



UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

ESCUELA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS

**Estudio Comparativo de las Propiedades Finales de
Extractos de Carragenina κ -I / κ -II Utilizando Distintas
Algas Productoras de Carragenina κ -II**

Tesis presentada como parte de
los requisitos para optar al grado
de Licenciado en Ciencia de los
Alimentos

Inelia María Solís Bravo

VALDIVIA – CHILE
2007

PROFESOR PATROCINANTE:

Sra. Marcia Costa Lobo
Ingeniero Civil Bioquímico
Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos

PROFESOR COPATROCINANTE:

Srta. Paula Arriagada Strodthoff
Ingeniero en Alimentos
Extractos Naturales Gelymar S.A.

PROFESOR INFORMANTE:

Sr. Fernando Figuerola Rivas
Ingeniero Agrónomo, M. Sc. Food Science
Instituto de Ciencia y Tecnología de los
Alimentos.

AGRADECIMIENTOS

A la empresa Gelymar S.A. por permitirme llevar a cabo este trabajo y especialmente a Pauta Arriagada Strodthoff, por su colaboración fundamental, buena disposición y constante apoyo demostrado durante toda realización de éste.

A mi madre que con su amor, esfuerzo e infinita fe en Dios, fue un apoyo fundamental durante mi paso por la universidad y en la realización de este trabajo.

A mi esposo Carlos, que con su inmenso amor y apoyo incondicional, tanto en la realización de este trabajo como en lo personal, y a mi hijo Martín, quien fue mi principal inspiración para salir adelante en los momentos difíciles.

A los profesores Marcia Costa y Fernando Figuerola por la colaboración demostrada para contribuir a mejorar la calidad de este trabajo.

A todas las personas que forman parte de Gelymar S.A. y especialmente del Centro de Innovación, que de alguna u otra forma colaboraron desinteresadamente con este trabajo.

INDICE DE MATERIAS

Capítulo		Página
1	INTRODUCCIÓN	1
2	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	2
2.1	Generalidades de las carrageninas	2
2.2	Principales algas productoras de carragenina	2
2.2.1	Algas de aguas tropicales	2
2.2.2	Algas de aguas frías	3
2.3	Estructura química de las carrageninas y su relación con las propiedades finales de los extractos	5
2.4	Principios fundamentales del proceso de extracción de carragenina	7
2.4.1	Tecnología de precipitación por alcohol	9
2.4.2	Tecnología de gel prensado	9
2.4.3	Tratamiento alcalino	9
2.5	Propiedades de las carrageninas	11
2.5.1	Viscosidad	11
2.5.2	Gelificación	13
2.5.3	Solubilidad	14
2.5.4	Estabilidad	14
2.5.5	Interacción con proteínas	15
3	MATERIAL Y MÉTODO	17
3.1	Lugar de ensayo	17
3.2	Materias primas	17
3.3	Materiales y equipos	17
3.4	Metodología de trabajo	18
3.5	Métodos de análisis	18
3.5.1.	Contenido de humedad	18
3.5.2	Tipo de carragenina	19
3.5.3	Tratamiento alcalino	20
3.5.4	Propiedades finales de los extractos de carragenina	20
3.5.4.1	Rendimiento total de carragenina	20
3.5.4.2	Viscosidad en agua al 1,5% a 75 °C	20
3.5.4.3	Viscosidad en agua al 2% + 0,2% KCl a 75 °C	20
3.5.4.4	Fuerza de Gel en agua al 1,5% a 20 °C	20
3.5.4.5	Fuerza de Gel en agua al 2% + 0,2% KCl a 25 °C	21
3.5.4.6	Índice de leche	21
3.5.5	Análisis estadístico	21
4	PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	23
4.1	Materia prima utilizada para la elaboración de carragenina	23
4.2	Evaluación del tratamiento alcalino	24

4.3	Evaluación del rendimiento total de carragenina	25
4.4	Determinación de las propiedades reológicas de los extractos de carragenina	26
4.4.1	Viscosidad	27
4.4.2	Fuerza de gel	28
4.4.3	Índice de leche	32
5	CONCLUSIONES	34
6	RESUMEN / SUMMARY	35
7	BIBLIOGRAFÍA	37
8	ANEXOS	40

INDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Contenido de componentes químicos y peso molecular	5
2	Diseño experimental	18
3	Contenido de frondas productoras de carragenina kappa-II y lambda encontrados en el alga <i>Chondracanthus chamissoi</i>	23

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Clasificación botánica de las principales algas rojas	3
2	Estructura química de los principales tipos de carragenina	6
3	Proceso de extracción de carragenina refinada	8
4	Conversión química de las carrageninas durante el tratamiento alcalino	10
5	Viscosidad en función de la temperatura	12
6	Mecanismo de gelificación de la carragenina	13
7	Interacción específica entre la carragenina κ -II y la κ -caseína	15
8	Comportamiento de la fuerza de gel en agua al 1,5% para distintos tiempos de tratamiento alcalino	24
9	Rendimiento total de carragenina	26
10	Viscosidad en agua a 75 °C para disoluciones de carragenina al 1,5% y al 2% + 0,2% de KCl	27
11	Fuerza de gel y su deformación para disoluciones de carragenina en agua al 1,5% y al 2% + 0,2% de KCl	29
12	Geles de carragenina en agua	30
13	Índice de leche	32

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo		Página
1	Fuerza de gel y su deformación en agua al 1,5% de extractos de carragenina κ -I / κ -II con distintos tiempos de tratamiento alcalino	41
2	Diagrama de proceso de elaboración de extractos de carragenina κ -I / κ -II	42
3	Planilla de control de proceso de elaboración de carragenina	43
4	Rendimiento de carragenina	44
5	Análisis estadístico del rendimiento total	45
6	Viscosidad en agua a 75 °C de disoluciones de carragenina al 1,5% y al 2% + 0,2% KCl	46
7	Análisis estadístico de la viscosidad en agua al 1,5% de carragenina	47
8	Análisis estadístico de la viscosidad en agua al 2% de carragenina + 0,2% KCl	48
9	Fuerza de gel y su deformación en agua al 1,5% y al 2% + 0,2% KCl	49
10	Análisis estadístico de fuerza de gel en agua al 1,5% de carragenina	50
11	Análisis estadístico de la deformación de los geles en agua al 1,5% de carragenina	51
12	Análisis estadístico de la fuerza de gel en agua al 2% de carragenina + 0,2% KCl	52
13	Análisis estadístico de la deformación de los geles en agua al 2% de carragenina + 0,2% KCl	53
14	Índice de leche	54
15	Análisis estadístico del Índice de leche	55
16	Determinación del contenido de humedad y cenizas	56

1. INTRODUCCIÓN

Los avances tecnológicos han permitido un aumento en el uso de hidrocoloides, debido a las múltiples ventajas que éstos ofrecen. Dentro de estos hidrocoloides, uno de los más utilizados son las carrageninas, las cuales se emplean como agente gelificante, espesante y estabilizante en la industria alimentaria, que es el campo de mayor aplicación y cuyo mercado ha crecido notablemente durante los últimos años.

Existen varios tipos de carragenina, que se denominan según la estructura que se encuentra en mayor proporción, sin embargo, sólo cuatro de éstos son de importancia comercial. De acuerdo a lo anterior, se encuentran las carrageninas iota, lambda, kappa-I y kappa-II. Esta última, es un polímero híbrido que posee una distribución similar de carragenina kappa-I e iota y ha adquirido gran importancia desde el punto de vista industrial debido a sus propiedades reológicas y, principalmente, a su funcionalidad específica en aplicaciones lácteas.

Se ha demostrado que la composición y estructura química de las carrageninas determina las características y propiedades reológicas de éstas, por ello, es de particular interés la estructura híbrida de la carragenina kappa-II, ya que ésta difiere entre familias e incluso dentro de géneros y especies de algas de la cual sea extraída.

La hipótesis planteada en este estudio consiste en que la variación de fuentes de carragenina kappa-II en la elaboración de extractos de carragenina kappa-I / kappa-II influirá en forma significativa en las propiedades finales de dichos extractos.

Objetivo general:

Comparar extractos de carragenina kappa-I / kappa-II elaborados a partir de distintas algas productoras de carragenina kappa-II, mediante la determinación de las propiedades finales del extracto.

Objetivos específicos:

- Elaborar extractos de carragenina kappa-I / kappa-II a partir de diferentes algas productoras de kappa-II.
- Determinar y comparar las propiedades finales de los diferentes extractos de carragenina kappa-I / kappa-II elaborados a partir de diferentes fuentes de kappa-II.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Generalidades de las carrageninas

Las carrageninas forman parte de un grupo de polisacáridos sulfatados, que constituyen la estructura principal de ciertas variedades de algas rojas, de la clase *Rhodophyceae*. Estos polímeros son fuertemente aniónicos debido a la presencia de grupos sulfatos, lo cual facilita su interacción con moléculas catiónicas y anfotéricas, como las proteínas, a su vez, se caracterizan por ser solubles en agua, formando soluciones de alta viscosidad y/o geles, por lo que son ampliamente utilizadas en diversos productos dentro de la industria alimentaria (WHISTLER y BeMILLER, 1993 y GELYMAR, 2005a).

Los diferentes tipos de carragenina comercial se presentan de dos formas, de acuerdo al grado de refinación que éstas tengan en su proceso de elaboración. Conforme a lo anterior, se encuentran la carragenina refinada, con un bajo contenido de impurezas y material celulósico y la semi refinada, compuesta de carragenina y otros materiales de la pared celular. Ambos tipos se utilizan en diversas aplicaciones industriales, como en productos cárnicos, lácteos, y otros (INTERNATIONAL MIGRATION REVIEW, IMR International, 1999).

2.2 Principales algas productoras de carragenina

En la extracción de carragenina se utilizan algas rojas de la clase *Rhodophyceae* (FIGURA 2), siendo los géneros *Euचेuma*, *Chondrus* y *Gigartina*, las principales fuentes de materia prima para la elaboración de carragenina de importancia comercial (IMR International, 1999).

2.2.1 Algas de aguas tropicales. Las especies de algas de este tipo, comercialmente importantes, pertenecen a la familia *Solieraceae* (FIGURA 1). Según lo que señalan ESTÉVEZ et al. (2000), *Kappaphycus alvarezii* (antiguamente *Euचेuma cottonii*), también denominada con el nombre común “*cottonii*”, es una de las algas rojas más utilizada como materia prima para la producción de carragenina kappa-I. Esta especie de alga crece en zonas de aguas tropicales, principalmente en las costas de Indonesia, Malasia y Filipinas, siendo este último país, uno de los mayores productores mundiales, tanto en la elaboración de carragenina kappa-I, como en el cultivo y exportación de esta especie, llegando a constituir alrededor del 70 % del alga que ese país exporta (HURTADO y AGBAYANI, 2000).

Euचेuma denticulatum o “*espinosum*”, debido a la morfología de sus frondas, es otra especie de alga de importancia comercial que crece en aguas tropicales, encontrándose en forma natural en las costas del norte de Australia, Tanzania, Indonesia y Filipinas (GELYMAR, 2002). De acuerdo a lo señalado por LUXTON

(1993), Indonesia es uno de los mayores productores de esta especie de alga, cubriendo gran parte de la demanda mundial de materia prima para la producción de carragenina iota.

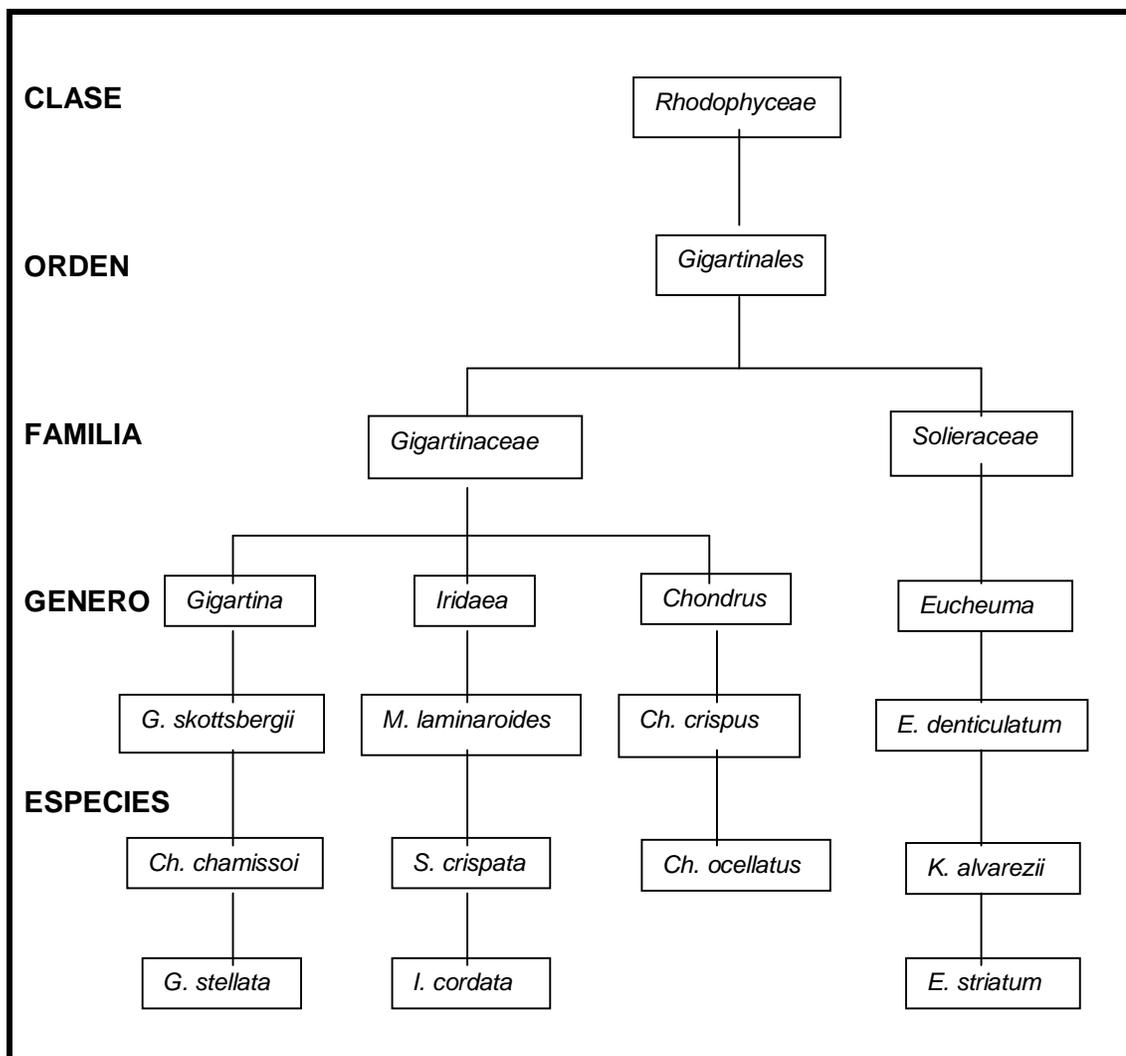


FIGURA 1 Clasificación botánica de las principales algas rojas.

