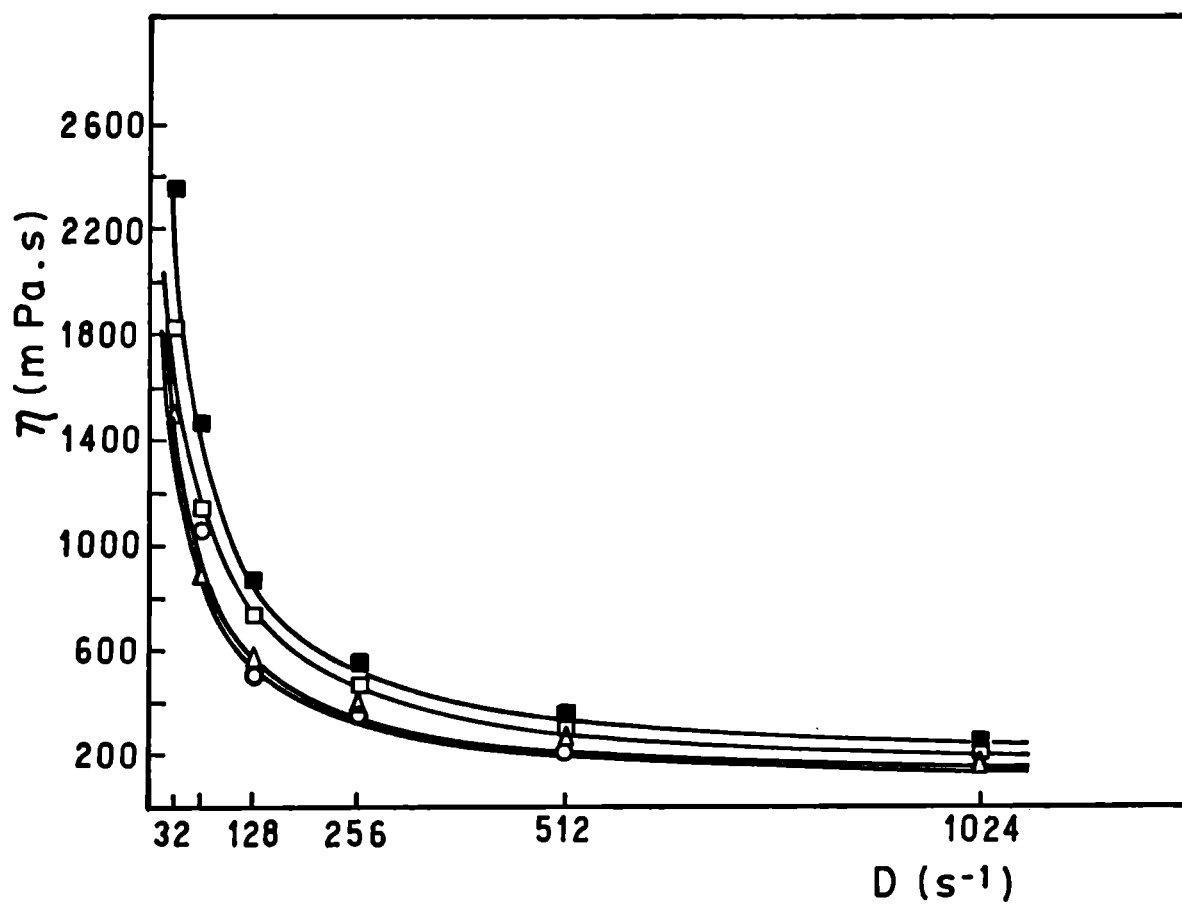


Fig. 4.5. Curvas de viscosidad aparente vs. gradiente de velocidad correspondientes a pastas de almidón de maíz 10 % p/p congeladas a distintas velocidades y sin congelar (■) sin congelar; (□) congelada ultra-rápido (216 cm/h); (Δ) congelada rápido (0,8 cm/h); (○) congelada lento (0,3 cm/h)

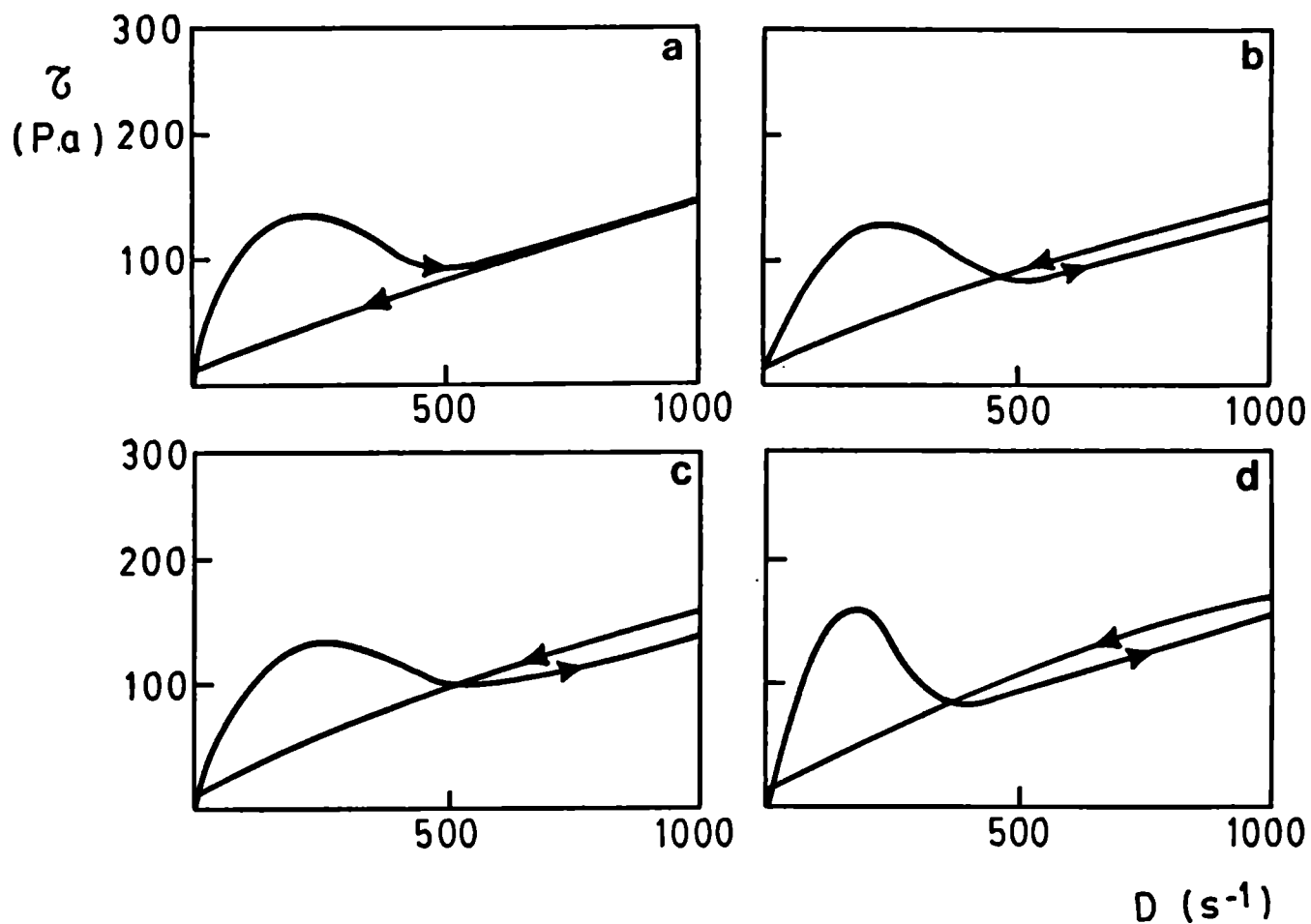


Fig. 4.6. Curvas de esfuerzo de corte vs. gradiente de velocidad correspondientes a pastas de almidón de maíz 10 % p/p, con goma xántica, congeladas a distintas velocidades y sin congelar. (a) sin congelar; (b) congelada ultra-rápido (216 cm/h); (c) congelada rápido (0,8 cm/h); (d) congelada lento (0,3 cm/h)

zante. Este efecto, que abarca una rango más amplio de gradientes de velocidad que en el caso de la Fig. 4.4d, no debe confundirse con el pico de ruptura característico de las estructuras tipo esponja formada por la congelación lenta. En el caso de las pastas con goma xántica, el pico ancho revela la ruptura de una estructura, apareciendo inclusive cierto efecto reopéctico, pero este mismo comportamiento se encuentra en las pastas sin congelar (Fig. 4.6a) y no está relacionado con características texturales indeseables del producto. Como se aprecia comparando las Fig 4.6 b, c y d con la correspondiente a la pasta sin congelar (a), el aspecto más destacable del agregado de hidrocoloide es que el tipo de comportamiento reológico no varía significativamente entre las pastas congeladas a distintas velocidades y aun entre éstas y la pasta sin congelar. Desde el punto de vista organoléptico, las pastas con agregado de estabilizante presentaban una textura suave y homogénea, independientemente de la velocidad de congelación utilizada, mientras que las que no incluían goma xántica en su formulación manifestaron, tras la congelación, los característicos aspectos "arenoso" (congelación rápida) y "esponjoso" (congelación lenta).

Las pastas en base a harina de trigo, sin agregado de hidrocoloide (Fig. 4.7), mostraron un comportamiento similar a las de almidón pero no se observó reopexia en el caso de las congeladas lento, lo que probablemente se debe relacionar con una menor separación de líquido y un menor desarrollo de la estructura tipo esponja. Probablemente, la presencia de proteína sea el factor que determine esta diferencia en el comportamiento, ya que al retener agua minimiza la desolvatación durante la congelación lenta. Esta desolvatación es la que favorecería la formación de una red fibrilar gruesa, tipo esponja.

Como en el caso anterior, el agregado de estabilizante (Fig. 4.8) minimiza el efecto de la velocidad de congelación, obteniéndose un comportamiento reológico similar al de la pasta sin congelar.

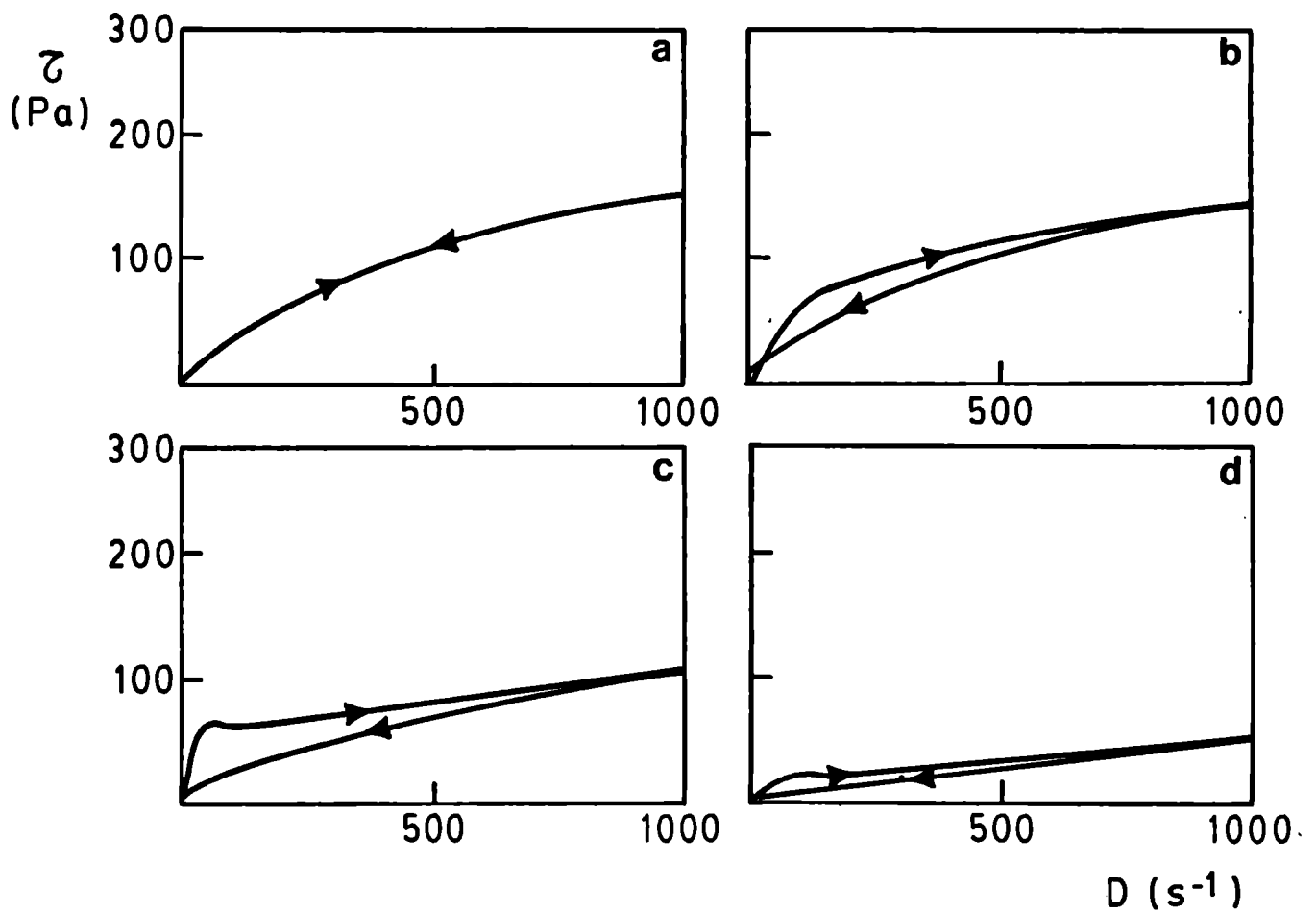


Fig. 4.7. Curvas de esfuerzo de corte vs. gradiente de velocidad correspondientes a pastas de harina de trigo 10 % p/p congeladas a distintas velocidades y sin congelar. (a) sin congelar; (b) congelada ultra-rápido (216 cm/h); (c) congelada rápido (0,8 cm/h); (d) congelada lento (0,3 cm/h)

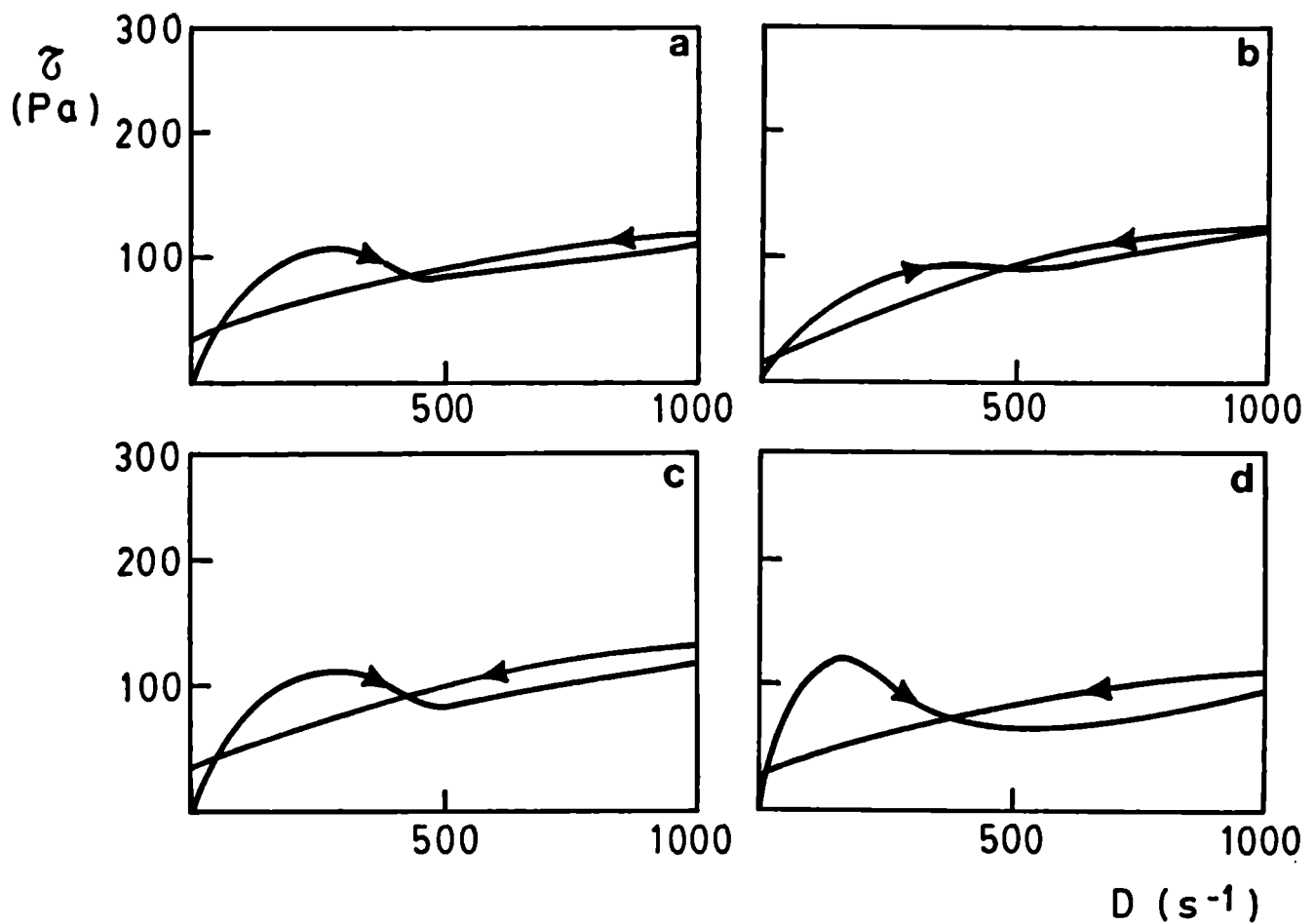


Fig. 4.8. Curvas de esfuerzo de corte vs. gradiente de velocidad correspondientes a pastas de harina de trigo 10 % p/p, con goma xántica, congeladas a distintas velocidades y sin congelar. (a) sin congelar; (b) congelada ultra-rápido (216 cm/h); (c) congelada rápido (0,8 cm/h); (d) congelada lento (0,3 cm/h)

4.4.2. Efecto del almacenamiento congelado

Con respecto al comportamiento viscoelástico de las pastas de almidón de maíz (sin goma xántica), manifestado en la zona de gradientes de velocidad (D) $< 500 \text{ s}^{-1}$, el almacenamiento congelado no produjo cambios cuando la congelación se efectuó por inmersión en N_2 líquido, obteniéndose curvas similares a las de la pasta recién congelada (Fig. 4.4b).

Las pastas congeladas a $0,3 \text{ cm/h}$ presentaron a lo largo de todo el período de almacenamiento el comportamiento esquematizado en la Fig. 4.4d, es decir con un agudo pico de ruptura estructural relacionable con la formación de una matriz esponjosa. En cuanto a las pastas congeladas rápido ($0,8 \text{ cm/h}$), se observó durante el almacenamiento a -5°C (no así a -10 y -20°C) el desarrollo paulatino del pico de ruptura característico de la estructura tipo esponja, aunque no tan agudo como en el caso de las pastas congeladas lentamente. En pastas de harina de trigo congeladas rápido y almacenadas a -5°C , se observó también el desarrollo de un pico de ruptura pero menos pronunciado que en el caso de las pastas de almidón. Las curvas obtenidas para pastas de almidón de maíz y de harina de trigo a las que se agregó goma xántica, mostraron a lo largo de todo el período e independientemente de la velocidad de congelación y temperatura de almacenamiento utilizadas, un comportamiento similar al de la muestra recién congelada.

Numerosos autores (Seves y Croce, 1966; Wong y Lelievre, 1982, Härröd, 1989a, 1989b, 1989c) han utilizado la ley de la potencia para el modelado del comportamiento de pastas de almidón. En el caso que nos ocupa, debido a la variabilidad de comportamiento dentro del rango de 0 a 500 s^{-1} , al manifestarse allí la componente viscoelástica del sistema, se cuantificaron las viscosidades aparentes en el rango de aplicación de la ley de la potencia (es decir a $D > 500 \text{ s}^{-1}$), con el objeto de analizar el efecto de velocidad de congelación, temperatura y tiempo de almacenamiento.

A modo de ejemplo, se muestran en la Tabla 4.1 a y b, los valores promedio de viscosidades aparentes obtenidos para cada condición de ensayo para sistemas en base a almidón de maíz con

y sin hidrocoloide y en la Tabla 4.2 a y b, los correspondientes a pastas en base a harina de trigo.

Tabla 4.1a. Viscosidades aparentes a 512 y 1024 s⁻¹ para pasta de almidón de maíz sin agregado de estabilizante.

Tiempo de almacena- miento (semanas)	V (cm/h)	512 s ⁻¹						1024 s ⁻¹		
		Temperatura de almacenamiento(°C)								
		-5	-10	-20	-5	-10	-20			
Viscosidades aparentes (mPa.s)										
1	216,0	309	211	233	154	266	289			
	0,8	94	131	123	64	85	74			
	0,3	55	83	87	50	72	69			
2	216,0	258	170	236	157	166	154			
	0,8	192	150	164	124	105	99			
	0,3	68	117	152	50	90	114			
4	216,0	320	189	256	191	126	158			
	0,8	138	156	183	88	104	119			
	0,3	67	81	129	59	69	103			
8	216,0	453	300	239	275	188	152			
	0,8	199	170	194	126	100	117			
	0,3	66	95	80	61	76	70			
12	216,0	416	311	302	244	198	179			
	0,8	123	126	192	79	85	122			
	0,3	68	70	66	62	69	54			

El error standard relativo en los valores de viscosidad es de 14 %

Tabla 4.2a. Viscosidades aparentes a 512 y 1024 s⁻¹ para pastas de harina de trigo sin agregado de estabilizante.

Tiempo de almacena- miento (semanas)	V (cm/h)	512 s ⁻¹ 1024 s ⁻¹					
		Temperatura de almacenamiento(°C)					
		-5	-10	-20	-5	-10	-20
Viscosidades aparentes (mPa.s)							
1	216,0	251	206	198	168	136	138
	0,8	151	122	145	99	83	81
	0,3	43	103	148	37	68	50
2	216,0	210	214	281	146	144	180
	0,8	135	136	148	89	92	95
	0,3	50	89	71	38	62	48
4	216,0	264	237	186	163	160	132
	0,8	105	120	163	67	80	107
	0,3	70	108	84	48	73	65
8	216,0	132	241	188	89	157	128
	0,8	130	127	125	82	80	79
	0,3	57	69	104	40	46	63
12	216,0	163	241	191	107	159	133
	0,8	110	146	168	73	91	108
	0,3	47	45	84	35	37	62

El error standard relativo en los valores de viscosidad es de 12 %

Tabla 4.2b. Viscosidades aparentes a 512 y 1024 s⁻¹ para pastas de harina de trigo con agregado de estabilizante.

Tiempo de almacena- miento (semanas)	V (cm/h)	512 s ⁻¹ 1024 s ⁻¹					
		Temperatura de almacenamiento(°C)					
		-5	-10	-20	-5	-10	-20
Viscosidades aparentes (mPa.s)							
1	216,0	145	286	—*	125	176	171
	0,8	132	185	150	100	138	112
	0,3	161	222	94	117	163	70
2	216,0	143	148	265	132	106	169
	0,8	126	164	132	88	121	92
	0,3	174	214	182	128	154	135
4	216,0	185	227	222	176	135	153
	0,8	154	129	149	113	97	109
	0,3	133	183	157	96	136	119
8	216,0	168	129	—*	134	97	154
	0,8	132	123	179	98	91	129
	0,3	221	154	160	150	117	105
12	216,0	142	247	265	121	148	164
	0,8	155	147	113	117	110	82
	0,3	101	176	186	69	132	134

* Valores no considerados por corresponder al final del pico de viscoelasticidad

El error standard relativo en los valores de viscosidad es de 12 %

En las Fig. 4.9 y 4.10 se han graficado los valores correspondientes a viscosidades aparentes de pastas de almidón y harina de trigo, respectivamente, medidos a un gradiente de velocidad de 512 s^{-1} . Se observa que no hay una tendencia definida de los valores de η_{ap} en función del tiempo de almacenamiento, lo que fue confirmado por el análisis de varianza discriminando los tres factores: tiempo, velocidad de congelación y temperatura de almacenamiento. El hecho de que el tiempo de almacenamiento tenga poca influencia frente al deterioro producido durante la congelación confirma los resultados obtenidos por otros autores sobre sistemas en base a almidón (Suzuki y col., 1977). Estos autores informaron que las salsas congeladas rápidamente sufrían poca incidencia del factor tiempo de almacenamiento, mientras que las congeladas lentamente mostraban una disminución de la viscosidad aparente a tiempos largos de almacenamiento (26 semanas). La temperatura de almacenamiento tampoco resultó tener una incidencia significativa ($P = 0,05$). El factor velocidad de congelación tuvo efecto muy significativo en ausencia de estabilizante.

De lo anterior se desprende que el almacenamiento congelado no afecta significativamente la viscosidad aparente de las pastas de almidón en la zona de la curva a $D > 500 \text{ s}^{-1}$, obteniéndose valores similares a los de las pastas recién congeladas.

Con respecto a la zona donde se manifiesta la conducta viscoelástica, el almacenamiento no tuvo casi efecto salvo en el caso de las pastas congeladas a $0,8 \text{ cm/h}$ y almacenadas a -5°C , en que se observó una agudización del pico de ruptura estructural. No obstante, este cambio producido a bajos gradientes de velocidad no afectó el comportamiento a gradientes más altos.

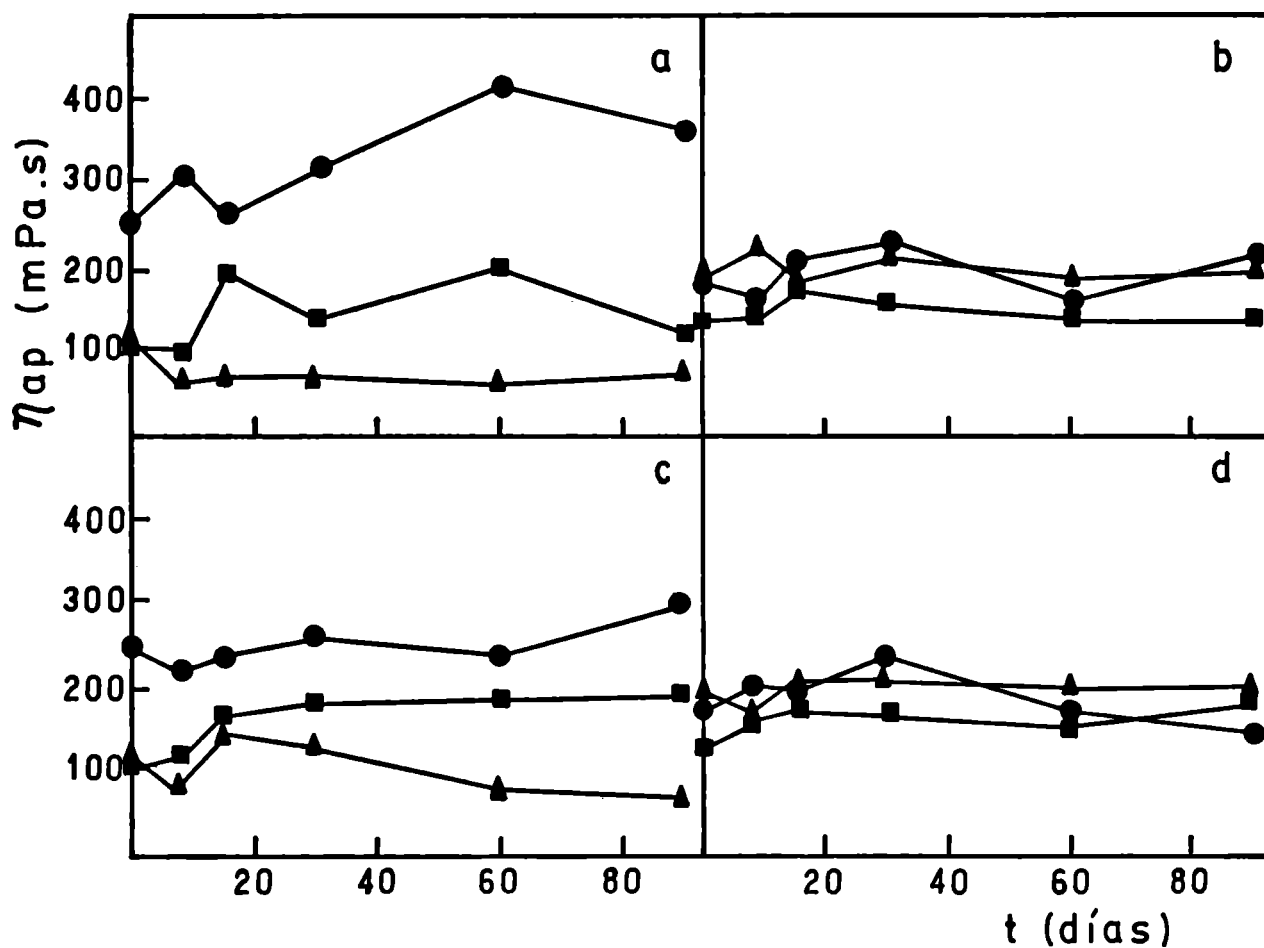


Fig. 4.9. Viscosidades aparentes en función del tiempo de almacenamiento a distintas temperaturas correspondientes a pastas de almidón de maíz 10 % p/p congeladas a distintas velocidades, con y sin agregado de goma xántica; (a) sin goma xántica, almacenada a -5°C ; (b) con goma xántica, almacenada a -5°C ; (c) sin goma xántica, almacenada a -20°C ; (d) con goma xántica, almacenada a -20°C . (●) congelado ultra-rápido (216 cm/h); (■) congelado rápido (0,8 cm/h); (▲) congelado lento (0,3 cm/h).

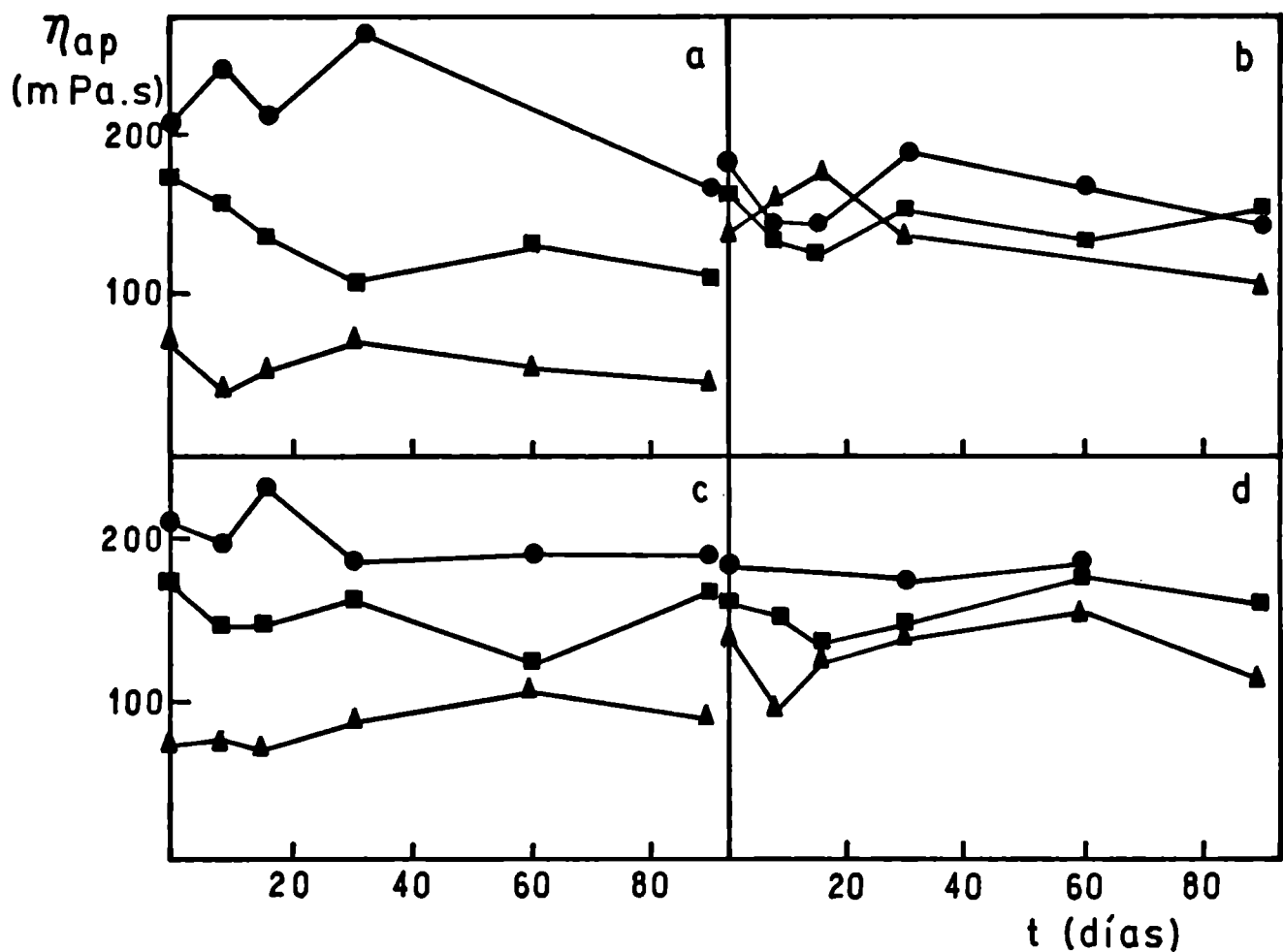


Fig. 4.10. Viscosidades aparentes en función del tiempo de almacenamiento a distintas temperaturas correspondientes a pastas de harina de trigo 10 % p/p congeladas a distintas velocidades, con y sin agregado de goma xántica; (a) sin goma xántica, almacenada a -5°C ; (b) con goma xántica, almacenada a -5°C ; (c) sin goma xántica, almacenada a -20°C ; (d) con goma xántica, almacenada a -20°C . (●) congelado ultra-rápido (216 cm/h); (■) congelado rápido (0,8 cm/h); (▲) congelado lento (0,3 cm/h).

4.4.3. Efecto de la velocidad de congelación en los parámetros m, n del modelo de Ostwald-De Waele.

Teniendo en cuenta lo dicho respecto al ajuste del comportamiento reológico de este tipo de sistemas a altos gradientes de velocidad (Evans y Haisman, 1979; Bourne, 1982), se calcularon los índices n y m mediante la regresión lineal efectuada con el programa SYSTAT, de la forma logarítmica de la ec. (4.1):

$$\log \tau = \log m + n \log D \quad (4.2)$$

En las tablas 4.3 a y b se muestran los valores obtenidos.

Tabla 4.3a. Efecto de la velocidad de congelación en el índice n para pastas de almidón de maíz y harina de trigo con y sin agregado de estabilizante.

	sin congelar	Velocidad de congelación (cm/h)		
		216	0,8	0,3
Índice de comportamiento de flujo (n)				
almidón de maíz	0,337	0,309	0,363	0,754
sin goma xántica	(0,040)*	(0,013)	(0,021)	(0,032)
almidón de maíz	0,342	0,408	0,339	0,378
con goma xántica	(0,026)	(0,011)	(0,016)	(0,014)
harina de trigo	0,373	0,430	0,380	0,506
sin goma xántica	(0,025)	(0,014)	(0,010)	(0,022)
harina de trigo	0,534	0,501	0,549	0,526
con goma xántica	(0,020)	(0,034)	(0,042)	(0,072)

* error standard. (n) de pastas sin congelar corresponde a la media de duplicados. Los restantes son promedio de 16 valores

Tabla 4.3b. Efecto de la velocidad de congelación en el índice m para pastas de almidón de maíz y harina de trigo con y sin agregado de estabilizante.

	sin congelar	Velocidad de congelación (cm/h)		
		216	0,8	0,3
Índice de consistencia (m) (Pa.s ⁻ⁿ)				
almidón de maíz sin goma xántica	22,21 (0,50)*	23,59 (3,02)	9,30 (1,41)	0,58 (0,13)
almidón de maíz con goma xántica	14,09 (3,22)	8,22 (0,84)	10,39 (1,05)	10,16 (0,92)
harina de trigo sin goma xántica	8,35 (1,66)	8,06 (1,09)	6,22 (0,46)	1,90 (0,29)
harina de trigo con goma xántica	2,63 (0,12)	5,77 (1,38)	2,48 (0,18)	3,35 (0,43)

* error standard. (m) de pastas sin congelar corresponde a la media de duplicados. Los restantes son promedio de 16 valores

Las diferencias entre los parámetros n y m correspondientes a las distintas condiciones fueron analizadas mediante el test de mínima diferencia significativa (LSD) para un nivel de confianza del 95 %.

El test mostró que en el caso de las pastas de almidón común sin hidrocoloide, no había diferencias significativas en el índice de comportamiento de flujo (n) entre las pastas congeladas rápido (0,8 cm/h) y las congeladas por inmersión en N₂ líquido (216 cm/h). En cambio, sí se encontraron diferencias significativas entre los valores de n correspondientes a pastas congeladas lento

(0,3 cm/h) y las congeladas a las otras dos velocidades. El índice de comportamiento de flujo resultó más cercano a 1 en el caso de las pastas congeladas lentamente, lo que revela un comportamiento más próximo al newtoniano y un alejamiento del comportamiento pseudoplástico típico de las pastas de almidón sin congelar. En cuanto al índice de consistencia (m), la diferencia fue significativa entre los m correspondientes a la pasta sin congelar y los m correspondientes a congelación lenta y rápida, pero no se encontraron diferencias significativas entre el índice de consistencia de las pastas congeladas por inmersión en N_2 líquido y la sin congelar. Los valores obtenidos revelan una tendencia a la disminución de m paralelo a la disminución de la velocidad de congelación, mientras que el n aumenta acercándose a 1. Esto se puede relacionar con el grado de ruptura estructural que conlleva la congelación. Cuanto más lenta la velocidad, mayor daño se produce en la estructura, que pierde su firmeza. Si se observa la Fig. 4.4d, vemos que la pendiente del tramo de la curva correspondiente a la zona de 500-1024 s^{-1} es mayor que en los otros casos, coincidiendo con la ruptura estructural, evidenciada por el pico. Este tipo de comportamiento se encontró en todas las muestras congeladas lentamente, correspondientes a distintos tiempos de almacenamiento.