FUENTE: IMR International (1999).

2.2.2 Algas de aguas frías. Este tipo de algas pertenecen a la familia *Gigartinaceae* (FIGURA 1), cuyas diferentes especies se pueden encontrar en forma natural en las costas de Nueva Zelanda, Irlanda, Australia, Canadá y, principalmente a lo largo de las costas de Sudamérica, como Perú, Argentina y Chile, siendo este último país, la mayor reserva mundial de algas de aguas frías, contribuyendo con alrededor de un 20 % de la materia prima para la producción de carragenina a nivel mundial (IMR International, 1999 y ZAMORANO, 2004).

Para ÁVILA **et al.** (1999), *Gigartina skottsbergii* o *Luga roja*, es una de las algas rojas de mayor importancia comercial en Chile, debido a su alto contenido y calidad de carragenina que posee, en tanto que BUSCHMANN **et al.** (2001), sostienen que *Sarcothalia crispata* (*Luga negra* o Nama) es una de las algas rojas de mayor demanda para la extracción de carragenina en Chile. Las estadísticas de producción de carragenina por especie, entregada por CHILE, SERNAPESCA (2005), entre el periodo de 1994 – 2004, sólo indican la cantidad de carragenina obtenida a partir de *Luga-Luga*, nombre genérico en el que se incluyen ambas especies de algas.

BUSCHMANN **et al.** (2001), también señalan que el mercado de *Chondracanthus chamissoii*, conocida también como “*chicoria de mar*”, o simplemente “*chamisol*” se ha abierto notablemente durante los últimos años, no sólo como materia prima para la producción de carragenina kappa-II, sino también como especie de alga comestible, la que se exporta principalmente a Japón.

El ciclo de vida es similar en todas las especies de algas pertenecientes a la familia *Gigartinaceae*, caracterizándose por ser trifásico isomórfico, vale decir, existe una alternancia de las generaciones tetrasporofítica, gametofítica y cistocárpica, morfológicamente similares, sin embargo, existen diferencias en el tipo de compuesto que sintetizan en cada una de las fases mencionadas, la fase haploide o gametofítica produce carragenina kappa-II y la fase diploide o esporofítica produce carragenina lambda (SANTELICES, 1989; Hoffmann y Santelices, 1997 citados por OTAÍZA **et al.**, 2001 y ESTEVEZ **et al.**, 2002).

Un estudio realizado por ZAMORANO y WESTERMEIER (1996), indica que la máxima biomasa de *Luga roja*, se produce durante la primavera y terminando los meses de verano, disminuyendo rápidamente hacia el otoño, sin embargo, presenta un estado predominantemente gametofítico durante la temporada de otoño-invierno. Este hecho indica que la carragenina biosintetizada en este estado del alga es del tipo kappa-II. La disponibilidad de *Luga roja*, según BUSCHMANN **et al.** (2001) y GELYMAR (2005a), tiene algunos inconvenientes debido a la variación estacional de sus esporas y al bajo grado de germinación y crecimiento potencial, además, crece principalmente en zonas submareales por lo cual dificulta su recolección, sin embargo, el desarrollo de programas de cultivo a través de la investigación científica, pueden asegurar una mejor producción y tasa de crecimiento de esta especie, no obstante, estos aspectos contribuyen a aumentar significativamente su costo como materia prima.

En relación a la disponibilidad estacional de las algas, BUSCHMANN **et al.** (2001) y OTAÍZA **et al.** (2001), señalan que la especie *Nama* posee un patrón estacional de abundancia, presentando un mínimo de densidad (frondas / m²) y biomasa durante la época de invierno y máximo hacia fines de la primavera, mostrando una abundancia relativa de frondas gametofíticas durante las diferentes épocas del año. No obstante, según GELYMAR (2005a), posee una mayor tasa de crecimiento en relación a *Luga roja*, lo cual es uno de los factores que contribuyen a que esta especie tenga una mayor disponibilidad y por ende, un menor costo.

La especie de alga *chamiso*, representa una alternativa como materia prima para la producción de carragenina, dado su bajo costo (GELYMAR, 2005a). Según un estudio realizado por GONZALEZ y MENESES (1996), esta especie de alga, también tiene una abundancia relativa de frondas en estado gametofítico durante las diferentes épocas del año, asociado principalmente a las diferencias en las capacidades reproductivas y/o fisiológicas entre las fases gametofítica y esporofítica de esta especie de alga, lo cual puede explicar el dominio natural de algas en este estado reproductivo. No obstante, las frondas en diferentes estados reproductivos, no son fácilmente diferenciables, a diferencia de lo que ocurre con *Luga roja* o *Nama*, por lo que su separación en planta es inviable (GELYMAR, 2005f).

Las algas de aguas frías, además de sintetizar carragenina kappa-II y lambda, el rendimiento total, expresado como materia seca de carragenina / materia seca de alga, es mucho mayor que el de las algas tropicales, lo cual hace aumentar significativamente el precio de las algas de aguas frías (IMR International, 1999 y ZAMORANO, 2004).

2.3 Estructura química de las carrageninas y su relación con las propiedades finales de los extractos

FENNEMA (2000), define la carragenina como cadenas lineales de unidades repetitivas de D-galactosa y 3,6 anhidro D-galactosa (3,6 AG), unidas a través de enlaces glicosídicos α -1,3 y β -1,4, a excepción de la carragenina lambda, que sólo esta compuesta de unidades de D-galactosa. También contienen grupos de éster sulfato en diferentes proporciones, de acuerdo al tipo de carragenina.

CUADRO 1 Contenido de componentes químicos y peso molecular.

Tipo de carragenina	Peso molecular (kDa)	Ester sulfato (%)	3,6 Anhidro Galactosa (%)
κ -I	100 – 300	24 – 25	34 – 36
κ -II	300 – 500	25 – 28	32 – 34
I	500 – 700	30 – 32	28 – 32
λ	> 700	35	0

FUENTE: GELYMAR (2005a).

Como se muestra en el CUADRO 1 y según lo señalado por VAN de VELDE *et al.* (2005), las carrageninas son clasificadas de acuerdo a la presencia de 3,6 AG y a la posición y número de grupos de éster sulfato, por lo tanto, estos componentes determinan las características y propiedades de los diferentes extractos de carragenina. De acuerdo a lo anterior, existen los tipos kappa-I (κ -I), kappa-II (κ -II), iota (I) y lambda (λ), que son los de interés comercial, y otros tipos denominados mu (μ), nu (ν), xi (ξ), theta (θ) y pi (π), que se pueden encontrar a menudo en las carrageninas nativas o cuando se utilizan métodos de extracción suaves. En la FIGURA 2, se muestran las estructuras químicas de los tipos de carragenina de importancia comercial.

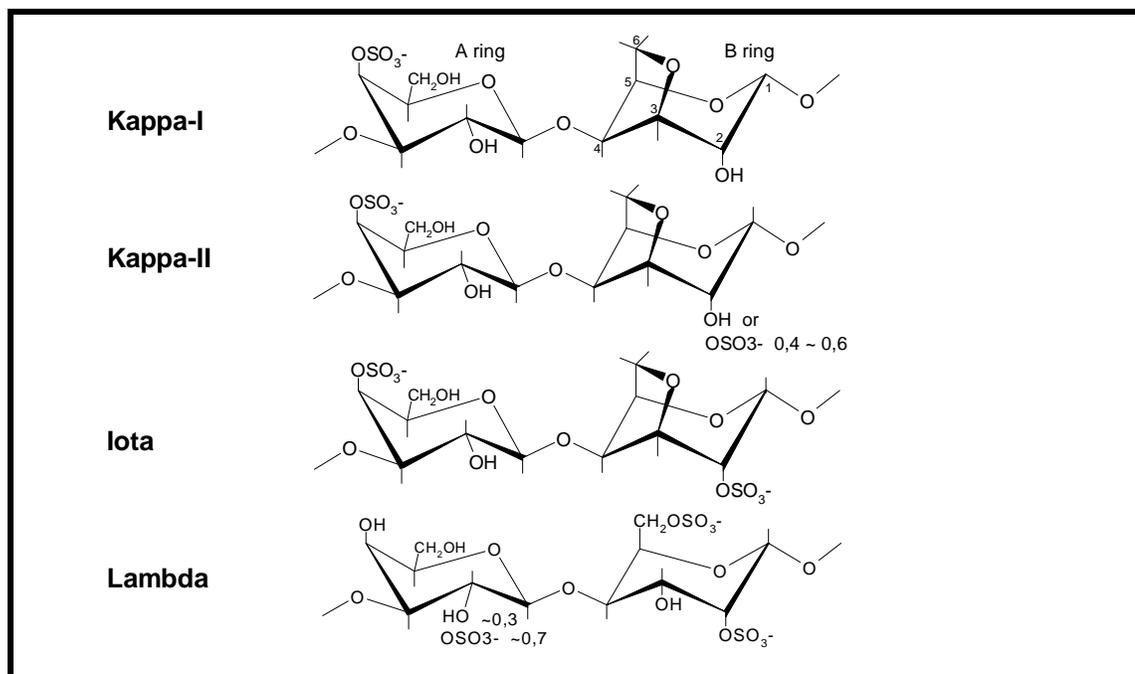


FIGURA 2 Estructura química de las carrageninas de importancia comercial.
FUENTE: GELYMAR (2005a).

La unidad principal de la carragenina κ -I, está compuesta de unidades de galactosa 4-sulfato unidas a través de enlaces α -1,3 y gran cantidad de unidades de 3,6 AG unidas a través de enlaces β -1,4. Según GLICKSMAN (1969); MILLANE *et al.* (1988) y WHISTLER y BeMILLER (1993), un aumento del contenido de 3,6 AG, implica una mayor capacidad de gelificación y sensibilidad al ión potasio, lo cual explica de algún modo, la textura firme y quebradiza de los geles que forma la carragenina κ -I en soluciones acuosas. Además, su estructura química permite la interacción con sales de potasio a través de los grupos sulfato, lo cual intensifica la fuerza del gel.

Para GLICKSMAN (1969), la presencia de un grupo sulfato en el carbono-2 de la unidad de 3,6 AG en la carragenina iota, es la principal diferencia estructural con la carragenina κ -I. Según MILLANE *et al.* (1988), a medida que aumenta el contenido de grupos sulfato en esta posición, disminuye la sensibilidad a los iones potasio y se produce un debilitamiento de la fuerza del gel, sin embargo, aumenta la sensibilidad a los iones calcio, por lo cual, éstos usualmente se emplean para incrementar la fuerza del gel de carragenina iota.

Las diferencias en la estructura química y en el contenido de componentes químicos entre las carrageninas κ -I e iota (CUADRO 1), implican que esta última sea más soluble y el gel que forma tenga mayor elasticidad, tanto en sistemas acuosos como lácteos, libre de sinéresis y además, resistente a los cambios producidos por ciclos de congelamiento / descongelamiento (MILLANE *et al.* (1988) y GELYMAR, 2005a).

La carragenina κ -II, para WHISTLER y BeMILLER (1993); VILLANUEVA *et al.* (2004) y VAN de VELDE *et al.* (2005), es un polímero híbrido ya que contiene carragenina iota y κ -I en su estructura, donde la proporción molar de esta última puede variar entre un 80 a 45%, según la familia y especie de alga de la cual sea extraída.

VAN de VELDE *et al.* (2001), estudiaron la estructura química de estos polímeros híbridos, con el fin de determinar la conformación de las cadenas de κ -I e iota dentro de la molécula y concluyeron que ésta consiste en cadenas mezcladas, donde ambos tipos de carragenina se encuentran presentes en la misma cadena. VILLANUEVA *et al.* (2004), compararon química y funcionalmente, extractos de carragenina κ -II y mezclas κ -I / I y encontraron que la fuerza de gel y cohesividad en agua de los extractos κ -II, es similar a mezclas κ -I / I con un contenido mayoritariamente de iota, mientras que la deformación de los geles, es similar a mezclas con una mayor proporción de carragenina κ -I. Ambos autores coinciden en que los extractos de carragenina κ -II, al tener una conformación estructural diferente, no sólo combinan las propiedades de los tipos κ -I e iota, sino que además, tienen características y propiedades reológicas especiales, especialmente la alta reactividad que se produce entre ésta y los sistemas lácteos y la formación de geles de textura firme y elástica, que la diferencian de una mezcla de carragenina κ -I / I elaborada.

Según VAN de VELDE *et al.* (2005), la razón κ -I / I de los diferentes extractos de carragenina κ -II y el peso molecular, pueden determinar en gran manera sus propiedades reológicas. Estos autores observaron una clara disminución de la fuerza de gel de a medida que la concentración molar de carragenina κ -I también disminuyó y gran variabilidad en el peso molecular entre las diferentes especies, donde los mayores valores determinan una mayor viscosidad.

Como se ha señalado anteriormente, en la fase tetrasporofítica de las algas de la familia Gigartineae sintetizan otros tipos de carragenina, donde sólo la carragenina lambda es de importancia comercial. Como se muestra en el CUADRO 1, este tipo de carragenina es altamente sulfatada y por ende, tiene como principal componente galactosa 2-sulfato y galactosa 2,6 disulfato (FIGURA 2), esta composición química implica que posea una alta solubilidad tanto en caliente como en frío y principalmente, permite formar soluciones de alta viscosidad. La ausencia de unidades de 3,6 AG en la molécula impide la formación del gel (GLICKSMAN, 1969 y GELYMAR, 2005a).

2.4 Principios fundamentales del proceso de extracción de carragenina

Las carrageninas tienen la particularidad de ser insolubles en solventes orgánicos como alcohol, éteres y cetonas, y las de tipo kappa e iota, lo son además en presencia de altas concentraciones de iones potasio y calcio. En este hecho se basan principalmente las tecnologías de extracción de carragenina (GELYMAR, 2005a).

La elaboración de carragenina implica un proceso de varias etapas, siendo las principales la extracción, purificación y secado. En general, se realiza un pre

tratamiento a las algas, que consiste en remover materias extrañas, como arenas y piedras, que comúnmente están presentes. En la etapa de extracción, las algas son tratadas con una solución alcalina a alta temperatura durante un cierto tiempo, de acuerdo al tipo de alga y al tipo de extracto de carragenina que se desea obtener. La etapa de purificación, generalmente se realiza a través de un proceso de filtración con ayuda de tierra de diatomeas, en el cual son separados los residuos insolubles que contienen gran cantidad de material celulósico (WHISTLER y Be MILLER, 1993).

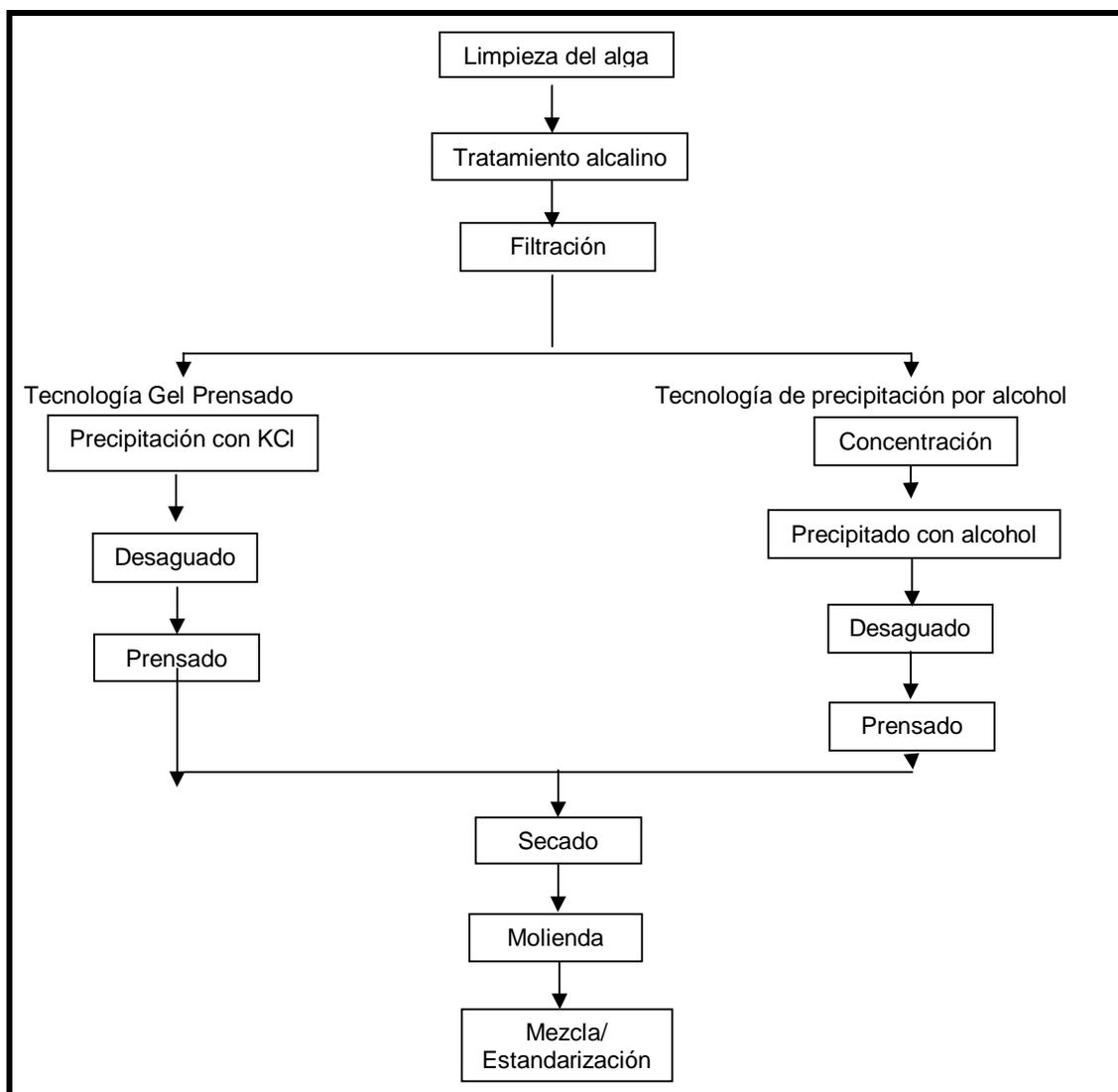


FIGURA 3 Proceso de extracción de carragenina refinada.

FUENTE: IMR International (1999).

Para la obtención de carragenina refinada, se solubiliza el alga en una solución alcalina diluida con aplicación de temperatura, para luego realizar el proceso contrario, es decir,

lograr la insolubilización de la carragenina para lograr la extracción. Para obtener carragenina semi refinada, hay una etapa de solubilización en que los componentes solubles de bajo peso molecular, se separan de las algas y el resto es secado y molido (WHISTLER y BeMILLER, 1993 y IMR International, 1999).

En la FIGURA 3, se puede observar en forma más detallada, las diferentes etapas del proceso de extracción de carragenina refinada, mediante las tecnologías de gel prensado y precipitación por alcohol. Ambas líneas de proceso, difieren básicamente en la forma de precipitar la carragenina; sin embargo, esto implica diferencias en el producto obtenido y en los costos, por ello, usualmente en la tecnología de precipitación por alcohol, se concentra el filtrado para disminuir la cantidad de alcohol a utilizar (WHISTLER y BeMILLER, 1993).

2.4.1 Tecnología de precipitación por alcohol. Esta es una de las tecnologías de extracción más antiguas y tradicionales. El solvente utilizado comúnmente es el alcohol isopropílico, el cual produce una deshidratación de la molécula de carragenina provocando la coagulación de la misma, por lo que es posible utilizar esta tecnología para extraer cualquier tipo de carragenina. Este hecho, también puede ser una desventaja si se desea extraer sólo un tipo de carragenina, para alguna aplicación específica; este tipo de inconvenientes se pueden producir a menudo, cuando las algas utilizadas pertenecen a la familia Gigartinaceae, ya que éstas producen carragenina κ -II y λ . Otro inconveniente de este proceso, es que implica un mayor costo, aunque el alcohol se recupere por destilación (WHISTLER y BeMILLER, 1993; IMR International, 1999 y GELYMAR, 2005a).

2.4.2 Tecnología de gel prensado. La tecnología de precipitación con KCl, es otra forma de obtener carragenina refinada. Consiste en precipitar la carragenina presente en una disolución de alga, por medio de una solución de KCl; esto se logra debido a las interacciones iónicas que se producen entre la carragenina y la sal, lo cual causa una desestabilización de la molécula. En este caso, el gel que se forma es prensado para remover la mayor parte del contenido acuoso antes del secado, por esta razón esta tecnología se denomina "gel prensado" (GELYMAR, 2005a).

Según WHISTLER y BeMILLER (1993), este método tiene algunas limitantes ya que sólo se puede utilizar para obtener extractos de carrageninas fuertemente sensibles a los iones potasio como lo son las carrageninas κ -I y κ -II, sin embargo, resulta más conveniente desde el punto de vista económico.

2.4.3 Tratamiento alcalino. Dentro del proceso de extracción de carragenina, el alga es tratada químicamente con una solución alcalina a alta temperatura. Según lo descrito por CIANCIA *et al.* (1993); FALSHAW *et al.* (2001); VIANA *et al.* (2004) y VAN de VELDE *et al.* (2005), el tratamiento alcalino cumple la función de formar las unidades 3,6 anhidro- α -D-galactosa y 3,6 anhidro- α -D-galactosa 2-sulfato, a partir de α -D-galactosa 6-sulfato y α -D-galactosa 2,6 disulfato, mediante la desulfatación de

estas moléculas. Con esto se consigue transformar las unidades precursoras μ , μ/v y v en carragenina κ -I, κ -II e ι respectivamente. Esta conversión química confiere el poder gelificante bajo las condiciones de solvente apropiadas. También se puede lograr la formación del anillo 3,6 AG y con ello carragenina θ , a partir de carragenina λ , pero la conformación de la molécula impide la gelificación. La reacción de los principales tipos de carrageninas se muestra en la FIGURA 4.

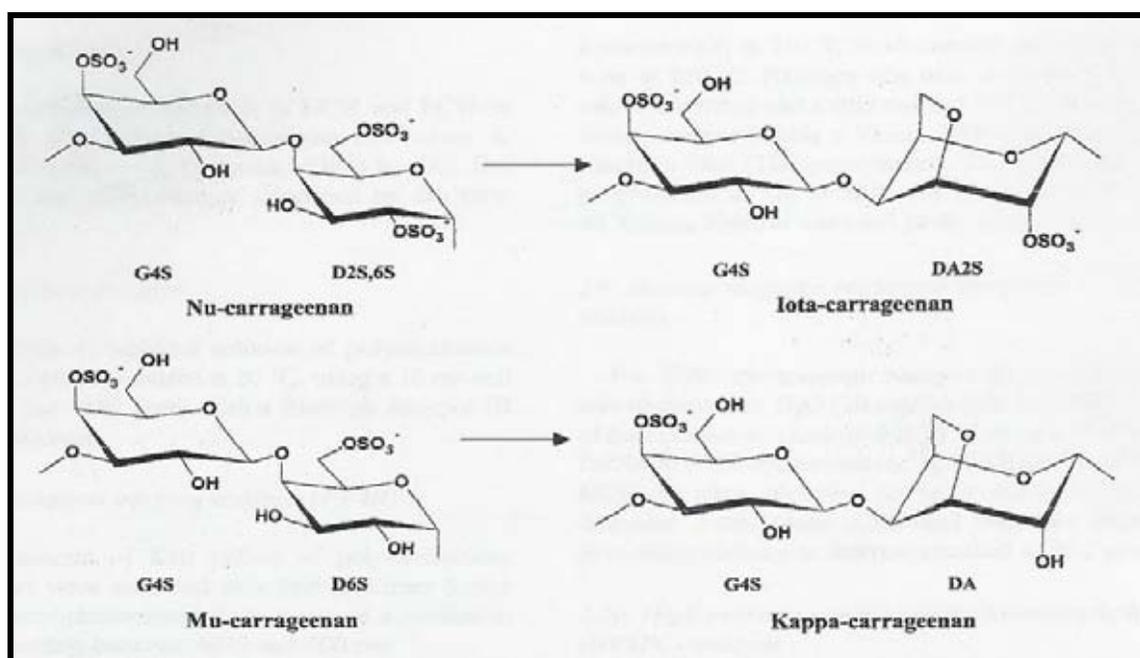


FIGURA 4 Conversión química de las carrageninas durante tratamiento alcalino. FUENTE: VIANA et al. (2004).

Según CIANCIA et al. (1993), químicamente, la reacción de ciclación involucra varias etapas consecutivas, sin embargo, una de las más importantes y responsable de la rapidez de la reacción, es la polarización del grupo hidroxilo en el carbono-3 de las unidades de α -D-galactosa 2,6 disulfato, que provocan una desestabilización de la molécula permitiendo la formación del anillo 3,6 AG. CIANCIA et al. (1997), señalan que además, la adición de sales al medio alcalino para aumentar la fuerza iónica, acelera la reacción. Esta última aseveración concuerda con lo descrito por FALSHAW et al. (2001), quienes señalan que la tasa de conversión no sólo es dependiente de la temperatura y concentración de álcali, sino que también de la fuerza iónica del medio.

Según un estudio realizado por CIANCIA et al. (1993), esta reacción es cerca de 20 a 60 veces más rápida para las carrageninas del tipo kappa que para la carragenina lambda, lo cual parece estar relacionado con la gran cantidad de grupos sulfato que contiene la carragenina lambda, los cuales se agrupan alrededor del grupo hidroxilo del carbono-3 de las unidades de α -D-galactosa 2,6 disulfato, protegiéndolo de la polarización y reduciendo así la rapidez de la reacción.

Debido a que la carragenina κ-II contiene los tipos de carragenina κ-I e iota, generalmente los tratamientos alcalinos que se aplican, tienen relación con las propiedades que se desean maximizar, es así como se utilizan condiciones fuertemente alcalinas y/o tiempos de reacción mayor, para conseguir un alto nivel de conversión de los precursores a carragenina κ-I e iota, maximizando la capacidad de gelificación y/o reactividad con las proteínas, mientras que se utilizan condiciones alcalinas más suaves, donde se produce menos conversión de las moléculas, para obtener un producto con una mayor solubilidad y viscosidad (WHISTLER y BeMILLER, 1993 y FALSHAW *et al.*, 2001).

Si bien la formación de las unidades de 3,6 AG implica un aumento en la fuerza del gel de carragenina, el tratamiento alcalino que se aplique debe ser el adecuado, ya que la aplicación de un tratamiento excesivo, ya sea por periodos prolongados o por altas concentraciones de álcali, puede provocar hidrólisis del polímero y consecuentemente pérdida de firmeza en el gel (WHISTLER y BeMILLER, 1993; CIANCIA *et al.*, 1993; CIANCIA *et al.*, 1997 y VIANA *et al.*, 2004).

2.5 Propiedades de las carrageninas

Las carrageninas son polímeros fuertemente aniónicos, de gran tamaño y peso molecular. Estas características, le confieren la capacidad de reaccionar con otras moléculas a través de diversos mecanismos, entre los que se incluyen los enlaces iónicos, puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals, para formar estructuras complejas que usualmente implican cambios en las propiedades físicas del sistema en que se aplican. Estas propiedades son aprovechadas ventajosamente en múltiples aplicaciones en la industria alimentaria (GLICKSMANN, 1969).

Para FENNEMA (2000), las carrageninas tienen las siguientes funciones como aditivo alimentario:

- Determinar diferentes propiedades reológicas con el fin de espesar y suspender partículas insolubles y/o de gran tamaño.
- Formar geles termorreversibles a temperatura ambiente, transparentes, de texturas rígidas a elásticas y con distintos grados de retención de agua
- Formar complejos con las proteínas para obtener geles, suspensión, floculación y estabilización.

Para llevar a cabo estas funciones en los distintos alimentos en que se aplican, las carrageninas poseen diversas propiedades, cuyas características varían principalmente según el tipo de carragenina y el medio en que son aplicadas.