En cuanto a las pastas de harina de trigo, el índice de comportamiento de flujo de las pastas congeladas lentamente resultó significativamente distinto al de la pasta sin congelar, en cambio el test no arrojó diferencias significativas entre los n correspondientes a las pastas congeladas ultra-rápido y rápido y el de la pasta sin congelar. Con respecto al índice de consistencia, vale lo dicho en el caso de las pastas de almidón, encontrándose diferencias significativas para la congelación lenta.

El efecto del agregado de goma xántica fue notable en evitar el deterioro producido por la congelación, inclusive utilizando bajas velocidades, no encontrándose diferencias significativas entre los índices correspondientes a distintas condiciones de congelación.

4.4.4. Comportamiento viscoelástico de los geles de almidón

En la Fig 4.11 se muestran, a modo de ejemplo, las curvas obtenidas (τ en función del tiempo, a una $D = 32 \text{ s}^{-1}$) para pastas de almidón congeladas a 216, 0,8 y 0,3 cm/h. Se observa la similitud con la curva de la Fig. 4.2, debido al doble efecto, viscoelástico y de ruptura estructural.

En la literatura se han utilizado modelos de diferente complejidad para cuantificar la dependencia del tiempo en el comportamiento viscoelástico de alimentos. Carbonell y col. han resumido los más importantes (1990):

1) Modelo de Weltmann:

$$B = \frac{U_1 - U_2}{\ln(t_2/t_1)} \quad (4.3)$$

donde B es el coeficiente de ruptura tixotrópica. U_1 y U_2 representan las viscosidades plásticas a t_1 y t_2 , respectivamente.

Una modificación de la ecuación propuesta por Weltmann es:

$$\tau_2 = \tau_1 - \sqrt{T} \ln(t_2/t_1) \quad (4.4)$$

donde la constante τ_1 es el esfuerzo de corte después de un corto periodo de corte, pudiendo determinarse a un gradiente de velocidad de 1 s^{-1} ; \sqrt{T} es la velocidad de ruptura tixotrópica.

2) Modelo de Hahn, Ree y Eyring:

$$\log(\tau - \tau_e) = p - a t \quad (4.5)$$

donde τ_e es el esfuerzo de equilibrio, $\tau - \tau_e$ es la caída de esfuerzo de corte que sigue una relación de primer orden con el tiempo y p y a son constantes para el sistema.



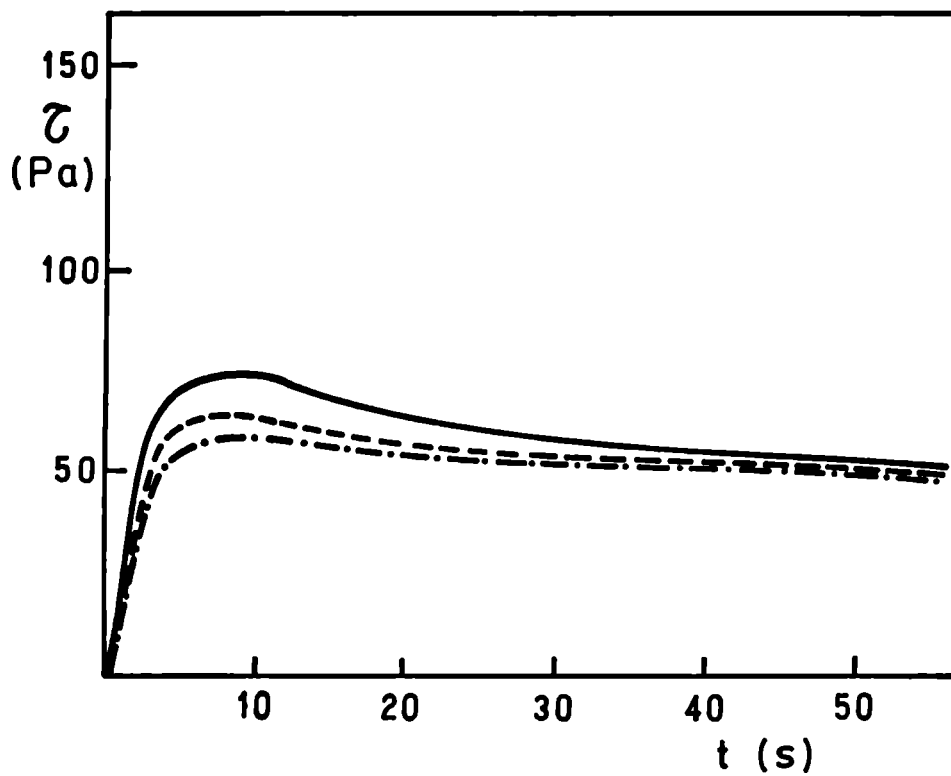


Fig. 4.11. Curvas de esfuerzo de corte en función del tiempo a un gradiente de velocidad constante ($D=32 \text{ s}^{-1}$) para pastas de almidón de maíz 10 % p/p, congeladas a distintas velocidades:

····· 216 cm/h; - - - - 0,8 cm/h; ——— 0,3 cm/h.

3) Modelo de Cheng y Evans:

Describe el fenómeno combinado tixotropía-antitixotropía observado en algunos materiales, cuando al estudiar el comportamiento de flujo a velocidades crecientes, el valor de τ disminuye para cada velocidad mientras que, durante la medida a velocidades decrecientes, en cada paso de velocidad se observa un aumento del valor de τ con el tiempo. Utilizan para la descripción de este comportamiento reológico dos ecuaciones generales, la ecuación de estado:

$$\tau = \eta(\lambda, D) D \quad (4.6)$$

donde λ es un parámetro que refleja el estado de alteración estructural en que se encuentra el producto. La otra ecuación utilizada es la de velocidad de ruptura estructural:

$$\frac{d\lambda}{dt} = g_D(\lambda, D) \quad (4.7)$$

indica que la velocidad a la cual cambia la estructura, g , es también función tanto del gradiente de velocidad (D) como del parámetro estructural.

4) Modelo de Tiu y Boger:

$$\tau = \lambda(\tau_0 + m D^n) \quad (4.8)$$

donde τ_0 es el esfuerzo de corte a $t=0$, λ es un parámetro estructural dependiente del tiempo y m y n son los parámetros de la ley de la potencia. En este modelo se asume que la variación con el tiempo del parámetro estructural λ obedece a una cinética de segundo orden:

$$\frac{d\lambda}{dt} = K_1 (\lambda - \lambda_0)^2 \quad (4.9)$$

donde la constante K_1 depende del gradiente de velocidad y debe determinarse experimentalmente.

5) Modelo de Figoni y Shoemaker:

$$\tau - \tau_e = (\tau_o - \tau_e) \exp(-t/\lambda) \quad (4.10)$$

donde τ_e es el esfuerzo de equilibrio, τ_o es el esfuerzo a $t=0$ y λ es el tiempo de relajación.

6) Modelo de Bird-Leider:

$$\tau = m D^n [1 + (b D t - 1) \exp(-t / c n)] \quad (4.11)$$

donde m , n son los parámetros de la ley de la potencia (ec 4.1); b y c son parámetros ajustables, siendo c el parámetro estructural dependiente del tiempo. A tiempos largos, la ecuación de Bird-Leider converge a la ecuación constitutiva de Ostwald-De Waele (ec. 4.1).

A pesar de que entre los diversos modelos empleados para describir el comportamiento viscoelástico, el de Bird y Leider (1974) ha resultado eficaz en la descripción del comportamiento de diversos sistemas alimenticios (mayonesa, manteca, margarina, puré de manzana, aderezos), son relativamente escasos los trabajos que han empleado este modelo (Kokini y Dickie, 1981; Dickie y Kokini, 1982).

En este trabajo se ha seleccionado el modelo de Bird-Leider para ajustar los datos experimentales. Empleando en la ec. (4.11) los valores de n y m previamente calculados en la sección 4.4.3 se regresionaron los datos experimentales de τ vs. t obtenidos de la curva correspondiente a la Fig. 4.11. Se utilizó para ello el programa SYSTAT para regresiones no lineales obteniéndose los parámetros b y c que se muestran en la Tabla 4.4, junto con los coeficientes de correlación no lineal obtenidos mediante el mencionado programa.

Tabla 4.4. Efecto de la velocidad de congelación sobre los parámetros b y c del modelo de Bird-Leider estimados para pastas de almidón común de maíz.

Velocidad de congelación (cm/h)	b ($\times 10^3$) (adimensional)	c (s)	r(*)
216,0	7,401	11,699	0,999
0,8	10,193	17,284	0,997
0,3	12,235	17,645	0,996

(*) coeficiente de correlación no lineal

El ajuste a las curvas experimentales, como se desprende de los coeficientes de correlación obtenidos fue muy bueno.

Se observa que el parámetro b, vinculado con el esfuerzo de corte máximo (correspondiente al pico que aparece a bajos gradientes de velocidad), crece a medida que la velocidad de congelación se hace más lenta mientras que c, relacionado con la relajación presenta la misma tendencia. Ambos parámetros se vinculan con los efectos viscoelástico y tixotrópico que aparecen en las curvas.

4.5. Consideraciones finales

En síntesis, el análisis de los datos obtenidos durante la congelación y el almacenamiento congelado revelan que el deterioro producido en la textura de pastas de almidón o harina debido a la congelación en sí es mucho más importante que el que se produce durante el almacenamiento. Salvo en el caso de las pastas congeladas rápido (0,8 cm/h) y almacenadas a -5°C , en que se vio favorecido el desarrollo de una estructura esponjosa y por lo tanto de un pico de ruptura a bajos D, ni el tiempo ni la temperatura de almacenamiento resultaron tener una incidencia significativa en el daño estructural en comparación con el efecto de la velocidad de congelación. Esta influye notablemente en el comportamien-

to reológico de las pastas, apareciendo, cuando las condiciones de congelación son inadecuadas, picos pronunciados que revelan la existencia de una estructura viscoelástica formada durante la congelación y destruida por aplicación del esfuerzo durante los ensayos reológicos. En este sentido, el uso de altas velocidades (congelación por inmersión en líquido criogénico) permitió minimizar notablemente los cambios estructurales (básicamente el desarrollo de esponjosidad) observados a velocidades de congelación más bajas y mantener así la calidad de textura original de la pasta aun durante el almacenamiento congelado.

Si bien, desde el punto de vista del deterioro, traducido en cambios en los índices de consistencia y de comportamiento de flujo y en la viscosidad aparente, no se observaron diferencias significativas entre harina y almidón de maíz, sin embargo, sí resultó importante la mejora obtenida mediante el agregado de hidrocoloide. La incorporación de goma xántica en la formulación permitió obtener sistemas estables desde el punto de vista reológico, independientemente de la velocidad de congelación utilizada.

Se desprende de este estudio que para una comprensión más acabada de los cambios en el comportamiento reológico de pastas de almidón gelatinizado sometidas a un proceso de congelación-descongelación no basta con el análisis de los tradicionales índices de la ley de la potencia, (n) y (m) -ley cuya aplicación en estos casos es válida sólo a gradientes altos de velocidad- sino que resulta indispensable el estudio cuali y cuantitativo de la zona donde se manifiesta la estructura viscoelástica del sistema.

Las transformaciones estructurales que explican la aparición del comportamiento viscoelástico y tixotrópico pueden relacionarse, al igual que en el caso de la sinéresis -objeto del capítulo anterior- con los fenómenos de formación y recristalización de hielo y retrogradación del almidón que serán tratados en los siguientes capítulos.

CAPITULO 5

**CRISTALIZACION Y RECRISTALIZACION
DEL HIELO**

5.1. Introducción

Si bien el almidón es utilizado comúnmente en la formulación de alimentos precocidos congelados, la información existente desde el punto de vista microscópico sobre los cambios que ocurren durante la congelación y el almacenamiento es limitada (Meryman, 1966; Berghofer y Klaushofer, 1976; Holmes y Soeldner, 1981; Przybyl y col., 1983). El deterioro ya descrito en los capítulos anteriores (sinéresis, formación de matriz esponjosa) ha sido atribuido por numerosos autores a la retrogradación (Hanson y col., 1951; Osman y Cummisford, 1959; Brunnek y Koptelova, 1970; Chan y Toledo, 1976) mientras que otros trabajos ponen el énfasis en la formación y posterior recristalización del hielo (Przybyl y col., 1983). Como ya fue definido en la introducción, se denomina recristalización al crecimiento de los cristales de hielo de mayor tamaño a expensas de los más pequeños, lo que conduce a la reducción del número total de cristales y al incremento del diámetro medio cristalino (Sy y Fennema, 1973; Bevilacqua y Zaritzky, 1982; Harper y Shoemaker, 1983; Martino y Zaritzky, 1987, 1988, 1989).

Cuando se miden tamaños cristalinos del hielo en matrices congeladas, resulta difícil preservar la estructura y mantener la localización y tamaño de los cristales. Este tipo de estudios puede encararse de dos maneras:

a. observación microscópica directa de la muestra congelada con ayuda de una platina refrigerada;

b. observación indirecta de los huecos dejados por los cristales de hielo en el sistema (técnicas de sustitución a bajas temperaturas)

En la técnica de observación directa, la muestra debe cortarse y observarse a baja temperatura por lo que se requiere de un equipamiento adecuado que permita un estricto control térmico.

En este sentido, en la técnica de sustitución, si bien la etapa de disolución y fijación se realiza a temperaturas inferiores a 0°C, las restantes etapas se llevan a cabo a temperatura ambiente resultando así mucho más versátil. Esta metodología se basa en la disolución de los cristales de hielo de la muestra

congelada mediante una solución que incluye una sustancia fijadora de la estructura que se quiere preservar. En este caso no se observan los cristales de hielo en forma directa sino los huecos dejados por ellos tras su disolución.

Diferentes autores (Varriano-Marston, 1977; Chabot y col., 1978, 1979; Chabot, 1981; Christianson y col., 1982) han recomendado las técnicas de grabado por congelación ("freeze-etching") o liofilización ("freeze-drying") para la preparación de muestras para la observación microscópica. No obstante, estas técnicas adolecen de serias desventajas a temperaturas por debajo de 0°C.

La técnica de liofilización requiere, generalmente, que los especímenes sean enfriados hasta -45 ó -60°C; en tanto que en el caso de la sustitución a baja temperatura, se utilizan temperaturas similares o aún más bajas.

Las técnicas de grabado en frío requieren temperaturas de -100°C o aún inferiores (Hunt, 1984). El enfriamiento a temperaturas más bajas produce la formación adicional de hielo, por lo que la información obtenida por estos métodos está limitada por las modificaciones en cantidad y distribución de los cristales que las técnicas en sí introducen.

La fijación isotérmica a temperaturas inferiores a 0°C es una técnica de equilibrio introducida por MacKenzie y col. (1975) que preserva la estructura y mantiene la relación conformacional de la fase hielo en equilibrio termodinámico con el espécimen congelado. Esta condición se alcanza con una solución fijadora con punto de fusión igual al de la temperatura de fijación (es decir, la temperatura a la que se encuentra la muestra) y el mantenimiento de estas condiciones durante el período de fijación. Estas formulaciones interactúan con los componentes del espécimen confiriendo rigidez a la matriz y asegurando la preservación del patrón cristalino original (MacKenzie y col., 1975; Hunt, 1984; Lampila y col., 1985; Martino y Zaritzky, 1986).

No existen reglas acerca de cuál es el mejor fijador para suspensiones de almidón gelatinizado (Kalab, 1983).

Generalmente, es necesario probar varios fijadores y elegir aquel que permite lograr una mejor calidad total de fijación (Bechtel, 1990). En bibliografía puede encontrarse un amplio

rango de agentes fijadores, concentraciones y sistemas buffer (Varriano-Marston, 1977; Angold, 1979; Chabot y col. 1979; Falk, 1980; Bechtel, 1990). Sin embargo, la mayoría de los trabajos sobre pastas de almidón, masas y productos horneados informan sobre el uso de aldehídos tales como glutaraldehído o formaldehído como fijadores. Bechtel (1990) enfatizó que para la localización citoquímica de carbohidratos, la fijación con formaldehído parece ser la mejor elección.

El formol ha sido citado como fijador de glucógeno en tejidos de origen animal aunque está aun en discusión si su acción fijadora es a nivel del polisacárido en sí o si en realidad, fija la matriz proteica que rodea al glucógeno (Everson Pearse, 1960). Asimismo, el formol ha resultado adecuado como fijador para ciertos materiales botánicos de paredes celulares gruesas, de difícil preservación con otros fijadores (Pease, 1960).

El objetivo de este capítulo fue analizar el efecto de la velocidad de congelación y temperatura de almacenamiento en el tamaño y distribución de los cristales de hielo formados en pastas gelatinizadas de almidón de maíz y de harina de trigo con y sin agregado de hidrocóloide. Para realizar tales mediciones a partir de micrografías se utilizó la técnica de sustitución isotérmica a bajas temperaturas que incluye como etapa importante la fijación.

La optimización de esta técnica incluye la prueba y selección de distintas soluciones fijadoras. Teniendo en cuenta que el aspecto más discutido de este tipo de metodología es la contracción de la matriz durante la deshidratación química, la selección de un fijador que minimice el problema resulta, por lo tanto, muy importante (Hood y col., 1974; Lee, 1984).

Asimismo se analizó la velocidad de difusión del fijador en el sistema a las bajas temperaturas de almacenamiento (-5, -10, -15 y -20°C) y se utilizaron modelos matemáticos para predecir los tiempos mínimos de fijación a cada temperatura.

5.2. Materiales y métodos

5.2.1. Preparación de las muestras

Las pastas de almidón de maíz y de harina de trigo, con y sin hidrocoloide, fueron preparadas según lo descrito en el Capítulo 2. Las pastas así obtenidas fueron distribuidas en pequeños moldes cilíndricos de aluminio de 0,8 cm de diámetro y 0,5 cm de altura, los cuales se envolvieron totalmente en película plástica (Parafilm) con el fin de evitar deshidrataciones durante el almacenamiento congelado. Las muestras fueron congeladas hasta una temperatura final de -20°C , en cámara de -20° y de -80°C lográndose respectivamente, velocidades de congelación de 2 cm/h ($t_c=4,5$ min) y de 15 cm/h ($t_c=1,0$ min), es decir, rápida y ultra-rápida. A los fines de comparar cualitativamente el grado de deterioro producido en la estructura de la pasta bajo diferentes velocidades de congelación se efectuaron congelaciones a 0,1 cm/h ($t_c=156$ min) y por inmersión en líquido criogénico (N_2) (> 100 cm/h).

Para el estudio de la cinética de recristalización, las muestras recién congeladas fueron trasladadas a cámaras de almacenamiento a -5 , -10 y -20°C ($\pm 0,5^{\circ}\text{C}$) donde permanecieron por un periodo máximo de 90 días. A diferentes tiempos de almacenamiento (0, 8, 15, 30, 60 y 90 días), muestras por duplicado elegidas al azar, fueron procesadas de acuerdo con el método de fijación que se describe a continuación.

5.2.2. Observación microscópica: técnica de sustitución isotérmica a temperaturas bajo cero

La técnica empleada se basó en la utilizada por Martino y Zaritzky (1986), adecuándola a las características del sistema bajo estudio.

Las muestras congeladas, almacenadas en cámaras de -5 , -10 y -20°C , fueron inmersas en la solución fijadora previamente enfriada hasta cada temperatura, llevándose a cabo una fijación

isotérmica.

Una vez que las muestras fueron fijadas, los pasos siguientes fueron llevados a cabo a temperatura ambiente. La deshidratación fue efectuada con una serie de soluciones etanólicas de concentración creciente (desde 70 hasta 100 % v/v de alcohol absoluto). Las muestras de pastas de almidón o harina fueron clarificadas a continuación en benceno (solvente afín con el medio de inclusión) y embebidas en parafina de uso histológico (Paraplast Plus, Monoject Scientific, USA, PF=56-58°C). Estos pasos se efectuaron en forma automática mediante un equipo Histokinette tipo E 7326 (British American Optical Co. Ltd.) basado en un mecanismo que permite rotar un porta-muestras y sumergirlo en las distintas soluciones de acuerdo a un programa de intervalos de tiempo determinado.

Las dimensiones de las muestras cilíndricas fueron medidas después de la deshidratación, clarificación y parafinización con el fin de determinar las modificaciones de tamaño introducidas por la técnica. Los factores de contracción (FC) fueron evaluados como la relación entre el diámetro de la muestra después del proceso completo de fijación respecto al valor inicial.

Para poder efectuar los cortes se realizó la inclusión definitiva de las muestras en bloques de parafina. Para ello fueron trasladadas después del procesado en el equipo automático a moldes de papel de 2,0 x 1,5 x 1,5 cm, llenos de parafina líquida. Una vez solidificados los bloques y montados sobre tacos de madera se efectuaron los cortes mediante un Micrótopo Rotatorio modelo 820 American Optical. El montaje fue tal que permitió el corte transversal a la dirección en la cual se produjo el crecimiento de los cristales de hielo en la pasta. El espesor de los cortes fue de 10 μ m.

Una vez adheridos al portaobjetos con albúmina de Mayer (albúmina de huevo en glicerina al 60 % v/v) los preparados fueron desparafinizados con xileno, hidratados mediante una serie de soluciones etanólicas de concentración decreciente (de 100 a 70 % v/v) y finalmente teñidos con una solución acuosa de I₂ (1 % p/v). Para su montaje definitivo se procedió a una nueva deshidratación mediante pasajes sucesivos por soluciones de concentra-

ción de etanol creciente hasta llegar a alcohol absoluto, 2 ó 3 pasajes por xileno, interponiéndose finalmente entre el cubreobjeto y el espécimen un medio de índice de refracción adecuado (Bálsamo de Canadá).

Las micrografías de los cortes así preparados fueron realizadas con un microscopio Leitz Ortholux II con cámara Leitz Vario Orthomat (Leitz, Alemania). De cada duplicado correspondiente a una dada condición de congelación y almacenamiento se tomó un número de micrografías tal que permitiera la medición de por lo menos 150 cristales.

5.2.2.1. Selección del fijador

Con el fin de seleccionar un fijador efectivo, fueron probadas diferentes formulaciones (Tabla 5.1).

La elección del fijador se realizó en base a la calidad del corte obtenido, rigidez de la muestra, cohesión del material después del corte (resistencia a la desintegración), resistencia del material al proceso de teñido y mantenimiento de las dimensiones relativas.

El etanol y el ClNa fueron utilizados como co-solutos con el objeto de bajar el punto de congelación de la solución. El primero es un agente de deshidratación muy utilizado debido a su efectividad y baja toxicidad.

El glutaraldehído fue probado debido a que es uno de los fijadores más comúnmente usados (MacKenzie y col. 1975, Hunt, 1984; Lee, 1984; Lampila y col., 1985). Las sales de fosfato fueron agregadas a una de las formulaciones con el fin de adecuar el pH al de la muestra (pH=5).

Las muestras tratadas con las diferentes formulaciones fueron sometidas a los siguientes pasos de la técnica según se describió en la sección anterior, utilizándose dos temperaturas de fijación, -5 y -20°C .

Tabla 5.1. Formulación de las soluciones fijadoras

Componentes	Concentración (% p/p)	Referencia
Carnoy (Cloroformo, ácido acético glacial, etanol absoluto)	30, 10, 60	Feder y Sidman (1958)
Acido acético, formaldehído al 40%, etanol absoluto, agua	5, 10, 70, 15	Woodroof (1939) Van Hulle y col(1965)
	5, 10, 38, 47	Presente trabajo
Etanol absoluto, formaldehído al 40%, agua	45, 10, 45	Presente trabajo
Etanol absoluto, formaldehído al 40%, agua	45, 10, 45	Lynch y col.(1965)
fosfato dibásico de sodio	0,35*	
fosfato monobásico de sodio	0,65*	
Glutaraldehído al 25%, etanol absoluto	8, 92	Presente trabajo

(*) Concentraciones expresadas en % p/v

5.2.2.2. Difusión del fijador y determinación de tiempos de fijación

Una vez efectuada la elección del fijador más adecuado, en base a los resultados obtenidos, se determinó el tiempo de fijación requerido por ese fijador a cada una de las temperaturas de

almacenamiento (-5, -10 y -20°C).

Los experimentos para establecer las velocidades de fijación fueron llevados a cabo mediante simulación de transferencia de masa unidireccional en medio semi-infinito. Las pastas de almidón fueron colocadas en recipientes cilíndricos de 3,5 cm de diámetro y 8 cm de altura, ocupándose con los geles el 50 % del volumen disponible y congelándose posteriormente hasta una temperatura final de -20°C. Las pastas fueron transferidas posteriormente a cámaras de almacenamiento a -5, -10, -15 y -20°C. La solución fijadora fue pre-enfriada a esa temperatura y colocada en el espacio libre de la parte superior de los recipientes cilíndricos. A diferentes tiempos, se midió el avance del frente fijador con calibre. A cada tiempo, se calculó el coeficiente de difusión en la zona donde el hielo es reemplazado por la solución fijadora, mediante ecuaciones válidas para medio semi-infinito, con coeficiente de difusión discontinuo.

La concentración de la solución fijadora en el frente de avance se obtuvo a partir de la determinación experimental de la curva de congelación de la solución.

Mediante los coeficientes de difusión obtenidos, se estimaron los tiempos de fijación necesarios para las pequeñas muestras utilizadas en las observaciones microscópicas. El análisis involucró la aplicación de modelos matemáticos basados en transferencia de masa unidireccional y los coeficientes de difusión previamente determinados.

5.2.2.3. Mediciones de recristalización

Los experimentos de recristalización fueron llevados a cabo con muestras cilíndricas de pastas de almidón y de harina, con y sin hidrocoloide preparadas según lo descrito en 5.2.1. A partir de las micrografías obtenidas se determinaron los diámetros equivalentes de los cristales de hielo en forma indirecta, es decir, midiendo los huecos dejados por ellos en el sistema. Se midió un mínimo de 150 cristales para cada velocidad de congelación,

tiempo y temperatura de almacenamiento, utilizándose un analizador de imágenes Morphomat 30 (Zeiss, Alemania) para determinar los diámetros equivalentes y a partir de ellos, las distribuciones cristalinas. Se probó el ajuste de dos tipos de distribuciones, normal y log-normal, calculándose las frecuencias y parámetros estadísticos (diámetro equivalente medio, varianza, desviación standard) mediante planillas de cálculo del programa Lotus 123. Se obtuvieron así los histogramas de frecuencias relativas en función del diámetro cristalino para cada tiempo y temperatura de almacenamiento.

5.3. Resultados y discusión

5.3.1. Selección del fijador

De acuerdo a los criterios mencionados en 5.2.2. se realizó la selección del fijador más adecuado.

Se observó una marcada contracción de las muestras fijadas con soluciones con alta concentración de etanol absoluto como el Carnoy. Esto es atribuible a la diferencia de presión osmótica entre la muestra y la solución fijadora. Similares resultados fueron obtenidos por Cohen (1984) y Lee (1984).

Utilizando ClNa para disminuir el punto de congelación de la solución hasta -20°C se obtuvieron resultados poco satisfactorios debido a que las altas concentraciones necesarias (23,3 % p/p) producían una gran diferencia de fuerza iónica entre la solución y la pasta de almidón, observándose también en este caso una marcada contracción.

El co-soluto finalmente elegido fue el etanol, formulándose las soluciones fijadoras con la mínima concentración de este alcohol compatible con la depresión del punto de congelación deseada. De este modo, la inclusión de agua en las soluciones evitó una contracción drástica de las muestras durante la fijación aunque limitó la variedad de formulaciones posibles debido a problemas de miscibilidad.

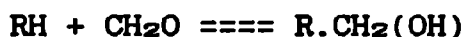
Como se mencionó previamente, la calidad de los cortes eva-

luada a través de la observación microscópica de pastas congeladas fijadas con diferentes soluciones fue uno de los parámetros utilizados para determinar la bondad del método de fijación. Los cortes obtenidos a partir de muestras fijadas con glutaraldehído mostraron ruptura en la red de almidón y desintegración. Por otro lado, la fijación ineficiente se evidenció en este caso en la difícil manipulación de las muestras para obtener los cortes.

La solución fijadora conteniendo las sales de fosfato produjo en ciertos casos opalescencia cuando la temperatura decrecía por lo que esta formulación fue finalmente descartada. Problemas similares a estos fueron informados por Hunt (1984) con respecto a los precipitados de fosfato.

La contracción relativa de las muestras después de cada estadio de la fijación isotérmica se muestra en la Fig. 5.1 (a, b, c y d) para las dos soluciones con las que se obtuvieron los mejores resultados. La solución de etanol absoluto, formaldehído al 40 % y agua (45, 10, 45 % v/v) fue la finalmente seleccionada ya que produjo la menor contracción de la matriz.

La acción fijadora del formol puede relacionarse con su capacidad para reaccionar con los grupos OH del polisacárido, formando uniones de tipo acetálico y hemiacetálico. Esta reactividad característica del grupo funcional aldehído con diversos grupos funcionales (amino, imino, amido, carboxilo, oxhidrilo, sulfhidrilo, anillos aromáticos, entre otros) es esquematizada por Everson Pearse (1960) según:



Las uniones así formadas son fácilmente hidrolizables salvo en los casos en que RH es un grupo SH o aromático y tiene lugar la formación de un puente metilénico. No obstante, ciertas condiciones del medio (pH, formación de puentes de hidrógeno estabilizantes, deshidratación favorecida por la presencia de etanol) pueden explicar la efectividad del formol como fijador para pastas de almidón, al actuar como factores de estabilización de las

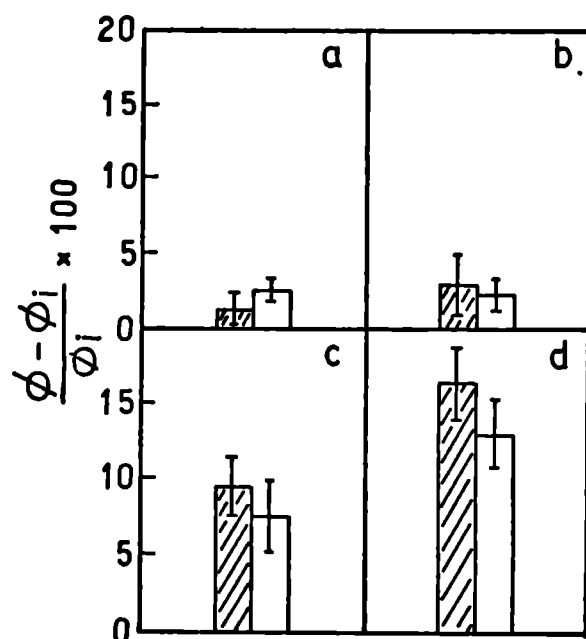




Fig. 5.1. Contracción relativa de las muestras después de cada estadio del método de fijación isotérmica a -5°C . ϕ = diámetro de la muestra medida después de cada estadio. ϕ_i = diámetro de la muestra antes de la fijación. : ácido acético glacial, formaldehído (40 %), etanol absoluto, agua (5, 10, 70, 15 % v/v); : etanol absoluto, formaldehído (40 %), agua (45, 10, 45 % v/v). (a) 4 días de fijación; (b) 7 días de fijación; (c) después de deshidratación y clarificación; (d) después de inclusión en parafina. Las barras indican los errores standard.

uniones acetálicas que se puedan formar.

El factor de contracción medio para este sistema fijador a las diferentes temperaturas probadas fue de $0,81 \pm 0,06$ ($P=0,05$).

Otras consideraciones acerca de errores sistemáticos introducidos por la contracción de las muestras durante el procesamiento pueden hallarse en la sección 5.3.4.3.1.

5.3.2. Difusión del fijador

La velocidad de difusión del fijador a temperaturas por debajo de 0°C fue determinada en un sistema con transferencia de masa unidireccional en un medio semi-infinito, donde la penetración del frente de avance $X(t)$ era muy pequeña respecto a las medidas de la muestra de almidón en la dirección de transferencia de masa (x). En el sistema elegido la concentración del fijador en la superficie $x = 0$ permanecía constante ($c = c_{\bullet}$). El coeficiente de difusión cambia en forma discontinua con un valor constante finito en la zona donde el hielo es disuelto por la solución fijadora ($0 < x < X(t)$) hasta llegar a 0 en la zona congelada ($x > X(t)$) donde el fijador no penetra. De acuerdo a la ley de Fick, la ecuación de difusión en la región $0 < x < X(t)$ es:

$$\frac{\delta c}{\delta t} = \mathcal{D} \frac{\delta^2 c}{\delta x^2} \quad (5.1)$$

donde c es la concentración de fijador al tiempo t y posición x con las siguientes condiciones iniciales y de límite:

$$\begin{array}{lll} t = 0 & c = 0 & \forall x \\ t > 0 & c = c_{\bullet} & x = 0 \\ & c = c_x & x = X(t) \end{array} \quad (5.2)$$

donde c_x es la concentración del fijador en el frente de avance.

La solución de la ecuación (5.1) y la posición del frente de avance $X(t)$ fueron dadas por Crank (1957).

$$X = b t^{1/2} \quad (5.3)$$

donde b es la pendiente de la recta obtenida representando X en función de $t^{1/2}$. Además:

$$g = \frac{c_e}{c_x} - 1 = \pi^{1/2} \frac{b}{2 \mathcal{D}^{1/2}} \exp \frac{b^2}{4 \mathcal{D}} \operatorname{erf} \frac{b}{2 \mathcal{D}^{1/2}} \quad (5.4)$$

Crank (1957) provee una solución gráfica a la función g en términos de $b/2 \mathcal{D}^{1/2}$, de donde puede obtenerse el coeficiente de difusión alimentando los demás parámetros.

Se supuso que el frente del fijador tenía una concentración de equilibrio correspondiente al punto de congelación. Esta concentración c_x fue determinada a partir de la curva de puntos de congelación experimentales de la solución fijadora (Fig. 5.2) graficada como temperatura de congelación en función de c' (concentración de la solución fijadora). Asimismo se supuso un coeficiente de partición constante (s) en la pasta de almidón ($c = s c'$), luego:

$$\frac{c_e}{c_x} = \frac{c'_e}{c'_x} \quad (5.5)$$

donde c'_x es la concentración de la solución cuyo punto de congelación coincide con la temperatura de la cámara de almacenamiento, c'_e es la concentración de la solución fijadora en contacto con la pasta de almidón.

Las posiciones de avance del frente $X(t)$ fueron medidas en función del tiempo a diferentes temperaturas (-5, -10, -15 y -20°C). Los gráficos de X vs. $t^{1/2}$ a dichas temperaturas resultaron líneas rectas según la ec. (5.3) (Fig. 5.3); los valores de b fueron obtenidos experimentalmente a partir de las pendientes de la regresión lineal de los datos.

Los valores experimentales de b y de c_e/c_x fueron alimentados a la solución gráfica de la ec. (5.4) para obtener los coeficientes de difusión a diferentes temperaturas (Tabla 5.2).

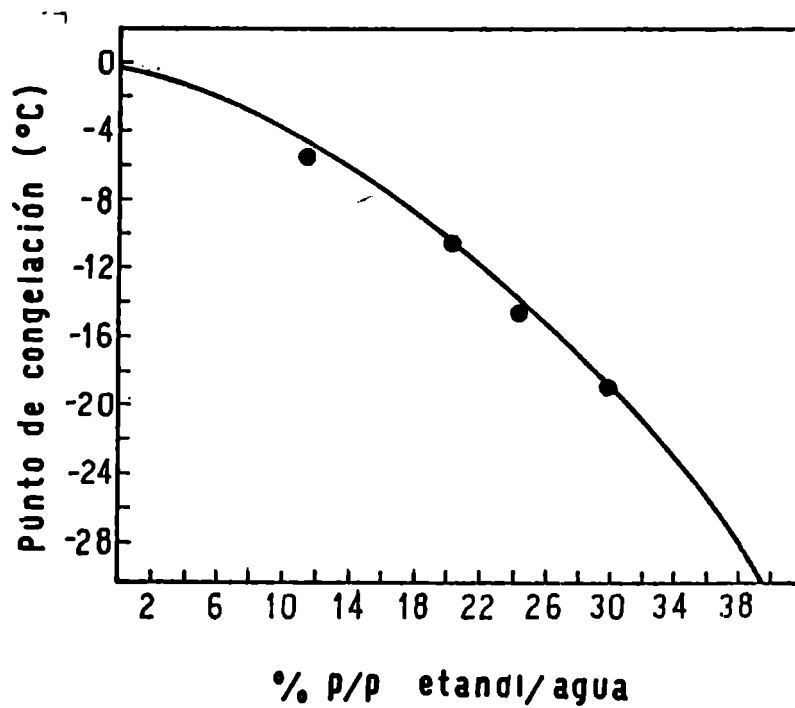


Fig. 5.2. Puntos de congelación de la solución de la solución fijadora: etanol absoluto, formaldehído (40 %), agua (45, 10, 45 % v/v)

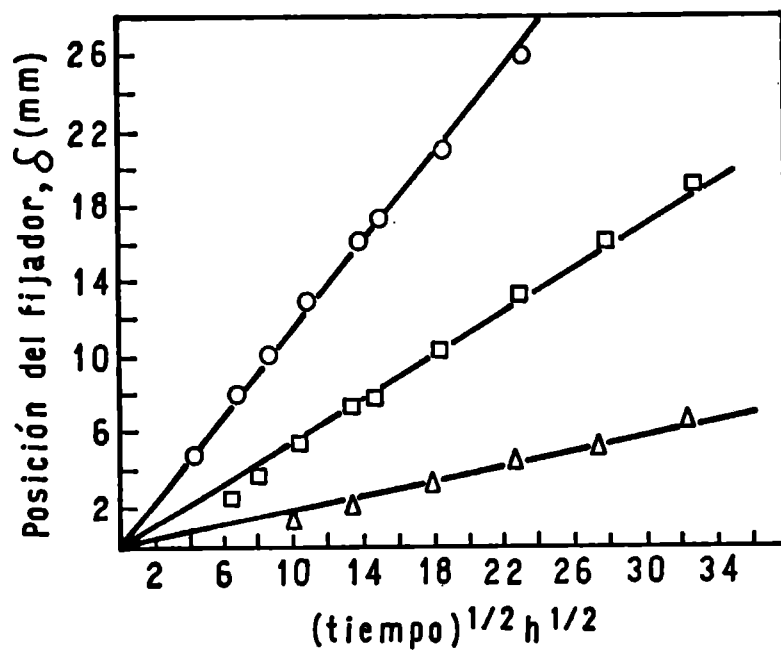


Fig. 5.3. Efecto de la temperatura sobre la posición del frente de fijación como función de $(\text{tiempo})^{1/2}$ en pasta de almidón de maíz (10 % p/p) considerada como medio semiinfinito (o) -5°C ; (□) -10°C ; (Δ) -20°C

La energía de activación para la difusión fue estimada de acuerdo a la ley de Arrhenius, obteniéndose un valor de $E_a = 95,44 \pm 1,15$ KJ/mol.