2.5.1 Viscosidad. La funcionalidad de las carrageninas en la mayoría de sus aplicaciones, depende en gran parte de sus propiedades reológicas. Estos polímeros, tienen la propiedad de formar soluciones acuosas de alta viscosidad, debido a que

poseen una estructura macromolecular lineal y a su naturaleza polielectrolítica. La repulsión entre los grupos de éster sulfato cargados negativamente alrededor de las cadenas, hace que la molécula permanezca extendida, mientras que su naturaleza hidrofílica, hace que ésta quede cubierta por moléculas de agua. Estos factores contribuyen a la resistencia al fluido y por ende, el comportamiento es de un fluido no newtoniano del tipo pseudoplástico, particularmente cuando la viscosidad de la solución es alta (FOOD AGRICULTURAL ORGANIZATION, FAO, 1987 y WHISTLER y BeMILLER, 1993).

La viscosidad de las soluciones de carragenina depende principalmente de la concentración, temperatura, presencia de otros solutos, tipo de carragenina y peso molecular. Esta propiedad reológica aumenta exponencialmente con la concentración, debido a que existe mayor interacción entre las cadenas de los polímeros, mientras que las sales disminuyen la viscosidad de las soluciones, debido a que reducen la repulsión electrostática entre los grupos sulfato (FAO, 1987 y GLICKSMAN, 1969).

En general, cuando las carrageninas se encuentran sometidas a altas temperaturas, dan soluciones de baja viscosidad y a medida que disminuye la temperatura del sistema, la viscosidad aumenta. En las carrageninas que poseen propiedades gelificantes, como la de los tipos κ -I, κ -II e iota, durante el enfriamiento del sistema, la viscosidad se incrementa gradualmente, produciéndose un aumento repentino e intenso a medida que se inicia la formación del gel (FAO, 1987 y GELYMAR, 2005a). Este último fenómeno se ilustra en la FIGURA 5.

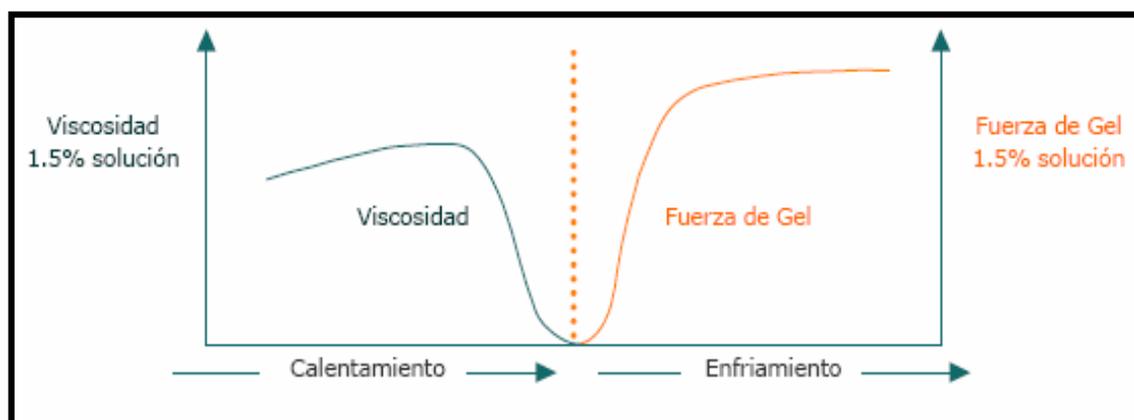


FIGURA 5 Viscosidad en función de la temperatura.
FUENTE: GELYMAR (2005a)

La gran cantidad de grupos de éster sulfato que posee la carragenina lambda, hacen que ésta sea altamente hidrofílica, lo cual junto a su alto peso molecular, contribuyen a formar soluciones de alta viscosidad tanto en frío como en caliente, por lo que es ampliamente utilizada para aplicaciones en las que se requiera impartir viscosidad al sistema. Las carrageninas iota y κ -II otorgan una viscosidad considerada media,

mientras que la viscosidad que se obtiene a partir de carragenina κ -I es baja, debido a su bajo peso molecular y a sus propiedades particularmente gelificantes (WISTLER y BeMILLER, 1993 y GELYMAR, 2005a).

2.5.2 Gelificación. Las carrageninas forman geles termorreversibles bajo las condiciones de solvente y ciclos de calentamiento y enfriamiento apropiados. WHISTLER y BeMILLER (1993); FENEMMA (2000) y NICKERSON *et al.* (2004), señalan que la formación del gel implica varios cambios estereoquímicos dentro de la molécula. En estado de sol, las moléculas de carragenina se presentan como cadenas simples y aleatorias, las que posteriormente debido al enfriamiento, forman la estructura energéticamente más favorable, en donde las moléculas adoptan una conformación ordenada de doble hélice, las que luego se agregan, para formar una red tridimensional que dará origen a un gel estable y firme. En la FIGURA 6 se esquematizan las diferentes etapas del mecanismo de gelificación de las carrageninas.

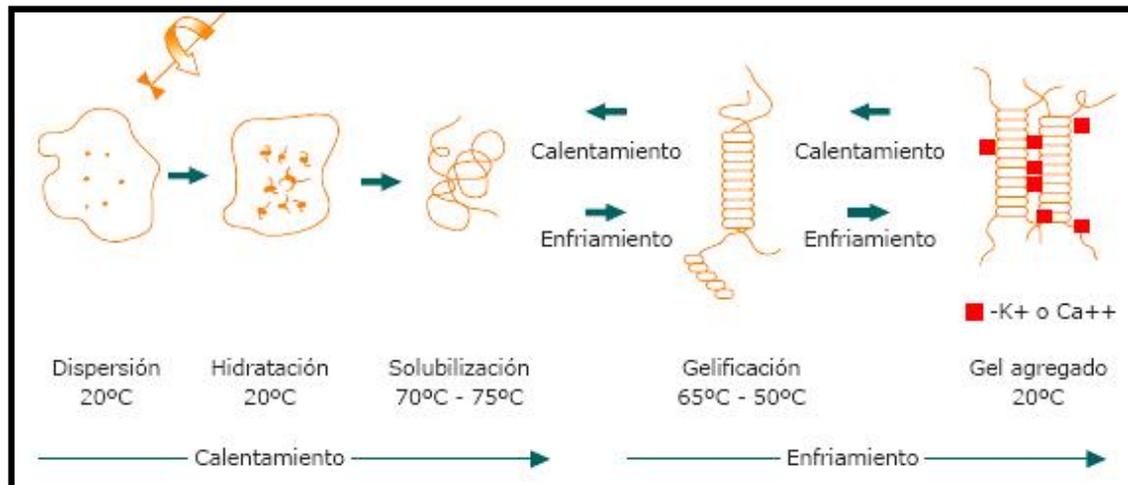


FIGURA 6 Mecanismo de gelificación de la carragenina.

FUENTE: GELYMAR (2005a).

La presencia de unidades de 3,6 AG en la estructura de las carrageninas κ -I, κ -II e iota, contribuye a un aumento en la hidrofobicidad de las moléculas, lo cual permite la formación del gel. No obstante, estos polímeros contienen algunos residuos de galactosa 6-sulfato, que impiden la formación de dobles hélices en la cadena, debilitando de esta forma la fuerza del gel. Este inconveniente, es superado mediante la aplicación de tratamiento alcalino durante el procesamiento de la carragenina, induciendo la formación de 3,6 AG mediante la desulfatación de los residuos de galactosa 6-sulfato (FAO, 1987 y FALSHAW *et al.*, 2003).

Un alto contenido de 3,6 AG implica una mayor fuerza y extensión de las zonas de juntura, debido a esto, la textura del gel de carragenina κ -I es firme y quebradiza con alta tendencia a la sinéresis. Los geles de carragenina κ -II, en cambio, al tener un

menor contenido de 3,6 AG, tienen la característica de ser firmes y elásticos, cuya fuerza es directamente proporcional a la concentración de carragenina y a la razón κ -I / I; debido a esto último, los geles de carragenina κ -II provenientes de distintas materias primas pueden presentar algunas diferencias en las propiedades del gel (WHISTLER y BeMILLER, 1993, VAN de VELDE *et al.*, 2001 y GELYMAR, 2005a).

La carragenina iota forma geles de textura muy elástica con baja sinéresis, debido a que posee mayor cantidad de grupos sulfato que permiten la formación de una estructura más flexible. La carragenina lambda, en cambio, no gelifica debido a la ausencia de 3,6 AG y a la gran cantidad de grupos sulfato que tienden a mantener las moléculas apartadas (FAO, 1987 y GELYMAR, 2005a).

WHISTLER y BeMILLER (1993); NICKERSON *et al.* (2004) y MANGIONE *et al.* (2005), señalan que la fuerza de los geles de carragenina puede ser incrementada mediante la incorporación de cationes de potasio y calcio, los cuales interactúan principalmente con las carrageninas del tipo kappa e iota, respectivamente. Estos iones, actúan produciendo puentes electrostáticos de forma ordenada, entre los dímeros de doble hélice cargados negativamente, con lo cual se contribuye a disminuir la entropía del sistema, de esta manera, las cadenas de carragenina adoptan una estructura más ordenada, causando la agregación de los polímeros y por consiguiente, ayudan a formar un gel de textura aun más firme.

2.5.3 Solubilidad. El proceso de solubilización, comprende una hidratación de las moléculas de carragenina en función de la concentración, tipo de cationes presentes, temperatura del agua y medio de dispersión (GELYMAR, 2005a).

El grado de sulfatación de la molécula, tiene directa relación con la solubilidad. La carga fuertemente negativa de los grupos sulfato, provoca que las cadenas de los polímeros se mantengan apartadas. Debido a esto, la carragenina lambda tiene alta solubilidad en agua y leche, tanto en frío como en caliente (GLISKMAN, 1969).

Las carrageninas del tipo kappa, debido a su bajo contenido de grupos sulfato, requieren un calentamiento para conseguir la individualización de las moléculas y con ello lograr la solubilización. A temperaturas sobre los 60 °C, se logra la solubilización de las moléculas en medio acuoso y en leche, a temperaturas cercanas a los 80 °C. A 20 °C, pueden ser solubles en agua sólo con la adición de sales de sodio, sin embargo, esto provoca una disminución en la viscosidad del sistema (GELYMAR, 2002).

2.5.4 Estabilidad. La mayor estabilidad de las soluciones de carragenina se encuentra entre pH 11,0 a 4,5, mientras que el gel es estable entre pH 12,0 a 3,7. Bajos valores de pH junto a la alta temperatura causa la hidrólisis de las moléculas de carragenina, lo que a su vez, origina una baja en la viscosidad y disminución de la fuerza del gel, sin

embargo, una vez formado el gel no hay hidrólisis (GLICKSMAN, 1969 y GELYMAR, 2002).

2.5.5 Interacción con proteínas. La capacidad de las carrageninas de reaccionar con las proteínas, depende de múltiples factores, tales como la concentración de carragenina, tipo de proteína, pH y punto isoeléctrico de la proteína (FAO, 1987).

Los productos lácteos constituyen una de las principales aplicaciones de las carrageninas, la cual se emplea como agente gelificante, viscosante y estabilizante, debido principalmente a la capacidad que poseen las carrageninas, a diferencia de otros hidrocoloides, de interactuar con las proteínas de la leche (DROHAN *et al.*, 1997 y LANGENDORFF *et al.*, 1997).

Según GLICKSMAN (1969), la capacidad de interacción se debe a los grupos sulfato y a las unidades de 3,6 AG, cuya presencia es fundamental para la formación del gel en el medio lácteo. Este fenómeno de interacción se presenta en las carrageninas del tipo kappa, especialmente en la carragenina k-II, cuya importancia comercial se debe precisamente a su funcionalidad específica en aplicaciones lácteas (VILLANUEVA *et al.*, 2004).

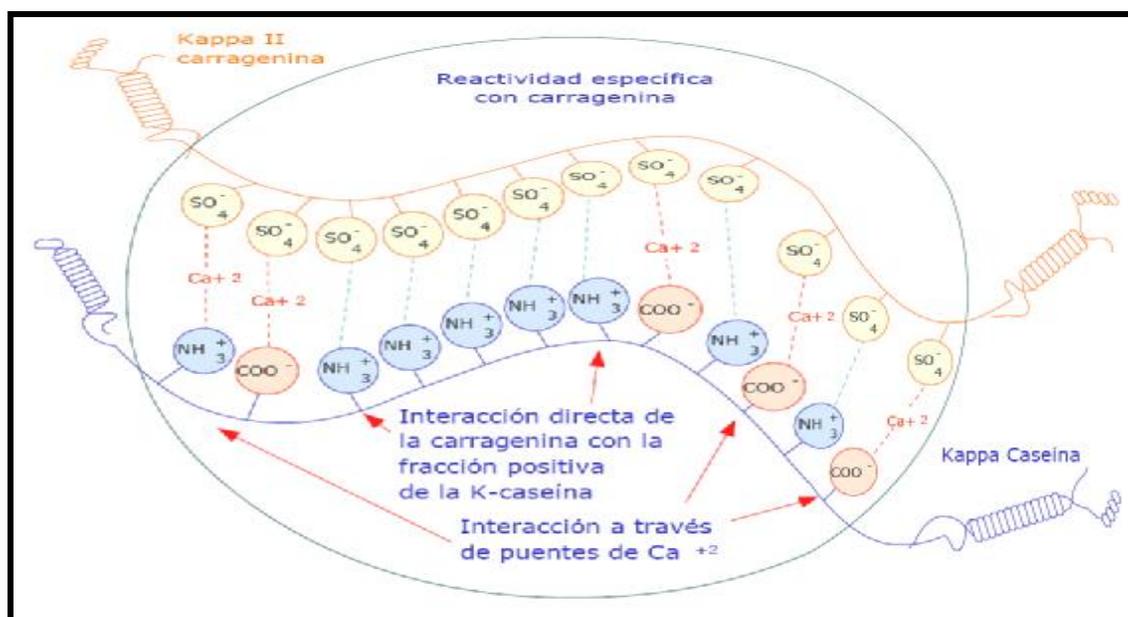


FIGURA 7 Interacción específica entre la carragenina k-II y la κ -caseína.
FUENTE: GELYMAR (2005a).

Para XU *et al.* (1992); LANGENDORFF *et al.* (1997) y VILLANUEVA *et al.* (2004), la alta reactividad que se produce entre la carragenina y la leche, se debe

específicamente a los grupos de éster sulfato cargados negativamente, presentes en la carragenina, que interaccionan con la región positiva de las micelas de κ -caseína de la leche y a la presencia de iones calcio, que actúan como puentes electrostáticos entre ambas moléculas. Esta reactividad específica se ilustra en la FIGURA 7.