Tabla 5.2. Efecto de la temperatura sobre el coeficiente de difusión del fijador elegido en pastas de almidón de maíz

T(°C)	D x 10 ¹⁰ (m ² s ⁻¹)
-5	1,21 ± 0,20
-10	0,60 ± 0,06
-15	0,21 ± 0,05
-20	0,11 ± 0,06

5.3.3. Tiempo de fijación de las muestras

Los valores de velocidad de avance del frente, los coeficientes de difusión calculados y la distribución de concentraciones del fijador fueron utilizados para predecir los tiempos de fijación de pequeñas muestras en base a modelos matemáticos simplificados.

Los tiempos de fijación a cada temperatura fueron estimados en dos pasos:

- 1) El tiempo (t_1) necesario para que el frente llegue al centro de la muestra; el perfil de concentraciones en ese momento abarca desde c_a en el borde hasta c_x en el centro.
- 2) El tiempo (t_2) necesario para aumentar la concentración en el centro de la muestra a un valor $c = 0,8 c_a$. Experimentos previos, utilizando la solución fijadora en distintas concentraciones y los criterios de calidad de corte ya mencionados, mostraron que esta concentración resultaba suficiente para la fijación de la

matriz.

Con el fin de poder utilizar como modelos matemáticos soluciones analíticas a la ecuación de difusión en estado no estacionario, se supuso transferencia de masa unidireccional en ambos pasos. Esta suposición condujo a valores sobreestimados de tiempo de fijación ya que los sistemas reales presentan transferencia de masa bi o tridireccional; sin embargo esta predicción sencilla, al ser por exceso, permite asegurar una penetración suficiente de la solución para lograr la fijación.

Para el primer paso, el tiempo (t_1) se obtuvo a partir de la ec.(5.3) usando los datos experimentales de b ; se consideró para los cálculos una muestra de 4 mm de espesor.

Para la segunda etapa se tuvo en cuenta que, una vez que el frente de avance alcanza el centro de la placa finita, el coeficiente de difusión es constante en todo el rango de concentraciones (Crank, 1957). En este caso puede usarse la bien conocida solución matemática para la difusión en placa plana con un coeficiente de difusión constante pero con una dada distribución inicial de concentraciones. Con el fin de simplificar el modelo matemático, se consideró que la concentración inicial era uniforme e igual a c_x , valor de concentración correspondiente al centro de la placa y punto mínimo del perfil. Esta suposición condujo nuevamente a una sobreestimación del tiempo de fijación, pero permitió el uso de soluciones matemáticas analíticas. Los valores de c_x/c_e para cada temperatura se muestran en la Tabla 5.3. La solución de Carslaw y Jaeger (1978) y las cartas de Heisler para placa plana (Holman, 1976) fueron utilizadas para estimar el tiempo (t_2) necesario a efectos de aumentar la concentración del fijador en el centro de la muestra ($x = 0$) desde $c=c_x$ hasta $c=0,8 c_e$, según la ecuación:

$$\frac{c - c_x}{c_e - c_x} = 1 - \frac{4}{\pi} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{(-1)^n}{2n+1} \exp \left(\frac{-\mathcal{D}(2n+1)^2 \pi^2 t}{4 l^2} \right) \quad (5.6)$$

Los coeficientes de difusión, previamente determinados a cada temperatura, fueron utilizados en este paso para calcular el

tiempo (t) siendo l el semi espesor de la muestra (2 mm).

Los valores obtenidos para el tiempo de fijación total (Tabla 5.3) muestran el importante efecto de la temperatura de fijación.

Tabla 5.3. Efecto de la temperatura en el tiempo de fijación de muestras de 4 mm de espesor

T(°C)	c_x/c_e	Tiempo de fijación t_1 (h)	Tiempo de fijación t_2 (h)	Tiempo total de fijación (h)
-5	0,29	3,2	5,1	8,3
-10	0,44	7,8	7,9	15,7
-15	0,61	47,2	18,8	66,0
-20	0,70	100,0	22,0	122,0

c_x = concentración del fijador en el frente de avance;

c_e = concentración del fijador en el borde de la muestra.

Como cabe esperar, a temperaturas más altas, donde se ve favorecida la difusión de las sustancias fijadoras, el tiempo total requerido para la fijación de la matriz de almidón es mucho menor (aproximadamente 15 veces) que el necesario a más bajas temperaturas. La consecuencia práctica de estos resultados es el empleo de mayores tiempos de inmersión en la solución fijadora en el caso de las muestras almacenadas a -20°C (no menos de 5 días).

5.3.4. Influencia de las condiciones de congelación y almacenamiento en la distribución de tamaños cristalinos en pastas de almidón de maíz y de harina de trigo sin y con agregado de estabilizante

5.3.4.1. Efecto de la velocidad de congelación

A partir de las mediciones de los diámetros equivalentes de los cristales de hielo se construyó en cada caso el histograma correspondiente de frecuencias relativas en función de diámetro (De).

Para el cálculo del diámetro cristalino medio y su error se aplicaron en una primera etapa las fórmulas correspondientes a distribución normal y distribución logarítmica comprobándose el ajuste de ambas mediante el test χ^2 (chi cuadrado). Al encontrar que no había demasiadas diferencias en cuanto a la bondad del ajuste, para el total de 128 histogramas obtenidos se optó por la distribución normal ya que ofrecía mayor sencillez para el cálculo de la media, varianza y desviación standard.

En las Figs. 5.4 y 5.5 se pueden observar las micrografías de pastas de almidón de maíz y harina de trigo, respectivamente, sin agregado de goma xántica, correspondientes a muestras congeladas a distintas velocidades sin almacenamiento posterior. Las zonas claras corresponden a los huecos dejados por los cristales de hielo. Comparando las micrografías (a) y (d) de cada serie, correspondientes a las velocidades más alta (> 100 cm/h) y más baja (0,1 cm/h) respectivamente, se puede apreciar el mayor tamaño de los cristales de hielo formados por congelación lenta que produce mayor deterioro de la matriz de almidón gelatinizado. Por el contrario, una congelación ultra-rápida por inmersión en N₂ líquido al conducir a la formación de cristales mucho más pequeños, conserva en mayor medida la estructura uniforme original. El agregado de estabilizante, según se desprende de las micrografías (Figs. 5.6 y 5.7) no tuvo un efecto notorio sobre el tamaño cristalino inicial, ya que en el caso más crítico (congelación lenta) la estructura presentaba un deterioro similar al de la pasta sin agregado de goma xántica.

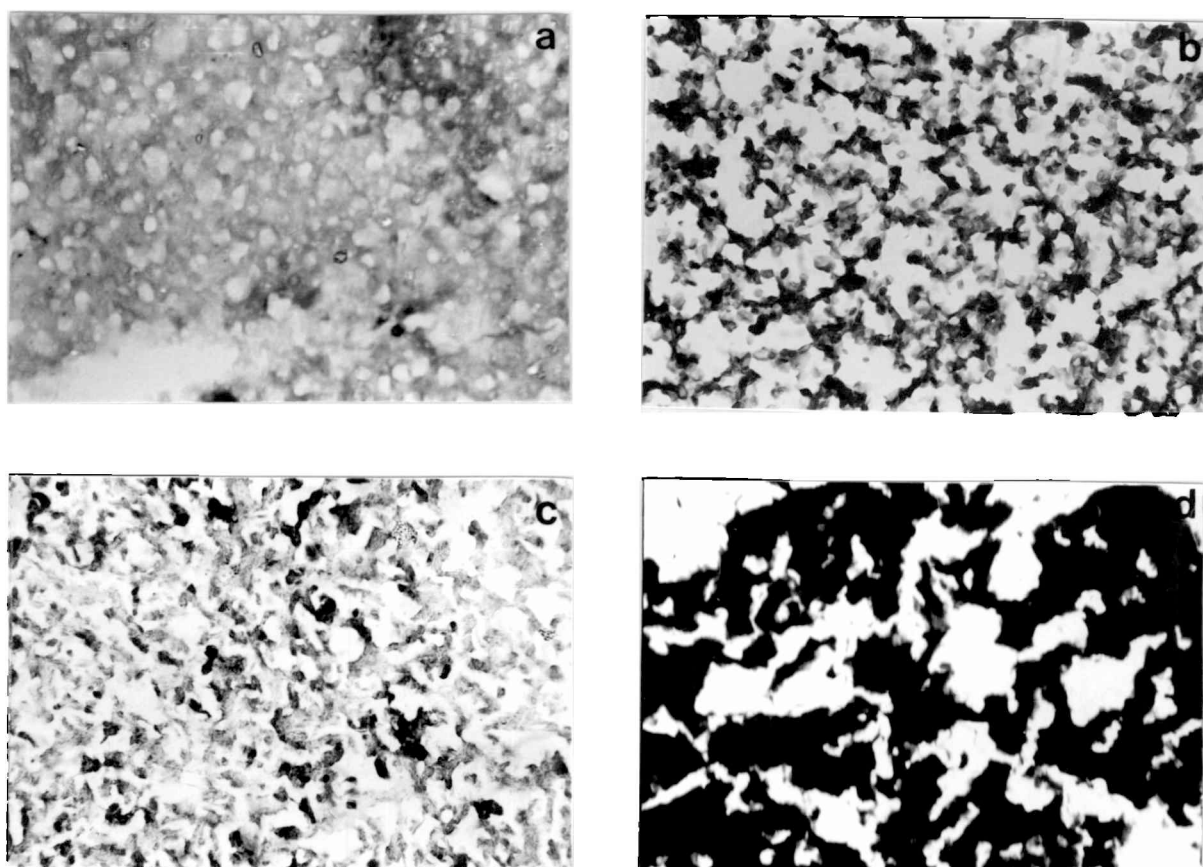


Fig. 5.4. Efecto de la velocidad de congelación sobre el tamaño de cristales de hielo en pastas de almidón de maíz sin agregado de goma xántica. Velocidades de congelación: (a) > 100 cm/h; (b) 15 cm/h; (c) 2 cm/h; (d) 0,1 cm/h. — = 100 μ m

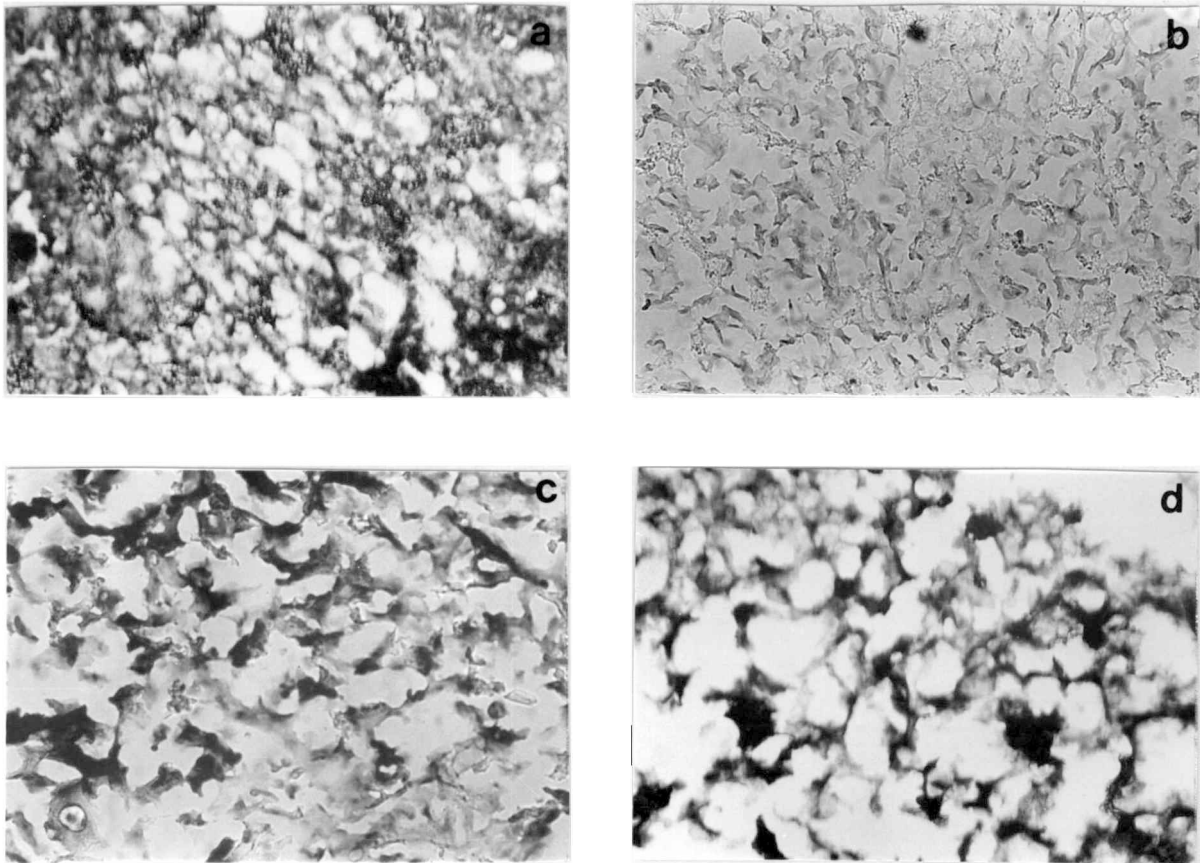


Fig. 5.5. Efecto de la velocidad de congelación sobre el tamaño de cristales de hielo en pastas de harina de trigo sin agregado de goma xántica. Velocidades de congelación: (a) > 100 cm/h; (b) 15 cm/h; (c) 2 cm/h; (d) 0,1 cm/h. $\text{-----} = 100 \mu\text{m}$

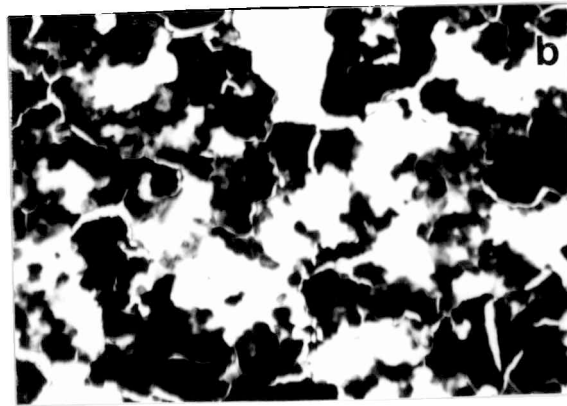
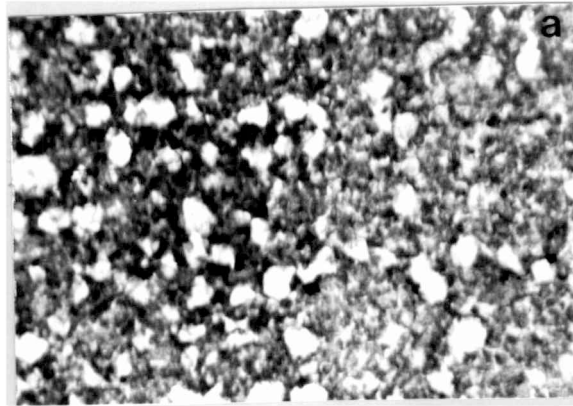


Fig. 5.6. Efecto de la velocidad de congelación sobre el tamaño de cristales de hielo en pastas de almidón de maíz con agregado de goma xántica. Velocidades de congelación: (a) > 100 cm/h; (b) $0,1$ cm/h. \longleftrightarrow = $100 \mu\text{m}$

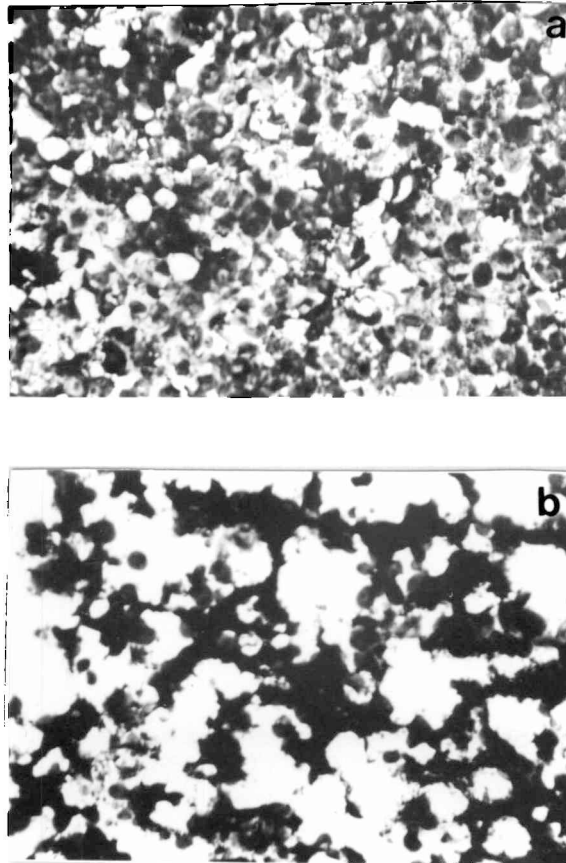


Fig. 5.7. Efecto de la velocidad de congelación sobre el tamaño de cristales de hielo en pastas de harina de trigo con agregado de goma xántica. Velocidades de congelación. (a) > 100 cm/h; (b) 0,1 cm/h. \longleftrightarrow =100 μ m

Para analizar el efecto de la velocidad de congelación, interesaba en particular el estudio de las distribuciones cristalinicas en muestras recién congeladas. En la Fig. 5.8 se han representado los histogramas de frecuencia cristalina (%) en función del diámetro equivalente (μm) para muestras congeladas a distintas velocidades sin posterior almacenamiento congelado. Las distribuciones (a) y (b) corresponden respectivamente a las muestras de las micrografías (c) y (b) de la Fig. 5.4, es decir a pastas de almidón común sin agregado de goma xántica. Las distribuciones (e) y (f) son las correspondientes a las pastas de harina de trigo cuyas micrografías se muestran en la Fig. 5.5 c y b. Se observa que todas las distribuciones correspondientes a congelaciones rápidas (15 cm/h) abarcan un rango más estrecho de diámetros cristalinicos. En la Tabla 5.4 se muestran los valores obtenidos de diámetro equivalente medio inicial (D_0) para las dos velocidades de congelación analizadas en los distintos sistemas en estudio. Pudo confirmarse que cuanto mayor era la velocidad de congelación, menores eran los diámetros medios de las distribuciones obtenidas.

De la observación de las distribuciones se desprende que una congelación más rápida da lugar a distribuciones más estrechas (menor desviación standard σ) correspondiendo además, la distribución a diámetros cristalinicos menores (menor D_e). Aun no habiendo diferencias de más de 5 μm en las medias como es el caso de las Fig. 5.5 c y d, vemos que la forma de las distribuciones (relacionable con σ) son muy distintas. Por ello, es importante considerar ambos valores, el de la media y el de σ como parámetros de comparación. Posteriormente se verá que el análisis de la desviación standard de la distribución inicial es de gran importancia respecto a la recristalización del hielo que ocurre durante el almacenamiento.

Las mediciones confirmaron que el agregado de estabilizante no afecta significativamente el tamaño cristalinico inicial, ya que

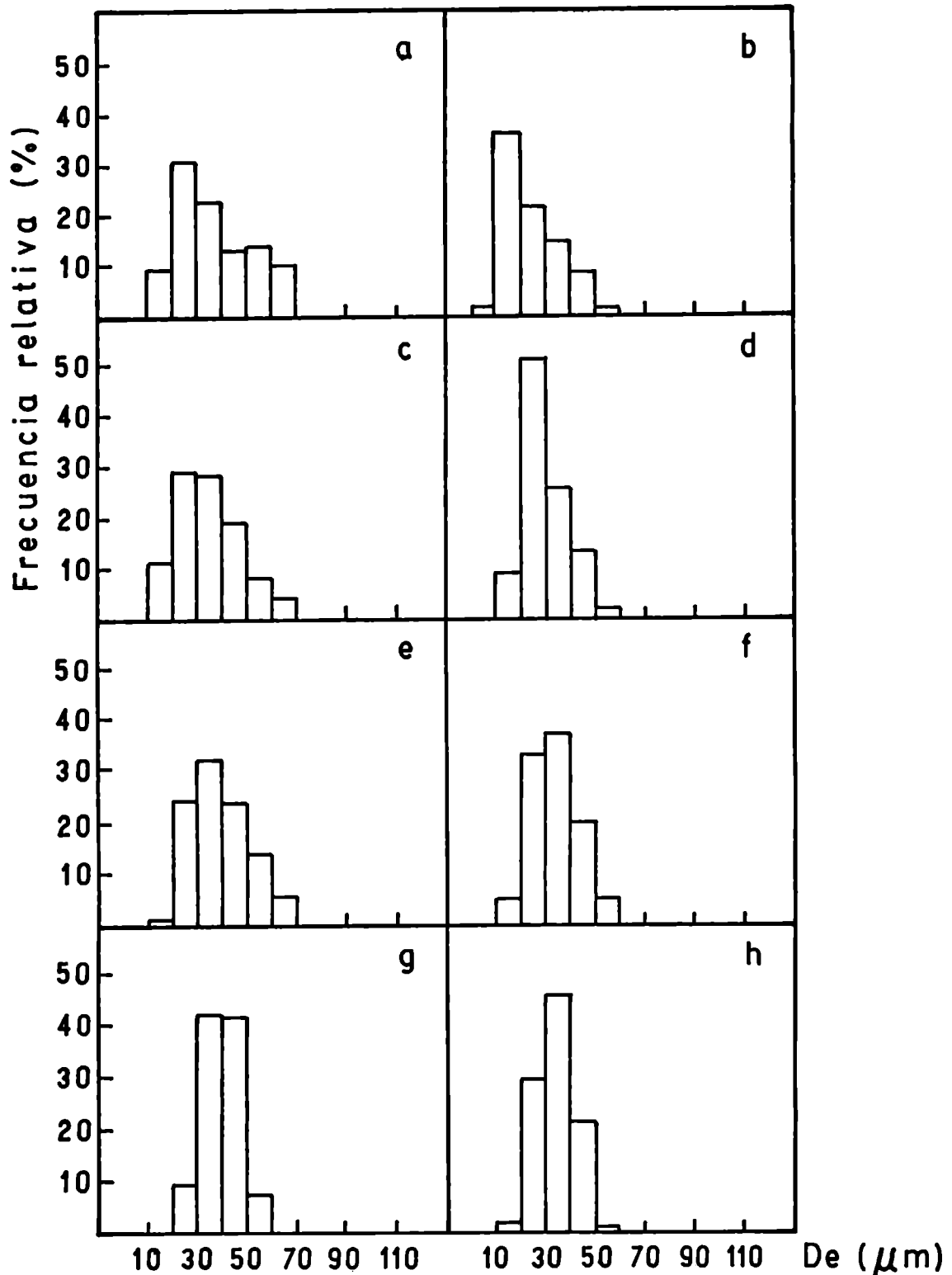


Fig. 5.8. Histogramas de frecuencia relativa (%) en función del diámetro equivalente (De) de cristales de hielo en pastas de almidón de maíz sin agregado de goma xántica congeladas a 2 cm/h (a) y 15 cm/h (b); con agregado de goma xántica congeladas a 2 cm/h (c) y 15 cm/h (d) y para pastas de harina sin agregado de goma xántica congeladas a 2 cm/h (e) y 15 cm/h (f) y con agregado de goma xántica congeladas a 2 cm/h (g) y 15 cm/h (h)

Tabla 5.4. Diámetros equivalentes medios de muestras congeladas sin almacenamiento posterior

	Do (μm)	
	$V_0 = 2 \text{ cm/h}$	$V_0 = 15 \text{ cm/h}$
almidón de maíz	$37,34 \pm 2,50$	$30,89 \pm 1,81$
almidón de maíz con goma xántica	$34,49 \pm 1,66$	$29,69 \pm 0,84$
harina de trigo	$39,07 \pm 1,33$	$33,76 \pm 1,09$
harina de trigo con goma xántica	$39,93 \pm 1,00$	$33,91 \pm 0,70$

Límites de confianza de los diámetros cristalinos estimados para una probabilidad del 95 %

a pesar de haber una diferencia significativa entre los diámetros medios cristalinos de pastas de almidón de maíz sin y con hidrocoloide congeladas a menor velocidad ($37,34 \mu\text{m}$ y $34,49 \mu\text{m}$ respectivamente) en los otros casos las diferencias están dentro del error. Con respecto a la proteína de la harina, ésta no parece ejercer un efecto apreciable durante la congelación en sí ya que las diferencias de diámetro medio cristalino entre pastas de harina y de almidón de maíz ($39,07 \mu\text{m}$ y $37,34 \mu\text{m}$ respectivamente) no difieren significativamente según ensayo t-student para diferencia de medias ($P=0,05$).

5.3.4.2. Recristalización de hielo en pastas de almidón de maíz y de harina de trigo. Efecto de la temperatura de almacenamiento y del agregado de estabilizante

En la Fig. 5.9 se presentan las micrografías obtenidas para muestras de almidón de maíz común sin agregado de goma xántica y

en la Fig. 5.10, los histogramas de frecuencia cristalina en función del \bar{D}_c correspondientes a las micrografías de la Fig. 5.9, para una velocidad de congelación de 2 cm/h. Tanto en las micrografías como en los histogramas se observa que hay un crecimiento notable del tamaño cristalino cuando la temperatura de almacenamiento es de -5°C . El diámetro medio de una muestra almacenada a esta temperatura durante 8 días resultó de $40,51 \mu\text{m}$ mientras que tras 60 días de almacenamiento llegó a $66,96 \mu\text{m}$. Esto se refleja en la distribución donde se observa un achatamiento del histograma en función del tiempo de almacenamiento debido al incremento de las frecuencias de los cristales de mayor diámetro y la consiguiente disminución de las correspondientes a los cristales de menor tamaño, efecto característico del proceso de recristalización.

Por otro lado, el almacenamiento a temperaturas más bajas (-10 y -20°C) mantiene la distribución cristalina dentro de un rango más estrecho y no produce un corrimiento del \bar{D}_c a valores tan altos como en el caso del almacenamiento a -5°C , aun a tiempos largos de almacenamiento (Fig. 5.10 d y f).

Las Fig. 5.11 y 5.12 muestran respectivamente las micrografías y los histogramas correspondientes a pastas de almidón congeladas a 15 cm/h, sin agregado de estabilizante. Se observa que las diferencias entre la muestra congelada y almacenada a -5°C durante 15 días y la que tiene 60 días de almacenamiento no son muy notorias, reflejándose este hecho en las distribuciones cristalinas. En particular, las muestras almacenadas a -20°C presentan una distribución de diámetros cristalinos muy similar a la inicial (Fig. 5.12 d y f).

Las siguientes micrografías e histogramas corresponden a pastas de harina de trigo congeladas a 2cm/h (Fig. 5.13 y 5.14 respectivamente) y a 15 cm/h (Fig. 5.15 y 5.16), almacenadas, como en el caso anterior a tres distintas temperaturas. Vemos que similarmente a lo antes descrito para pastas de almidón, el crecimiento cristalino es importante a -5°C pero no se observan cambios sustanciales cuando el almacenamiento es a -10 ó -20°C respecto a la muestra sin almacenamiento.

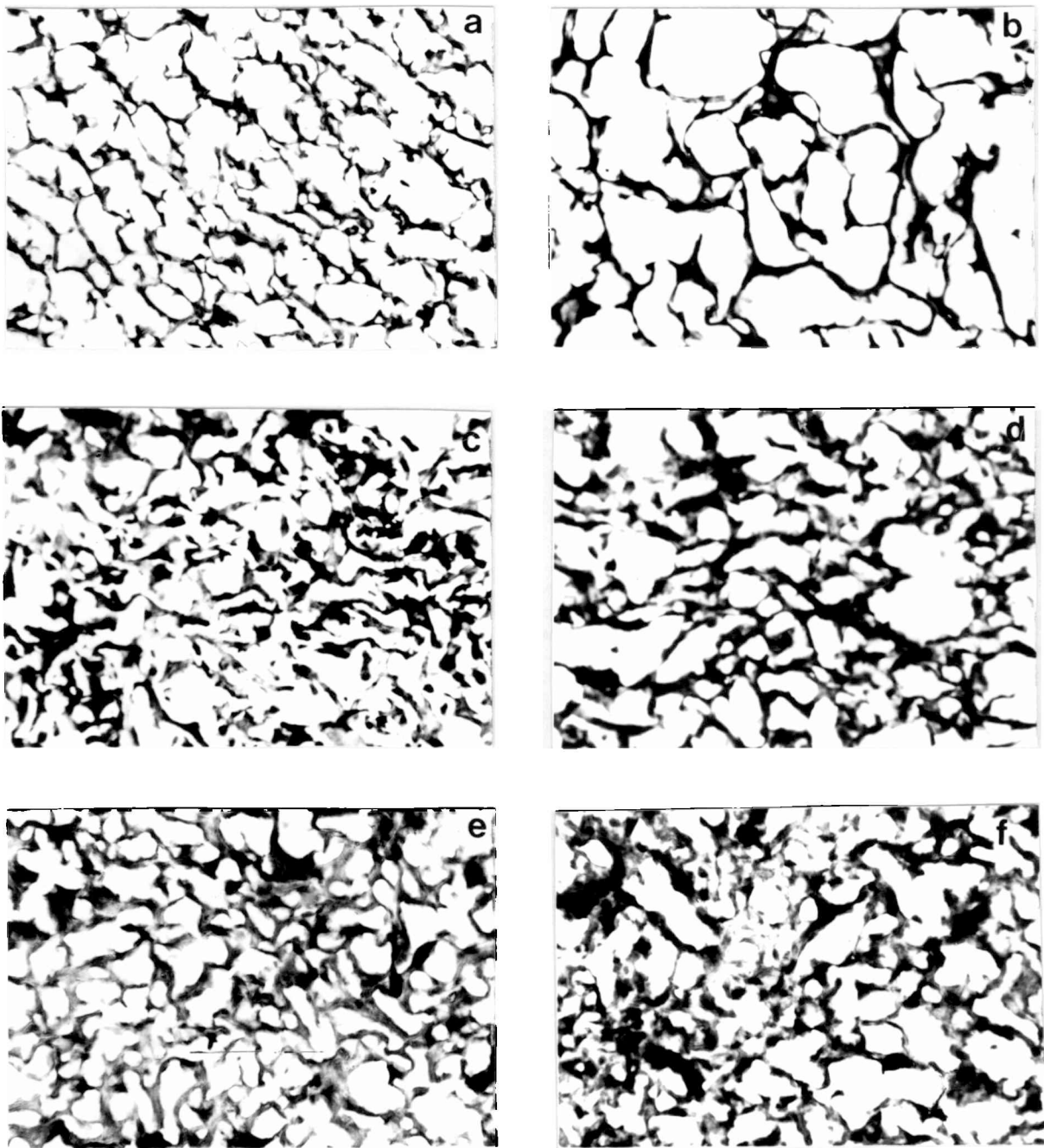


Fig. 5.9. Micrografías de pastas de almidón de maíz sin agregado de goma xántica congeladas a 2 cm/h correspondientes a distintos tiempos y temperaturas de almacenamiento. (a) 8 días a -5°C ; (b) 60 días a -5°C ; (c) 8 días a -10°C ; (d) 60 días a -10°C ; (e) 8 días a -20°C ; (f) 60 días a -20°C
 — =100 μm

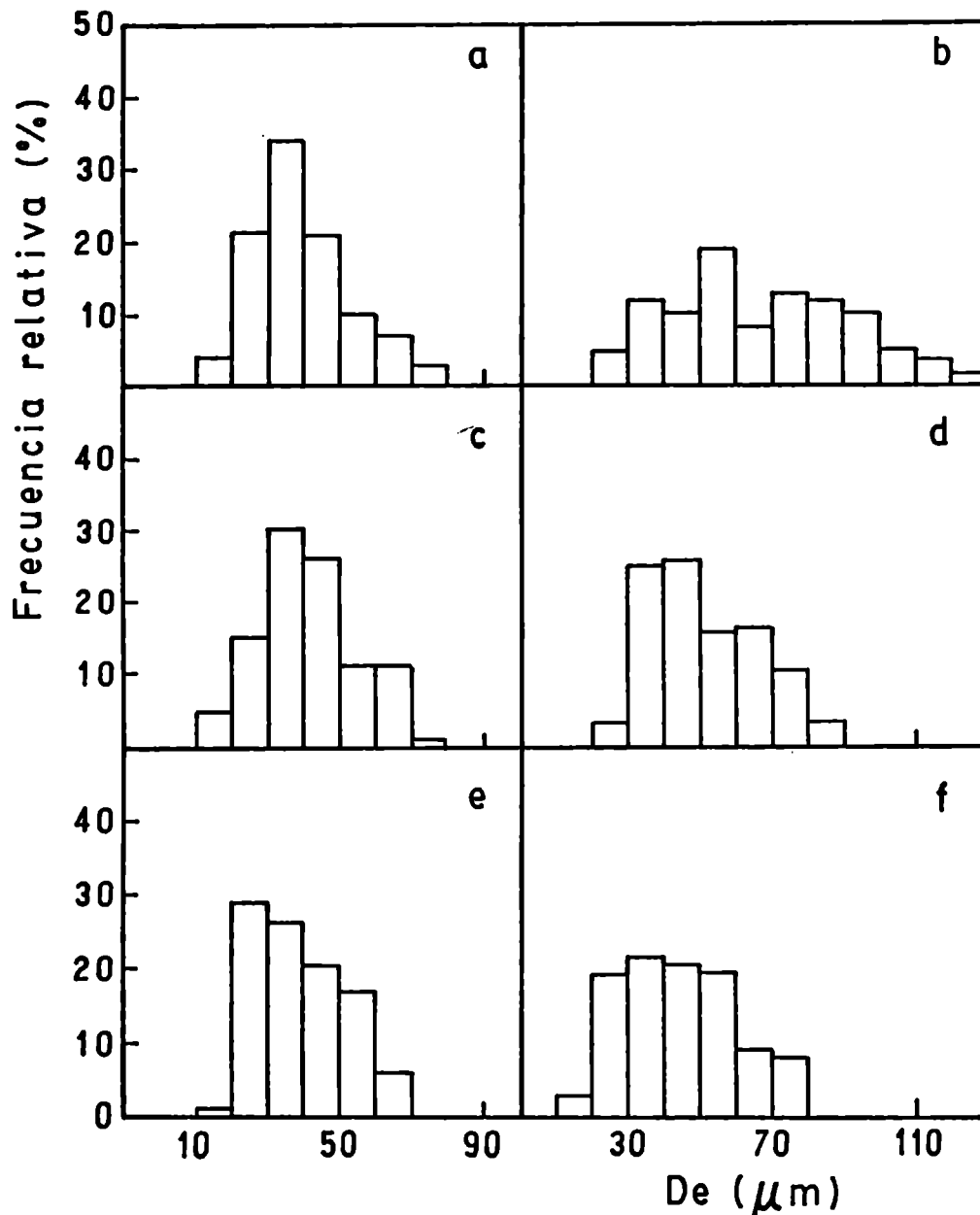


Fig. 5.10. Histogramas de frecuencia relativa (%) en función de diámetro equivalente (De) de cristales de hielo de pastas de almidón de maíz sin agregado de goma xántica congeladas a 2 cm/h correspondientes a distintos tiempos y temperaturas de almacenamiento. (a) 8 días a -5°C ; (b) 60 días a -5°C ; (c) 8 días a -10°C ; (d) 60 días a -10°C ; (e) 8 días a -20°C ; (f) 60 días a -20°C .

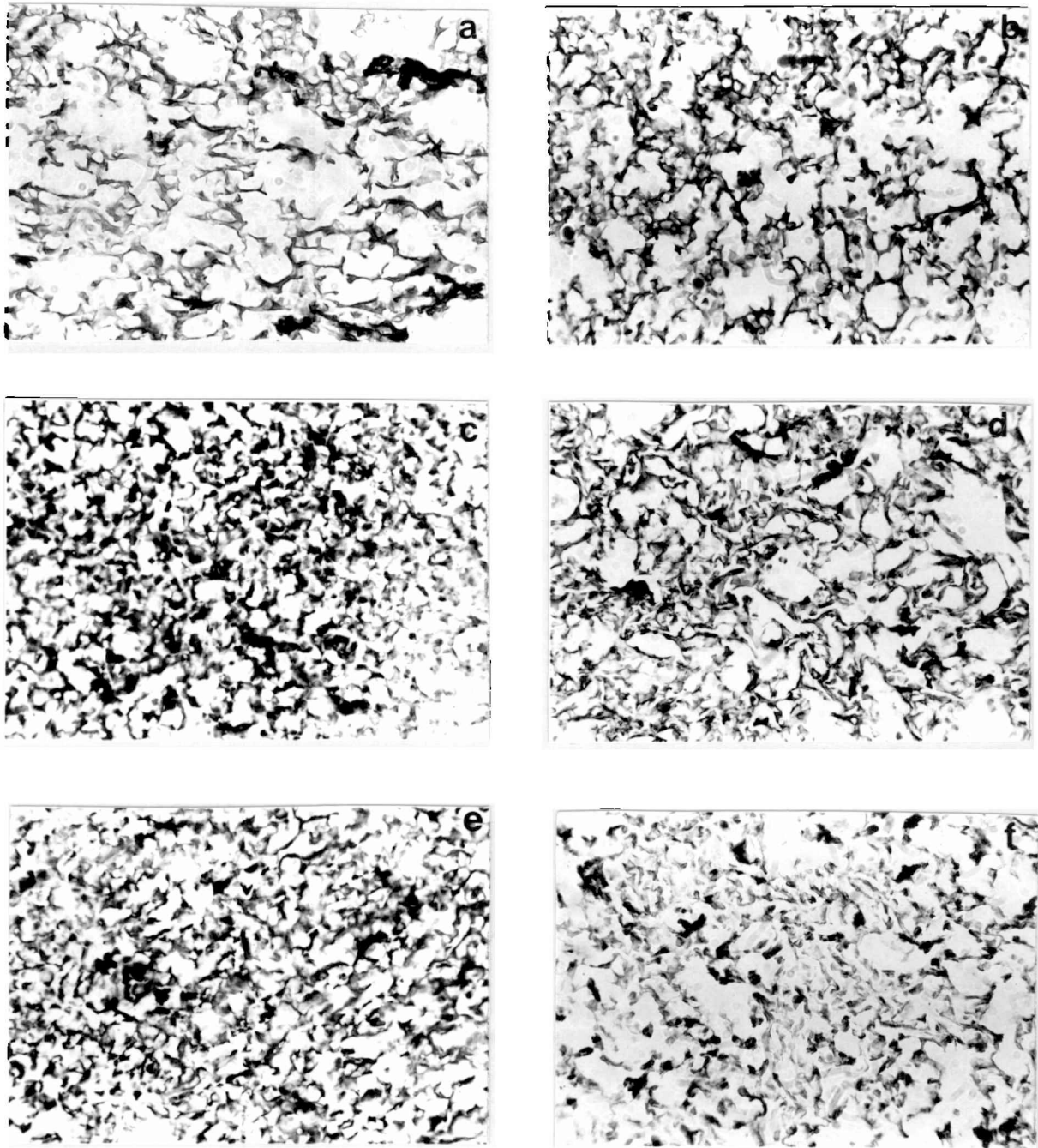


Fig. 5.11. Micrografías de pastas de almidón de maíz sin agregado de goma xántica congeladas a 15 cm/h correspondientes a distintos tiempos y temperaturas de almacenamiento. (a) 15 días a -5°C ; (b) 60 días a -5°C ; (c) 15 días a -10°C ; (d) 60 días a -10°C ; (e) 15 días a -20°C ; (f) 60 días a -20°C
 ─── =100 μm

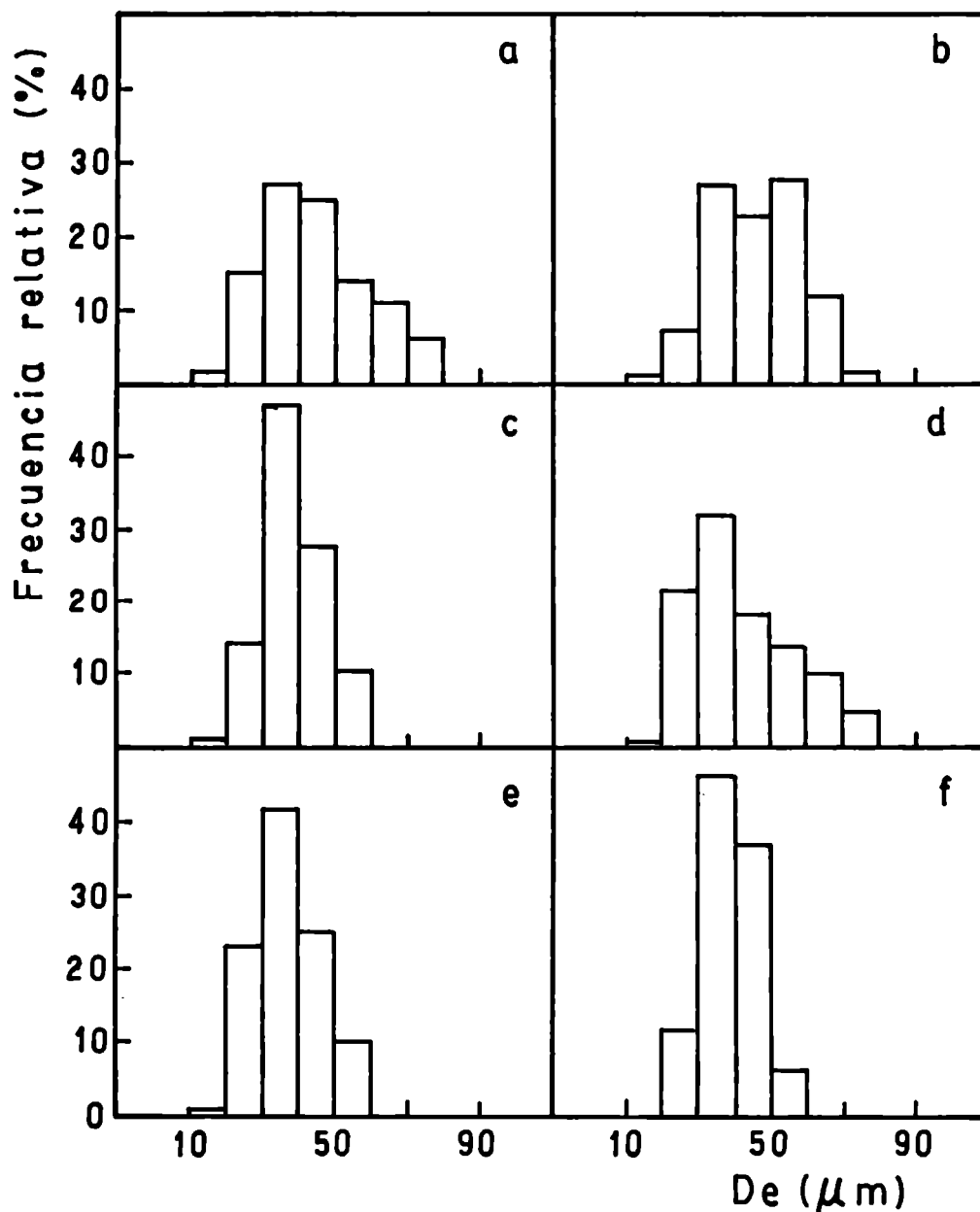


Fig. 5.12. Histogramas de frecuencia relativa (%) en función de diámetro equivalente (De) de cristales de hielo de pastas de almidón de maíz sin agregado de goma xántica congeladas a 15 cm/h correspondientes a distintos tiempos y temperaturas de almacenamiento. (a) 15 días a -5°C ; (b) 60 días a -5°C ; (c) 15 días a -10°C ; (d) 60 días a -10°C ; (e) 15 días a -20°C ; (f) 60 días a -20°C

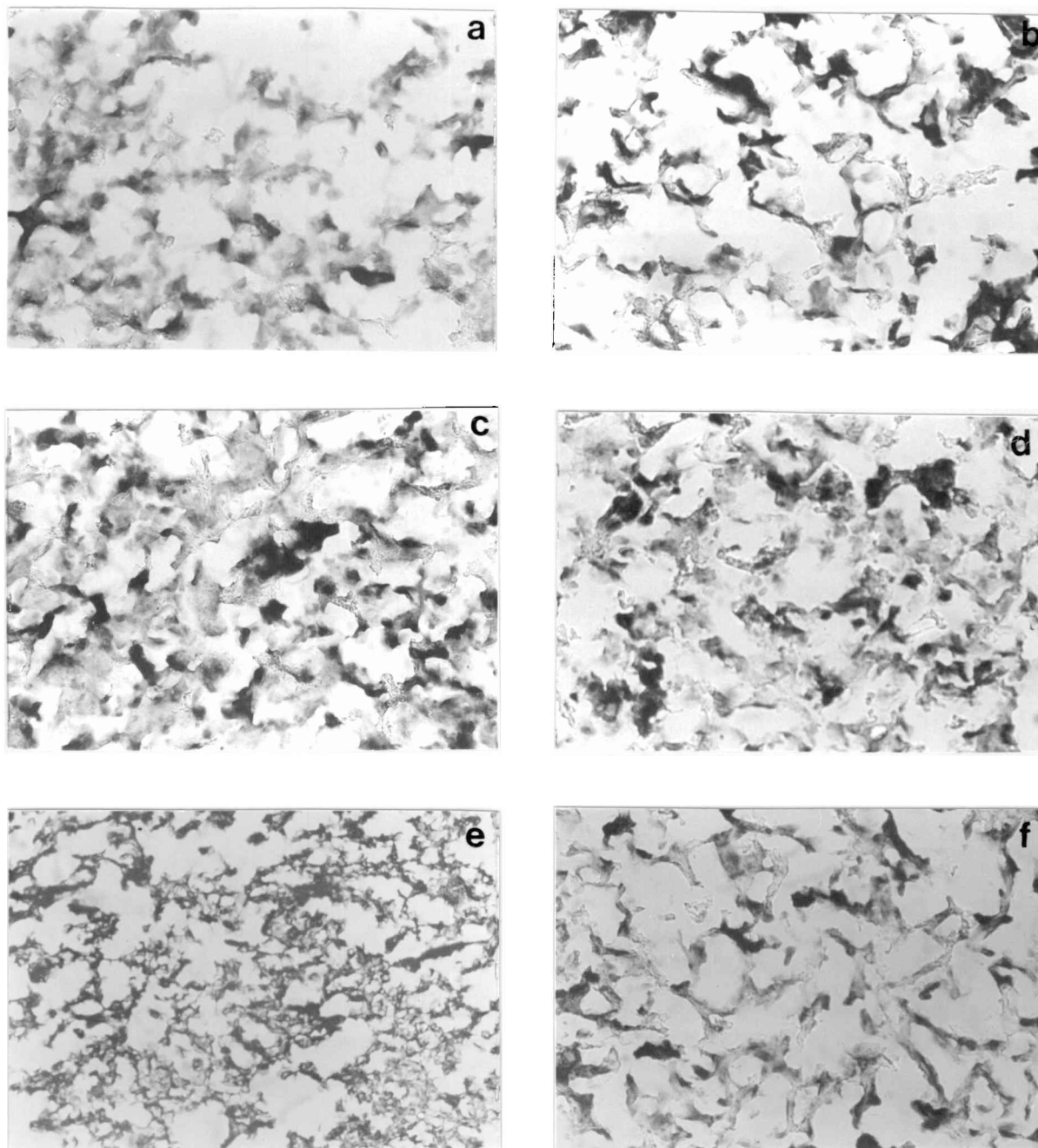


Fig. 5.13. Micrografías de pastas de harina de trigo sin agregado de goma xántica congeladas a 2 cm/h correspondientes a distintos tiempos y temperaturas de almacenamiento. (a) 15 días a -5°C ; (b) 60 días a -5°C ; (c) 15 días a -10°C ; (d) 60 días a -10°C ; (e) 15 días a -20°C ; (f) 60 días a -20°C
— = 100 μm

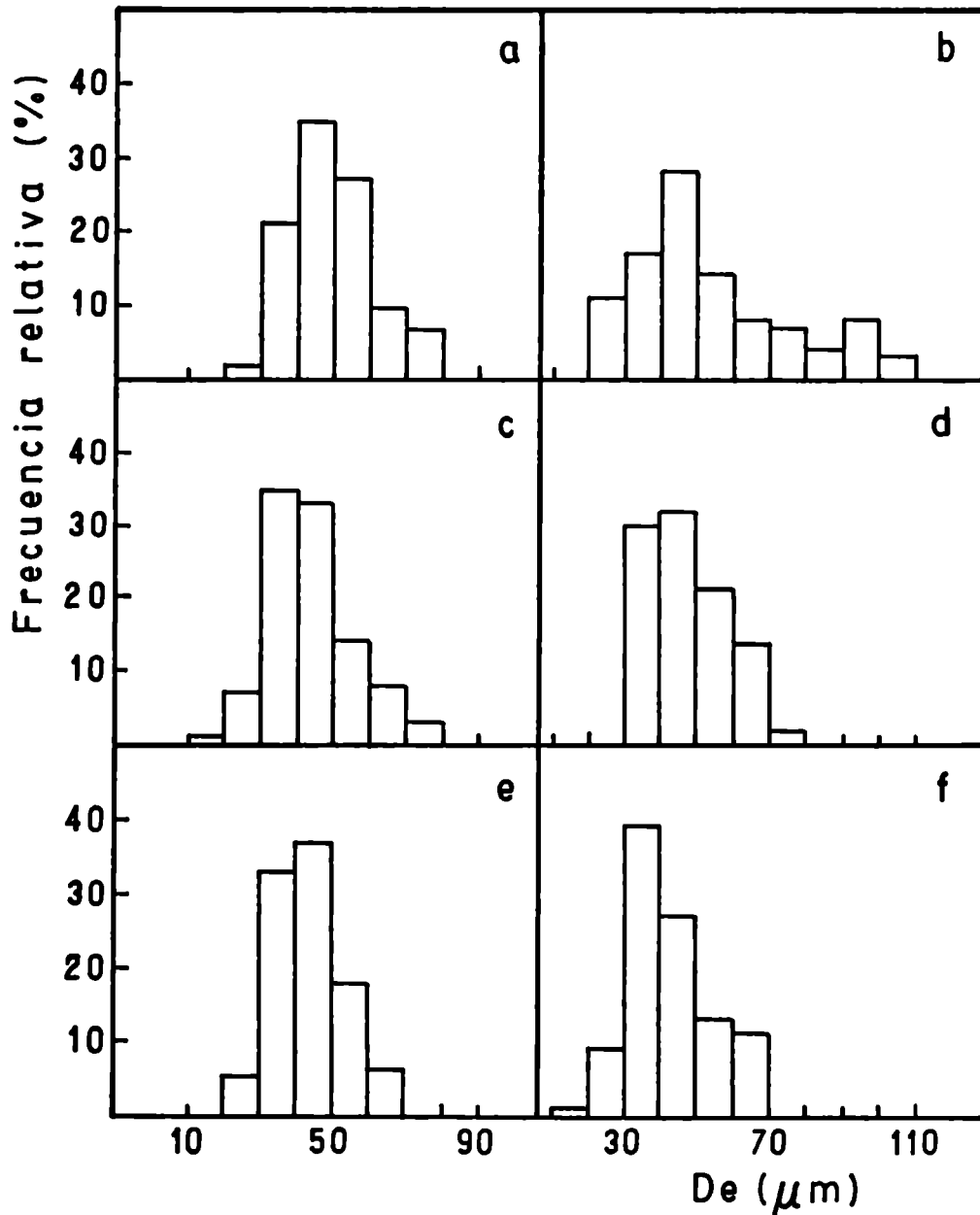


Fig. 5.14. Histogramas de frecuencia relativa (%) en función de diámetro equivalente (De) de cristales de hielo de pastas de harina de trigo sin agregado de goma xántica congeladas a 2 cm/h correspondientes a distintos tiempos y temperaturas de almacenamiento. (a) 15 días a -5°C ; (b) 60 días a -5°C ; (c) 15 días a -10°C ; (d) 60 días a -10°C ; (e) 15 días a -20°C ; (f) 60 días a -20°C

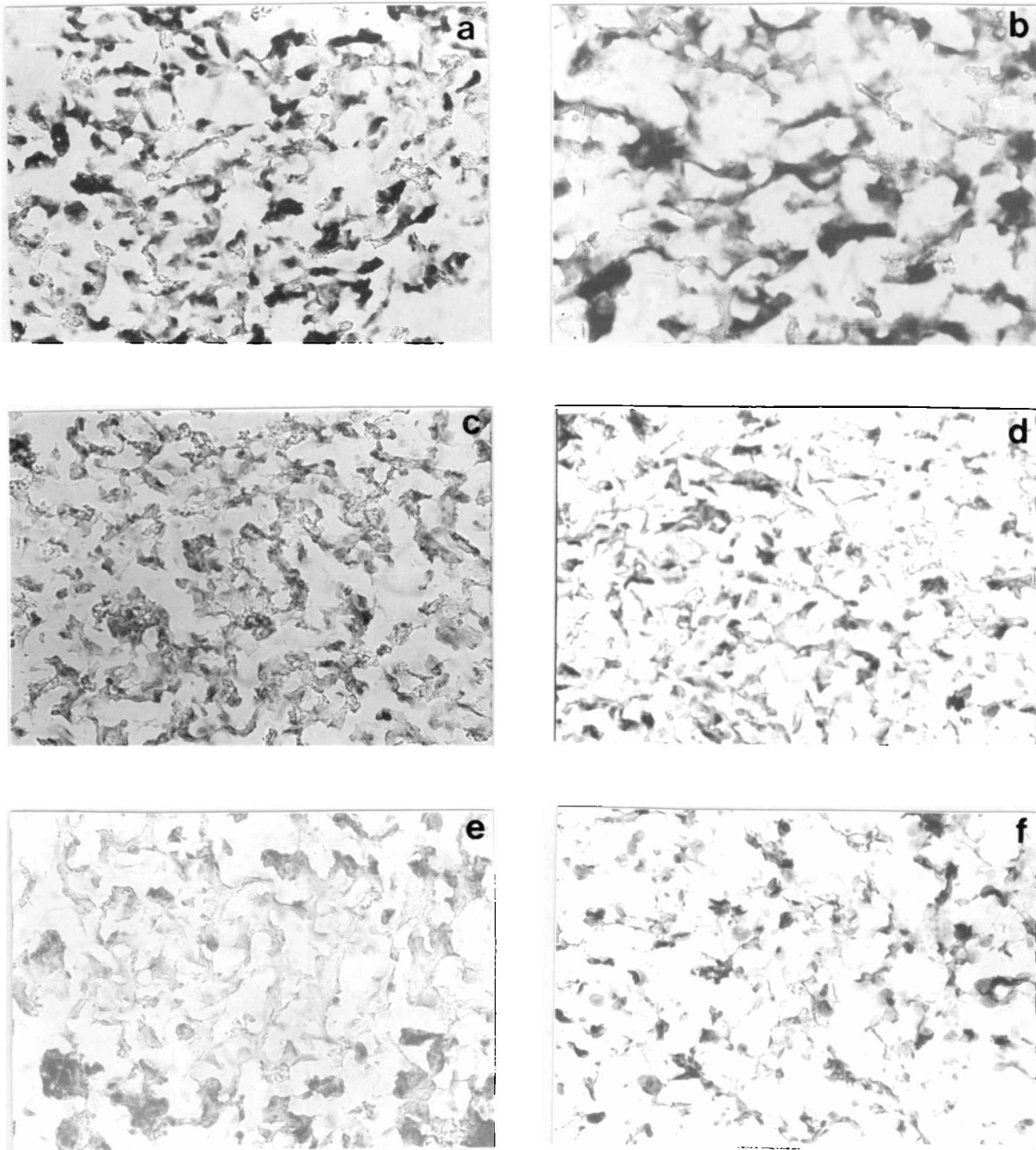


Fig. 5.15. Micrografías de pastas de harina de trigo sin agregado de goma xántica congeladas a 15 cm/h correspondientes a distintos tiempos y temperaturas de almacenamiento. (a) 15 días a -5°C ; (b) 60 días a -5°C ; (c) 15 días a -10°C ; (d) 60 días a -10°C ; (e) 15 días a -20°C ; (f) 60 días a -20°C
 ─── = 100 μm

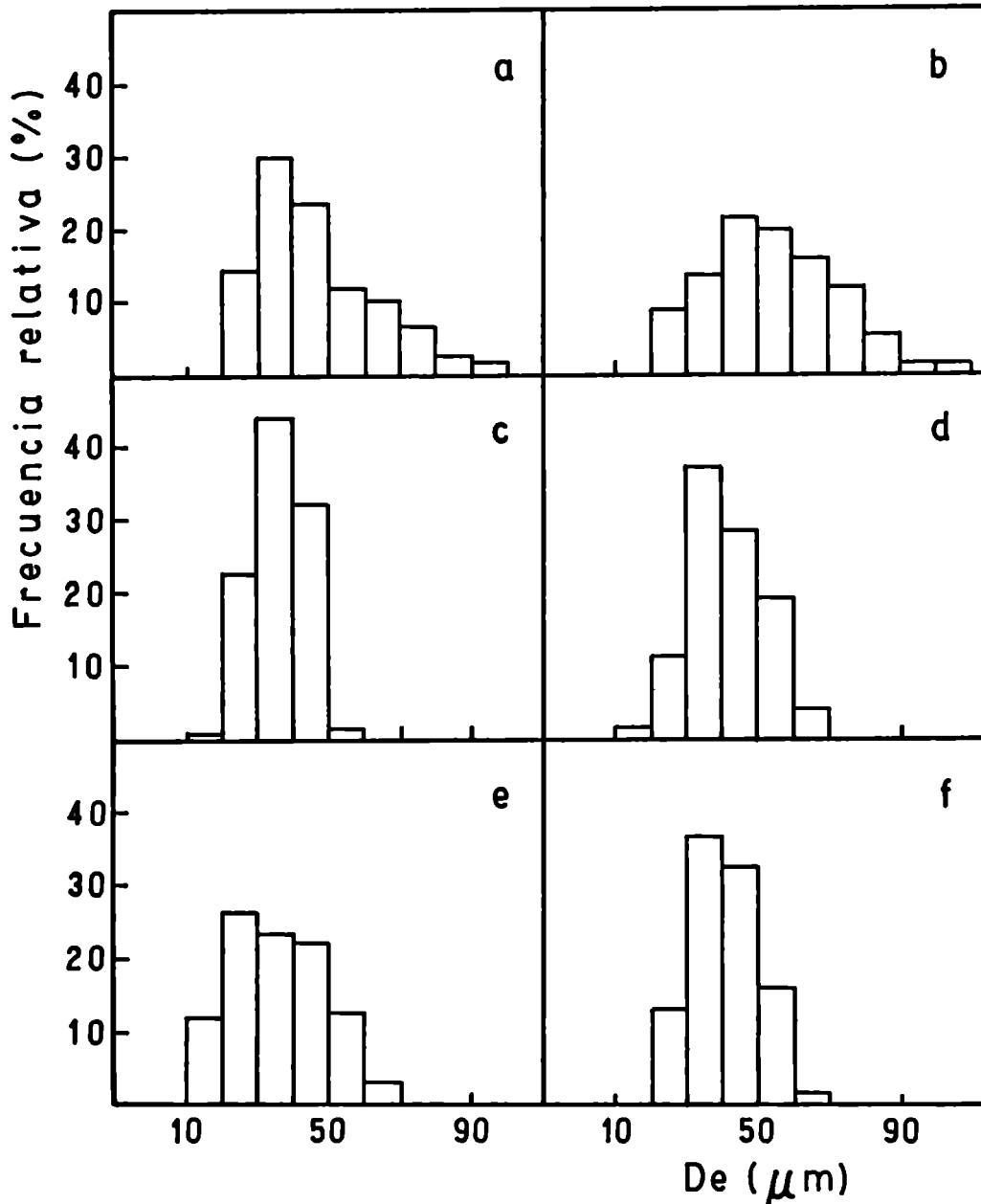


Fig. 5.16. Histogramas de frecuencia relativa (%) en función de diámetro equivalente (De) de cristales de hielo de pastas de harina de trigo sin agregado de goma xántica congeladas a 15 cm/h correspondientes a distintos tiempos y temperaturas de almacenamiento. (a) 15 días a -5°C ; (b) 60 días a -5°C ; (c) 15 días a -10°C ; (d) 60 días a -10°C ; (e) 15 días a -20°C ; (f) 60 días a -20°C

El agregado de goma xántica no produjo una variación apreciable en el aspecto de las micrografías y la obtención de las distribuciones de frecuencias de diámetro equivalente no diferían significativamente de las obtenidas para pastas sin agregado de estabilizante. En la Fig. 5.17 se muestran a modo de ejemplo, micrografías correspondientes a pastas de almidón de maíz con estabilizante congeladas a 15 cm/h y almacenadas 60 días a -5°C y a -20°C. En las siguientes Figuras (5.18, 5.19, 5.20 y 5.21) se representaron los histogramas correspondientes a pastas de almidón de maíz y de harina de trigo con hidrocoloide congeladas a 2cm/h y 15 cm/h y almacenadas a -5 y -20°C. De la comparación con los histogramas correspondientes a pastas de almidón común y de harina de trigo sin estabilizante (Fig. 5.10, 5.12, 5.14 y 5.16) se aprecia la ausencia de un efecto inhibitorio del crecimiento cristalino por parte del hidrocoloide usado, goma xántica.

En todos los casos se alcanzó un diámetro equivalente medio máximo o límite a largos tiempos de almacenamiento (Dl) correspondiente a una distribución cristalina estable. El diámetro límite resultó dependiente de la temperatura de almacenamiento y de la velocidad de congelación.

El hecho de que el diámetro límite dependa de la velocidad de congelación puede relacionarse con las características de la distribución cristalina inicial. Así, si en las muestras recién congeladas la distribución de diámetros cristalinos tiene un cierto D_0 y σ , durante la recristalización la distribución cristalina se desplazará hacia mayores valores alcanzando un diámetro límite Dl tal que

$$Dl - D_0 = n\sigma \quad (5.6)$$

donde n (factor de desplazamiento) dependerá de la temperatura de almacenamiento.

En la Tabla 5.6 se muestran los valores de D_0 y Dl obtenidos en cada caso y los valores del factor de desplazamiento n para cada temperatura y velocidad de congelación.

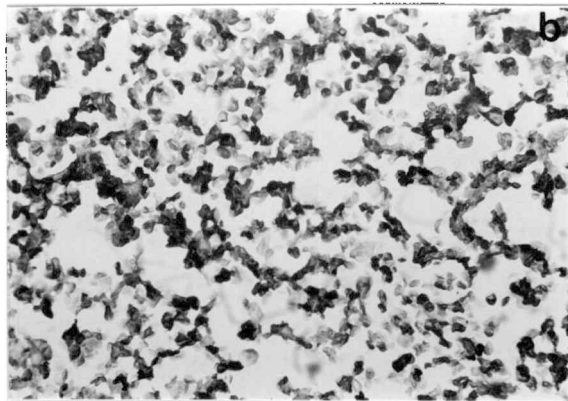
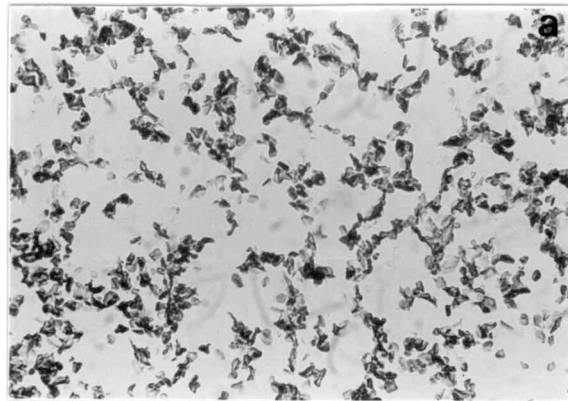


Fig. 5.17. Micrografías de pastas de almidón de maíz con agregado de goma xántica congeladas a 15 cm/h y almacenadas 60 días a (a) -5°C , (b) -20°C
— = 100 μm

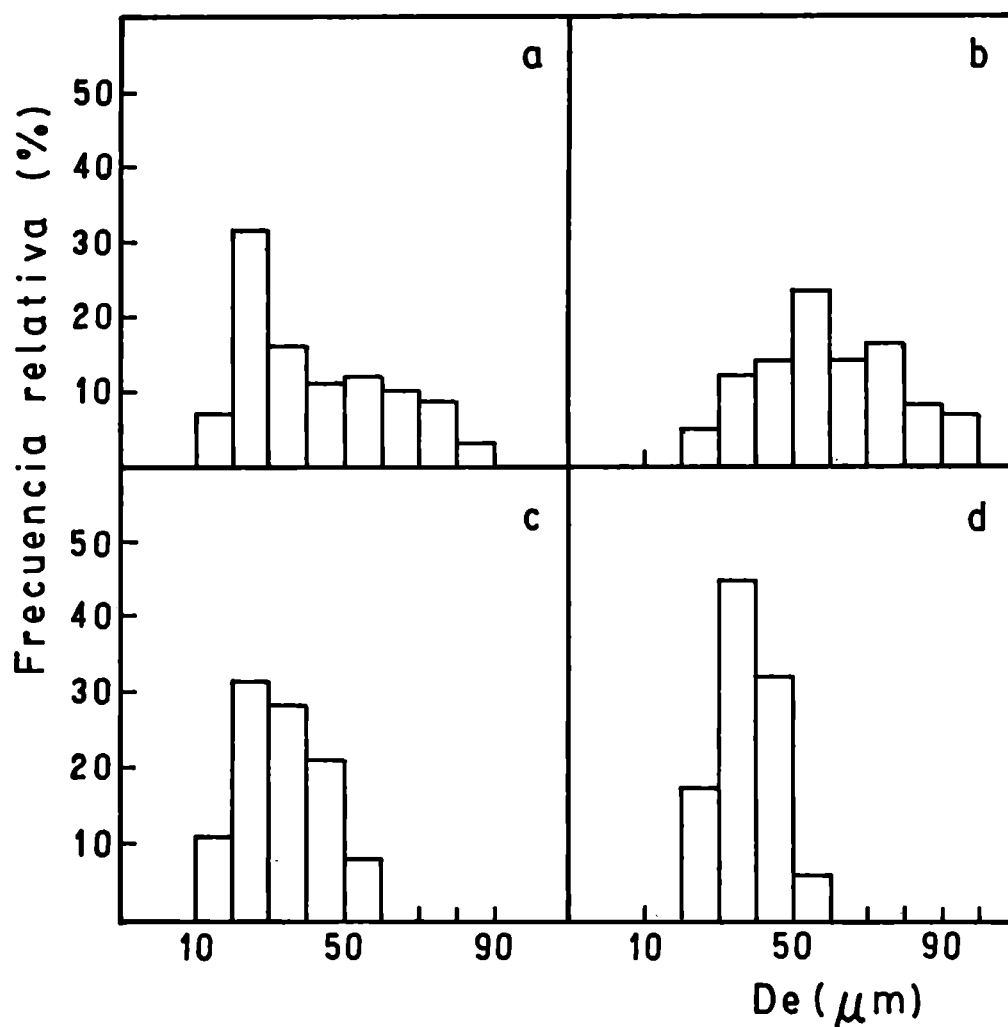


Fig. 5.18. Histogramas de frecuencia relativa (%) en función de diámetro equivalente (De) de cristales de hielo en pasta de almidón de maíz con agregado de goma xántica correspondientes a muestras congeladas a 2 cm/h y almacenadas a -5°C durante 8 días (a) y 60 días (b) y a -20°C durante 8 días (c) y 60 días (d)

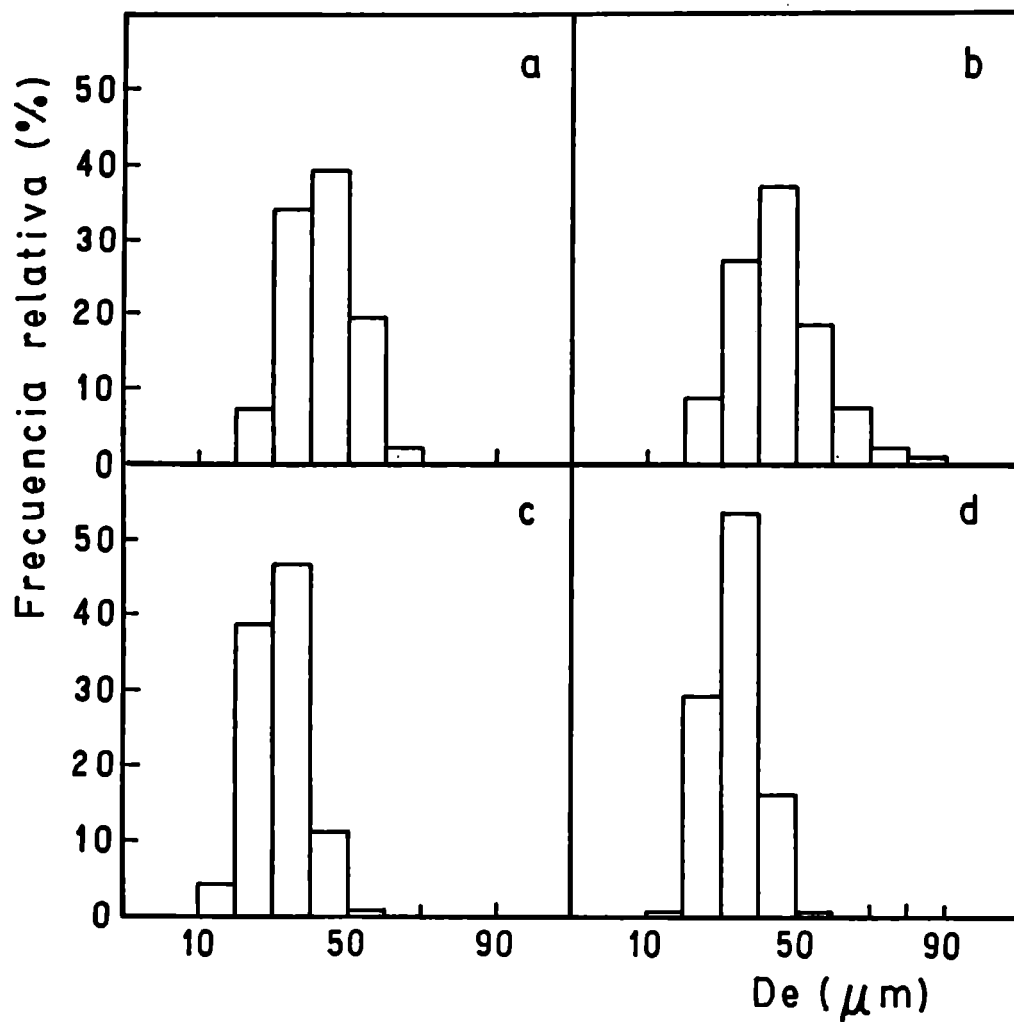


Fig. 5.19. Histogramas de frecuencia relativa (%) en función de diámetro equivalente (De) de cristales de hielo en pasta de almidón de maíz con agregado de goma xántica correspondientes a muestras congeladas a 15 cm/h y almacenadas a -5°C durante 8 días (a) y 60 días (b) y a -20°C durante 8 días (c) y 60 días (d)

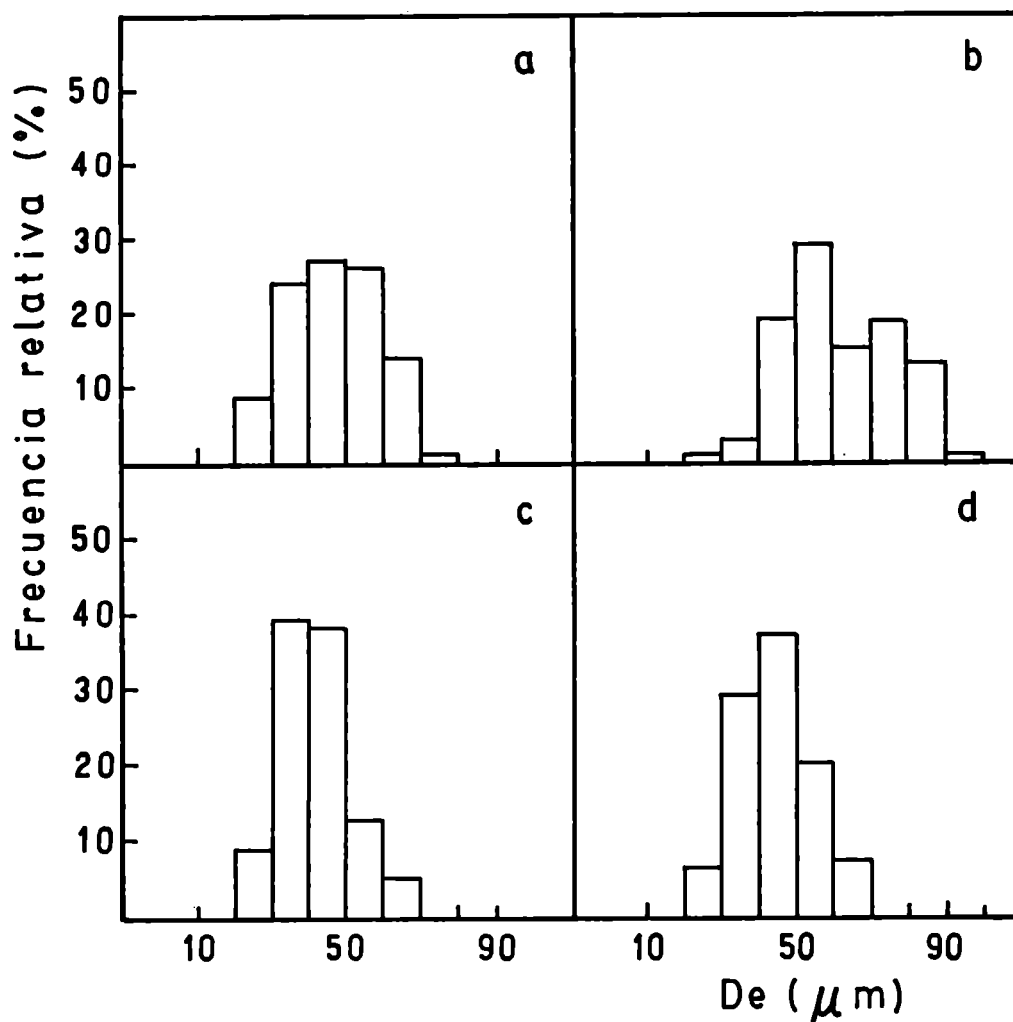


Fig. 5.20. Histogramas de frecuencia relativa (%) en función de diámetro equivalente (De) de cristales de hielo en pasta de harina de trigo con agregado de goma xántica correspondientes a muestras congeladas a 2 cm/h y almacenadas a -5°C durante 8 días (a) y 60 días (b) y a -20°C durante 8 días (c) y 60 días (d)

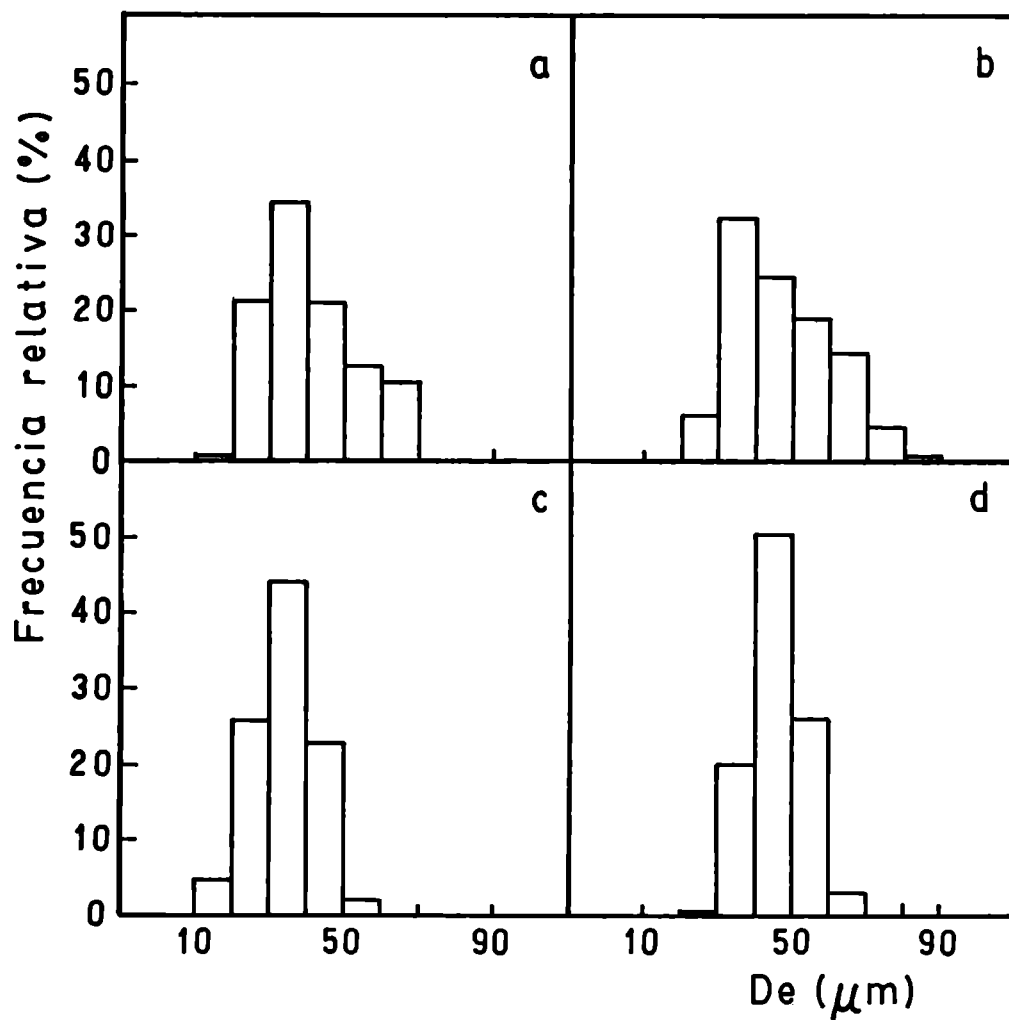


Fig. 5.21. Histogramas de frecuencia relativa (%) en función de diámetro equivalente (D_e) de cristales de hielo en pasta de harina de trigo con agregado de goma xántica correspondientes a muestras congeladas a 15 cm/h y almacenadas a -5°C durante 8 días (a) y 60 días (b) y a -20°C durante 8 días (c) y 60 días (d)

Tabla 5.6. Factores de desplazamiento de distribución cristalina para distintas velocidades de congelación y temperaturas de almacenamiento

	V (cm/h)	Do	Temperatura de almacenamiento					
			-5°C		-10°C		-20°C	
			Dl	n	Dl	n	Dl	n
almidón sin goma xántica	2	37,34 (14,58)*	66,35	1,99	51,10	0,94	45,67	0,57
	15	30,89 (12,52)	47,29	1,31	41,60	0,86	36,43	0,44
almidón con goma xántica	2	34,49 (12,36)	60,57	2,11	41,99	0,61	38,15	0,30
	15	29,69 (8,75)	44,75	1,72	34,78	0,58	33,71	0,46
harina sin goma xántica	2	39,07 (11,48)	57,78	1,63	46,06	0,61	43,17	0,36
	15	33,76 (8,86)	52,84	2,15	40,94	0,81	39,59	0,68
harina con goma xántica	2	39,93 (7,06)	62,22	3,16	47,58	0,77	43,45	0,35
	15	33,90 (7,12)	45,69	1,66	38,54	0,58	36,53	0,33

Do, Dl en μm .