Según lo que señalan DROHAN **et al.** (1997) y VILLANUEVA **et al.** (2004), las interacciones entre la carragenina y la κ -caseína, adquieren mayor importancia cuando la concentración de carragenina en el sistema es baja ($< 0,018\%$ p/p), ya que a una concentración mayor, capaz de permitir la gelificación del sistema lácteo, la formación del gel es predominantemente el resultado de la asociación de las hélices de carragenina.

El mecanismo de estabilización mediante la aplicación de carragenina, se logra en primera instancia, a través del aumento de la viscosidad que se produce en el sistema lácteo, pero es atribuido principalmente, a la formación de un gel de estructura débil e imperceptible, capaz de suspender las partículas de cacao y soportar la agitación. Además, se consigue una mejor textura y palatabilidad en el producto (VILLANUEVA **et al.**, 2004 y GELYMAR, 2005d).

3. MATERIAL Y MÉTODO

3.1 Lugar de ensayo

La realización del trabajo experimental correspondiente a la elaboración y evaluación de las propiedades finales: rendimiento, viscosidad, fuerza de gel e índice de leche de los extractos de carragenina κ -I / κ -II, se llevó a cabo en el Centro de Innovación de la empresa Extractos Naturales Gelymar S.A. desde el mes de enero hasta el mes de marzo del 2006.

3.2 Materias primas

Las algas fueron seleccionadas en forma aleatoria, cuyas partidas forman parte de la materia prima que habitualmente se procesa en planta. Estas partidas seleccionadas se detallan a continuación:

- *Cottoni*, en estado semi seca. Partida PT SUM 39, Cont. PONU 060898-0
- *Luga roja*, en estado semi seca, kappa-II seleccionada. Partida 9807, Quellón.
- *Nama*, en estado semi seca, kappa-II seleccionada. Partida 982825, Proveedor: Maria Ruiz Millalonco, Quellón.
- *Chamisoj*, en estado semi seca. Partida PSW 115, proveniente de Perú.

3.3 Materiales y equipos

- Hidróxido de Potasio (KOH) sólido en escamas al 90% p/p
- Ácido sulfúrico (H₂SO₄) 95 - 97% v/v p.a.
- Diatomita calcinada con fundente (CELITE 545)
- Isopropanol al 99 % v/v grado USP
- Cloruro de Potasio (KCl) grado alimenticio
- Cacao puro en polvo Hershey's o Barry's
- Baño termostático Memmert
- pH-metro ORION modelo 420
- Paño filtrante 100% polipropileno de espesor $0,6 \pm 0,06$ mm
- Estufa de secado Memmert
- Molino eléctrico
- Balanza digital de precisión $\pm 0,01$ gr
- Balanza analítica
- Viscosímetro rotacional Brookfield LV con husillos
- Analizador de textura TA XT2 con vástago de base plana de 1,0 cm de área
- Incubador de geles Precision Scientific
- Copa Krimko
- Material de laboratorio (pipeta graduada, pipeta automática, vaso precipitado, probetas, espátula, etc.)

3.4 Metodología de trabajo

Todos los extractos de carragenina fueron elaborados de acuerdo al procedimiento propuesto por GELYMAR (2005f) para la elaboración de los extractos de carragenina refinada κ-I / κ-II, mediante la tecnología de precipitación con alcohol a escala de laboratorio (ANEXO 2).

3.4.1 Tratamientos. En todos los tratamientos efectuados, se utilizó la especie de alga *cottoni*, como fuente de kappa-I, variando sólo la fuente de kappa-II. La proporción de los tipos de alga que se utilizó en los tres tratamientos fue de 1:1.

Tratamiento 1 (control). Fuente de carragenina κ-II: *Luga roja*

Tratamiento 2. Fuente de carragenina κ-II: *Nama*

Tratamiento 3. Fuente de carragenina κ-II: *Chamiso*.

3.4.2. Diseño experimental. En este estudio se realizó un diseño completamente aleatorizado. Este se esquematiza en el CUADRO 2.

CUADRO 2 Diseño experimental.

Ensayo		Factor	Respuesta estudiada
Tratamiento	Repeticiones		
1 al 3	5 repeticiones de cada tratamiento	Fuente de carragenina κ-II	Propiedades finales: Rendimiento, Viscosidad, Fuerza de Gel e Índice de leche

3.5 Métodos de análisis

Los análisis efectuados durante la realización del trabajo experimental, tuvieron como finalidad determinar ciertos parámetros de proceso a la materia prima y al proceso de elaboración, así como también, evaluar ciertas propiedades fisicoquímicas y reológicas de los extractos de carragenina elaborados.

3.5.1 Contenido de humedad. Se determinó la humedad de las algas de acuerdo al procedimiento descrito en GELYMAR (2005b) y se calculó el contenido según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ humedad} = \left(1 - \left(\frac{P3 - P1}{P2} \right) \right) * 100 \quad \text{Ec. (3.1)}$$

Donde:

P1= Peso bandeja sin muestra

P2= Peso muestra

P3= Peso muestra seca

3.5.2 Tipo de carragenina. La determinación del tipo de carragenina (kappa-II y lambda), se realizó mediante el método del Resorcinol, según GELYMAR (2005c). Para ello se tomó una submuestra representativa de alga y se determinó el tipo de carragenina a cada fronda. Esta prueba es de carácter cualitativo y los resultados se interpretaron de acuerdo al siguiente criterio:

- Coloración rojo-púrpura indica la presencia de carragenina kappa-II (gametofitos)
- Ausencia de color o una coloración muy débil indica presencia de carragenina lambda (esporofitos)

De acuerdo a los resultados obtenidos de la prueba se clasificaron las frondas en productoras de kappa-II y productoras de lambda, se pesaron, y luego se determinó el contenido de cada una de ellas según las siguientes fórmulas:

$$\% \text{ de alga productora de carragenina lambda} = \frac{P_l}{P_T} * 100 \quad \text{Ec. (3.2)}$$

$$\% \text{ de alga productora de carragenina kappa} = \frac{P_k}{P_T} * 100 \quad \text{Ec. (3.3)}$$

Donde:

P_L = Peso de algas productoras de carragenina lambda

P_K = Peso de algas productoras de carragenina kappa

P_T = Peso total de algas de la submuestra

Esta prueba se realizó sólo a la especie *Chamisoj*, debido a que sus frondas no pueden ser diferenciadas visualmente. El objetivo de esta prueba, fue conocer el contenido de lambda presente, ya que se utilizó la totalidad de alga (productoras de kappa-II y lambda), en los ensayos correspondientes al tratamiento T3. Las frondas de *Luga roja* y *Nama* que formaron parte del estudio, correspondían a "kappa-II seleccionada", es decir, fueron separadas en planta, en forma previa, las frondas productoras de carragenina kappa-II de las frondas productoras de lambda, ya que es posible notar diferencias entre ellas visualmente. Se siguió este procedimiento con el fin de simular lo que se realiza en planta.

3.5.3 Tratamiento alcalino. Esto se realizó con el fin de corroborar las condiciones de este tratamiento para los extractos estudiados, es decir, con una proporción de alga de 1:1, ya que esta mezcla no es procesada en planta. Se utilizaron algas del tratamiento control (*Cottoni / Luga roja*) y se realizaron tres ensayos para los extractos de carragenina en estudio. Se corroboró el tiempo óptimo a través de medición de la fuerza de gel en agua al 1,5%, de las muestras obtenidas a las 1, 2, 3, 4, 5, 6, y 7 horas de tratamiento alcalino, en donde el óptimo correspondió a los extractos con una fuerza de gel estable, es decir, sin aumento posterior. Este periodo fue el aplicado a los tres tratamientos, ya que al ser los mismos tipos de carragenina (κ -I y κ -II), y misma proporción de las algas utilizadas (1:1), tienen tiempos de tratamiento alcalino similares.

3.5.4 Propiedades finales de los extractos de carragenina.

Las propiedades evaluadas correspondieron a las principales propiedades reológicas y fisicoquímicas que poseen los extractos de carragenina κ -I / κ -II.

3.5.4.1 Rendimiento total de carragenina. Se determinó de acuerdo a lo descrito en GELYMAR (2005e), y se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{m_f}{m_i} * 100 \quad \text{Ec. (3.4)}$$

Donde:

m_f : peso final de la muestra obtenida en base seca

m_i : Peso inicial de la muestra utilizada en base seca

3.5.4.2 Viscosidad en agua al 1,5% a 75 °C. Se prepararon disoluciones en agua al 1,5% de carragenina. Se ajustó la temperatura de la disolución a 75 °C y se midió la viscosidad a 60 rpm, leyendo después de 15 segundos de inducida la rotación (GELYMAR, 2004a).

3.5.4.3 Viscosidad en agua al 2% + 0,2% KCl a 75 °C. Se prepararon disoluciones en agua al 2% de carragenina + 0,2% de KCl. Se ajustó la temperatura de la disolución a 75 °C y se midió la viscosidad a 60 rpm leyendo después de 15 segundos de inducida la rotación (GELYMAR, 2004b).

3.5.4.4 Fuerza de gel en agua al 1,5% a 20 °C. Se prepararon disoluciones de carragenina en agua al 1,5% y se dejaron gelificar a temperatura ambiente. Posteriormente, fueron almacenados en incubadora a 20 °C durante 18 – 24 h. El gel fue desmoldado e invertido y se verificó que la temperatura de éste se encuentre a 20 °C. Posteriormente, se efectuó la medición de la fuerza de gel y su deformación, previo

ajuste de la velocidad del vástago del texturímetro y la distancia a recorrer por éste, en 1,6 mm /s y 20 mm, respectivamente. La fuerza de gel de cada muestra corresponde a la máxima fuerza promedio obtenida después de una deformación de 20 mm (GELYMAR, 2001a).

3.5.4.5 Fuerza de gel en agua al 2% + 0,2% KCl a 25 °C. Se prepararon disoluciones en agua al 2% de carragenina + 0,2% de KCl. Estas se dejaron gelificar a temperatura ambiente y luego, fueron almacenadas en una incubadora a 20 °C, durante un periodo de 18 – 24 h. El gel fue desmoldado e invertido y se ajustó la temperatura de éste a 25 °C. Posteriormente, se efectuó la medición de la fuerza de gel y su deformación, previo ajuste de la velocidad del vástago del texturímetro y la distancia a recorrer por éste, en 1,6 mm /s y 20 mm, respectivamente. La fuerza de gel de cada muestra corresponde a la máxima fuerza promedio obtenida después de una deformación de 20 mm (GELYMAR, 2001b).

3.5.4.6 Índice de leche. Para la determinación del índice de leche, se prepararon muestras con leche estandarizada al 2% de materia grasa, azúcar, cacao y el extracto de carragenina correspondiente a los distintos tratamientos. Se colocaron en baño termostático a 80 °C durante 20 minutos, agitando cada 5 minutos para lograr la total disolución del cacao. Al cabo de este periodo, fueron retiradas del baño y enfriadas rápidamente hasta alcanzar una temperatura de 10 °C, para luego ser almacenadas durante 18 – 24 horas en refrigeración.

Se determinó el grado de decantación del cacao según el siguiente criterio:

- (1) No decanta cacao
- (2) Decantan pocas partículas de cacao
- (3) Decantan muchas partículas de cacao, pero no se observan manchas ni anillos
- (4) Se observan manchas o anillos tenues
- (5) Se observa un marcado anillo y/o mancha
- (6) El cacao se encuentra decantado, formando una capa

Luego de registrar el grado de decantación, las muestras fueron agitadas y se verificó que la temperatura de éstas se encuentre a 10 °C. Posteriormente, se determinó el tiempo de vaciado en una copa de inmersión, lo cual corresponde a la viscosidad de Zahn. Se calculó la concentración de carragenina por peso de leche (mg / L), que se requiere para producir una viscosidad de Zahn igual a un estándar, éste corresponde a 28,36 s. Esta cantidad de carragenina calculada corresponde al índice de leche (GELYMAR, 2005d).

3.5.5 Análisis estadístico. Los resultados de los análisis correspondientes a las diferentes propiedades finales evaluadas, se analizaron con las siguientes pruebas estadísticas:

- Análisis estadístico descriptivo de las pruebas reológicas y fisicoquímicas, correspondiente a las propiedades finales de los extractos obtenidos de cada tratamiento y sus repeticiones
- Test de homogeneidad de varianzas de Levene, para validar la aplicación del test de análisis de varianza
- Análisis de varianza de 1 vía para determinar si existen diferencias significativas a un nivel de confianza del 95% entre los tratamientos debido al cambio de fuente de carragenina κ -II
- Test de comparación múltiple, Test de Tukey (HSD) para identificar los tratamientos estadísticamente diferentes según la ANDEVA (p -valor $\leq 0,05$)

Para analizar los resultados se utilizó el software SPSS 13.0

4. PRESENTACION Y DISCUSION DE RESULTADOS

4.1 Materia prima utilizada para la elaboración de carragenina

Las algas utilizadas para la elaboración de carragenina, frecuentemente presentan una gran variabilidad composicional, por lo que a menudo se utilizan mezclas de algas para obtener extractos con las propiedades reológicas deseadas. Dentro de los controles que se efectúan a estas materias primas, se encuentran la separación y/o remoción de sales adheridas, arena, piedras u otros organismos de origen marino y la determinación del contenido de humedad del alga (FAO, 1987 y GELYMAR, 2005a).

Antes de realizar el proceso de extracción de carragenina, es fundamental la selección adecuada de la especie de alga a utilizar, y en el caso de las especies del género *Gigartina*, que producen dos tipos de carragenina (κ -II y λ), la identificación de las frondas, ya que estas materias primas siguen diferentes líneas de proceso, y por ende, a partir de éstas se obtienen productos con propiedades diferentes. La fácil diferenciación e identificación de las frondas en las distintas fases reproductivas de las especies de algas *Luga roja* y *Nama*, a diferencia de lo que ocurre con la especie *Chamiso*, resulta ventajosa para el posterior procesamiento de éstas (WHISTLER y BeMILLER, 1993 y GELYMAR, 2005c).

Los resultados de la prueba de determinación de frondas productoras de carragenina κ -II y λ en la especie *Chamiso*, a través del método del resorcinol, se muestran en el CUADRO 3.

CUADRO 3 Contenido de frondas productoras de carragenina kappa-II y lambda encontrados en el alga *Chondracanthus chamissoi*.