(*) desviación standard

El corrimiento de la distribución en el caso del almacenamiento a -5°C corresponde a un valor promedio de $n = 1,96 (\pm 0,28)$, a -10°C de $n = 0,72 (\pm 0,07)$ y a -20°C , de $n = 0,44 (\pm 0,07)$ (promedios calculados con una probabilidad del 90 %). Es decir, se ha observado que la media se traslada con un factor n que depende fundamentalmente de la temperatura de almacenamiento y es prácticamente independiente de la distribución inicial. Esto permitiría inferir, dada una distribución inicial dependiente de la velocidad de congelación el D_1 a distintas temperaturas de almacenamiento.

El hecho de que la temperatura de almacenamiento afecte los valores de D_1 fue ya descrita por Beck (1954) en sistemas metálicos. Cuando los sistemas contienen otra fase dispersa (como en este caso, el almidón), las partículas dispersas actúan como inclusiones que reducen la energía límite del cristal. Esto produce una fuerza que retarda el crecimiento cristalino. La fuerza impulsora para el crecimiento se vuelve más pequeña hasta que cesa. Cuando aumenta la temperatura, aumenta la relación entre tamaño de cristal de hielo a tamaño de partícula incluida, permitiendo alcanzar diámetros límite mayores.

5.3.4.3. Modelado de la cinética de recristalización

En aquellos sistemas donde existe un diámetro límite o máximo para la recristalización, la fuerza impulsora de este fenómeno es la diferencia de curvatura (inversa del diámetro) de los cristales a un tiempo dado de almacenamiento ($1/\bar{D}_e$) respecto de la curvatura límite, es decir, la inversa del mayor diámetro alcanzado en el almacenamiento o diámetro límite ($1/D_1$). Cuanto mayor sea esta diferencia mayor será la velocidad de recristalización. Según lo antedicho, la cinética del fenómeno puede expresarse según (Bolling y Winegard, 1958):

$$\frac{d \bar{D}_e}{d t} = k \left(\frac{1}{\bar{D}_e} - \frac{1}{D_1} \right) \quad (5.7)$$

donde k es la constante cinética del proceso, y \bar{D}_e el diámetro equivalente medio cristalino a un tiempo dado.

Cuando $1/D_l$ se hace despreciable (Feltham, 1957), la ec. (5.7) queda reducida a:

$$\frac{d \bar{D}_e}{d t} = \frac{k}{\bar{D}_e} \quad (5.8)$$

Esta situación se presenta cuando no hay impedimentos estéricos para el crecimiento del grano cristalino (en este caso el diámetro límite tiende a un valor infinito) como en las soluciones (Martino y Zaritzky, 1987) y al comienzo de la recristalización cuando $1/D_e$ es mucho mayor que $1/D_l$ (Bevilacqua y Zaritzky, 1982). La integración de la ec.(5.7) conduce a la siguiente expresión:

$$\ln \frac{D_l - D_o}{D_l - \bar{D}_e} + \frac{(D_o - \bar{D}_e)}{D_l} = \frac{k t}{D_l^2} \quad (5.9)$$

donde D_o es el diámetro inicial.

A partir de los datos experimentales obtenidos (D_o , D_l y \bar{D}_e para cada tiempo y temperatura de almacenamiento) se calculó k para cada velocidad de congelación utilizando el programa SYSTAT para regresiones no lineales. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 5.7.

Tabla 5.7. Constantes cinéticas para la recristalización del hielo

	T (°C)	k ₁ (μm ² d ⁻¹)	k ₂ (μm ² d ⁻¹)
	-5	232,66 (37,32)*	201,62 (10,45)
almidón sin goma xántica	-10	93,90 (3,26)	100,30 (9,68)
	-20	56,93 (4,62)	38,15 (3,24)
	-5	227,71 (70,17)	190,62 (86,57)
almidón con goma xántica	-10	96,81 (18,21)	68,50 (18,30)
	-20	55,94 (24,51)	30,00 (16,66)
	-5	218,46 (36,24)	176,18 (17,12)
harina sin goma xántica	-10	93,43 (32,45)	74,55 (8,44)
	-20	54,26 (13,19)	50,04 (15,97)
	-5	219,54 (23,87)	156,31 (9,83)
harina con goma xántica	-10	72,21 (13,34)	119,12 (17,00)
	-20	40,50 (6,74)	38,37 (8,10)

k₁= constante correspondiente a congelación lenta

k₂= constante correspondiente a congelación rápida

(*)desviación standard

Como se observa en la Tabla 5.7, las constantes cinéticas de recristalización resultaron independientes de la velocidad de congelación inicial de las muestras. Además se observó que no



existían diferencias significativas en las constantes cinéticas para una determinada temperatura entre los sistemas espesados con almidón o harina, con o sin estabilizante.

En las Figuras 5.22 y 5.23 se muestran los puntos experimentales y las curvas teóricas correspondientes al modelo propuesto en la ec. 5.9 para los cuatro sistemas mencionados.

Con las constantes obtenidas se calculó la energía de activación del fenómeno de recristalización para los distintos sistemas a partir de la ecuación

$$\ln k = \ln k_0 - E_a/RT \quad (5.10)$$

donde k = factor preexponencial, R = constante de los gases ideales (J/K mol), E_a = energía de activación (J/mol), T = temperatura (K)

En la Fig. 5.24 se han representado los valores experimentales de $\ln k$ en función de la inversa de la temperatura y las rectas de mejor ajuste para sistemas con y sin agregado de goma xántica.

Tabla 5.8. Energía de activación del fenómeno de recristalización de hielo en pastas con y sin hidrocoloide

	E_a (KJ/mol)	$\ln k_0$	r
almidón sin goma xántica	55,43 (13,69)*	30,11 (4,02)	0,9546
almidón con goma xántica	57,90 (12,98)	31,13 (5,98)	0,9125
harina sin goma xántica	46,47 (10,02)	25,94 (4,61)	0,9187
harina con goma xántica	56,65 (9,02)	30,55 (4,16)	0,9535

(*) desviación standard r : coeficiente de correlación

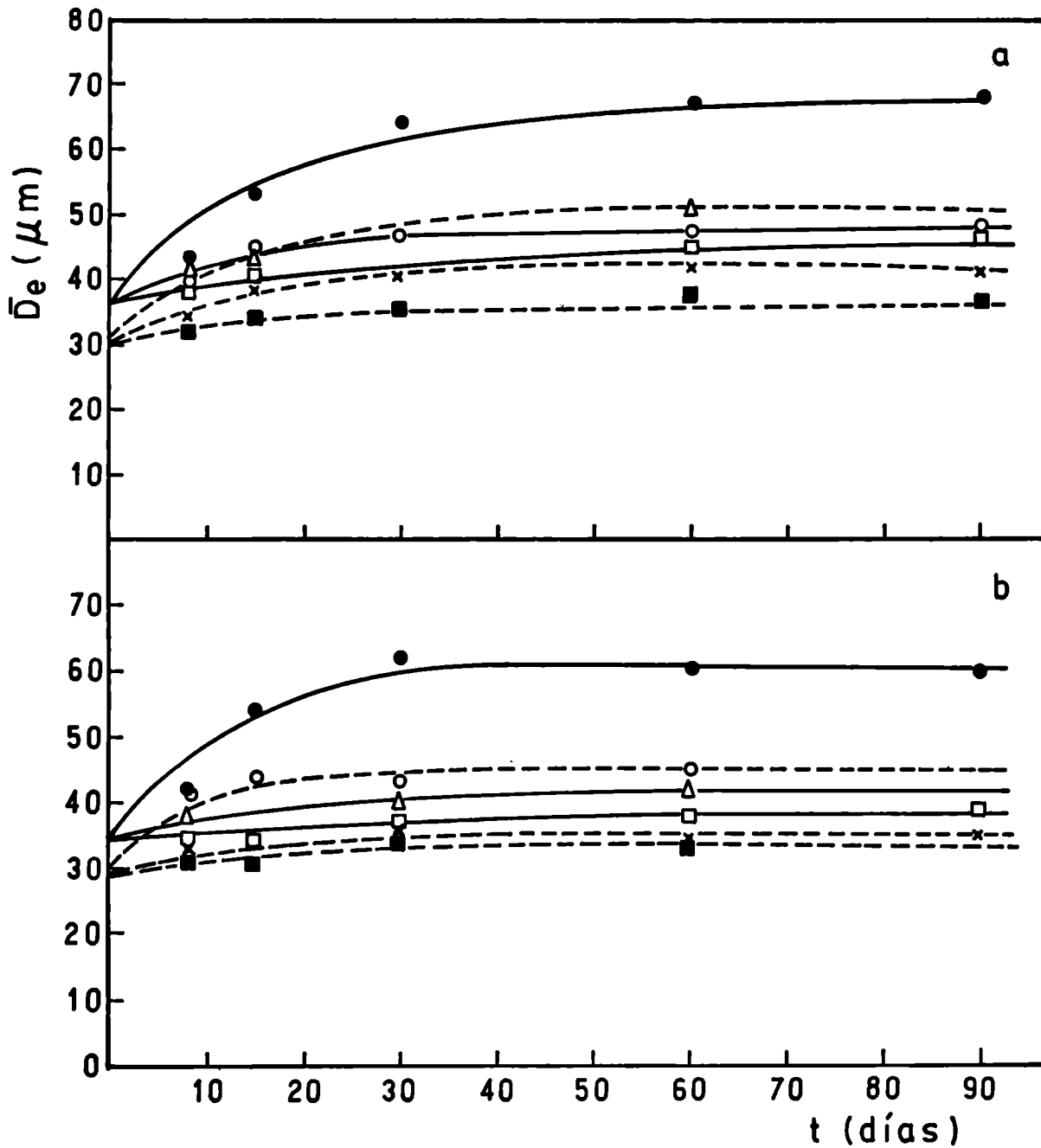


Fig. 5.22. Diámetro equivalente medio (\bar{D}_e) de cristales de hielo en función del tiempo de almacenamiento correspondiente a pastas de almidón de maíz sin goma xántica (a) y con goma xántica (b). congeladas a 2 cm/h y almacenadas a (●) -5°C ; (Δ) -10°C y (\square) -20°C y congeladas a 15 cm/h y almacenadas a (○) -5°C ; (x) -10°C y (■) -20°C

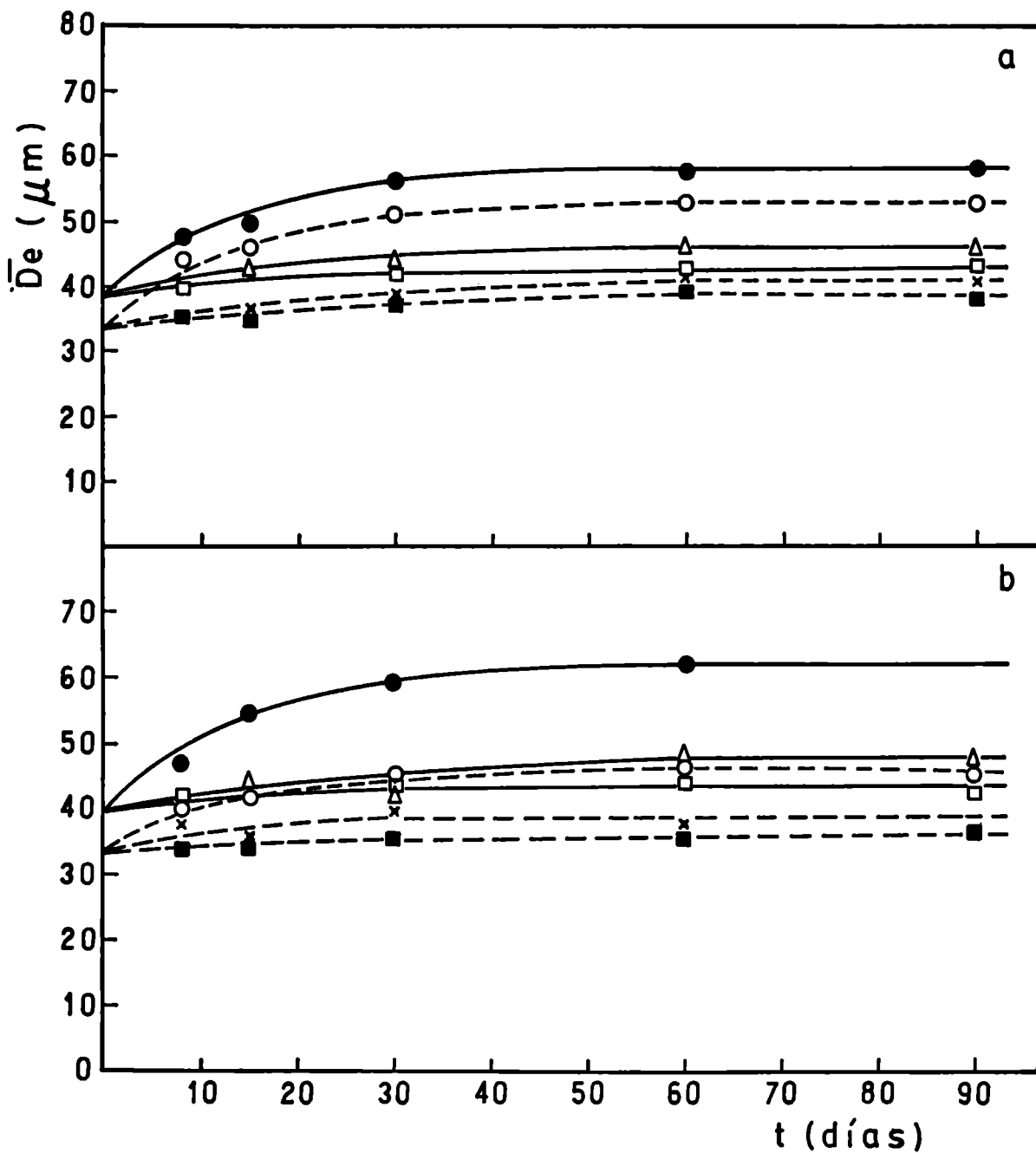


Fig. 5.23. Diámetro equivalente medio (\bar{D}_e) de cristales de hielo en función del tiempo de almacenamiento correspondiente a pastas de harina de trigo sin goma xántica (a) y con goma xántica (b). congeladas a 2 cm/h y almacenadas a (●) -5°C ; (Δ) -10°C y (\square) -20°C y congeladas a 15 cm/h y almacenadas a (○) -5°C ; (x) -10°C y (■) -20°C

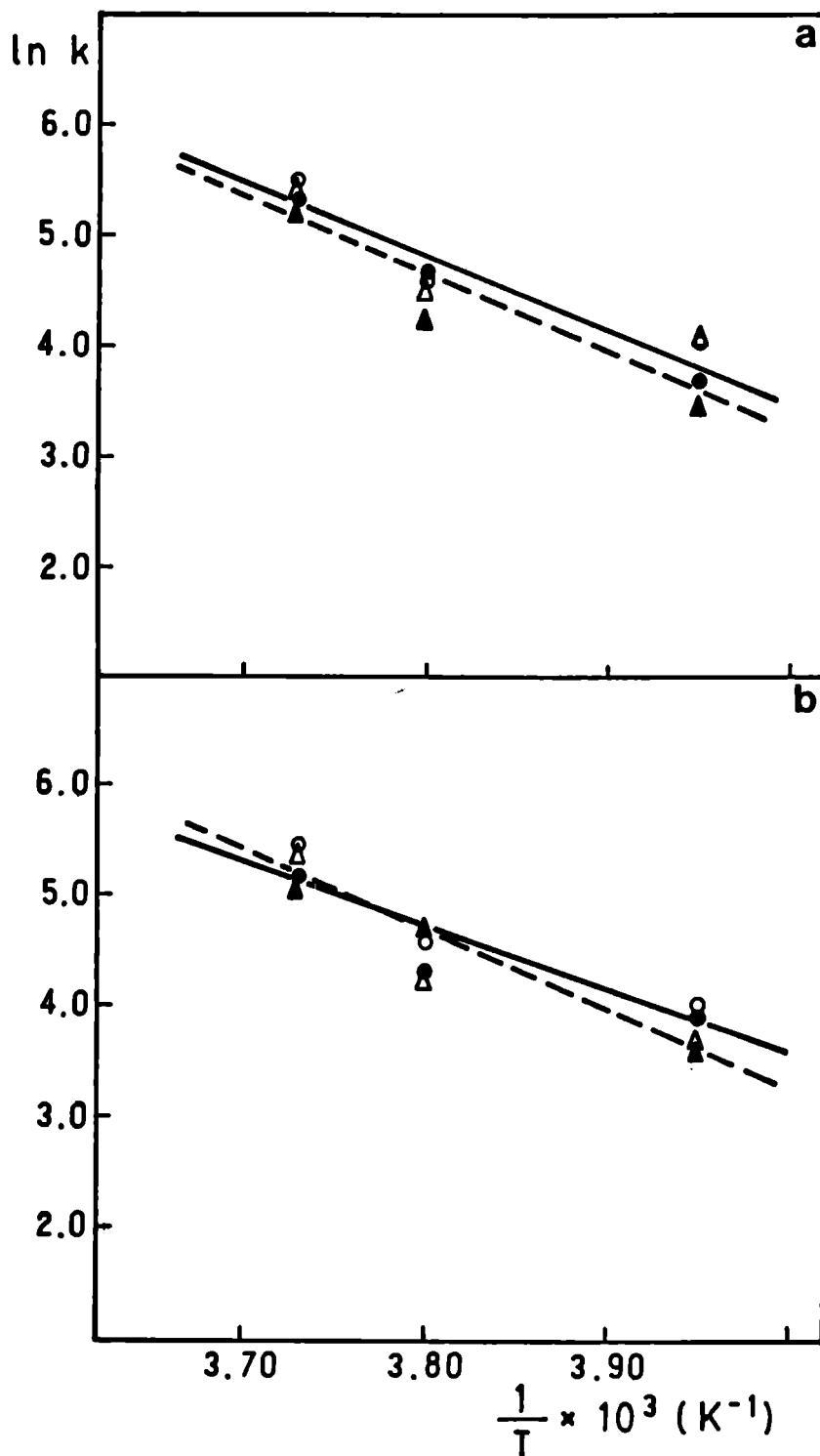


Fig. 5.24. Representación de $\ln k$ en función de la inversa de la temperatura (T^{-1}) donde k es la constante cinética de recristalización de hielo en (a) pastas de almidón de maíz sin goma xántica (—), congelada a 2 cm/h (o) y a 15 cm/h (●) y con goma xántica (---), congeladas a 2 cm/h (Δ) y a 15 cm/h (\blacktriangle); (b) pastas de harina de trigo sin goma xántica (—) congeladas a 2 cm/h (o) y a 15 cm/h (●) y con goma xántica (---), congeladas a 2 cm/h (Δ) y a 15 cm/h (\blacktriangle)

Se observa que la energía de activación (E_a) asociada a la recristalización de hielo no difiere significativamente entre los distintos sistemas, a base de almidón de maíz o harina de trigo, tengan o no goma xántica en su formulación. Antes de llegar a las consideraciones finales se efectuará un breve análisis de los errores inherentes a la metodología empleada, para determinar en qué grado afectan a las constantes cinéticas (Tabla 5.7) y a los valores de E_a obtenidos.

5.3.4.3.1. Análisis de los errores inherentes a la técnica empleada

Existen, básicamente, dos fuentes de error asociadas con la técnica de sustitución a bajas temperaturas empleada para la observación microscópica indirecta de los cristales de hielo:

- 1) la recristalización de hielo durante la fijación
- 2) la contracción de la muestra durante la fijación y etapas subsiguientes (deshidratación e inclusión)

Con respecto a la primera, varios autores (Hunt, 1984; Martino y Zaritzky, 1986) señalaron que puede afectar las mediciones de los cristales. Con el fin de analizar este efecto, el cambio en el diámetro equivalente cristalino producido por la recristalización durante la fijación fue evaluado mediante la ec. (5.9). Asumiendo un valor típico inicial de $D_0 = 40 \mu\text{m}$, se estimaron los valores de D_e correspondientes al tiempo de fijación a las diferentes temperaturas.

La Tabla 5.9 muestra que la recristalización del hielo durante la fijación tiene poca influencia sobre el tamaño final cristalino, no siendo los errores relativos de las mediciones mayores que 3,75 %. Pudo observarse que a pesar de que a -20°C el tiempo de fijación era muy prolongado (5 días) el porcentaje de error sobre las mediciones resultó mínimo.

Tabla 5.9. Efecto de la recristalización durante la fijación sobre el diámetro cristalino (De) calculado según ec.(5.9) para un diámetro inicial de 40 μm.

T(°C)	Tiempo total de fijación(días)	De(μm)	Error relativo ((De-Do)/Do)x100
- 5	0,3	41,5	3,75
-10	0,6	41,3	2,50
-20	5,0	40,8	2,00

La influencia de la segunda fuente de error, la contracción de la muestra, sobre las constantes cinéticas y la energía de activación fue analizada, asumiendo que, por similitud geométrica, los factores de contracción (FC) deberían afectar directamente el diámetro de los huecos, es decir, los tamaños cristalinos.

Consideremos que $FC = De/De' = D1/D1' = Do/Do'$ con $FC < 1$, donde los valores sin prima correspondientes a los diámetros medidos en la muestra contraída y De' , $D1'$ y Do' los valores hipotéticos en la muestra no contraída. Este efecto sobre las constantes cinéticas fue analizado usando los valores prima en la ec.(5.9) para obtener la siguiente ecuación:

$$\ln \frac{D1' - Do'}{D1' - De'} + \frac{(Do' - De')}{D1'} = \frac{k t}{FC^2 D1'^2} \quad (5.11)$$

Como puede deducirse de la ec. (5.11), los factores de contracción si bien afectan las constantes cinéticas (siendo su valor real $k' = k/FC^2$), no tienen influencia sobre la energía de activación del fenómeno de recristalización.

5.4. Consideraciones finales

Como se observa a partir de los resultados expuestos en la Tabla 5.8 y teniendo en cuenta que la E_a calculada no se ve afectada por los errores inherentes a la técnica empleada se puede afirmar que no se encontraron diferencias significativas entre los valores de E_a correspondientes a la recristalización de hielo en cada uno de los cuatro sistemas en estudio. El agregado de hidrocoloide no modificó la velocidad de recristalización y por lo tanto, tampoco se vio modificada la E_a .

Si bien, ha sido tradicionalmente aceptado que los hidrocoloides tienen una acción limitante del crecimiento cristalino (Shuman, 1960), este estudio indica que el agregado de hidrocoloide en el nivel de concentración ensayada no estaría actuando por modificación del diámetro cristalino del hielo.

Similares resultados fueron reportados por Reid y col. (1987) quienes no encontraron un rol particular de los hidrocoloides por ellos estudiados (carragenano, carboximetilcelulosa al 0,5 %) sobre el crecimiento cristalino de sistemas modelo de sacarosa al 30 %, almacenados a distintas temperaturas.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo parecen cuestionar, como los de los autores mencionados, la efectividad de los hidrocoloides en cuanto a inhibición de la recristalización de hielo, debiéndose buscar el fundamento de su acción estabilizante en otra clase de mecanismos tal como la retención de agua tras la descongelación debido a su carácter hidrofílico.

En síntesis, de los factores bajo estudio, se encontró que la velocidad de congelación no sólo incidía en el diámetro medio cristalino de hielo inicial sino también en la dispersión de la distribución cristalina. Velocidades de congelación más altas condujeron a distribuciones más estrechas de frecuencia cristalina. La temperatura de almacenamiento tuvo influencia, como era de esperar, en la recristalización de hielo siendo ésta mayor cuanto más alta la temperatura de almacenamiento. Por otro lado, se encontró que el diámetro límite alcanzado (D_l) era dependiente de la temperatura de almacenamiento. Su valor pudo predecirse a partir de parámetros de la distribución cristalina inicial, a través

de un factor de desplazamiento.

Con respecto al tipo de espesante utilizado no se encontraron diferencias significativas en la velocidad de recristalización de hielo a distintas temperaturas entre sistemas a base de almidón de maíz o de harina de trigo. Esto último revelaría poco o ningún efecto de la proteína a nivel de la formación y recristalización de hielo.

CAPITULO 6

ANALISIS DE LA RETROGRADACION DEL ALMIDON POR CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE BARRIDO

6.1. Introducción

La retrogradación de geles de distintos tipos de almidón a temperaturas superiores a 0°C ha sido ampliamente estudiada en los últimos años (Mc Iver y col., 1968; Colwell y col. 1969; Longton y Le Grys, 1981; Miles y col., 1985; Nakazawa y col., 1985; Jankowski y Rha, 1986; Zeleznak y Hosenev, 1986; Paton, 1987) utilizando diversas técnicas, entre ellas la calorimetría diferencial de barrido (DSC). Sin embargo, es relativamente escasa la información concerniente al fenómeno de retrogradación a temperaturas por debajo de 0°C. El deterioro de las pastas de almidón y de sistemas más complejos (como por ejemplo salsas preparadas en base a espesantes), al ser sometidos a procesos de congelación-descongelación, es un fenómeno descrito y ampliamente citado en la literatura; sin embargo el grado de dicho deterioro ha sido generalmente determinado a través de métodos de cuantificación de exudado y textura (Hanson y col., 1951; Osman y Cummisford, 1959; Brunnek y Koptelova, 1971; Przybyl y col., 1983), viscosidad y viscoelasticidad (Suzuki y col., 1977; Kikuchi e Izutsu, 1981). Sólo más recientemente se han utilizado técnicas de calorimetría diferencial de barrido (White y col., 1989).

Con respecto al fenómeno de retrogradación a temperaturas sobre 0°C en sistemas a base de distintos tipos de almidón, nativos o modificados, en distintas concentraciones y condiciones de almacenamiento, es considerable la información que ha sido obtenida utilizando DSC.

Longton y LeGrys (1981) estudiaron la retrogradación de geles de almidón de trigo almacenados entre 4° y 30°C y hallaron que la retrogradación (cristalinidad) se incrementaba con el tiempo, más rápidamente y hasta un valor mayor cuanto más baja era la temperatura de almacenamiento, confirmando así lo observado por otros autores (Schoch, 1968). Asimismo, informaron que no ocurría retrogradación cuando el contenido de agua era mayor de 90 % o menor al 20 %.

Nakazawa y col. (1985) realizaron experiencias de DSC en ge-

les de almidón de papa almacenados a bajas temperaturas observando que el rango en que aparecía el pico de retrogradación en los termogramas era más amplio a medida que se incrementaba la concentración de almidón; encontraron asimismo que la energía requerida para producir la ruptura de las uniones intermoleculares del almidón retrogradado era de alrededor del 50 % de la involucrada en la gelatinización del gránulo original.

Zeleznak y Hoseney (1986) observaron que el contenido de agua era un factor importante en la retrogradación del almidón, encontrando que los valores máximos de entalpía de retrogradación se obtenían para una concentración de almidón del 50-60 % y que el factor determinante era la cantidad de agua presente en la etapa de envejecimiento y no en la de gelatinización previa. Utilizando además amilopectina solubilizada llegaron a importantes conclusiones respecto al rol de este polisacárido: la mayor endoterma observada mediante la técnica de DSC corresponde a la amilopectina retrogradada y eso ocurre cuando ésta no se encuentra en forma granular. El remanente de amilopectina en el gránulo no tendría, según estos autores, influencia en la retrogradación.

Estos resultados coinciden con lo informado por Miles y col. (1985), quienes utilizando técnicas de medición de viscoelasticidad, rayos-X y calorimetría llegaron a la conclusión de que la retrogradación era un proceso separable en dos etapas: una de corto plazo irreversible que involucra a la amilosa y no es medible con DSC y otra a más largo plazo, térmicamente reversible, relacionada con la recristalización de la amilopectina y responsable de la reversibilidad parcial en los cambios reológicos (del módulo de elasticidad) y cristalinidad; la cristalinidad residual correspondería a la amilosa.

Teniendo en cuenta la escasa información existente sobre el fenómeno de retrogradación durante la congelación y el almacenamiento congelado, el objetivo del presente capítulo fue la determinación del grado de retrogradación en suspensiones de almidón o harina gelatinizados, congeladas a distintas velocidades y almacenadas a distintas temperaturas utilizando como técnica la calorimetría diferencial de barrido.

6.2. Materiales y métodos

6.2.1. Fundamento de la técnica de calorimetría diferencial de barrido (DSC)

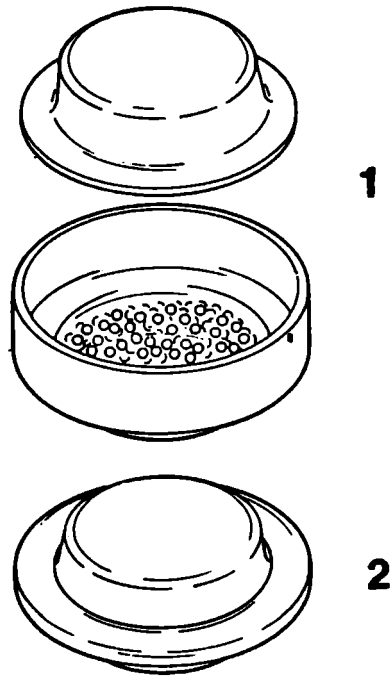
Muchos cambios que se producen en los productos alimenticios involucran la toma o cesión de calor (congelación de agua, cambios de fase en lípidos, desnaturalización de proteínas, gelatinización de almidón). Estos cambios de entalpía pueden detectarse mediante la técnica conocida como calorimetría diferencial de barrido (DSC).

Con esta metodología, la muestra que se ensaya y una muestra de referencia se someten a un calentamiento controlado; la diferencia de flujo calórico necesario para mantener la muestra y la referencia a una misma temperatura se determina mediante termosensores y se registra con un dispositivo adecuado. Si en la muestra tiene lugar una transformación acompañada de un cambio de entalpía, el área por debajo de la curva trazada por el registrador sirve de medida para dicho cambio.

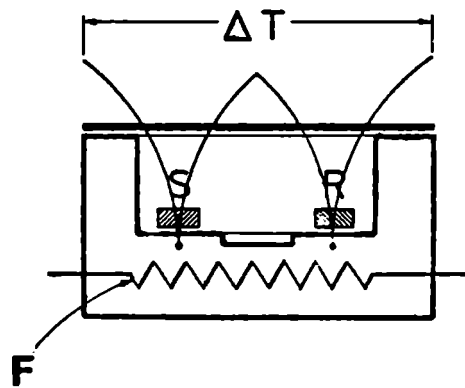
La muestra y la referencia son colocadas en cápsulas de aluminio selladas herméticamente (Fig. 6.1a) y éstas ubicadas en la celda (Fig. 6.1b). La capacidad de las cápsulas es de 10 a 20 μl , pudiendo soportar presiones de hasta 2-3 atmósferas. Es necesario que la muestra esté finamente dividida para un óptimo contacto con la superficie de la cápsula; en el caso de trabajar con muestras con alto contenido de agua este requerimiento se ve facilitado.

La calibración del instrumento se lleva a cabo generalmente con sustancias de alta pureza, de entalpía y punto de fusión perfectamente conocidos. El más utilizado es el indio (ΔH fusión = 28,424 J/g; p.f. = 156,4°C).

La determinación de la entalpía del proceso bajo estudio requiere la medición del área de la endo o exoterma. Esto presenta a veces dificultades ya que la línea de base puede no ser horizontal debido a las diferencias de calor específico entre la muestra y la referencia, asimismo el pico generalmente no es simétrico. Un procedimiento aceptado para la determinación de la



a



b

Fig. 6.1. (a) esquema de las cápsulas herméticas utilizadas, antes (1) y después (2) del sellado. (b) diagrama de la celda utilizado en DSC. S: muestra, R: referencia, F: fuente térmica (Lund, 1983)

línea de base del pico se ilustra en la Fig. 6.2. Los puntos de intersección T_0 y T_c representan las temperaturas inicial y final de la transición. La línea de base comienza en el punto de inflexión de la izquierda y termina en el sitio donde la pluma vuelve a la línea de base por la derecha (Lund, 1983).