Ensayo	Contenido de carragenina κ -II (%)	Contenido de carragenina λ (%)
1	70,83	29,17
2	87,50	12,50
3	83,33	16,67
4	83,33	16,67
5	79,17	20,83
Promedio	80,83 ± 6,32	19,17 ± 6,32

De acuerdo a lo expuesto en el CUADRO 3, el alga *Chamiso* resultó tener un contenido mayoritario de frondas productoras de carragenina κ -II, en los cinco ensayos realizados. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por BULBOA y MACCHIAVELLO (2001) y RIOFRÍO (2003), quienes encontraron que esta especie de alga, tiene abundancia y/o dominio de gametofitos en diferentes épocas el año, debido

principalmente a la mayor capacidad reproductiva y fisiológica en esta fase. Los gametofitos están asociados a una mayor producción o síntesis de carragenina κ -II.

El predominio natural de frondas en estado gametofítico, se presenta también en otras especies de la familia *Gigartinales*, cuyos contenidos específicos en cada una de estas algas pueden variar acorde a la época del año. FALSHAW *et al.* (2001), estimaron un contenido de 79% de frondas gametofíticas para *Luga roja*, y de un 83% para *Nama*, cuyos valores pueden ser considerados cercanos a los rangos señalados por GELYMAR (2005f), los cuales varían entre un 80 a 90% para *Luga roja* y entre un 70 a 95% para *Nama*, por lo que ambas especies de algas presentan un contenido de κ -II similar al encontrado en *Chamiso* en este estudio.

4.2 Evaluación del tratamiento alcalino

Dada la baja capacidad de gelificación de los extractos de carragenina nativa, las algas utilizadas como materia prima para la elaboración de carragenina comercial, son tratadas con una solución alcalina a alta temperatura durante un tiempo determinado, según el tipo de carragenina, para lograr la formación del anillo 3,6 AG, responsable de la capacidad de gelificación de la carragenina (CIANCIA *et al.*, 1993, WHISTLER y BeMILLER, 1993 y HOFFMANN *et al.*, 1995).

En la FIGURA 8 se muestran las curvas de tratamiento alcalino de cada ensayo realizado. Los resultados promedios de la fuerza de gel y su deformación, de los extractos de carragenina obtenidos en los diferentes tiempos de tratamiento alcalino estudiados, se muestran en detalle en el ANEXO 1.

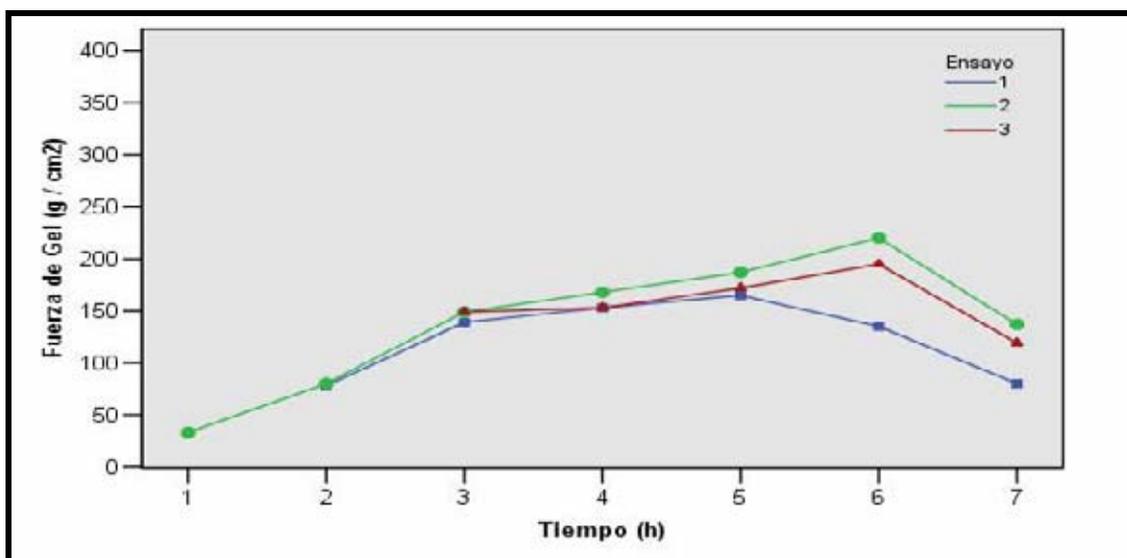


FIGURA 8 Comportamiento de la fuerza de gel en agua al 1,5% para distintos tiempos de tratamiento alcalino.

Como se aprecia en la FIGURA 8, en los diferentes ensayos realizados hubo un aumento en la fuerza de gel durante las primeras horas, hasta llegar a valores relativamente estables entre las cuatro y cinco horas. Esto se debe a que bajo estas condiciones de tratamiento, las moléculas de galactosa-6 sulfato y galactosa 2,6 disulfato, forman las unidades de 3,6 AG, convirtiendo las unidades precursoras de carragenina nativa μ y ν en carragenina κ -I e iota respectivamente. Estos cambios producidos en la conformación de las moléculas de carragenina permiten la formación del gel bajo las condiciones de solvente apropiadas (CIANCIA *et al.*, 1993; WHISTLER y BeMILLER, 1993; VAN de VELDE *et al.*, 2001 y GELYMAR, 2005a).

Por otro lado, se observó una fuerte disminución en la fuerza de gel de los extractos de carragenina con un tratamiento de siete horas, lo cual se debe según CIANCIA *et al.* (1997) y VIANA *et al.* (2004) a que los tratamientos alcalinos prolongados, así como también, la utilización de soluciones con una alta concentración de álcali, hidrolizan los polímeros de carragenina, provocando la disminución en la capacidad de gelificación de ésta.

De acuerdo a los ensayos realizados, se corroboró que el tiempo óptimo de tratamiento para los extractos en estudio, es de cinco horas, al igual que para extractos κ -I / κ -II similares elaborados en planta, es decir, los mismos tipos de algas, y por ende, de carrageninas en la mezcla, pero con distinta proporción (GELYMAR 2004f). Las cinco horas de tratamiento se consideraron óptimas, ya que fue posible obtener carragenina con altos valores de fuerza de gel, maximizando así la capacidad de gelificación de ésta, sin riesgos de que se produzca la hidrólisis de las moléculas de carragenina, con la consecuencia de una caída en esta propiedad reológica (FALSHAW *et al.*, 2001). Este tiempo óptimo de tratamiento alcalino, fue el aplicado posteriormente en los tres tratamientos que formaron parte de este estudio.

4.3 Evaluación del rendimiento total de carragenina

El contenido de carragenina que se logra extraer de las algas, es de gran importancia desde el punto de vista comercial, por ende, tiene directa relación con el valor económico de estas materias primas (IMR International, 1999; BUSCHMANN *et al.*, 2001 y ZAMORANO, 2004). De acuerdo a los resultados de este estudio, el valor promedio del rendimiento total de carragenina (materia seca de carragenina / materia seca de alga), obtenido en el tratamiento T1 fue de un 41%, mientras que en los tratamientos T2 y T3 se obtuvo un rendimiento de 38 y 31% respectivamente, los cuales corresponden a valores que normalmente se encuentran en extractos de carragenina κ -I / κ -II similares (GELYMAR, 2005e).

Cabe señalar, que el contenido de carragenina lambda que poseen los extractos de carragenina correspondientes al tratamiento T3, no interfiere en la determinación del rendimiento total, ya que en éste y en todos los tratamientos realizados, se utilizó la tecnología de precipitación con isopropanol, mediante el cual precipitó toda la carragenina presente en disolución (WHISTLER y BeMILLER, 1993 y GELYMAR, 2005a).

En la FIGURA 9 se ilustra el rendimiento total promedio de los extractos de carragenina obtenido en los tres tratamientos realizados. Los valores del rendimiento de carragenina obtenido en cada tratamiento y sus repeticiones se muestran en detalle en el ANEXO 4.

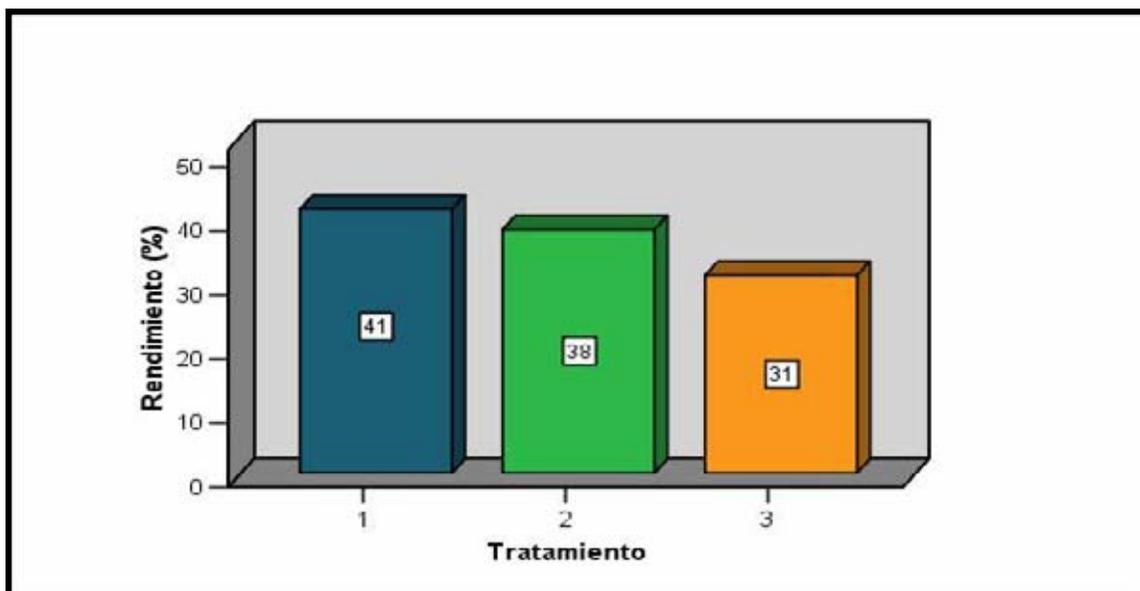


FIGURA 9 Rendimiento total de carragenina.

El análisis estadístico arrojó diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre los tres tratamientos y según el test de comparación múltiple Tukey (HSD), el tratamiento T1 (*Cottoni / Luga roja*), posee un rendimiento de carragenina significativamente mayor, mientras que el tratamiento T3 (*Cottoni / Chamiso*) un rendimiento significativamente inferior al resto de los tratamientos (ANEXO 5). Estos resultados concuerdan con los estudios realizados por ÁVILA *et al.* (1999) y BUSCHMANN *et al.* (2001), quienes sostienen que *Luga roja* es una de las algas de aguas frías de mayor importancia comercial debido precisamente a que posee un alto contenido de carragenina.

Según lo señalado por BULBOA y MAQUIAVELLO (2001) y RIOFRÍO (2003), las diferencias en el rendimiento total de carragenina encontradas entre tratamientos, son atribuibles principalmente a la capacidad de síntesis de este hidrocoloide que posee cada especie de alga, lo que a su vez depende en gran parte, del estado de madurez de las frondas, de ciertos factores ambientales tales como temperatura, nutrientes y luz entre otros y de características propias de cada especie de alga.

4.4 Determinación de las propiedades reológicas de los extractos de carragenina

Las carrageninas son consideradas uno de los mayores ingredientes texturizantes utilizados en diversas aplicaciones alimentarias, por lo que sus propiedades reológicas

son de gran importancia y constituyen el principal interés para la obtención de nuevos extractos de carragenina que maximicen y/o combinen estas propiedades (WHISTLER y BeMILLER, 1993 y VILLANUEVA *et al.*, 2004).

4.4.1 Viscosidad. La carragenina κ -I no se caracteriza por producir soluciones de alta viscosidad, debido principalmente a que poseen un bajo contenido de grupos sulfato, sin embargo, las soluciones de carragenina κ -II presentan una mayor viscosidad, dado su mayor peso molecular. Mediante la combinación de ambos tipos de carragenina, como también, dependiendo del tipo de tratamiento alcalino utilizado durante el proceso de elaboración, es posible obtener soluciones con variados grados de viscosidad (WHISTLER y BeMILLER, 1993; IMR International, 1999 y GELYMAR, 2005a).

En este estudio se evaluó la viscosidad en agua en disoluciones al 1,5% y al 2% + 0,2% KCl, de los diferentes extractos de carragenina κ -I / κ -II, cuyo comportamiento se puede observar en la FIGURA 10. Los resultados de la viscosidad obtenida para ambas disoluciones en cada tratamiento y sus repeticiones aparecen en detalle en el ANEXO 6.

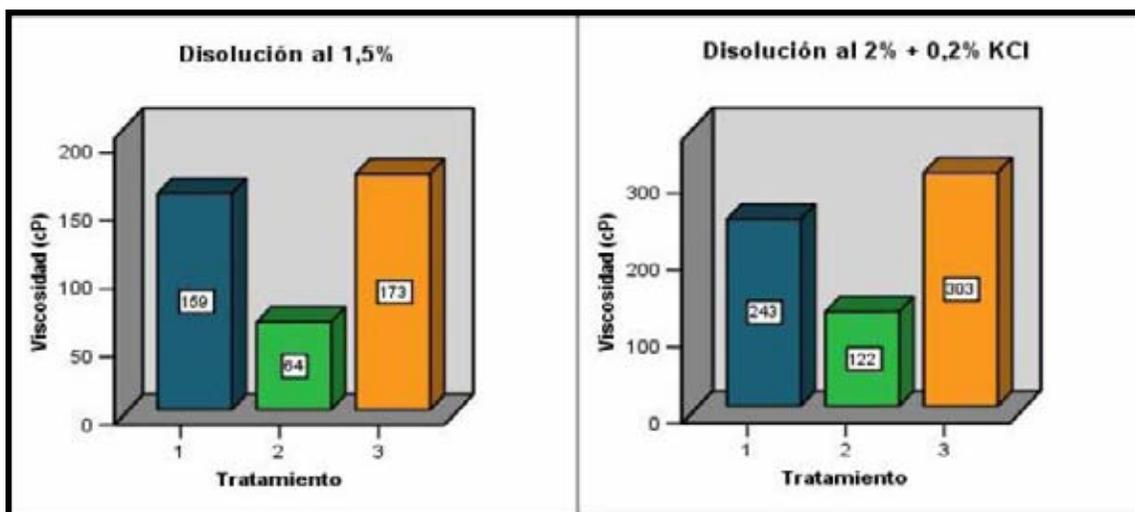


FIGURA 10 Viscosidad en agua a 75 °C para disoluciones de carragenina al 1,5% y al 2% + 0,2% de KCl.