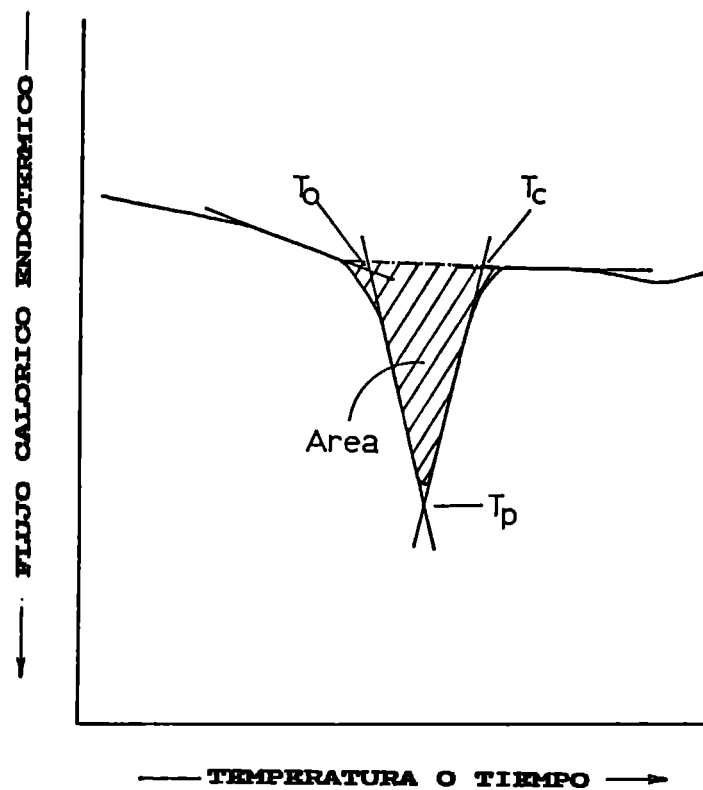


Fig. 6.2. Determinación de la línea de base, área, temperaturas inicial (T_0) y final (T_c) en una endoterma típica de calorimetría diferencial de barrido (Lund, 1983)

El área medida se relaciona con el cambio entálpico mediante una serie de constantes y se refiere a la masa de muestra (generalmente peso seco). En nuestro caso se utilizó la siguiente ecuación:

$$\Delta H = \frac{A (60 B E \Delta q_s)}{m} \quad (6.1)$$

donde A = área del pico (cm²)

m = masa de la muestra (mg)

E = coeficiente de calibración de la celda (mW/mV)

B = velocidad de registro (min/cm)

Δq_s = sensibilidad en el eje Y (mV/cm)

60 = factor de conversión de minutos a segundos

ΔH = entalpía de fusión (J/g)

En los ensayos del presente trabajo, el cambio entálpico determinado mediante la técnica descripta corresponde al pasaje de amilopectina retrogradada (es decir, cristalizada) nuevamente a solución. Esta entalpía es, por lo tanto, de igual valor absoluto y signo contrario a la involucrada en la retrogradación. Las mediciones fueron realizadas con un equipo Du Pont (USA) Serie 99 (Módulo base de la celda 910) con registrador XY Hewlett Packard (USA). La velocidad de calentamiento fue de 10°C/min; el rango de temperaturas de corrida, de 20 a 120°C, condiciones similares a las utilizadas por Miles y col.(1985). La velocidad de registro empleada fue de 1 min/cm y la sensibilidad, de 0,5 mV/cm. Como referencia se empleó una doble cápsula vacía. La calibración se realizó con indio, obteniéndose un coeficiente E= 0,204 (mW/mV).

6.2.2. Congelación, almacenamiento y descongelación de las muestras

Las pastas utilizadas fueron preparadas en la forma descrita en el Capítulo 2. Alicuotas de 5 gramos de la misma fueron envasadas en recipientes plásticos cilíndricos, envueltas individualmente en Parafilm y congeladas en distintas condiciones obteniéndose las siguientes velocidades y tiempos característicos: 0.3 cm/h (tc=210 minutos); 1 cm/h (tc=42 min); 2,3 cm/h (tc=20 min); 4,3 (tc=6 min) y 12 cm/h (tc=0,75 min). La primera veloci-

dad (0,3 cm/h) corresponde a una congelación lenta (cámara); las tres siguientes (1, 2 y 4,3 cm/h) a congelaciones rápidas (túnel o placas) y la última es ultra-rápida.

Las congelaciones fueron seguidas con termocuplas como fue descrito en el Capítulo 2, alcanzándose una temperatura final, en todos los casos, de -20°C . Las muestras se estabilizaron a esa temperatura durante 12 hs. y fueron trasladadas a cámaras de almacenamiento a -1 , -5 , -10 y -20°C ($\pm 0.5^{\circ}\text{C}$). A distintos tiempos de almacenamiento se descongelaron en cuarto de temperatura controlada a 20°C ($\pm 0.5^{\circ}\text{C}$) y alícuotas de aproximadamente 15 mg de pasta fueron encapsuladas herméticamente utilizándose para la pesada una balanza Mettler AE163 (Suiza) con precisión de centésima de mg. Posteriormente a cada corrida, el peso seco de las muestras fue determinado mediante el secado de las cápsulas convenientemente perforadas a 120°C durante 24 hs. (Jankowski y Rha, 1986). Para ello se utilizó una unidad infrarroja de secado Mettler LP16 (Suiza).

6.3. Resultados y discusión

6.3.1. Entalpías de gelatinización

En la Fig. 6.3 se muestran los termogramas correspondientes a la gelatinización de una suspensión al 10 % p/p de almidón de maíz común (a) y de harina de trigo (b), con y sin agregado de goma xántica. Los valores de entalpía de gelatinización encontrados y el rango de temperatura en que la misma ocurre se muestran en la Tabla 6.1.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo son coincidentes con los reportados por Eberstein y col. (1980), quienes utilizando también la técnica de calorimetría diferencial de barrido informaron para pastas de almidón de maíz al 20 % p/p un valor de ΔH de gelatinización de 13,79 J/g y un rango de gelatinización de $65-77^{\circ}\text{C}$, en buena concordancia con los resultados obtenidos por otros autores. Los resultados obtenidos por Eberstein y col. corresponden, como los del presente trabajo, al rango de

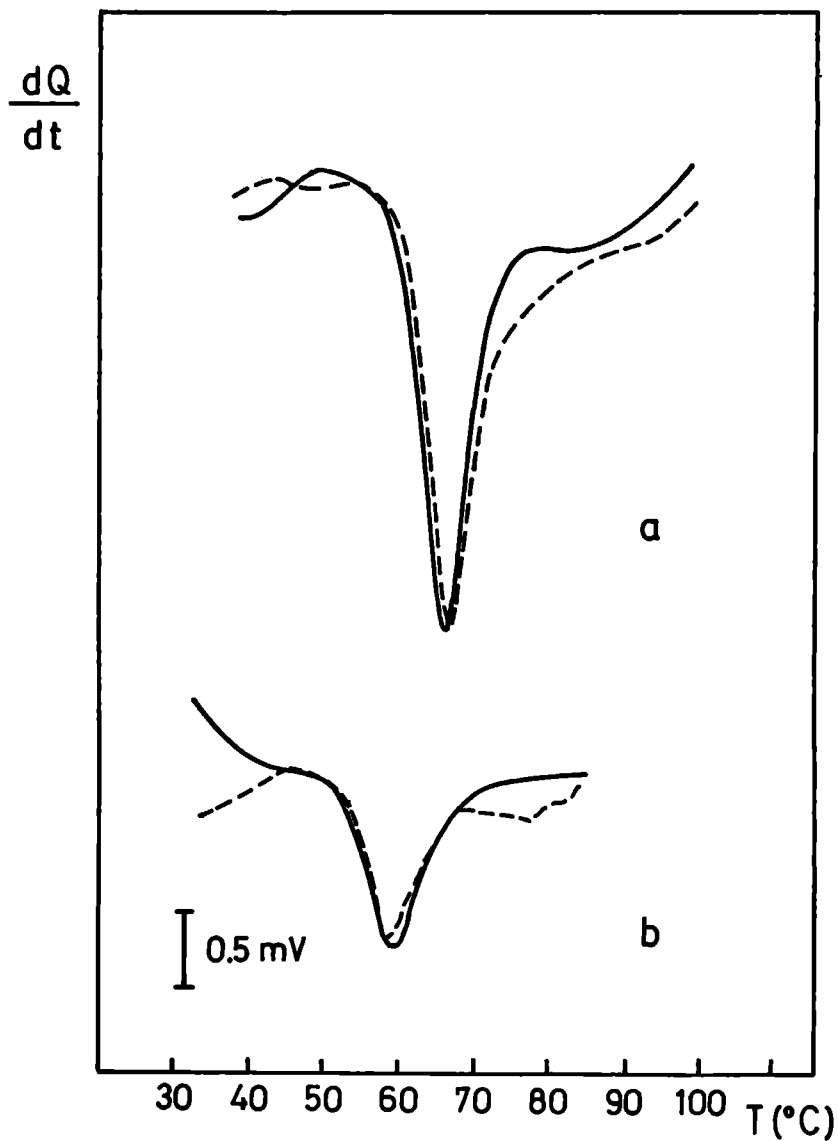


Fig. 6.3. Termogramas obtenidos por DSC correspondientes a la gelatinización de pastas al 10 % p/p de: (a) almidón de maíz sin goma xántica — y con goma xántica - - - - y (b) harina de trigo sin goma xántica — , y con goma xántica

Tabla 6.1. Entalpías de gelatinización de pastas de almidón de maíz y harina de trigo con y sin goma xántica

	sin goma xántica		con goma xántica	
	$\Delta H(J/g)$	rango de T ($^{\circ}C$)	$\Delta H(J/g)$	rango de T ($^{\circ}C$)
almidón de maíz	12,16 (0,34)	60-73	13,00 (2,04)	61-75
harina de trigo	6,48 (0,01)	52-67	5,48 (0,45)	52-68

Los valores entre paréntesis corresponden a los errores standard. Los ensayos fueron realizados por duplicado. Límite de confianza en la temperatura= $\pm 1^{\circ}C$

concentraciones de pastas de almidón en donde la entalpía de gelatinización se independiza del contenido de agua, tomando un valor constante.

Wirakartakusumah (1981), investigando la influencia del contenido de agua sobre el ΔH de gelatinización del almidón de arroz, encontró que el valor de la misma se hacía máximo para una relación de almidón/agua de 1,5/1 (60 %), permaneciendo constante independientemente de la cantidad de agua agregada. Un comportamiento similar fue descrito para pastas de almidón de trigo por Eliasson (1980).

Como se desprende de la Tabla 6.1, el efecto del agregado de goma xántica sobre la entalpía de gelatinización no es significativo, y como resulta evidente en la Fig. 6.3, tampoco afecta la forma de los picos. Estos resultados coinciden con los de Ghiasi y col. (1982), quienes utilizando pastas de almidón de trigo con agregado de goma xántica informaron que ésta no afectaba significativamente ni el valor de entalpía ni el rango de gelatinización cuando el sistema tenía una relación alta agua/almidón. La explicación dada por los autores era que, a bajas concentraciones de almidón, existe suficiente agua disponible para la gelatiniza-

ción, no siendo ésta afectada por la retención de agua que puedan ejercer el hidrocoloide o la proteína. Esta situación de suficiente disponibilidad de agua es la que explica también los picos únicos obtenidos (Fig. 6.3).

Cuando la relación agua/almidón es baja, aparece un segundo pico a temperaturas más altas (Biliaderis y col., 1980; Wirakartakusumah, 1981; Ghiasi y col., 1982; Burt y Russell, 1983). Según la explicación de Biliaderis y col.(1980), consistente con las nuevas teorías (Slade y Levine, 1987, 1988, 1991), cuando hay presente una gran cantidad de agua, la hidratación extensiva de las regiones amorfas del gránulo facilitan la fusión de los cristales de almidón dentro de un rango muy estrecho de temperaturas, resultando de este modo la aparición de un único pico de gelatinización. Cuando el almidón se halla más concentrado, sólo puede ocurrir una fusión parcial de acuerdo con el mecanismo citado (primera endoterma). La subsiguiente redistribución del agua alrededor de los cristales no fundidos ayudaría a la fusión de los mismos tras el calentamiento a temperaturas más altas (segunda endoterma). La fusión de los mencionados cristales, involucraría una transición de la forma helicoidal de la amilosa a la del ovillo al azar, ayudada por la solvatación, por lo que la disponibilidad de agua jugaría un rol de gran importancia.

6.3.2. Efecto de la congelación y del almacenamiento congelado sobre la entalpía de retrogradación y rango de temperatura de transición

6.3.2.1. Influencia de la velocidad de congelación

En las Tablas 6.2 y 6.3 se muestran los valores de entalpía de retrogradación y rangos de temperatura de la transición, respectivamente, hallados para muestras congeladas a distintas velocidades que no fueron sometidas a almacenamiento. Se describe además brevemente el aspecto presentado por los geles, clasificándolos en esponjosos, arenosos u homogéneos, de acuerdo a los calificativos respecto a la textura habitualmente usados en lite-

ratura (Dreher y col., 1983). El guión indica que no se ha observado pico de retrogradación.

No se observó la aparición de pico de retrogradación en muestras de pastas de almidón de maíz recién congeladas cuando la velocidad de congelación utilizada era mayor o igual a 2,3 cm/h pero sí se observó a velocidades más bajas, no encontrándose diferencias significativas entre los resultados obtenidos al congelar a 1,0 cm/h ó 0,3 cm/h. Es importante destacar que la presencia de hidrocoloide no ha evitado la retrogradación del almidón ni ha afectado significativamente los valores de entalpía o el rango de temperatura en el que ocurre la transición.

En el caso de las pastas de harina con y sin hidrocoloide no se observó en ningún caso la aparición de pico de retrogradación.

Otra conclusión que se desprende de la Tabla 6.2 es que las características texturales de "esponjosidad" o "arenosidad" no se pueden relacionar directamente con el cambio entálpico que se mide a través de la calorimetría diferencial de barrido.

El hecho de que no se observe pico de retrogradación tras una congelación rápida o muy rápida podría explicarse a la luz de las recientes teorías sobre la retrogradación del almidón (Slade y Levine, 1987), quienes hacen hincapié en la existencia de dos transiciones, a T_g y T_m . Como ya fue señalado en el Capítulo 1, la temperatura de transición T_g es aquella en que se produce el pasaje del estado vítreo al estado viscoso y T_m , la correspondiente a la de fusión. Entre las temperaturas correspondientes a estas dos transiciones se puede tener una mezcla de cristales ordenados y polímero amorfo. La localización de T_g resulta dependiente de la velocidad de enfriamiento, mientras que T_m no está sujeta a cambio. Cuanto más rápido es el enfriamiento, el valor de T_g se localiza a mayores temperaturas, reduciéndose el rango T_g - T_m . Así, si la velocidad de enfriamiento supera a la de cristalización puede no haber cambios observables a T_m , con formación de cristales, aun para un polímero cristalizabile (Hiemenz, 1984). Teniendo en cuenta este criterio, en el caso de las pastas de almidón gelatinizado, si la velocidad de congelación es muy rápida, no se observa cristalización del almidón (retrogradación) durante la congelación ya que la temperatura desciende rápidamente

te por debajo de T_g , habiéndose reducido el rango T_g-T_m donde ocurre la nucleación y propagación cristalina.

Tabla 6.2. Efecto de la velocidad de congelación en la entalpía de retrogradación y apariencia de pastas de almidón de maíz común y de harina de trigo, con y sin hidrocoloide

	Velocidad de congelación (cm/h)				
	12,0	4,3	2,3	1,0	0,3
almidón de maíz sin goma xántica	- *	-	-	2,05 ** (0,35)	2,97 (0,20)
	ligeramente arenoso	ligeramente arenoso	arenoso	arenoso	esponjoso
almidón de maíz con goma xántica	-	-	-	2,38 (0,26)	2,76 (0,36)
	homogéneo	homogéneo	homogéneo	homogéneo	homogéneo
harina de trigo sin goma xántica	-	-	-	-	-
	ligeramente arenoso	ligeramente arenoso	arenoso	arenoso	ligeramente esponjoso
harina de trigo con goma xántica	-	-	-	-	-
	homogéneo	homogéneo	homogéneo	homogéneo	homogéneo

* El guión indica que no se ha observado pico de retrogradación
 **Los valores de entalpía están expresados en J/g (base seca)
 Los valores entre paréntesis corresponden a los errores standard.
 Los ensayos fueron realizados por duplicado.

Tabla 6.3. Rangos de temperatura correspondientes a las endotermas de retrogradación de pastas de almidón de maíz común congeladas a 1,0 y 0,3 cm/h

	Velocidad de congelación (cm/h)	
	1,0	0,3
almidón de maíz sin goma xántica	37 - 60*	36 - 55
almidón de maíz con goma xántica	37 - 61	39 - 57

*Los valores de temperatura están expresados en °C, con un error de $\pm 1^\circ\text{C}$ para un 90 % de confianza.

Para explicar la formación de esta estructura tipo "esponja", hay que tener en cuenta la discriminación entre retrogradación a corto plazo, relacionada con la cristalización de la amilosa y la que ocurre a más largo plazo, debida a la cristalización de la amilopectina. Esta última se relaciona con el cambio en el módulo de elasticidad de los geles de almidón y con la aparición de un pico de retrogradación en los termogramas (Miles y col., 1985; Morris, 1990). La retrogradación de la amilosa es térmicamente irreversible y fue descrita por Morris (1990) como la formación de una red fibrilar gruesa. Desde este punto de vista, velocidades más bajas favorecerían la desolvatación del gel y la consiguiente formación de zonas de mayor concentración de amilosa, donde se vería favorecido el engrosamiento de la estructura fibrilar descrito por Morris y otros autores (Schulze, 1964; Kikuchi e Isutzu, 1981). Esta estructura fibrilar esponjosa estaría relacionada con la cristalización de amilosa que por ser térmicamente irreversible no aparece en los registros calorimétricos.

De los resultados podemos concluir que la acción del hidro-

coloide se produce a nivel de la red de amilosa, impidiendo el engrosamiento fibrilar, es decir, la estructura tipo esponja, probablemente debido a que por su carácter altamente hidrofílico evita la desolvatación durante la congelación. Sin embargo, esto no impide la cristalización de la amilopectina y por ello aparecen, dentro del mismo rango de temperaturas, picos de área comparable a los obtenidos en el caso de las pastas sin hidrocoloide.

En el caso de las pastas de harina, la proteína ejercería un efecto protector a nivel de la red de amilosa, impidiendo la formación de una estructura tipo "esponja" tan firme como la que se desarrolla en las pastas de almidón. El hecho de que no se haya detectado pico de retrogradación en la pasta de harina aun a velocidades bajas podría obedecer a que, siendo el ΔH de retrogradación a un tiempo dado, una fracción del ΔH total de gelatinización, y en el caso de la harina, este valor es menor que en el de almidón, las pastas congeladas no llegan a retrogradar en grado detectable para la sensibilidad del equipo.

6.3.2.2. Efecto del almacenamiento congelado sobre la retrogradación

En la Fig. 6.4 se muestran termogramas obtenidos para pastas de almidón de maíz común congeladas a 0,3 cm/h y almacenadas a -1°C , durante 7, 16 y 30 días.

Las Fig. 6.5, 6.6 y 6.7a corresponden a termogramas obtenidos para pastas de almidón de maíz congeladas a 12,0; 1,0 y 0,3 cm/h y almacenadas a -5°C . Se observa en todos los casos, un incremento del área de los termogramas en función del tiempo de almacenamiento. Como fue señalado previamente, dicha área se relaciona a través de la ec. (6.1) con la entalpía involucrada en la transición, en este caso, la de retrogradación. Se nota, asimismo, que en todos los casos se llega a un área máxima, es decir, a una entalpía límite. Si se comparan los termogramas de la Fig. 6.7a con los correspondientes a la pasta congelada a la misma velocidad y almacenada a -1°C (Fig. 6.4), se observa que el crecimiento del área de los termogramas es mucho más rápido en el

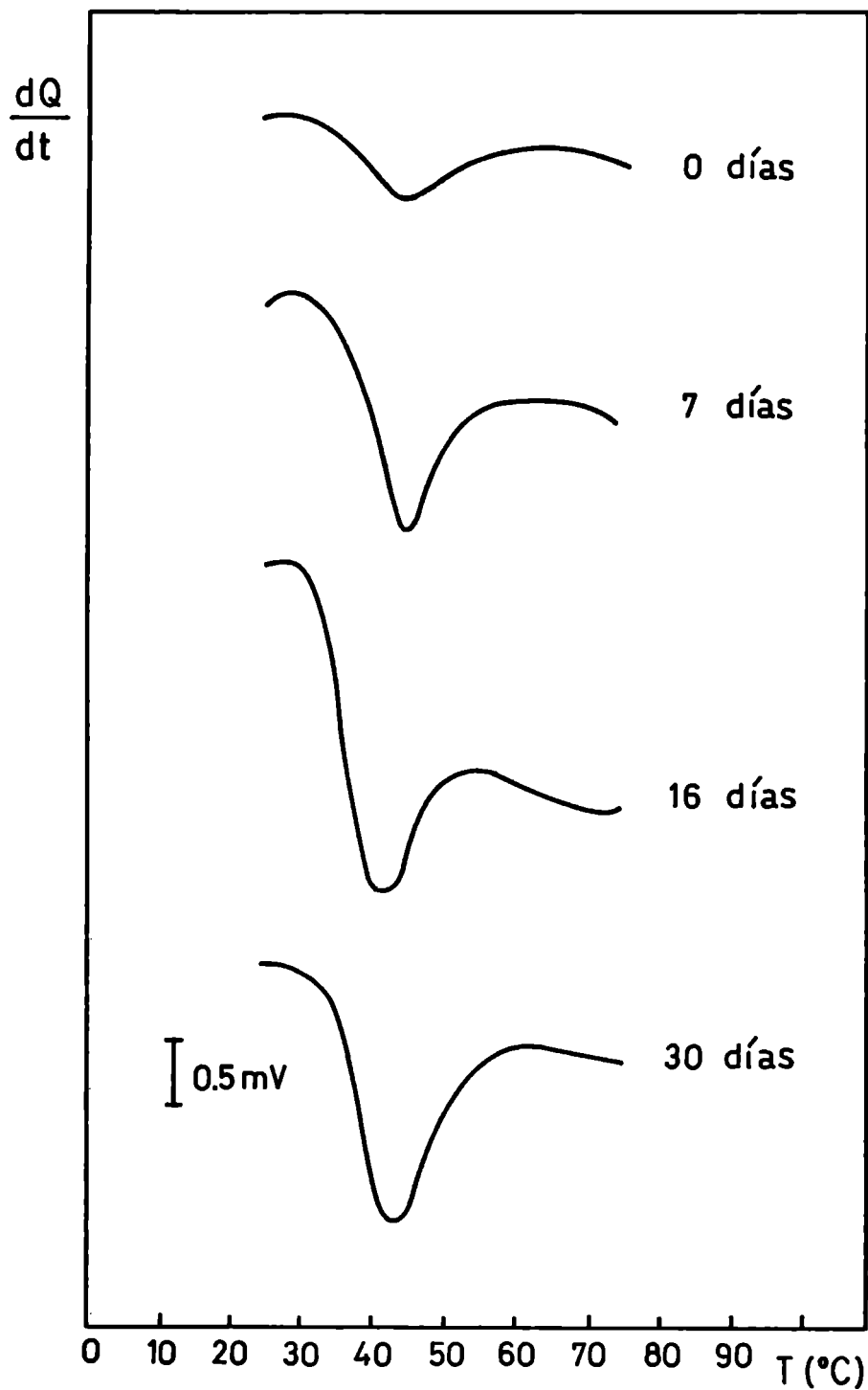


Fig. 6.4. Termogramas obtenidos por DSC correspondientes a pastas de almidón de maíz congeladas a 0.3 cm/h y almacenadas durante distintos tiempos a -1°C

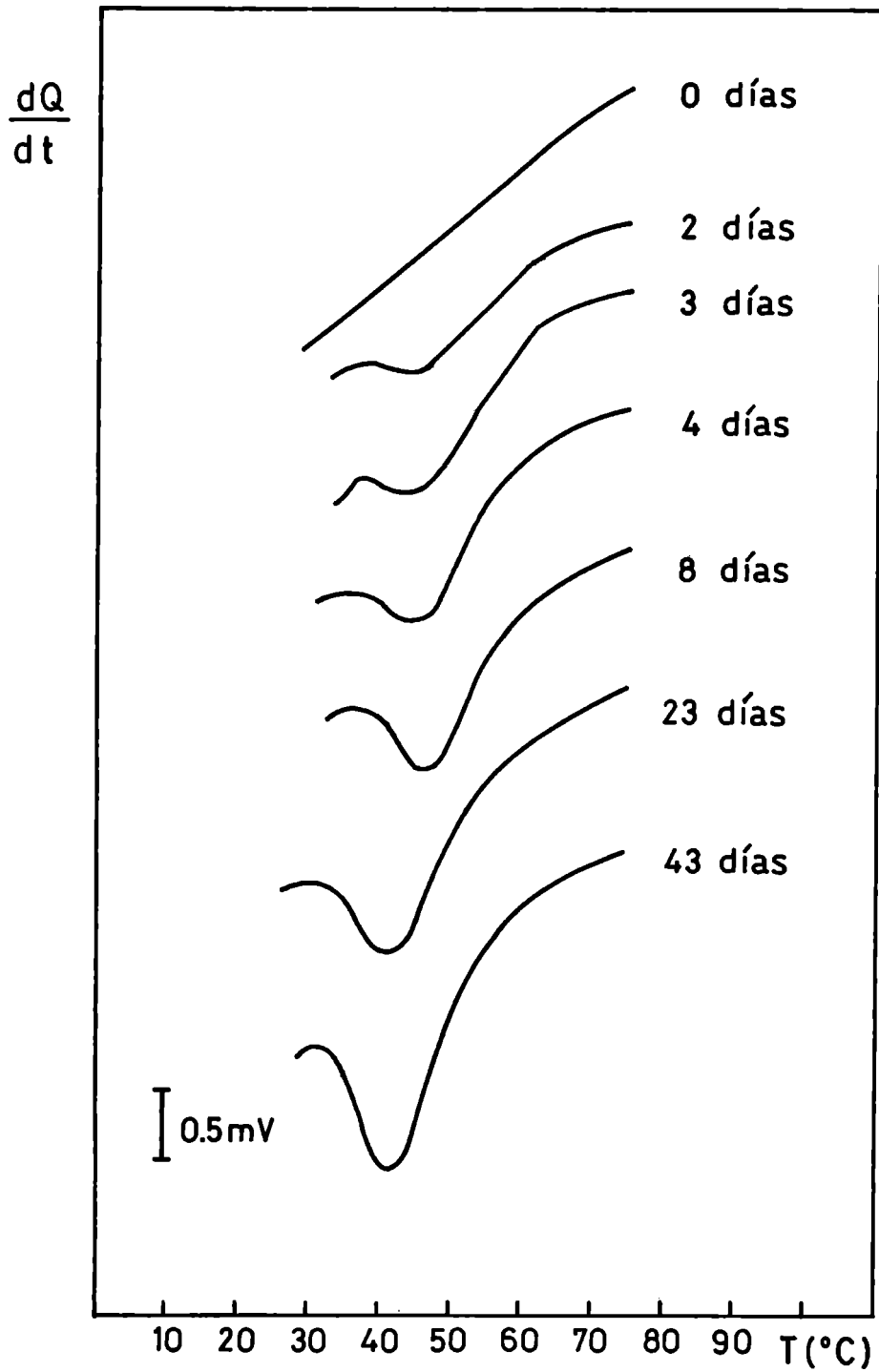


Fig. 6.5. Termogramas obtenidos por DSC correspondientes a pastas de almidón de maíz congeladas a 12 cm/h y almacenadas durante distintos tiempos a -5°C

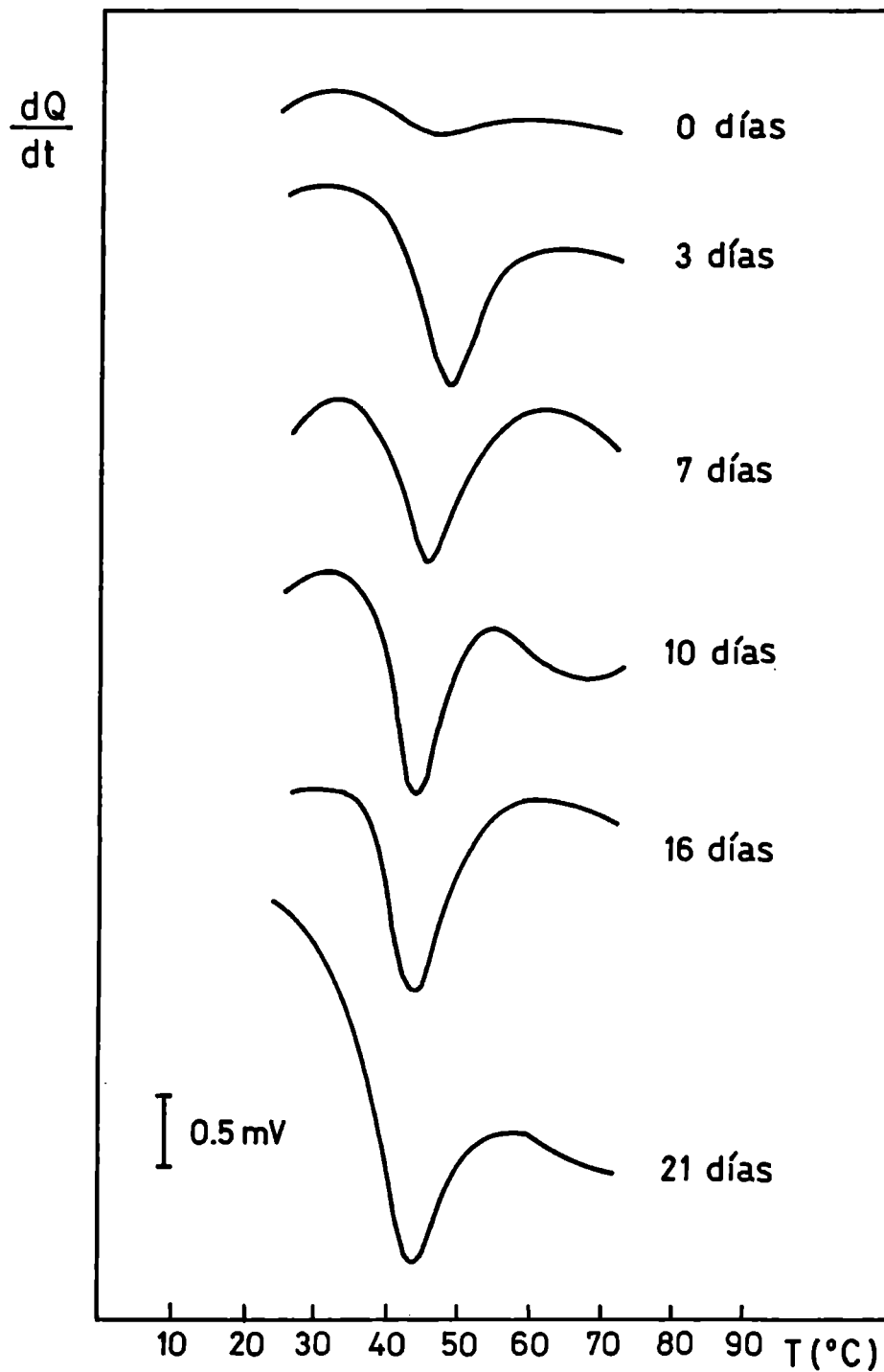


Fig. 6.6. Termogramas obtenidos por DSC correspondientes a pastas de almidón de maíz congeladas a 1,0 cm/h y almacenadas durante distintos tiempos a -5°C

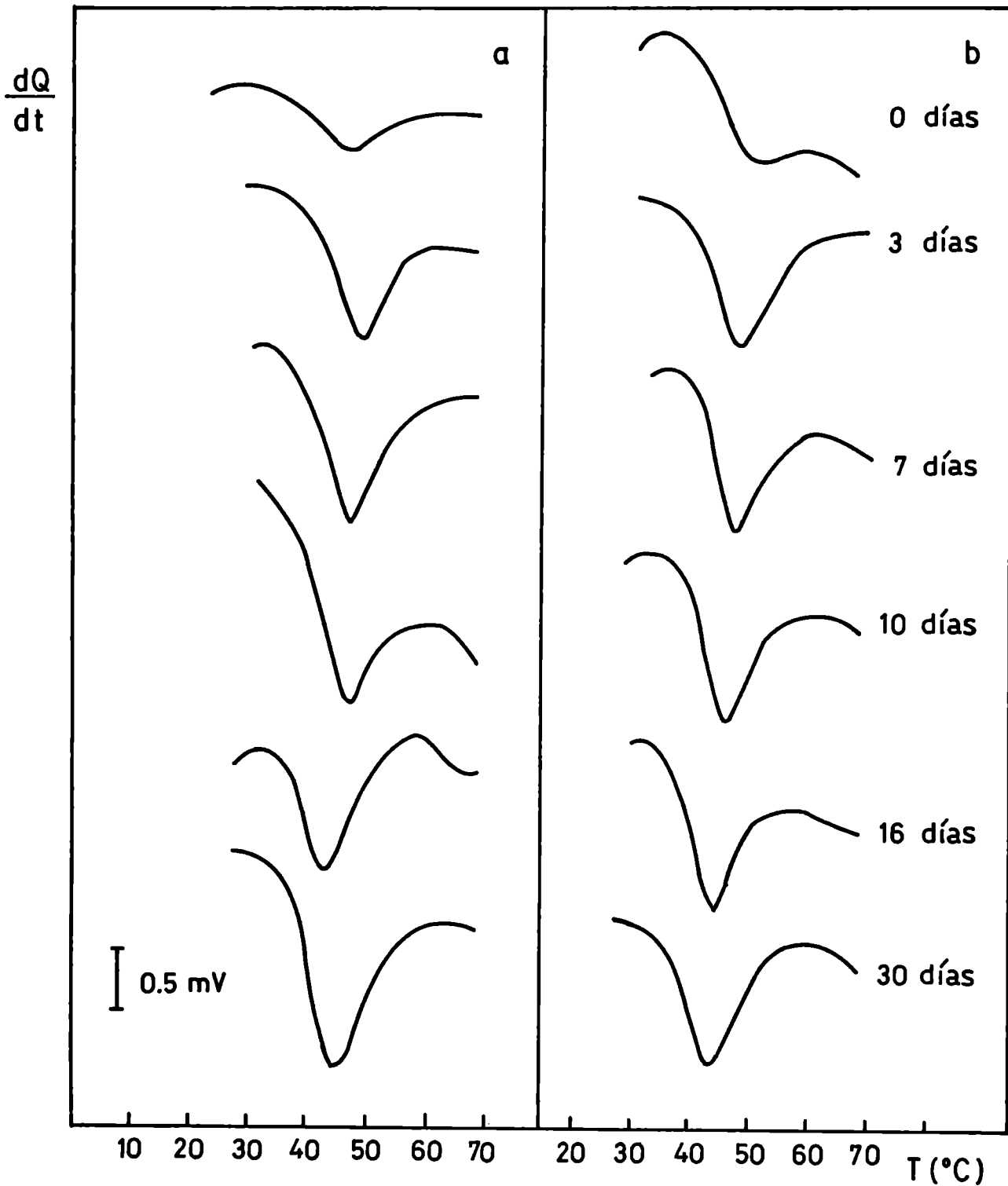


Fig. 6.7. Termogramas obtenidos por DSC correspondientes a pastas de almidón de maíz congeladas a 0.3 cm/h y almacenadas durante distintos tiempos a $-5^{\circ}C$ (a) sin goma xántica; (b) con goma xántica

caso del almacenamiento a -1°C que durante el almacenamiento a -5°C , lo que indica que la velocidad de retrogradación es mayor a -1°C .

En la Fig. 6.7b se muestran los termogramas correspondientes a pastas de almidón común con agregado de goma xántica congeladas a $0,3\text{ cm/h}$ (lento) y almacenadas a -5°C durante distintos tiempos. Comparando con la Fig. 6.7a se observa que prácticamente no hay diferencias en cuanto al área obtenida a cada tiempo de almacenamiento, lo que demuestra que la presencia del hidrocoloide no evita ni retarda la retrogradación.

En la siguiente figura se han representado, como ejemplo, algunos de los termogramas obtenidos para pastas de harina de trigo sin hidrocoloide (Fig. 6.8a) y con hidrocoloide (Fig.6.8b) almacenadas a -5°C a distintos tiempos. Se observa que las áreas de los termogramas son menores, a un mismo tiempo de almacenamiento, que las correspondientes a pastas de almidón. Asimismo la entalpía máxima resulta significativamente menor en el caso de las pastas de harina.

A temperaturas más bajas (-10 , -20°C) no se observó la aparición de un pico de retrogradación durante el almacenamiento congelado, en aquellos casos en que no se había detectado pico en muestras recién congeladas (cuando la congelación se efectuó a velocidades superiores a 1 cm/h para pastas de almidón de maíz y a todas las velocidades de congelación para pastas de harina de trigo). En los casos en que hubo retrogradación durante la congelación (en pastas de almidón de maíz cuando la velocidad de congelación fue de $1,0$ ó $0,3\text{ cm/h}$), el valor de entalpía se mantuvo constante durante el almacenamiento no siendo significativamente distinto al inicial. Como ejemplo de lo expuesto, en la Tabla 6.4 se presentan los valores de entalpía obtenidos después de 70 días de almacenamiento a -10°C para pastas de almidón de maíz común y harina de trigo, congeladas a $0,3\text{ cm/h}$.