Los valores de viscosidad obtenidos en ambas disoluciones varían entre tratamientos, sin embargo, en los tres tratamientos realizados, la viscosidad de la disolución en agua al 1,5% supera los 50 cP, que es el valor mínimo que se requiere de acuerdo a las especificaciones, para extractos de carragenina κ -I / κ -II similares (GELYMAR, 2005a).

La adición de KCl incrementó considerablemente la viscosidad de las disoluciones en cada uno de los tratamientos. Según lo señalado por NICKERSON *et al.* (2004), las

sales de potasio al poseer la capacidad de interactuar con las carrageninas κ -I y κ -II, inducen una conformación más ordenada de las cadenas de estos polímeros, con lo cual se promueve la gelificación y de esta forma, se genera una mayor resistencia al fluido. No obstante, el análisis con KCl constituye también una forma de estandarizar el nivel de cenizas en las disoluciones y por consiguiente, observar su comportamiento en un sistema saturado y se espera que la viscosidad exhibida en esta disolución, tenga la misma tendencia que la viscosidad en agua (GELYMAR, 2004b).

De acuerdo a lo señalado en los ANEXOS 7 y 8, el análisis estadístico de los datos arrojó diferencias significativas entre tratamientos ($p \leq 0,05$), siendo la viscosidad de las disoluciones correspondientes al tratamiento T2, de acuerdo al test de comparación múltiple Tukey (HSD), significativamente más baja que el resto de los tratamientos, lo cual concuerda con los antecedentes señalados por GELYMAR (2005f), que indican que la carragenina κ -II extraída de *Nama* produce disoluciones de baja viscosidad comparada con *Luga roja* y *Chamiso*, mientras que el tratamiento T3, a pesar de la presencia de carragenina lambda, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas con el tratamiento control T1. Este comportamiento de la viscosidad se observó de igual forma en la disolución al 1,5% y en la disolución al 2% + 0,2% KCl, lo cual es consistente con lo señalado anteriormente (GELYMAR, 2004b).

Según VAN de VALDE **et al.** (2001); FALSHAW **et al.** (2003); VILLANUEVA **et al.** (2004) y VAN de VALDE **et al.** (2005), las propiedades reológicas de las carrageninas son determinadas por la composición y estructura química de éstas. Algunas investigaciones relacionadas fueron llevadas a cabo por VAN de VALDE **et al.** (2001) y VILLANUEVA **et al.** (2004). Estos autores estudiaron la estructura química de la carragenina κ -II extraída de algunas especies de algas y concluyeron que este polímero híbrido se compone de unidades de carragenina κ -I e iota dentro de una misma cadena, por lo cual sus propiedades reológicas difieren ampliamente de las de una mezcla elaborada, compuesta de carrageninas κ -I e iota.

Las diferencias en la viscosidad, encontradas entre tratamientos, es probable que tengan relación con la naturaleza de la hibridación κ -I/ I en las cadenas de la carragenina κ -II que sintetizan las especies de algas *Luga roja*, *Nama* y *Chamiso*, ya que al ser polímeros híbridos, existen múltiples posibilidades de ordenamiento conformacional, como también, con el peso molecular de éstas, el cual de acuerdo a la literatura, puede presentar grandes variaciones entre especies y se espera que a medida que estos polímeros tengan un mayor peso molecular, la viscosidad que imparten también sea mayor (VILLANUEVA **et al.**, 2004; VAN de VELDE **et al.**, 2005 y GELYMAR, 2005f).

4.4.2 Fuerza de Gel. A diferencia de lo que ocurre con la viscosidad, las carrageninas κ -I y κ -II con un adecuado tratamiento alcalino, se caracterizan por tener una gran capacidad de gelificación, asociada al alto contenido de unidades de 3,6 AG que poseen en su estructura, es por ello, que la fuerza de gel constituye una de las

principales propiedades reológicas de estos extractos (WHISTLER y BeMILLER, 1993 y GELYMAR, 2005a).

Los resultados de las mediciones efectuadas a los geles de carragenina tanto para la disolución al 1,5% como para la disolución al 2% + 0,2% de KCl de cada tratamiento y sus respectivas repeticiones, se encuentran detalladas en el ANEXO 9.

En la FIGURA 11 se muestra el comportamiento de la fuerza de gel y su deformación, en los diferentes tratamientos estudiados. En ella, es posible observar claramente que esta propiedad reológica mostró una tendencia similar en ambas disoluciones, variando ampliamente entre tratamientos. La fuerza de gel fue notoriamente más alta en los geles con adición de KCl, sin embargo, la deformación de éstos disminuyó en forma considerable.

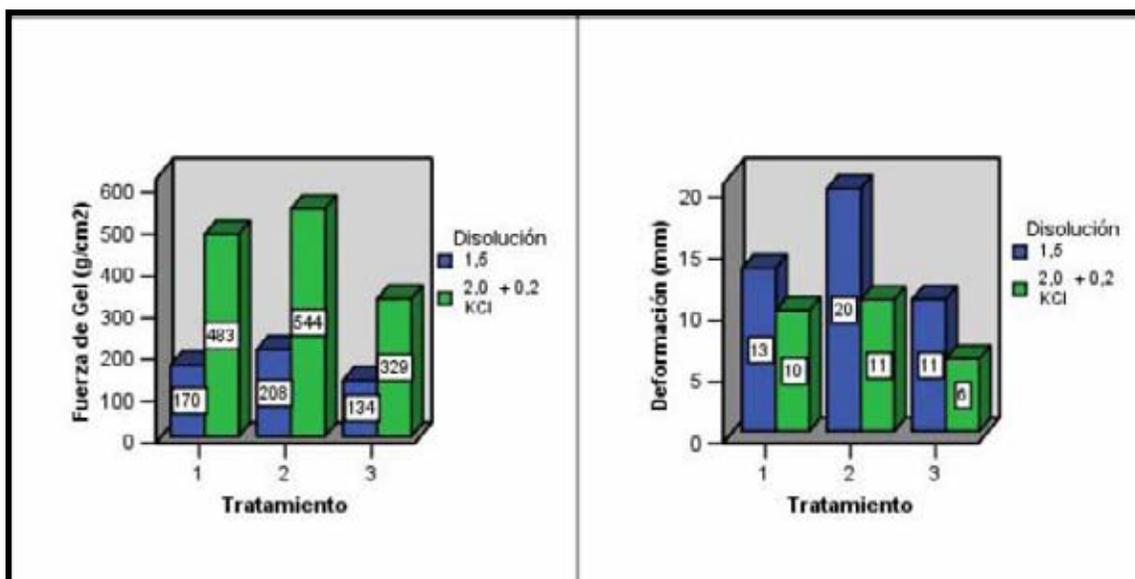


FIGURA 11 Fuerza de gel y su deformación para disoluciones de carragenina en agua al 1,5% y al 2% + 0,2% de KCl.

El notorio incremento de la fuerza de gel en la disolución al 2% + 0,2% KCl con respecto a la disolución al 1,5%, se debe, en parte a que la disolución con KCl se encuentra levemente más concentrada, no obstante, principalmente es el resultado de las interacciones entre los iones potasio y las carrageninas κ-I y κ-II, específicamente a través de los grupos sulfatos presentes en las unidades de galactosa y de las fuerzas de atracción electrostáticas con los residuos de 3,6 AG. Estas interacciones producidas inducen el proceso de transición de las cadenas de los polímeros desde un estado desordenado aleatoriamente (estado de sol) a un estado en donde las cadenas se ordenan formando dobles hélices (estado de gel), como también, promueve la agregación de estas cadenas. Estos cambios producidos, implican la obtención de un

gel mucho más firme pero a la vez con menor elasticidad (WHISTLER y BeMILLER, 1993; CHEN *et al.*, 2002; NICKERSON *et al.*, 2004 y MANGIONE *et al.*, 2005).

En la FIGURA 12 se muestran los geles de carragenina en agua al 1,5% y al 2% + 0,2% KCl correspondientes a cada uno de los tratamientos realizados, en los cuales es posible notar la mayor firmeza y menor elasticidad de los geles con adición de KCl.

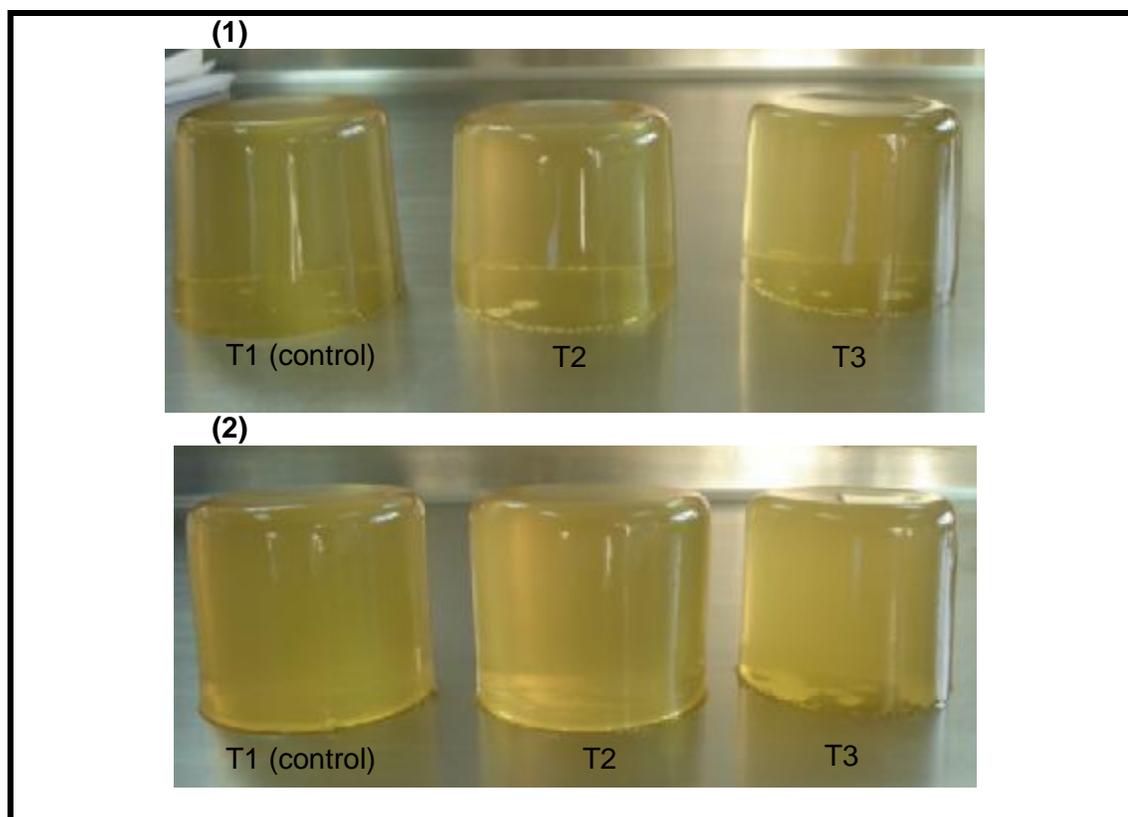


FIGURA 12 Geles de carragenina en agua. (1) Disolución al 1,5%; (2) Disolución al 2% + 0,2% KCl.

El análisis estadístico de la fuerza de gel y su deformación en agua al 1,5% de carragenina, arrojó diferencias significativas entre tratamientos ($p \leq 0,05$), y de acuerdo al test de comparación múltiple Tukey (HSD), el tratamiento T2 obtuvo una fuerza de gel significativamente más alta que el resto de los tratamientos y el tratamiento T3, valores de fuerza de gel significativamente inferiores (ANEXO 10 y 11).

Los resultados obtenidos para los geles en agua al 2% + 0,2% KCl, también indican que existen diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$), sin embargo, el test de comparación múltiple Tukey (HSD), indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos T1 y T2, sólo el tratamiento T3

obtuvo una fuerza de gel y deformación significativamente inferior al resto de los tratamientos (ANEXO 12 y 13).

Normalmente, en el análisis de fuerza de gel, al igual que en la medición de viscosidad, los resultados de ambas disoluciones de carragenina siguen la misma tendencia, observándose siempre una mayor capacidad de gelificación en los geles con KCl. Las distintas tendencias obtenidas en los resultados de las disoluciones al 1,5% y al 2% + 0,2% pueden ser explicadas por las diferencias en el contenido de cenizas de los extractos. Usualmente, altos niveles de cenizas son asociados a una etapa de repulpado deficiente durante el proceso de elaboración, lo cual puede interferir en la medición de la fuerza de gel, tendiendo a aumentar su valor (GELYMAR, 2001b). De acuerdo al análisis de determinación del contenido de cenizas que se muestra en el ANEXO 16, los extractos de carragenina correspondientes al tratamiento T1 poseen un nivel promedio de cenizas de 31%, en tanto que este valor es de 33% en el tratamiento T2 y de 30% en el tratamiento T3, por lo que los resultados del análisis de fuerza de gel con KCl se consideran más representativos, ya que estos niveles de cenizas se encuentran estandarizados.

FALSHAW **et al.** (2001); VILLANUEVA **et al.** (2004) y VAN de VELDE **et al.** (2005), señalan que la fuerza de los geles de carragenina κ-II, es proporcional al contenido molar de carragenina κ-I que ésta posea. Estudios realizados por FALSHAW **et al.** (2001) y VAN de VELDE **et al.** (2005), acerca de la estructura y propiedades de la carragenina κ-II sintetizada por distintas especies de algas, señalan que *Luga roja* tiene un porcentaje molar de carragenina κ-I de aproximadamente un 62%, superando levemente a *Nama*, que se estima que posee un 57% y que además, la razón κ-I / I en éstas y otras especies de algas que sintetizan carragenina κ-II, es independiente de factores estacionales, tales como la época del año y el lugar de cosecha, lo que no es consistente con los resultados de la fuerza de gel al 1,5% obtenidos en este estudio, ya que los valores obtenidos en el tratamiento 2 (*Cottoni* / *S. Nama*), fueron significativamente superiores al tratamiento T1 (*Cottoni* / *Luga roja*), sin embargo, en la fuerza de gel al 2% + 0,2% KCl, no se encontraron diferencias entre estos tratamientos, lo cual según lo señalado anteriormente, es un análisis más representativo, ya que en éste se encuentra estandarizado el nivel de cenizas.