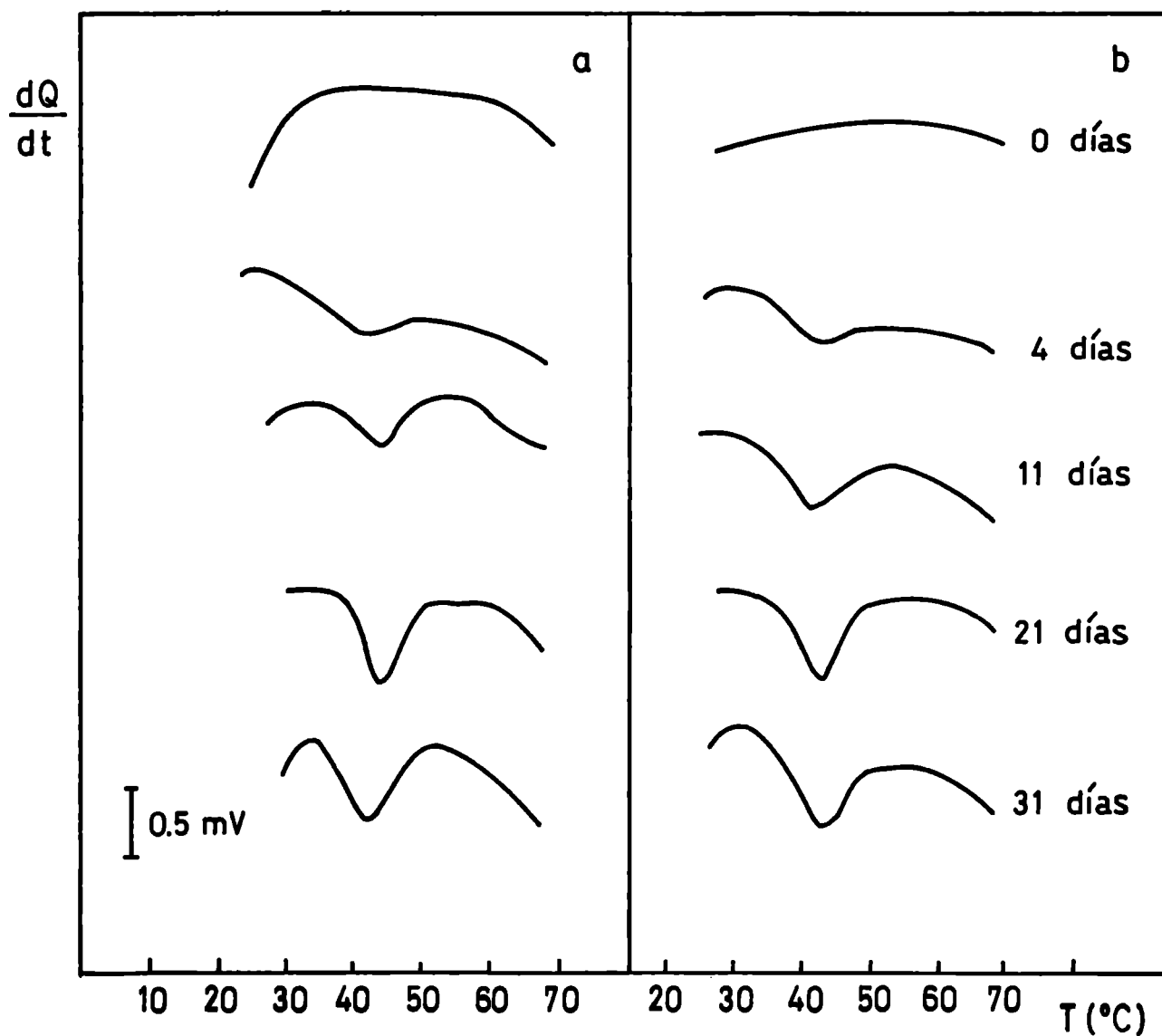


Fig. 6.8. Termogramas obtenidos por DSC correspondientes a pastas de harina de trigo congeladas a 0.3 cm/h y almacenadas durante distintos tiempos a -5°C (a) sin goma xántica; (b) con goma xántica

Tabla 6.4. Entalpías de retrogradación de pastas de almidón de maíz y harina de trigo congeladas a 0,3 cm/h, después de 70 días de almacenamiento a -10°C

	ΔH (J/g) (0 días)	ΔH (J/g) (70 días)
almidón de maíz sin goma xántica	2,97 (0,20)	2,82 (0,14)
almidón de maíz con goma xántica	2,75 (0,36)	2,84 (0,27)
harina de trigo sin goma xántica	- *	-
harina de trigo con goma xántica	-	-

(*) No fue detectado pico de retrogradación

Los valores entre paréntesis corresponden a los errores standard.
Los ensayos fueron realizados por duplicado

Paralelamente al crecimiento del área bajo la curva de los termogramas, correspondiente a la cristalización térmicamente reversible de la amilopectina, se observó que a las temperaturas más altas de almacenamiento (-1 y -5°C) se desarrollaba una textura esponjosa, ya descrita en capítulos anteriores. Aun en aquellos casos en que este tipo de estructura no se había formado durante la congelación, se observó que se iba desarrollando durante el almacenamiento cuando las temperaturas utilizadas para el mismo eran altas, no así a -10 y -20°C.

Esta estructura, relacionada con el engrosamiento de la red de amilosa (Morris, 1990) no se evidenció en las pastas de almidón de maíz o de harina con agregado de estabilizante. El aspecto y la textura de las pastas con hidrocoloide fue muy similar al de las recién preparadas, es decir homogéneo y casi nada arenoso.

Esto indicaría una acción de la goma xántica a nivel de la amilosa impidiendo la retrogradación de la misma.

A la luz de las nuevas hipótesis formuladas por Slade y Levine (1987) basadas en la teoría de volumen libre de Williams-Laudel-Ferry, el hecho de que se haya encontrado un desarrollo de la retrogradación a temperaturas de almacenamiento superiores a -5°C y no a -10 ó -20°C es concordante con que por encima de -5°C se está en la zona de estado viscoso para las mezclas almidón gelatinizado-agua, en particular el almidón gelatinizado con un contenido de humedad superior o igual al 27%. Los autores definen una temperatura de transición vítrea T_g de -5°C para pastas de almidón de trigo. Por encima de esta temperatura, hay suficiente movilidad molecular como para que pueda producirse la cristalización del almidón. Por debajo de esa temperatura, el estado vítreo confiere bastante inmovilidad a las moléculas, impidiendo la retrogradación.

El hecho de que a -1°C , la velocidad de retrogradación del almidón sea mayor se explicaría a partir de que a esa temperatura es mayor la velocidad de la segunda etapa de la cristalización, la propagación, que aumenta exponencialmente con ΔT por encima de T_g (hasta T_m).

Slade y Levine (1987) han sugerido que la "movilidad" del agua y el volumen libre parecen jugar un rol clave para evitar la retrogradación. La inhibición de la retrogradación de amilosa en el caso de las pastas de almidón estabilizadas con goma xántica podría deberse a la dificultad en la migración de los grandes segmentos de las cadenas principales de almidón, requeridos para el crecimiento cristalino, quedando éste inhibido en términos reales, debido a la disminución de la propagación.

6.3.2.3. Modelado del fenómeno de retrogradación

Como se ha visto, la retrogradación del almidón debe considerarse un fenómeno de cristalización. Para el tratamiento de los datos experimentales se utilizó el modelo de Avrami, aplicado en la cinética de cristalización de polímeros. Este modelo contempla la formación de núcleos de crecimiento a partir de embriones pre-existentes en el material, seguida de crecimiento cristalino con morfología lineal, plana o tridimensional.

En este modelo predice el incremento de la fracción cristalizada (θ) en función del tiempo (t) de acuerdo a una ecuación de tipo exponencial:

$$\theta = 1 - \exp(-k t^n) \quad (6.2)$$

donde el exponente n , conocido comunmente como exponente de Avrami, es un parámetro que se relaciona tanto con la formación de núcleos cristalinos como con su morfología (Hiemenz, 1984).

El modelo de Avrami ha sido ampliamente usado en trabajos concernientes a la retrogradación de almidón (McIver y col., 1968; Colwell y co., 1969; Longton y LeGrys, 1981; Russell, 1983; Jankowski y Rha, 1986).

Los nuevos conceptos referentes a la retrogradación de almidón (Slade y Levine, 1987), contrapuestos a lo tradicionalmente aceptado respecto al rol excluyente de la amilosa en la retrogradación, han puesto en cuestionamiento la utilización del modelo de Avrami para la cinética de la retrogradación. Algunos autores han utilizado este modelo únicamente con datos obtenidos a partir de calorimetría diferencial de barrido (Longton y LeGrys, 1981) y otros también para el tratamiento de los valores de módulo de elasticidad en función del tiempo (Russell, 1983; Jankowski y Rha, 1986; Roulet y col., 1990). Dado que el cambio en el módulo de elasticidad sería paralelo al desarrollo de la cristalinidad involucrando tanto a la amilosa como a la amilopectina, el empleo de la ecuación de Avrami no sería adecuado para los casos en que se modelan parámetros reológicos. Sin embargo, podría utilizarse con los datos de calorimetría ya que lo único que se mide median-

te esta técnica es la cristalización de la amilopectina.

Los parámetros obtenidos vía este modelo tendrían una utilidad teórica relativa pues fueron originalmente derivados para definir el mecanismo de cristalización bajo condiciones de equilibrio termodinámico cuando se trata en realidad de un proceso de no-equilibrio (Slade y Levine, 1987).

No obstante, todavía el modelo de Avrami resulta, según Slade, "un medio conveniente para representar los datos empíricos de los experimentos de retrogradación". Por otro lado, dado que en la literatura el tratamiento de los datos se ha realizado según este modelo, su aplicación permite comparar los resultados con los obtenidos por otros autores.

Los valores de entalpía calculados a partir de las áreas de los termogramas utilizando la ec. (6.1) para cada tiempo de almacenamiento (ΔH_t) y los valores de entalpía iniciales (ΔH_0) (correspondientes a la retrogradación que ocurre durante la congelación) fueron regresionados según la ec. (6.2) desarrollada:

$$\frac{\Delta H_t - \Delta H_0}{\Delta H_\infty - \Delta H_0} = 1 - \exp(-k t^n) \quad (6.3)$$

donde ΔH_∞ es el valor de entalpía máximo o límite.

Para el ajuste de los datos experimentales se utilizó el módulo Systat para regresiones no lineales. Dado que k depende sólo de la temperatura de almacenamiento, se regresionaron juntos los valores de ΔH_t correspondientes a las muestras congeladas a distintas velocidades, restándole su correspondiente ΔH_0 . Se tomó $n = 1$ en todos los casos ya que, aunque el modelo ha sido evaluado para distintos valores de n , estudios previos han concluido que el que mejor ajusta es la unidad (McIver y col., 1968; Colwell y co., 1969).

En la Tabla 6.4 se exponen los valores de k y ΔH_∞ hallados para almacenamientos a -1 y -5°C para pastas de almidón de maíz común y de harina de trigo con y sin agregado de hidrocóloide.

Tabla 6.5. Parámetros cinéticos de retrogradación durante almacenamiento congelado para pastas de almidón de maíz y de harina de trigo

	Temperatura de almacenamiento			
	-1°C		-5°C	
	k(días ⁻¹)	ΔH _o (J/g)	k(días ⁻¹)	ΔH _o (J/g)
almidón de maíz sin g. xántica	0,309 (0,064)* r=0,988	8,883** (0,330)	0,114 (0,033) r=0,970	9,288 (0,836)
almidón de maíz con g. xántica	0,369 (0,227) r=0,982	8,730 (0,372)	0,216 (0,063) r=0,988	6,132 (0,271)
harina de trigo sin g. xántica	0,289 (0,079) r=0,983	2,897 (0,142)	0,130 (0,024) r=0,979	2,575 (0,150)
harina de trigo con g. xántica	0,248 (0,023) r=0,994	3,285 (0,071)	0,235 (0,034) r=0,993	2,383 (0,084)

(*)Error standard (P=0,05)

r=coeficiente de correlación de la regresión no lineal

(**) Entalpías calculadas en base seca

Se observa que en el caso de las pastas de almidón de maíz, las constantes correspondientes al almacenamiento a -5°C son menores, como era de esperar a las obtenidas para -1°C. Asimismo, comparando los valores de ΔH_o se desprende que el hidrocólido disminuye este valor límite. Respecto de las pastas de harina, se observa un ΔH_o similar para almacenamiento a -1 y a -5°C y, como fue observado en el caso de las pastas de almidón sin hidrocólido, un menor k en el caso del almacenamiento a -5°C. En este ca-

so, sin embargo, no se detectó una depresión significativa del ΔH límite de retrogradación de las pastas de harina con hidrocoloide respecto del de las pastas sin hidrocoloide, ni tampoco una diferencia significativa entre las k correspondientes a distintas temperaturas de almacenamiento (0,248 y 0,235 días⁻¹). Los altos valores del coeficiente de correlación indican un buen ajuste de los datos experimentales al modelo propuesto confirmándose, de este modo, la validez de regresionar conjuntamente los datos obtenidos a partir de muestras congeladas a distintas velocidades y almacenadas a la misma temperatura.

En la Fig. 6.9 se han representado los valores fracción retrogradada (θ) función del tiempo de almacenamiento para muestras congeladas a distintas velocidades y almacenadas a -1 y -5°C , sin agregado de goma xántica.

La Fig. 6.10 corresponde a los valores obtenidos para pastas de almidón de maíz con agregado de goma xántica e iguales condiciones de congelación y almacenamiento que las pastas correspondientes a la Fig. 6.9.

En las Fig. 6.11 y 6.12 se muestran los valores de fracción retrogradada en función del tiempo para pastas de harina sin agregado de goma xántica y con ella, respectivamente. Las curvas teóricas mostradas en cada una de las figuras fueron calculadas en base a los parámetros mostrados en la Tabla 6.5.

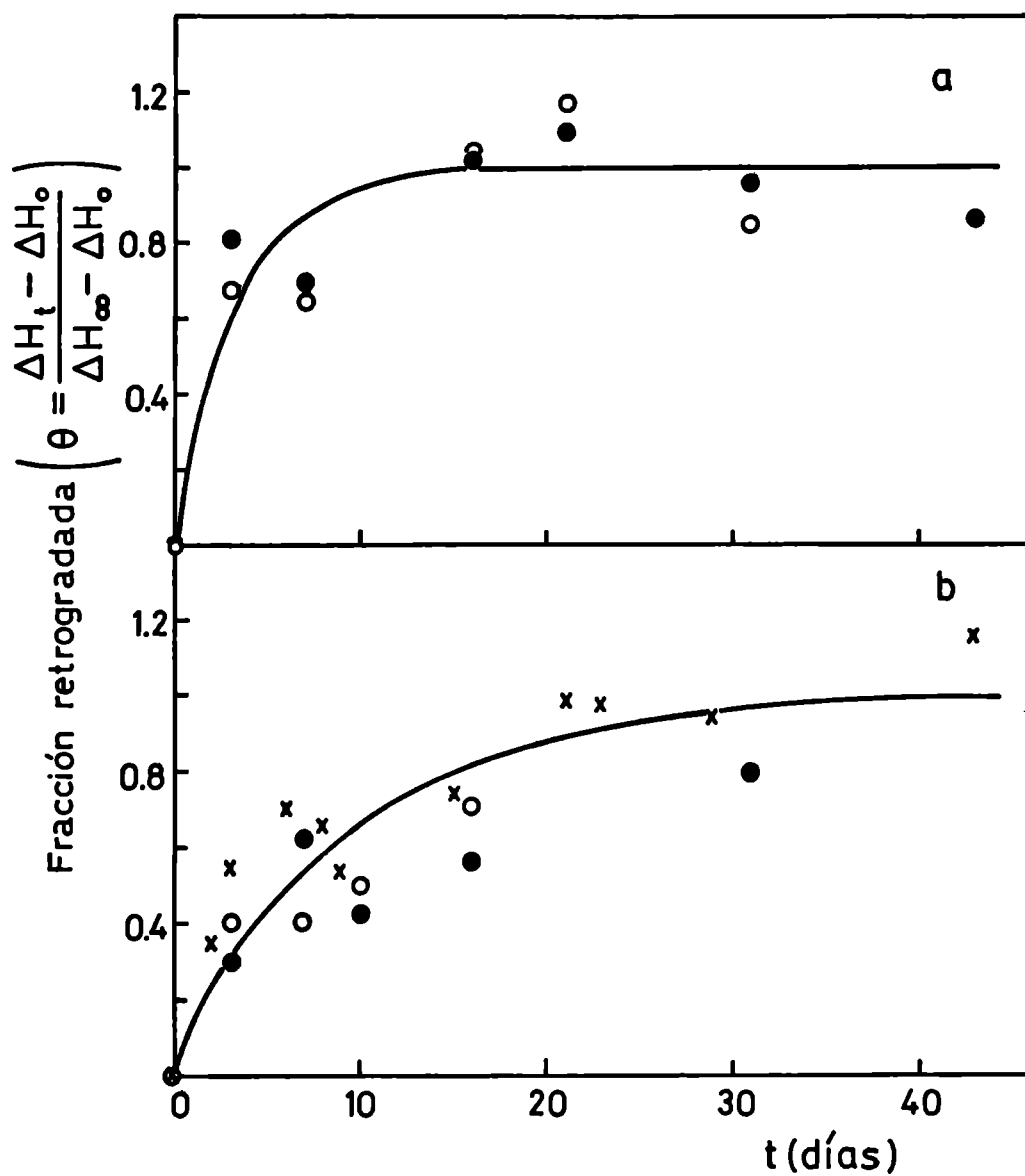


Fig. 6.9. Fracción retrogradada de almidón (θ) en función del tiempo de almacenamiento correspondiente a pastas de almidón de maíz común sin goma xántica, almacenadas a -1°C (a) y -5°C (b).

(●) congelado lento (0,3 cm/h); (○) congelado rápido (1,0 cm/h); (x) congelado ultra-rápido 12 cm/h. — Modelo de Avrami ec. (6.2)

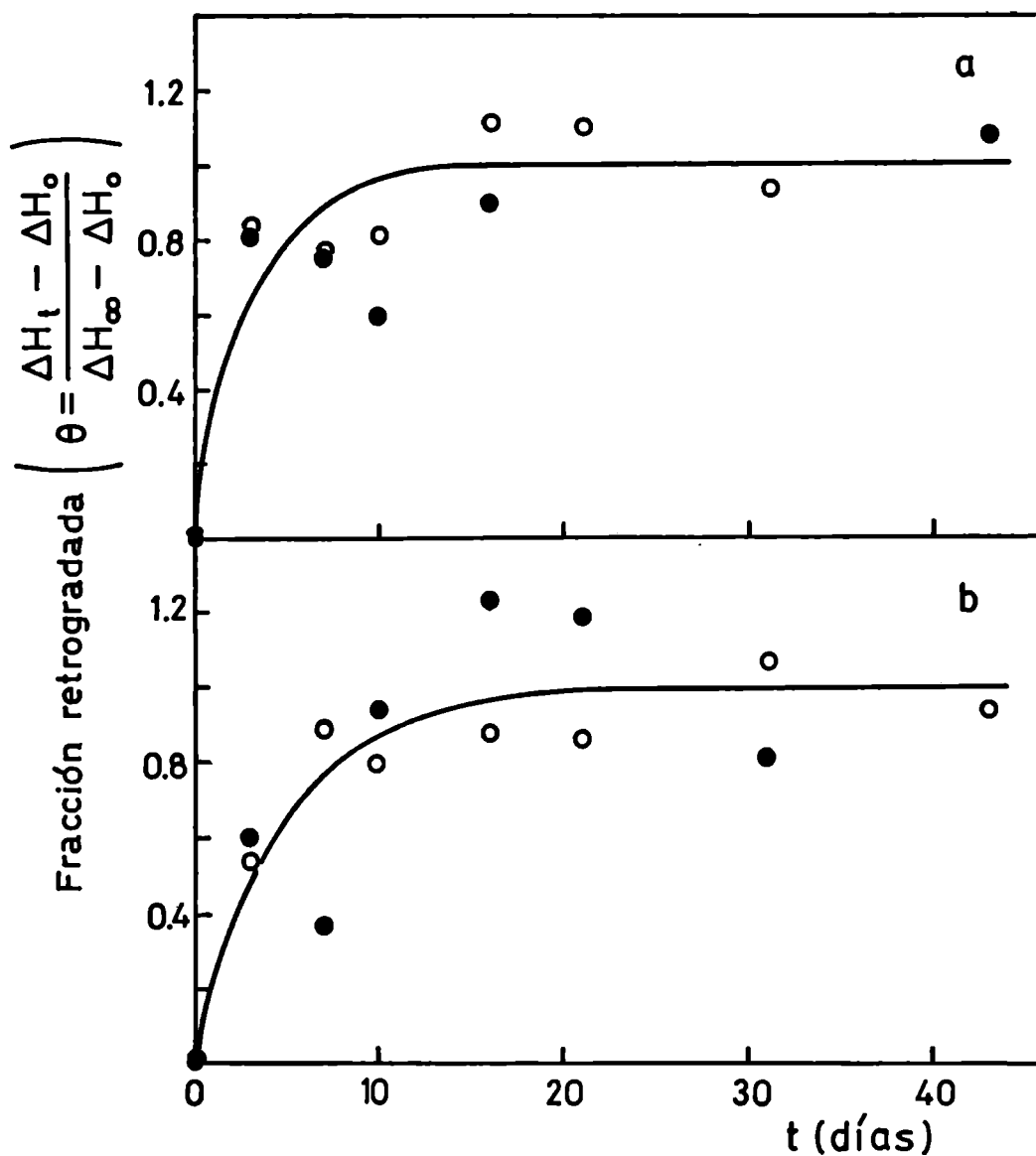


Fig. 6.10. Fracción retrogradada de almidón en función del tiempo de almacenamiento correspondiente a pastas de almidón de maíz común con goma xántica, almacenadas a -1°C (a) y -5°C (b).

(●) congelado lento (0,3 cm/h); (○) congelado rápido (1,0 cm/h).

— Modelo de Avrami, ec. (6.2)

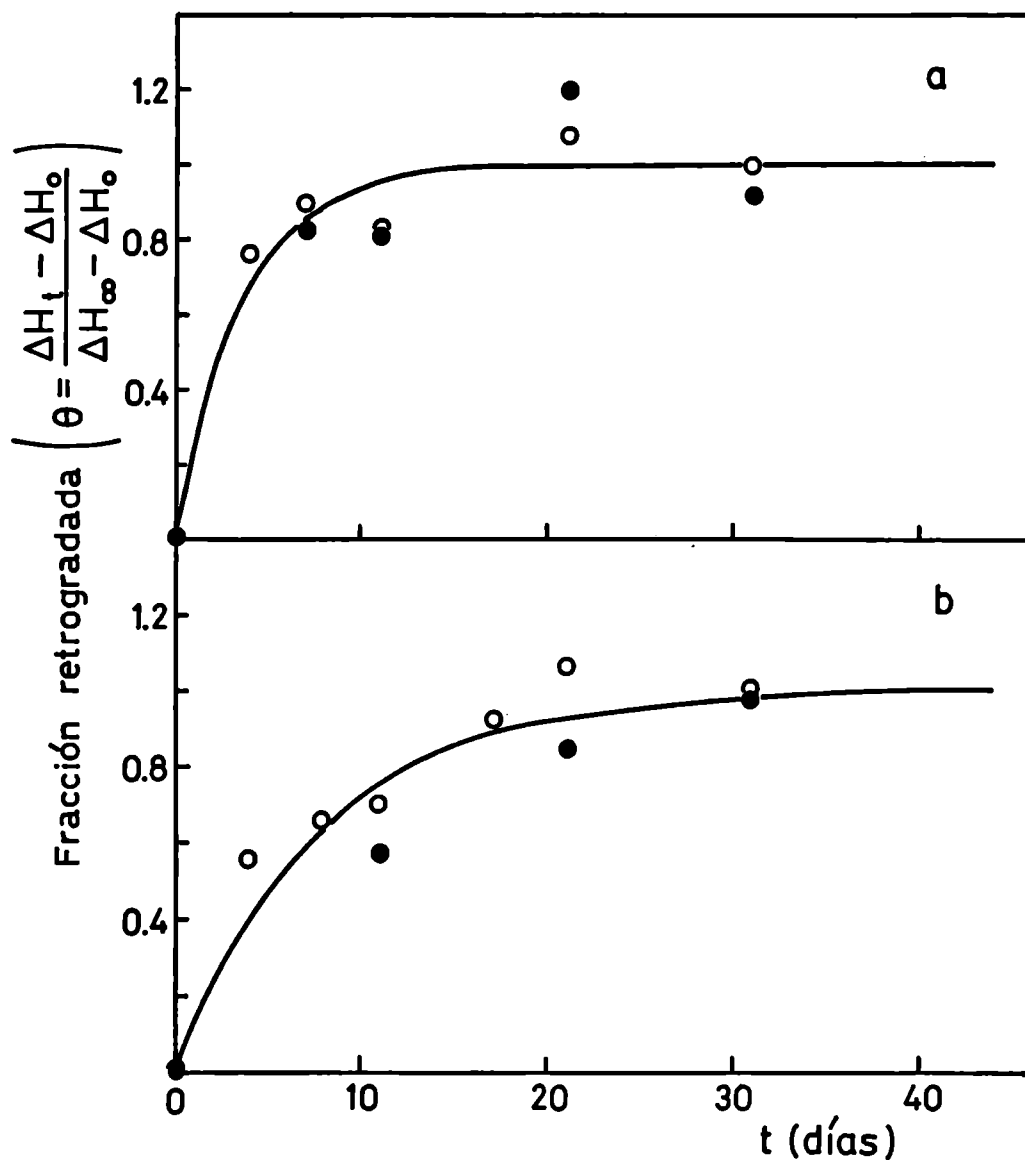


Fig. 6.11. Fracción retrogradada de almidón en función del tiempo de almacenamiento correspondiente a pastas de harina de trigo sin goma xántica, almacenadas a -1°C (a) y -5°C (b).

(●) congelado lento (0,3 cm/h); (○) congelado rápido (1,0 cm/h).

— Modelo de Avrami, ec. (6.2)

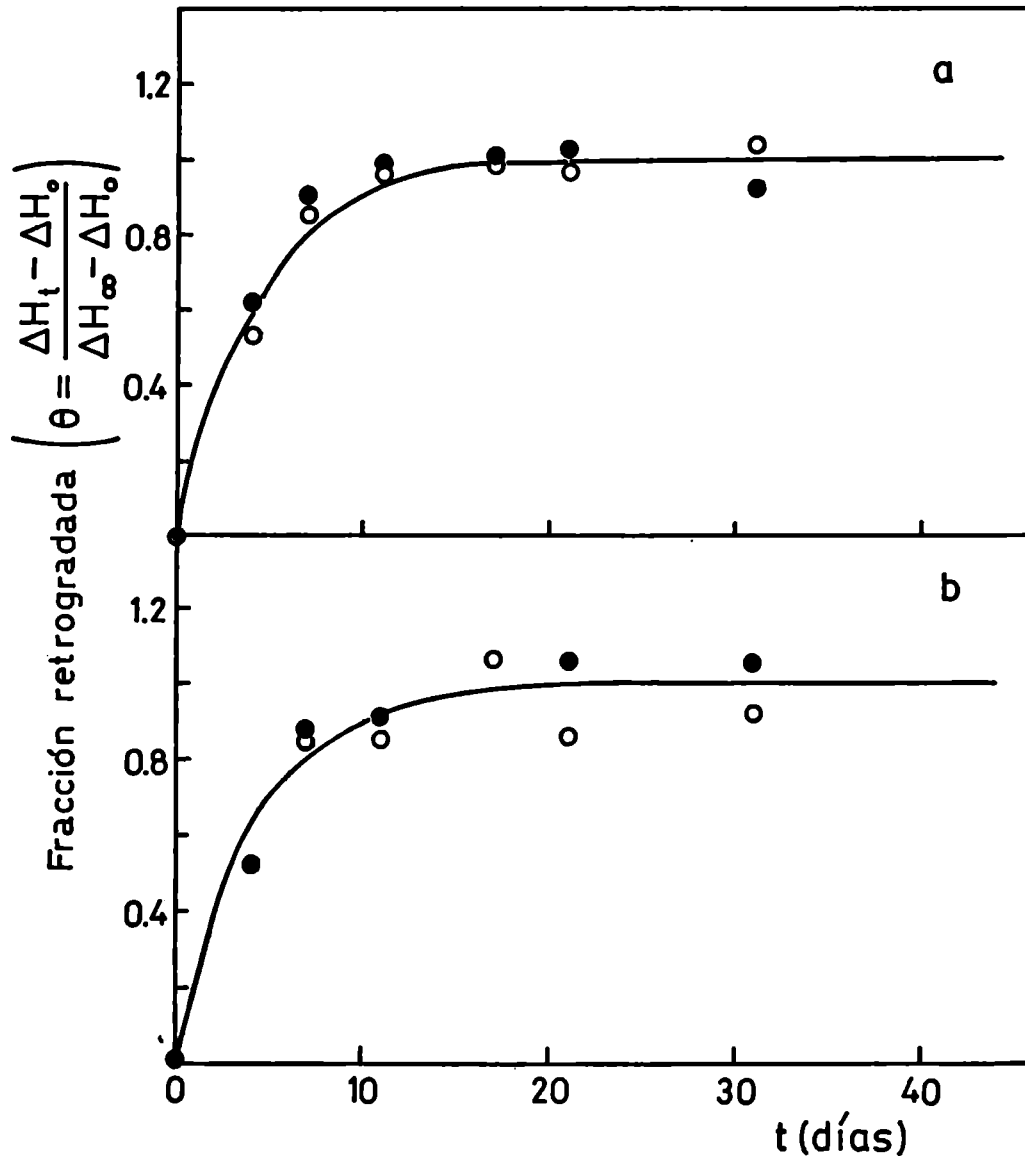


Fig. 6.12. Fracción retrogradada de almidón en función del tiempo de almacenamiento correspondiente a pastas de harina de trigo con goma xántica, almacenadas a -1°C (a) y -5°C (b).

(●) congelado lento (0,3 cm/h); (○) congelado rápido (1,0 cm/h).

— Modelo de Avrami, ec. (6.2)

6.4. Consideraciones finales

Velocidades de congelación altas ($> 1\text{cm/h}$) impiden la retrogradación de almidón durante la congelación misma, ya que se pasa rápidamente al estado vítreo sin dar lugar a la formación de núcleos cristalinos de almidón.

Con respecto al almacenamiento, temperaturas más cercanas a 0°C ($-1, -5^{\circ}\text{C}$) favorecieron la retrogradación, ya que el sistema se encuentra en un estado intermedio entre el vítreo y el fundido, donde se ve acelerada la nucleación y la propagación de los cristales debido a la mayor movilidad de las cadenas. No sólo se ha observado a estas temperaturas una mayor cristalización de amilopectina (detectable por calorimetría) sino que además se ha generado una textura esponjosa característica, vinculable con la cristalización de amilosa (no cuantificable por DSC). La retrogradación durante el almacenamiento no fue detectada a temperaturas más bajas ($-10, -20^{\circ}\text{C}$).

El agregado de estabilizante no ha impedido la retrogradación de la amilopectina, aunque sí lo ha limitado en algún grado en el caso de las pastas de almidón de maíz (disminución del ΔH límite de retrogradación). El hidrocoloide ha mostrado un efecto notable evitando la formación de la estructura esponjosa característica relacionada con la amilosa.

Los resultados obtenidos coinciden con los de literatura respecto al menor grado de retrogradación de harina de trigo (debido a que su entalpía de gelatinización también es menor). Esto explica los menores valores de ΔH_{∞} obtenidos aplicando el modelo de Avrami. La proteína parece tener poco o ningún efecto en cuanto a inhibir la retrogradación, pero sí se destaca el hecho de la menor tendencia a formar estructura esponjosa en las pastas de harina.

Por lo expuesto, el uso de velocidades de congelación altas y de bajas temperaturas de almacenamiento resultan aconsejables para minimizar la retrogradación posterior. El empleo de goma xántica, aunque no impide la retrogradación de la amilopectina, al actuar aparentemente a nivel de la amilosa limita en forma efectiva el desarrollo de la textura esponjosa.

CAPITULO 7

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se analizaron los efectos de la velocidad de congelación, temperatura y tiempo de almacenamiento congelado y del agregado de un hidrocoloide estabilizante (goma xántica) sobre pastas de almidón de maíz y harina de trigo.

Tradicionalmente se ha considerado el deterioro de las pastas de almidón congeladas, manifestado a través de la producción de exudado (sinéresis) y cambios texturales (desarrollo de estructura esponjosa o arenosa, pérdida de viscosidad) como una consecuencia de la retrogradación del almidón y más recientemente dichos cambios han sido también vinculados con la formación y recristalización de hielo.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo han permitido arribar a las siguientes conclusiones:

- La velocidad de congelación influye significativamente en la producción de exudado y cambios de textura. A mayor velocidad de congelación se observó una menor separación de líquido. Bajas velocidades condujeron a la formación de una estructura esponjosa, tanto en pastas de almidón de maíz como de harina de trigo aunque en este último caso, la estructura resultó menos firme. Los niveles de exudado de las pastas con textura esponjosa resultaron menores que los esperados debido a la retención de agua por parte de la matriz porosa; no obstante, el deterioro de textura era tan severo que tornó inaceptable a las pastas. La congelación rápida o ultra-rápida evitó esta modificación indeseable de la textura pero, salvo en el caso de congelación por inmersión en N₂ líquido, se observó desarrollo de arenosidad o granulosidad relacionado con la separación de fases.

- El almacenamiento congelado produjo un deterioro adicional de las pastas, en diferente grado según fuera la temperatura de almacenamiento elegida. En general, cuanto más alta la temperatura de almacenamiento, mayor fue el deterioro observado. A -5°C, salvo en el caso de las muestras congeladas por inmersión en N₂ líquido se verificó una pérdida de la estructura homogénea origi-

nal, desarrollándose una microesponja aun en aquellos casos en que ésta no se había formado durante la congelación. A -10°C no se observó desarrollo de esponjosidad pero sí separación de fases y textura arenosa en mayor grado que a -20°C .

- Las pastas a base de harina de trigo presentaron menores niveles de exudado que las de almidón, tanto después de la congelación como durante el almacenamiento congelado efecto, que se puede relacionar con la presencia de la proteína, que por su carácter hidrofílico aumenta la capacidad de retención de agua del gel.

- El empleo de un hidrocoloide estabilizante (goma xántica) permitió una relativa independencia respecto de las condiciones de congelación ya que aún utilizando bajas velocidades pudieron obtenerse pastas de textura homogénea y bajos niveles de exudado. Asimismo, la presencia de goma xántica evitó la formación de estructura esponjosa durante el almacenamiento a temperaturas altas (-5°C) y el desarrollo de granulosidad a temperaturas más bajas (-10 y -20°C), manteniéndose en todos los casos, niveles inferiores de exudado y una textura homogénea, similar a la original. No obstante resulta aconsejable el almacenamiento a bajas temperaturas ya que a -5°C la acción de la goma xántica no fue tan eficaz como a -10 y -20°C .

- El empleo de un almidón químicamente modificado (Polar Gel) no presentó ventajas en comparación con las formulaciones que combinaban almidón común de maíz o harina de trigo y goma xántica. Estas últimas presentaron mayor estabilidad, desde el punto de vista de la sinéresis, frente a condiciones desfavorables de congelación.

- Los estudios reológicos confirmaron la importancia del efecto de la velocidad de congelación, en particular sobre el comportamiento viscoelástico de las pastas de almidón. La incidencia de la velocidad de congelación sobre el deterioro resultó mucho mayor que el tiempo o temperatura de almacenamiento, pudiéndose in-

ferir que el mayor daño se produjo durante la congelación en sí.

- La estructura esponjosa mencionada anteriormente, formada a bajas velocidades de congelación o durante el almacenamiento a temperaturas inadecuadas (-5°) pudo caracterizarse a través del comportamiento viscoelástico de las pastas con la aparición de un pico de ruptura estructural a bajos gradientes de velocidad. En las pastas congeladas lento, el pico resultó más agudo y se observó un comportamiento reopéctico adicional que puede relacionarse con una mayor separación de fases -producto de la destrucción estructural durante la corrida. El comportamiento viscoelástico pudo modelarse a través de la ecuación de Bird-Leider obteniéndose los parámetros correspondientes. En las muestras congeladas rápido se observó tanto disminución de viscosidad aparente como un fuerte comportamiento tixotrópico mientras que las pastas congeladas ultra-rápido mostraron una textura y comportamiento reológico similares a los de la pasta no congelada.

- Las pastas, a altos gradientes de velocidad, ajustaron al comportamiento pseudoplástico, modelándose dicho comportamiento a través de la ley de la potencia lo que permitió obtener los índices de consistencia y de comportamiento de flujo. La influencia de la velocidad de congelación se manifestó también en esta zona. Al respecto, no se registraron diferencias significativas entre los índices de comportamiento de flujo y de consistencia correspondientes a pastas congeladas rápido respecto de las congeladas ultra-rápido. En el caso de la congelación lenta se produjo un marcado aumento del índice de comportamiento de flujo, acompañado de una disminución del índice de consistencia, debido a la severa ruptura estructural producida.

- El almacenamiento congelado afectó fundamentalmente el comportamiento viscoelástico de las pastas tanto de almidón como de harina, cuando se utilizó una temperatura de almacenamiento de -5°C . Salvo en el caso de las pastas congeladas por inmersión en N_2 líquido, las pastas almacenadas a la temperatura mencionada presentaron la aparición o agudización del pico de ruptura es-

tructural.

- Los estudios de cristalización del hielo incluyeron la puesta a punto de la técnica de sustitución a bajas temperaturas para su aplicación en pastas de almidón gelatinizado congeladas, obteniéndose los coeficientes de difusión del fijador a las distintas temperaturas de ensayo, tiempos de fijación y energía de activación del fenómeno.

- Los estudios de cristalización de hielo permitieron determinar que el diámetro equivalente medio cristalino inicial así como la distribución de frecuencias cristalinas en función del diámetro equivalente eran dependientes de la velocidad de congelación. Velocidades altas condujeron a diámetros equivalentes medios bajos y estrechas distribuciones de frecuencias relativas. Velocidades más bajas de congelación ampliaron el rango de distribución cristalina a la vez que se produjo un desplazamiento del diámetro equivalente medio a valores más altos.

- El fenómeno de recristalización del hielo se modeló mediante ecuaciones basadas en que la fuerza impulsora del fenómeno es la diferencia de curvatura cristalina a un tiempo dado y la curvatura límite, ya que se comprobó la existencia de un diámetro cristalino de hielo máximo o límite dependiente tanto de la velocidad de congelación como de la temperatura de almacenamiento. Se pudo establecer una relación que permitió predecir el diámetro límite a partir de parámetros de la distribución cristalina inicial.

- Con respecto a la cinética de recristalización, la velocidad de congelación no tuvo efecto sobre el valor de las constantes, dependiendo éstas, como era de esperar, sólo de la temperatura de almacenamiento. Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas entre las constantes correspondientes a la recristalización de hielo en sistemas sin y con goma xántica, lo que indicaría la ausencia de efecto de este hidrocoloide sobre el crecimiento cristalino.

- Los estudios de calorimetría diferencial de barrido permitieron cuantificar la retrogradación de la amilopectina. Se pudo determinar que altas velocidades de congelación ($> 1\text{cm/h}$) impedían la retrogradación durante la congelación misma ya que se pasaría rápidamente al estado vítreo sin dar lugar a la formación de núcleos cristalinos de almidón.

- Durante el almacenamiento congelado, temperaturas más cercanas a 0°C ($-1, -5^{\circ}\text{C}$) favorecieron la retrogradación, ya que el sistema se encuentra en un estado intermedio entre el vítreo y el fundido, donde se ve acelerada la nucleación y la propagación de los cristales debido a la mayor movilidad de las cadenas. A estas temperaturas se observó una mayor cristalización (retrogradación) de la amilopectina (detectable por calorimetría) y se desarrolló, además, la estructura esponjosa típica asociada a la cristalización (retrogradación) de amilosa, no detectable por calorimetría. A temperaturas más bajas ($-10, -20^{\circ}\text{C}$), no se detectó retrogradación durante el almacenamiento.

El fenómeno de retrogradación del almidón durante el almacenamiento congelado fue modelado según la ecuación de Avrami, obteniéndose los correspondientes parámetros.

- El agregado de goma xántica no impidió la retrogradación de la amilopectina aunque sí pareció tener algún efecto limitante a través de la disminución del valor máximo o límite de entalpía de retrogradación. En cambio, la goma xántica resultó muy eficaz en evitar la formación de la estructura esponjosa característica relacionada con la retrogradación de amilosa.

- Las pastas de harina de trigo presentaron menores entalpías de retrogradación. Asimismo, no se detectó retrogradación durante la congelación de dichas pastas aun utilizando velocidades bajas.

- El deterioro observado en pastas de almidón o harina se puede relacionar con retrogradación de amilosa, retrogradación de amilopectina y formación y recristalización de hielo durante el

almacenamiento. Estos tres factores tendrían distinto grado de incidencia según la velocidad de congelación utilizada y la temperatura de almacenamiento elegida.

- Con respecto a la velocidad de congelación, ésta es un factor determinante ya que incide también en el almacenamiento posterior: una congelación rápida produjo niveles más bajos de exudado y menor reducción en la viscosidad aparente durante el almacenamiento que la congelación lenta. La congelación con N₂ líquido es, en este sentido la que más ayuda a la conservación de las cualidades originales de la pasta. Durante la congelación se combinan los dos fenómenos: retrogradación del almidón y formación de cristales de hielo. Si la velocidad de congelación es lenta, el daño producido por la formación de hielo es mayor debido al mayor tamaño de los cristales. Cuando la velocidad de congelación es lenta se producía además la retrogradación de la amilosa, perceptible por la formación de una matriz porosa (esponja) con capacidad para retener agua. A velocidades menores o iguales que 1 cm/h tendría lugar además la retrogradación de la amilopectina. Cuando se congela por inmersión en N₂ líquido no se observa ni formación de estructura tipo esponja ni retrogradación de amilopectina; a esta velocidad de congelación la transición del estado fundido al vítreo es tan rápida que no se produce la nucleación y propagación de los cristales de amilosa y de amilopectina. La producción de exudado, menor que en los otros casos, se debe atribuir únicamente a la formación de cristales de hielo pequeños, que ocasionan un menor deterioro a la matriz de almidón. Por el contrario, una congelación lenta daría lugar a la formación de cristales de almidón (retrogradación). Al mismo tiempo la lenta solidificación del agua produciría un efecto de desolvatación al concentrarse el polímero (almidón) en determinadas zonas, lo que facilita la formación de cristales a partir del acoplamiento de cadenas.

En este caso serían ambos fenómenos, retrogradación y cristalización de hielo los que influyen en la producción de exudado, llevando éste a niveles más altos. La retrogradación de amilosa es la responsable del comportamiento viscoelástico típico de

las pastas congeladas, caracterizado por un agudo pico de ruptura.

- Con respecto a la temperatura de almacenamiento, a -5°C , inciden también dos fenómenos: retrogradación del almidón y recristalización del hielo. Aun en aquellos casos donde no se producía retrogradación durante la congelación debido a la utilización de altas velocidades, la cristalización de almidón, tanto de la amilosa como de la amilopectina, tenía lugar durante el almacenamiento a esta temperatura. Esto se debe a que a esta temperatura hay suficiente movilidad de las cadenas de amilosa y amilopectina como para que se produzcan la nucleación y propagación cristalinas. En el caso de las pastas congeladas en N_2 líquido se elevaba la temperatura de transición vítrea por arriba de -5°C , por lo tanto, un almacenamiento a esta temperatura no llegaba a producir la nucleación y el crecimiento necesarios para que tenga lugar la retrogradación, lo que explica la ausencia de cambios macroscópicos observada en este caso: escasa sinéresis, ausencia de pico de ruptura estructural, aspecto homogéneo similar al de la pasta sin congelar. Con respecto a la recristalización de hielo, -5°C resulta una temperatura inadecuada debido a que la velocidad de recristalización es alta. Se forman cristales grandes, que producen un mayor deterioro en la estructura, lo que se suma al efecto del fenómeno de retrogradación. Ambos fenómenos, retrogradación y recristalización de hielo, están probablemente relacionados, por ejemplo a través de mecanismos como el de desolvatación; al formarse grandes cristales de hielo a partir de la desaparición de los más pequeños se produciría el efecto de concentración de almidón mencionado que puede facilitar la nucleación y posterior crecimiento de los cristales de almidón.

- A temperaturas de almacenamiento más bajas, -10 y -20°C , no fue detectada retrogradación de amilosa o amilopectina (por estar a temperaturas más bajas que las de transición vítrea, donde hay inmovilidad total de las cadenas, que no permite su acoplamiento) por lo que el deterioro observado, se debe relacionar únicamente con la recristalización de hielo. Esta es mayor a -10 que a

-20°C, lo que explicaría los mayores niveles de exudado. No obstante, en ambos casos, el grado de recristalización del hielo es mucho menor que en el caso de las pastas almacenadas a -5°C. El aspecto granuloso o arenoso, típico del almacenamiento a estas temperaturas se debería relacionar por lo tanto con la recristalización de hielo y no con el fenómeno de retrogradación de almidón.

- La goma xántica no tuvo efecto como limitante del crecimiento cristalino y tampoco impidió la retrogradación de la amilopectina. Mostró capacidad para inhibir la formación de estructura tipo esponja (retrogradación de amilosa) con lo cual se mejoró notablemente la textura de las pastas congeladas y almacenadas a -5°C. Los menores niveles de exudado observados en las pastas de almidón o harina con inclusión de goma xántica deberían relacionarse, no con un efecto sobre el tamaño de los cristales de hielo sino más bien con el carácter hidrofílico de la goma que permite una mayor retención de agua durante y después de la descongelación. El aspecto homogéneo de las pastas o sea la ausencia de arenosidad en aquellos casos en que se incluyó goma xántica en la formulación se podría relacionar con la capacidad que tiene esta goma, como otros hidrocoloides, de retener sólidos en suspensión, evitando separaciones de fase.

El hecho de que la goma xántica no actúe sobre la retrogradación de la amilopectina y sí sobre la de la amilosa podría relacionarse por un lado, con factores estructurales de la amilosa (mayor longitud de la cadena, ausencia de ramificaciones) y por otro con la relativa mayor exposición de este polisacárido. Recuérdese que las moléculas de amilosa son liberadas al medio durante la gelatinización, quedando los gránulos de almidón semi-desintegrados "inmersos" en una matriz de amilosa. La amilosa tiene, por lo tanto, mayor oportunidad de actuar con otros componentes del sistema como por ejemplo un hidrocoloide, compitiendo la interacción amilosa-hidrocoloide con la amilosa-amilosa necesaria para que ocurra la retrogradación.

- La proteína presente en la harina tampoco evita la retrogradación detectable por calorimetría, es decir la de la amilopectina y por otro lado los geles de harina también desarrollan estructura tipo esponja, lo que significa que la amilosa retrograda en estos sistemas. Por los resultados obtenidos, la proteína no parecería tener un efecto inhibitorio sobre el crecimiento cristalino, por lo que su efecto sobre la producción de exudado, al minimizarlo, podría estar relacionado únicamente a la capacidad de retención de agua.

- Si bien, un buen proceso de conservación de pastas de almidón debería realizarse, a altas velocidades de congelación (en lo posible por inmersión en líquido criogénico), con un posterior almacenamiento congelado a temperaturas suficientemente bajas (-10°C), cuando se utiliza goma xántica en la formulación, aun en niveles muy bajos (0,3 %), se presentan ciertas ventajas ya que se pueden utilizar velocidades de congelación no tan altas (inclusive lentas), conservando la calidad del producto, con la consiguiente reducción en el costo de equipamiento).



CRISTINA FERRERO
Lic. Química



Dra. NOEMI E. ZARITZKY
DIRECTORA DE INVESTIGACION

BIBLIOGRAFIA

- Andreotti, R.; Tomasicchio, M. y Castelvetri, F. (1974) Studi sulla stabilizzazione al congelamento di salse emulsionate - maionese e salse tipo maionese. *Industria Conserve* 49, 95-100.

- Angold, R.E. (1979) Cereals and bakery products. En *Food Microscopy*, pp. 75-138. J.G. Vaughan (Ed.), Academic Press, London, New York.

- Anker, C.A. y Geddes, W.F. (1944) Gelatinization studies upon wheat and other starches with the amylograph. *Cereal Chem.* 21, 335-360.

- Anónimo. (1990) Global Frozen Foods Almanac. Quick Frozen Foods International, Octubre, A1-A30.

- Baidón, S.M.; Costell, E. y Durán, L. (1987) Sinéresis de los geles de agar y kappa-carragenato. Influencia de la adición de gomas de garrofin y de guar. *Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment.* 27, 545-555.

- Bagley, E.B. y Christianson, D.D. (1982) Swelling capacity of starch and its relationship to suspension viscosity-effect of cooking time, temperature and concentration. *J. Texture Stud.* 13, 115-126.

- Banks, W. y Greenwood C.T. (1975) Starch and its components, pp. 5-55, 113-188, 242-305. Edinburgh University Press, Great Britain.

- Bear, R.S. y Samsa, E.G. (1943) Gelatinization mechanism of starch granules. *Ind. Eng. Chem.* 35, 721-726.

- Bechtel, D.B. (1990) Preparation of cereals and grain products for transmission electron microscopy. *Food Struct.* 9, 241-251.

- Beck, P.A. (1954) Annealing of cold worked metals. *Advances in Physics, Philosophical Magazine Supplement* 3, 245-324.
- Berghofer, E. y Klaushofer, H. (1976). Examination of freeze-dried starch pastes and starch sponges by means of scanning electron microscope. *Starch* 28, 113-152.
- Bevilacqua, A.E. y Zaritzky, N.E. (1982) Ice recrystallization in frozen beef. *J. Food Sci.* 47, 1410-1414.
- Biliaderis, C.G.; Maurice, T.J. y Vose, J.R. (1980) Starch gelatinization phenomena studied by differential scanning calorimetry. *J. Food Sci.* 45, 1669-1680.
- Bolling, G.F. y Winegard, W.C. (1958) Grain growth in zone-refined lead. *Acta Metallurgical* 6, 283-287.
- Bourne, M.C. (1982) *Food Texture and Viscosity: Concept and Measurement*, pp. 208-223. Academic Press, London, New York.
- Bowler, P.; Williams, M.R. y Angold, R.E. (1980) A hypothesis for the morphological changes which occur on heating lenticular wheat starch in water. *Starch* 32, 186-189.
- Brunnek, N.I. y Koptelova, E.K. (1970) Concentrating agents for frozen sauces. *Konservnaya i Ovoshchesushil'naya Promyshlennost'* 1970 (11), 36-37.
- Budiaman, E.R. y Fennema, O. (1986) Linear rate of water crystallization as influenced by temperature of hydrocolloid suspensions. *J. Dairy Science* 70, 534-546.
- Burt, D.J. y Russell, P.L. (1983) Gelatinization of low water content wheat starch-water mixtures. *Starch* 35, 354-360.

- Calvelo, A. (1981) Recent studies on meat freezing. En: Developments in Meat Science, Vol.2, pp. 125-158. Ralston Lawrie (Ed.) Applied Science Publishers, London, New Jersey.

- Campbell, A.M.; Porter Penfield M. y Griswold, R.M. (1980) Starch and flour. En: The Experimental Study of Food, pp. 282-313. Constable and Co. Ltd., London.

- Carbonell, E; Costell, E. y Durán, L. (1990) Comportamiento reológico de los productos derivados de fruta. Flujo, dependencia del tiempo y plasticidad. Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment. 30, 189-209.

- Carslaw, H.S. y Jaeger, J.C. (1978) Conduction of heat in solids, (2nd edition), pp. 225. Oxford at the Clarendon Press.

- Chabot, J.F. (1981) Preparation of food science samples for SEM. Scanning Electron Microsc. 1979; III: 9-16.

- Chabot, J.F.; Allen, J.E. y Hood, L.F. (1978). Freeze-etch ultrastructure of waxy maize and acid hydrolyzed waxy maize starch granules. J. Food Science 43, 727-730.

- Chabot, J.F.; Hood, L.F. y Liboff M. (1979) Effect of scanning electron microscopy preparation methods on the ultrastructure of white bread. Cereal Chem. 56, 462-464.

- Chalmers, B. (1977) Microscopic heat flow considerations. En: Principles of solidification, pp. 20-125. Robert E. Krieger Publishing Co., Huntington, New York.

- Chan, W.S. y Toledo, R.T. (1976) Dynamics of freezing and their effects on the water-holding capacity of a gelatinized starch gel. J. Food Sci. 41, 301-303.

- Cheftel, J.C. y Cheftel, H. (1976) Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos, Vol. I. Editorial Acribia, Zaragoza.

- Cheng, D.C.H. y Evans, F. (1965) Phenomenological characterization of the rheological behaviour of inelastic reversible thixotropic and antithixotropic fluids. *Brit. J. Appl. Phys.* **16**, 1599-1617.

- Cherry, J.P. (1982) Protein-polysaccharide interactions. En: *Food Carbohydrates*, pp. 375-397. D.R. Liniback y G.E. Inglett), AVI Publishing Co., Westport, Connecticut.

- Christianson, D.D. y Bagley, E.B. (1983) Apparent viscosities of dispersions of swollen cornstarch granules. *Cereal Chem.* **60**, 116-121.

- Christianson, D.D.; Baker, F.L.; Loffredo, A.R. y Bagley, E.B. (1982) Correlation of microscopic structure of corn starch granules with rheological properties of cooked pastes. *Food Microstruc.* **1**, 13-24.

- Cohen, A.L. (1984) Critical point drying. Principles and procedures. En: *Preparation of Biological Specimens for Scanning Electron Microscopy*, pp. 107-128. Scanning Electron Microsc., Inc.

- Colwell, K.H.; Axford, D.W.E.; Chamberlain, N. y Elton, G.A.H. (1969) Effect of storage temperature on the ageing of concentrated wheat starch gels. *J. Sci. Food Agric.* **20**, 550-555.

- Crank, J. (1957) *The Mathematics of Diffusion*, pp. 30-37. Oxford University Press, London.

- Dengate, H.N. (1988) Swelling, pasting and gelling of wheat starch. En: *Advances in Cereal Chemistry and Technology*, Vol.6, pp. 49-82. Y. Pomeranz (Ed.), American Association of Cereal Chemists, Inc. St. Paul, Minnesota.
- Dickie, A.M. y Kokini, J.L. (1982) Use of the Bird-Leider equation in food rheology. *J. of Food Process Engineering* 5, 157-174.
- Dreher, M.L.; Tinsley, A.M.; Scheerens, J.C. y Berry, J.W. Buffalo Gourd root starch. Part II. Rheologic behavior, freeze thaw stability and suitability for use in food products. *Starch* 35, 157-162.
- Eberstein, K.; Höpcke, R.; Konieczny-Janda, G. y Stute, R. (1980) Differential scanning calorimetry studies on starch. I. Applications of thermoanalytical methods to characterize starches. *Starch* 32, 397-404.
- Eichner, K. (1977) Packaging and storage of cooled and frozen ready-to-serve foods. En: *How Ready are Ready-to-serve Foods?* (International Symposium, August 23-24, 1977, Karlsruhe, Germany), pp. 198-214. K. Paulus (Ed.)
- Eliasson, A.C. (1980) Effect of water content on the gelatinization of wheat starch. *Starch* 32, 270-272.
- Ellis, H.S.; Ring, S.G. y Whittam, M.A. (1989) A comparison of the viscous behaviour of wheat and maize starch pastes. *Journal of Cereal Science* 10, 33-34.
- Evans, I.D. y Haisman, D.R. (1979) Rheology of gelatinized starch suspensions. *J. Texture Stud.* 10, 347-370.
- Everson-Pearse, A.G. (1960) *Histochemistry Theoretical and Applied*, pp. 53-74. J & A Churchill Ltd., London.
- Falk, R.H. (1980) Preparation of plant tissues for SEM. Scan-

ning Electron Microsc. 1980; II: 79-87.

- Feder, N. y Sidman, R.L. (1958). Methods and principles of fixation by freeze-substitution. J. Biophysic. and Biochem. Cytol. 4 (5), 593-609.

- Feltham, P. (1957) Grain growth. Acta Met. 5, 95-105.

- Fennema, O.R. (1973) Solid-liquid equilibria y nature of freezing process. En: Low-Temperature Preservation of Foods and Living Matter, pp. 101-222. O.R. Fennema; W.D. Powrie; E.H. Marth (Eds.), Marcel Dekker, Inc. New York.

- Figoni, P.I. y Shoemaker, C.F. (1981) Characterization of Structure breakdown of foods from their flow properties (A review). J. Texture Stud. 12, 287-305.

- Fiszman, S.M. (1989) Propiedades funcionales de los hidrocoloides polisacaridicos. Mecanismos de gelificación. Rev. Agroquim. Tecnol. Aliment. 29, 415-429.

- Gallant, D.J. y Bouchet, B. (1986) Ultrastructure of maize starch granules. A review. Food Microstruc. 5, 141-155.

- Ghiasi, K.; Hosney, R.C. y Varriano-Marston, E. (1982) Effects of flour components and dough ingredients on starch gelatinization. Starch 60, 58-61.

- Glicksman, M. (1982) Food Hydrocolloids, Vol. 1, pp. 127-149. Martin Glicksman (Ed.), CRC Press, Inc. United States.

- Greenwood, C.T. (1964) Structure, properties and amylolytic degradation of starch. Food Technol. 18, 137-144.

- Hanson, H.L.; Campbell, A. y Lineweaver, H. (1951) Preparation of stable frozen sauces and gravies. Food Technol. 5, 432-440.

- Harper, E.K. y Shoemaker, C.F. (1983). Effect of locust bean gum and selected sweetening agents on ice recrystallization rates. *J. Food Sci.* 48, 1801-1803.

- Harris, J. (1972) A continuum theory of structural change. *Rheol. Acta* 11, 145-151.

- Harrison, J.D. y Tiller, W.A. (1963) Ice interface morphology and texture developed during freezing. *J. Appl. Phys.* 34, 3349-3355.

- Härröd, M. (1989a) Modelling of flow properties of starch pastes prepared by different procedures. *J. of Food Process Engineering* 11, 257-275.

- Härröd, M. (1989b) Apparent concentration: a method to predict the flow properties of viscous foods for process applications. *J. of Food Process Engineering* 11, 277-296.

- Härröd, M. (1989c) Time-dependent flow behavior of starch pastes, with food process applications. *J. of Food Process Engineering* 11, 297-309.

- Hellman, N.N.; Fairchild, B. y Senti, F.R. (1954) The bread staling problem. Molecular organization of starch upon aging of concentrated starch gels at various moisture levels. *Cereal Chem.* 31, 495-505.

- Hermansson, A.M. (1986) Water and fatholding. En: *Functional Properties of Food Macromolecules*, pp. 273-314. J.R. Mitchell y D.A. Ledward (Eds.), Elsevier Applied Science Publishers, Belfast.

- Hiemenz, P.C. (1984) *Polymer chemistry: the basic concepts*. Marcel Dekker Inc., New York.

- Himmelblau, D.M. (1968) Process Analysis by Statistical Methods. J.Wiley & Sons, Inc, New York.
- Holman, J.P. (1976) Heat Transfer, pp. 109-110. Mc Graw Hill Kogakusha Ltd.
- Holmes, Z.A. y Soeldner, A. (1981). Effect of heating rate and freezing and reheating of corn and wheat starch-water dispersions. Journal of The American Dietetic Association 78, 352-354.
- Holmes, E.L.; Rutter, J.W. y Winegard, W.C. (1957) Growth conditions for stability of a cellular solid-liquid interface. Can. J. Phys. 35, 1223-1227.
- Hood, L.F.; Seifried, A.S. y Meyer, R. (1974) Microstructure of modified tapioca starch-milk gels. J. Food Sci. 39, 117-120.
- Hood, L.F. y Seifried, A.S. (1974) Effect of frozen storage on the microstructure and syneresis of modified tapioca starch-milk gels. J. Food Sci. 39, 121-124.
- Hunt, C.J. (1984) Isothermal freeze-fixation. En: Science of Biological Specimen Preparation, pp. 123-130. Scanning Electron Microsc., Inc.
- Igoe, R.S. (1982) Hydrocolloid interactions useful in food systems. Food Technol. 4, 72-74.
- International Institute of Refrigeration (1972) Recommendations for the processing and handling of frozen foods. Institut International du Froid, Paris (Ed.).
- Jankowski, T. y Rha, C.K. (1986) Retrogradation of starch in cooked wheat. Starch 38, 6-9.

- Kalab, M.(1983). Electron microscopy of foods. En: Physical properties of foods, pp. 43-104. M. Peleg and E. Bagley (Eds.), AVI Publishing Company, Inc.

- Kalb, A.J. y Sterling, C. (1961) Temperature and the retrogradation of starch. J. Food Sci. 26, 587-592.

- Kalb, A.J. y Sterling, C. (1962) Role of hydrogen ion concentration in retrogradation of starch sols. J. Appl. Polymer Sci. 6, 571.

- Katz, J.R. (1928) Gelatinization and retrogradation of starch in relation to the problem of bread staling. En: Starch Chemistry. R.P. Walton (Ed.) Chem. Cat. Co., Inc., New York.

- Katz, J.R. y Van Itallie, T.B. (1930) Abhandlungen zur physikalischen Chemie der Stärke und der Brotbereitung. V. Alle Stärkearten haben das gleiche Retrogradationspektrum. Z.physikal. Chemie A 150, 90-99.

- Kerr, R.W. (1950) Chemistry and Industry of Starch (2nd Edition) Academic Press, New York.

- Kikuchi, E. e Izutsu, T. (1981) Preparation of stable frozen white sauce. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi 28 (11) 569-577.

- Kokini, J.L. y Dickie, A. (1981) An attempt to identify and model transient viscoelastic flow in foods. J. Texture Stud. 12, 539-557.

- Kuchenbecker, W. (1986) Curso de elaboración de comidas preparadas (6-10 de Octubre, Centro de Investigación y Tecnología de Carnes-CITECA, INTI).

- Lampila, L.E.; Mobr, V. y Reid, D.S. (1985) Scanning electron microscopic study of rockfish preserved at either ambient temperature or by isothermal freeze-fixation. *Food Microstructure*, **4**, 11-16.

- Lampitt, L.H.; Fuller, C.H.F.; Goldenberg, N. y Green, G.H. (1948) The fractionation of potato starch. Part VI. The retrogradation of potato starch fractions. *J. Soc. Chem. Ind.* **67**, 179-184.

- Lawrie, R.A. (1974) *Ciencia de la Carne*. Ed. Acribia, Zaragoza.

- Leach, H.W., Mc Cowen, L.D. y Schoch, T.J. (1959) Structure of the starch granule. I. Swelling and solubility patterns of various starches. *Cereal Chem.* **36**, 534-544.

- Lee, R.M.K.W. (1984) A critical appraisal of the effects of fixation, dehydration and embedding on cell volume. En: *Science of Biological Specimen Preparation*, pp. 61-70. Scanning Electron Microsc., Inc.

- Leider, P.J. y Bird, R.B. (1974) Squeezing flow between parallel disks. I. Theoretical analysis. *Ind. Eng. Chem. Fund.* **13**, 336-341.

- Lerici, C.R. y Pallotta, U. (1971) Su alcuni aspetti del congelamento dell'acqua nei sistemi biologici. *Ind. Agr.* **9**, 203-213.

- Longton, J. y LeGrys, G.A. (1981) Differential scanning calorimetry on the cristallinity of ageing wheat starch gels. *Starch* **33**, 410-414.

- Luallen, T. (1985) Starch as a functional ingredient. *Food Technol.* January, 59-63.

- Lund, D.B. (1983) Applications of differential scanning

calorimetry in foods. En: Physical Properties of Foods, pp. 125-143. M. Peleg, E.B. Bagley (Eds.), AVI Publishing Co., Westport, Connecticut.

- Lusena, C.V. y Cook, W.H. (1953) Ice propagation in systems of biological interest. Effect of membranes and solutes in a model cell system. Arch. Biochem. Biophys. 46, 232-240.

- Lusena, C.V. y Cook, W.H. (1954) Ice propagation in systems of biological interest. II. Effect of solutes at rapid cooling rates. Arch. Biochem. Biophys. 50, 243-251.

- Lynch, M.J.; Raphael, S.S.; Mellor, L.D.; Share, P.D.; Hills, P. e Inwood, M.J.H. (1965) Técnicas histológicas, Cuarta Sección. En: Métodos de laboratorio, pp. 515-556. Editorial Interamericana, S.A., México.

- Mc Iver, R.G.; Axford, D.W.E.; Colwell, H.K. y Elton, G.A. (1968) Kinetic study of the retrogradation of gelatinized starch. J. Sci. Food Agric. 19, 560-563.

- Macklin, W.C. y Ryn, B.F. (1966) Habits of ice growth in supercooled water and aqueous solutions. Phil. Mag. 14, 847-860.

- MacKenzie, A.P.; Kuster, T.A. y Luyet, B.J. (1975). Freeze-fixation at high subzero temperatures. Cryobiology 12, 427-439.

- Martino, M.N. y Zaritzky, N.E. (1986) Fixing conditions in the freeze substitution technique for light microscopy observation of frozen beef tissue. Food Microstruc. 5, 19-24.

- Martino, M.N. y Zaritzky, N.E. (1987) Effects of temperature on recrystallization of poly-crystalline ice. Sciences des Aliments 7, 147-166.

- Martino, M.N. y Zaritzky, N.E. (1988) Ice crystal size modifications during frozen beef storage. *J. Food Sci.* 53, 1631-1637.

- Martino, M.N. y Zaritzky, N.E. (1989) Ice recrystallization in a model system and in frozen muscle tissue. *Cryobiology* 26, 138-148.

- Meryman, H.T. (1966) Review of biological freezing. En "Cryobiology", pp. 2-114. H.T. Meryman (Ed.), Academic Press, London.

- Miles, M.J.; Morris, V.J.; Orford P.D. y Ring Stephen G. (1985) The roles of amylose and amylopectin in the gelation and retrogradation of starch. *Carbohydrate Research* 135, 271-281.

- Miller, B.S., Derby R.I. y Trimbo, H.B. (1973) A pictorial explanation for the increase in viscosity of a heated wheat starch-water suspension. *Cereal Chem.* 50, 271-280.

- Montgomery, E.M. y Senti, F.R. (1958) Separation of amylose from amylopectin of starch by an extraction-sedimentation procedure. *J. Polymer Sci.* 28, 1-10.

- Morris, V.J. (1990) Starch gelation and retrogradation. *Trends in Food Sci. and Technol.* July, 1-6.

- Nakazawa, F.; Noguchi, S.; Takahashi, J. y Takada, M. (1985) Retrogradation of gelatinized potato starch studied by differential scanning calorimetry. *Agric. Biol. Chem.* 49, 953-957.

- Olkku, T. y Rha, C. (1978) Gelatinization of starch and wheat flour starch (A review). *Food Chem.* 3, 293-317.

- Osman, E. y Cummisford, P. (1959) Some factors affecting the stability of frozen white sauces. *Food Research* 24, 595-604.

- Ott, M. y Hester, E.E. (1965) Gel formation as related to concentration of amylose and degree of starch swelling. Cereal Chem. 42, 476-484.
- Paton, D. (1987) Differential scanning calorimetry of oat starch pastes. Cereal Chem. 64, 394-399.
- Paulus, K. (1977) Ready-to-serve foods: definitions, application, quality requirements. En: How Ready are Ready-to-serve Foods? (International Symposium, August 23-24, 1977, Karlsruhe, Germany), pp. 6-14. K. Paulus (Ed.)
- Pease, D.C. (1960) Histological Techniques for Electron Microscopy, pp. 31-60. Academic Press, New York, London.
- Plaskett, T.S. y Winegard, W.C. (1959) Cellular growth in tin alloys. Can. J. Phys. 37, 1555-1557.
- Pomeranz, Y. (1985). Functional Properties of Food Components, pp. 25-90, 397-426. Academic Press, New York, London.
- Poulsen, K.P. y Jakobsen O.P. (1983) Freeze thaw stability of gels. En: XVIth Congrès International Du Froid (Paris, 1983) Comptes Rendus, Tome III, pp. 711-716.
- Przybyl, H.; Boruch, M. y Urbaniak, M. (1983) The influence of some parameters of processing of frozen sauces on the colloidal-emulsive medium stability after defreezing. En: XVIth Congrès International Du Froid (Paris, 1983) Comptes Rendus, Tome III, pp. 705-710.
- Reeve, R.M. (1954) Histological survey of conditions influencing texture in potatoes. I. Effects of heat treatments on structure. Food Research 19, 323-332.

- Reid, D.S., Alviar, M.S.B. y Lim, M.H. (1987) The rates of change of ice crystal size in model systems stored at different temperatures relevant to the storage of frozen food. En: Development in Refrigeration, Refrigeration for Development. XIIth International Congress of Refrigeration (Proceedings) (Austrian Association of Refrigeration and Air Conditioning), pp. 397-401. IFF(Ed.)

- Rha, C. (1978) Rheology of fluid foods. Food Technol. 32, 77-82.

- Rocks, J.K. (1971) Xanthan gum. Food Technol. 25, 476-483.

- Roulet, P.; MacInnes, W.M.; Gumy, D. y Würsch, P. (1990) Retrogradation kinetics of eight starches. Starch 42, 99-101.

- Russell, P.L. (1983) A kinetic study of bread staling by differential scanning calorimetry. Starch 35, 277-281.

- Schoch, T.J. (1941) Physical aspects of starch behavior. Cereal Chem. 18, 121-128.

- Schoch, T.J. (1965) Starch in bakery products. Bakers Dig. 39, 48-57.

- Schoch, T.J. (1968) Effects of freezing and cold storage on pasted starches. En: The Freezing Preservation of Foods, Vol.4. K. Tressler, W.B. Van Arsdel y M.J. Copley (Eds.), Avi Publishing Co., Westport, Connecticut.

- Schramm, G. (1984) Introducción a la viscosimetría práctica. Haake GmbH (Ed.) Karlsruhe, Alemania.

- Schulze, W.E.; Yu, D.T. y MacMasters M.M. (1964) Coacervation of starch I. By Freezing. Starch 16, 41-44.

- Seves, A. y Croce, A. (1966) Reologia di soluzioni acquose di amidi modificati. *Ind. Carta* 4 (6), 209-215.

- Shoemaker, C.F. y Figoni, P.I. (1984) Time-dependent rheological behavior of foods. *Food Technol. March*, 110-112.

- Shuman, C. (1960) Theoretical aspects of hydrocolloids in controlling crystal structure in foods. *Advances in Chem. Ser.* 25, 59-63.

- Slade, L. y Levine, H. (1987) Recent advances in starch retrogradation. En: *Industrial Polysaccharides: The Impact of Biotechnology and Advanced Methodologies*, pp. 387-430. S.S. Stivalo, V. Crescenzi and I.C.M. Dea (Eds.), Gordon and Breach Science Publishers, New York.

- Slade, L. y Levine, H. (1988) Structural stability of intermediate moisture foods- A new understanding. En: *Food Structure- Its Creation and Evaluation*, pp. 115-147. J.M.V. Blanshard y J.R. Mitchell (Eds.), Butterworths, London, Boston.

- Slade, L. y Levine, H. (1991) Beyond water activity: recent advances based on an alternative approach to the assessment of food quality and safety. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 30, 115-360.

- Sosulski, F. (1977) Concentrated seed proteins. En: *Food Colloids*, pp. 152-206. H. Graham (Ed.), AVI Publishing Co. Inc. Westport, Connecticut.

- Sterling, C. (1977) Textural qualities and molecular structure of starch products (A review). *Journal of Texture Studies* 9, 225-255.

- Sterling, C. (1978) Gelatinization of Dieffenbachia starch. *Starch* 29, 117-121.

- Stevens, D.J. y Elton, G.A.H. (1971) Thermal properties of the starch/water system. Part 1. Measurement of heat of gelatinization by differential scanning calorimetry. *Starch* 23, 8-11.
- Suzuki, S.; Mitsuko, M. y Yoshie O. (1977) Studies on the degeneration of white sauce through freezing. Part II. Influence of rapidity in freezing process. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* 24, 362-365.
- Sy, D.H. y Fennema, O.R. (1973) Rates of recrystallization in beef liver tissue. En: *Proceedings XIIIth International Congress of Refrigeration (Washington)*, Vol III, 199-204.
- Tiller, W.A. (1964) Dendrites. *Science* 146, 871-879.
- Van Hulle, G.; Fennema, O. y Powrie, W.D. (1965). A comparison of methods for the microscopic examination of frozen tissue *J. Food Sci.* 30, 601-603.
- Varriano-Marston E. (1977). A comparison of dough preparation procedures for scanning electron microscopy. *Food Technol.*, 31, 32-36.
- Waldt, L.M. y Kehoe, D. (1959) Starch chemistry for the food technologist. *Food Technol.* 13, 1-4.
- Whistler, R.L. (1953) Starch retrogradation. En: *Starch and its Derivatives*, pp. 213. J.A. Radly (Ed.), Chapman and Hall Ltd., London.
- White, P.J.; Abbas, I.R. y Johnson, L.A. (1989) Freeze-thaw stability and refrigerated-storage retrogradation of starches. *Starch* 41, 176-180.

- Williamson, R.B. y Chalmers, B. (1967) Morphology of ice solidified in undercooled water. En: Crystal growth. Proceedings of an international conference on crystal growth, Boston, June 1966, pp. 739-743. H. Steffen Peiser (Ed.), Pergamon Press, London, New York, Toronto.

- Wirakartakusumah, M.A. (1981) Kinetics of starch gelatinization and water absorption in rice. Ph.D. Thesis. Department of Food Science, University of Wisconsin-Madison, Wisconsin.

- Wong, R.B.K. y Lelievre, J. (1982) Rheological characteristics of wheat starch pastes measured under steady conditions. J. Appl. Polymer Sci. 27, 1433-1440.

- Woodroof, J.G. (1939) Method for "Fixing ice crystal pattern" in frozen products. Science 27, 87.

- Zeleznak, K.J. y Hosney, R.C. (1986) The role of water in the retrogradation of wheat starch gels and bread crumb. Cereal Chem. 63, 407-411.

Parte de los resultados de la presente tesis han sido volcados en los trabajos "Light microscopy measurements of ice recrystallization in frozen corn starch pastes using isothermal freeze fixation". Ferrero, C.; Martino, M.N. y Zaritzky, N.E. enviado para su publicación a Food Structure (actualmente en prensa) y "Fixative diffusion in a frozen starch paste system". Ferrero, C.; Martino, M.N. y Zaritzky, N.E. enviado para su publicación a International Communications in Heat and Mass Transfer.

Fe de Erratas

Indice: falta subtítulo 5.2.2.2. Difusión del fijador y determinación de tiempos de fijación. Página 113"

Pág. 16: donde dice "Olkhu y Rha" debe decir "Olkku y Rha"

Págs. 63, 65, 67 y 70: donde dice "Las barras indican los errores standard" debe decir "Las barras indican los errores standard (P=0,05)"

Pág. 90: donde dice "Härröd, 1989a, 1989b, 19896c" debe decir "Härröd, 1989a, 1989b, 1989c"

Pág. 133: donde dice "Fig. 5.12 d y f" debe decir "Fig. 5.12 e y f"

Págs. 144, 145, 146 y 147: donde dice "...y a -20°C durante 8 días (c) y 60 días (b)" debe decir "...y a -20°C durante 8 días (c) y 60 días (d)"

Págs. 182 y 183 donde dice "Colwell y co." debe decir "Colwell y col."

Pág. 190: donde dice "...aunque sí lo ha limitado en algún grado..." debe decir "...aunque sí la ha limitado en algún grado..."