De acuerdo a los antecedentes de GELYMAR (2005f), las diferencias en la fuerza de gel de los extractos, son atribuibles más bien, a la naturaleza de la hibridación κ-I / κ-II que poseen los extractos de carragenina de cada una de las especies estudiadas, cuya conformación exacta de cada uno de estos polímeros es aun desconocida (VILLANUEVA **et al.**, 2004; VAN de VELDE **et al.**, 2005 y GELYMAR, 2005f).

Los bajos valores de fuerza de gel y su respectiva deformación encontrados en el tratamiento T3, pueden ser atribuidos además de lo expuesto anteriormente, a la proporción de carragenina lambda presente en estos extractos. Este tipo de carragenina al carecer del anillo 3,6 AG en su estructura, no posee la capacidad de gelificación, por lo que su presencia en los extractos correspondientes al tratamiento

T3 contribuye a la pérdida de firmeza en estos geles (WHISTLER y BeMILLER, 1993 y GELYMAR, 2005a).

4.4.3 Índice de leche. La propiedad única que poseen las carrageninas, especialmente la carragenina κ -II, de reaccionar con las proteínas de la leche por atracción electrostática, genera una red que aporta estabilidad al sistema, lo cual sumado a la formación de un gel débil e imperceptible al tacto, permiten suspender partículas a concentraciones de carragenina muy bajas. La capacidad de estabilizar partículas en suspensión, también es influenciada por la viscosidad, ya que en un comienzo, es decir, antes de que se forme la estructura del gel, el aumento de la viscosidad del sistema permite que la decantación de partículas se produzca más lentamente (DROHAN *et al.*, 1997; LANGENDORFF *et al.*, 1997; FENNEMA, 2000; ROOD *et al.*, 2000 y GELYMAR, 2005d).

La capacidad de los diferentes extractos de carragenina de suspender partículas de cacao en leche, fue evaluada a través de lo que se conoce comercialmente como índice de leche. Esta propiedad se define específicamente, como la concentración de carragenina necesaria para producir una viscosidad de Zahn igual a un estándar, la cual se relaciona a su vez con el grado de decantación del cacao (GELYMAR, 2005d). Los resultados de este análisis efectuado a los tratamientos se muestran en detalle en el ANEXO 14.

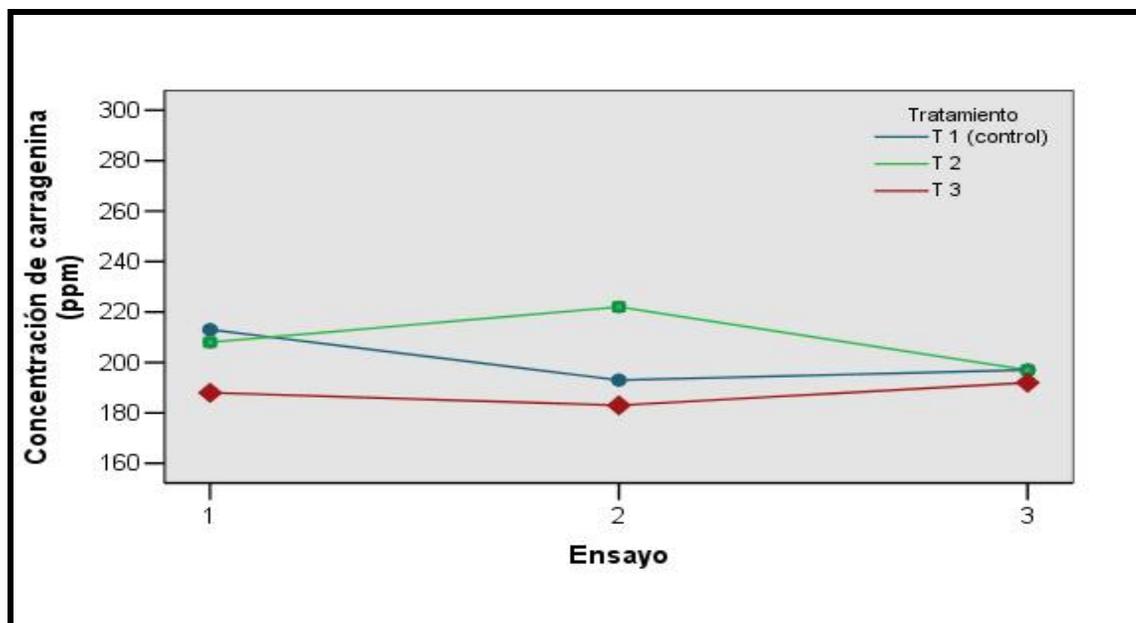


FIGURA 13 Índice de leche.

De acuerdo a los resultados, la concentración de carragenina promedio calculada para el tratamiento T1 fue de 201 ppm, en tanto que para el tratamiento T2 fue de 209 ppm

y para el tratamiento T3 de 188 ppm. Según las especificaciones establecidas para esta propiedad reológica en extractos de carragenina κ -I / κ -II similares, la concentración requerida de este hidocoloide debe fluctuar entre 190 a 250 ppm aproximadamente, por lo que los resultados obtenidos en este estudio se encuentran ampliamente dentro del rango de aceptación (GELYMAR, 2005a). En la FIGURA 13 se ilustra el índice de leche observado en los diferentes tratamientos y ensayos realizados.

De acuerdo al análisis estadístico de los datos que se encuentra en el ANEXO 15, no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos, con un 95% de confianza ($p \geq 0,05$). Como se ha mencionado anteriormente, el índice de leche depende de una combinación de varios factores, entre los que se encuentra la viscosidad y fuerza de gel exhibida por los extractos de carragenina, sin embargo, el hecho de que estas propiedades difieran significativamente entre tratamientos no implica necesariamente que existan diferencias en el índice de leche obtenido (VILLANUEVA **et al.**, 2004 y GELYMAR, 2005d).

DROHAN **et al.** (1997); LANGENDORFF **et al.** (1997) y ROOD **et al.** (2000), sostienen que la reactividad específica entre la carragenina y las proteínas de la leche, se debe específicamente a la interacción entre los grupos sulfatos cargados negativamente y la fracción positiva de las micelas de κ -caseína y a la presencia de iones calcio, que actúan como puentes electroestáticos entre ambas moléculas, por lo que los resultados del índice de leche obtenidos en este estudio, se atribuyen principalmente a que los extractos de carragenina κ -II de las diferentes algas analizadas, poseen una capacidad de interacción similar con las proteínas de la leche.

5. CONCLUSIONES

De acuerdo a los objetivos planteados en este estudio y de los resultados obtenidos, se desprenden las siguientes conclusiones:

- La fuente botánica de las algas que sintetizan extractos de carragenina κ -II, influyó significativamente en el rendimiento total de carragenina, siendo significativamente superior en los extractos T1 (*Luga roja*) que el obtenido en los extractos T2 (*Nama*) y T3 (*Chamiso*). Las diferencias en el rendimiento total son atribuidas a la capacidad de síntesis que posee cada especie de alga, asociado al estado de madurez de las frondas y a factores ambientales.
- La viscosidad en agua de las disoluciones correspondientes al tratamiento T2 fue significativamente inferior a la de los tratamientos T1 y T3 tanto para la disolución al 1,5% como al 2% + 0,2% KCl, debido a la naturaleza de la hibridación κ -I / I en las cadenas de la carragenina κ -II, que sintetizan las especies de algas *Luga roja*, *Nama* y *Chamiso*, como también al peso molecular de estos polímeros.
- La variación de la fuente de carragenina κ -II influyó en forma significativa en la fuerza de gel y su deformación en agua, siendo el tratamiento T1 estadísticamente diferente a T2 y T3 en la disolución 1,5%, mientras que al 2% + 0,2% KCl no se observaron diferencias entre T1 y T2, siendo ambos significativamente superiores a T3, lo cual es atribuido a la naturaleza de la hibridación κ -I / I de los extractos que sintetizan las diferentes especies de algas estudiadas.
- No se observaron diferencias en el índice de leche de los diferentes extractos de carragenina κ -I / κ -II, por lo que se concluye que la capacidad de interacción con las proteínas de la leche es similar entre la carragenina κ -II extraída de los diferentes especies de algas.

6. RESUMEN

ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS PROPIEDADES FINALES DE EXTRACTOS DE CARRAGENINA κ -I / κ -II UTILIZANDO DISTINTAS ALGAS PRODUCTORAS DE CARRAGENINA κ -II

La finalidad de este estudio fue comparar las propiedades fisicoquímicas y reológicas de extractos de carragenina κ -I / κ -II, elaborados con distintas algas productoras de κ -II. Las propiedades estudiadas fueron rendimiento total, viscosidad y fuerza de gel en agua y en medios con alta concentración de KCl e índice de leche. Los tratamientos corresponden a un control (T1), elaborado con *Kappaphycus alvarezii* como fuente de carragenina κ -I y *Gigartina skottsbergii* como fuente de carragenina κ -II. *Sarcothalia crispata* y *Chondracanthus chamissoi*, reemplazaron a *Gigartina skottsbergii* en los tratamientos T2 y T3, respectivamente, usando una proporción 1:1 de cada tipo de alga en todos los tratamientos. La fuente botánica de las algas que sintetizan carragenina κ -II, influyó significativamente en el rendimiento total de carragenina, asociado a la capacidad de síntesis que posee cada especie de alga, siendo el rendimiento observado en T1, significativamente superior al obtenido en T2 y T3. No se observaron diferencias entre la viscosidad de T3 y T1, mientras que la viscosidad observada en T2 fue significativamente menor comparada con T1, tanto para la disolución en agua como para la disolución con KCl. La fuerza de gel y su deformación en agua, fue estadísticamente diferente en todos los tratamientos; no se observaron diferencias en la fuerza de gel y su deformación con KCl entre T1 y T2, siendo ambos significativamente mayores comparados con T3. Las diferencias encontradas en estas propiedades reológicas, son atribuidas a la naturaleza de la hibridación κ -I / I en las cadenas de la carragenina κ -II. La variación de la fuente de κ -II, no influyó significativamente en el índice de leche, por lo que reactividad específica con las proteínas de la leche, es similar entre los extractos de κ -II que sintetizan las diferentes especies de algas estudiadas.

Palabras claves: carragenina κ -II; propiedades reológicas; *Gigartina skottsbergii*; *Sarcothalia crispata*; *Chondracanthus chamissoi*

SUMMARY

COMPARATIVE STUDY OF FINAL PROPERTIES OF κ -I / κ -II CARRAGEENAN EXTRACTS USING DIFFERENT SEAWEED PRODUCING κ -II CARRAGEENAN

The aim of this study was to compare the physical-chemical and rheology properties of κ -I / κ -II carrageenan extracts manufactured with different seaweed sources producing κ -II carrageenan. Properties studied were total yield, water viscosity and water gel strength, viscosity and gel strength in dissolutions with high KCl concentration and milk index. Treatments responses to a control (T1), manufactured with *Kappaphycus alvarezii* like source of κ -I carrageenan and *Gigartina skottsbergii* like source of κ -II carrageenan. *Sarcothalia crispata* and *Chondracanthus chamissoi*, replaced to *Gigartina skottsbergii* in T2 and T3 respectively, using a proportion of 1:1 of each type of seaweed in all treatments. Botanical sources of seaweeds producing κ -II carrageenan influenced significantly in total yield of carrageenan, associated to synthesis capability of each type of seaweed, being the observed yield significantly higher in T1 compared with T2 and T3. No differences observed in viscosity of T3 respect to T1, while viscosity observed in T2 was significantly lower compared with T1 in both dissolutions. Gel strength and deformation to 1,5% was statistically different between all treatments; no differences were observed in gel strength and deformation with KCl between T2 and T1, being both significantly higher compared with T3. Observed differences in these rheological properties are attributable to the κ -I / κ -II hybridization in the κ -II carrageenan chains. The κ -II source variation in carrageenan extracts, not influenced significantly in the milk index, therefore the specific reactivity with the milk protein, is resembling between the κ -II carrageenan extracted of different species of seaweeds studied.

Keywords: κ -II carrageenan; rheological properties; *Gigartina skottsbergii*; *Sarcothalia crispata*; *Chondracanthus chamissoi*

7. BIBLIOGRAFIA

- ÁVILA, M.; CANDIA, A.; NUÑEZ, M. y ROMO, H. 1999. Reproductive biology of *Gigartina skottsbergii* (Gigartinaceae, Rhodophyta) from Chile. *Hydrobiologia*. 326/327: 253-258.
- BULBOA, C. y MACCHIAVELLO, J. 2001. The effects of light and temperature on different phases of the life cycle in the carrageenan producing alga *Chondracanthus chamissoi*. (Rhodophyta, Gigartinales). *Botánica Marina*. 44: 371-374.
- BUSCHMANN, A.; CORREA, J.; WESTERMEIER, R.; HERNANDEZ, M. y NORAMBUENA, G. 2001. Red algal farming in Chile: a review. *Aquaculture*. 194: 203-220.
- CHEN, Y.; LIAO, M. y DUNSTAN, D. 2002. The rheology of K⁺ - κ-carrageenan as a weak gel. *Carbohydrate Polymers*. 50 (2): 109-116.
- CHILE. SERVICIO NACIONAL DE PESCA, SERNAPECA. 2005. Anuarios estadísticos. (on line) <<http://www.sernapesca.cl>>. (16 junio 2005).
- CIANCIA, M; MATULEWICZ, M. y CEREZO, A. 1997. Alkaline modification of carrageenans. Part III. Use of mild alkaline media and high ionic strengths. *Carbohydrate Polymers*. 32(3-4): 293-295.
- CIANCIA, M.; NOSEDA, M.; MATULEWICZ, M. y CEREZO, A. 1993. Alkali-modification of carrageenan: mechanism and kinetics in the kappa/iota, mu/nu and lambda series. *Carbohydrate Polymers*. 20:95-98
- DROHAN, D.; TZIBOULA, A.; Mc NULTY, D. y HORNE, D. 1997. Milk protein carrageenan interactions. *Food Hydrocolloids*. 11 (1): 101-107
- ESTEVEZ, J.; CIANCIA, M. y CEREZO, A. 2000. The system of low molecular weight carrageenan and agaroids from the room temperature extracted fraction of *Kappaphycus alvarezii*. *Carbohydrate Research*. 325: 287-299.
- ESTEVEZ, J.; CIANCIA, M. y CEREZO, A. 2002. Carrageenan biosynthesized by carposporophytes of red seaweeds *Gigartina skottsbergii* (Gigartinaceae) and *Gymnogondrus torulosus* (Phylloporaceae). *Journal of Phycology*. 38: 344-350
- FALSHAW, R.; BIXLER, H.; JOHNDRO, K. 2001. Structure and performance of commercial kappa-2 carrageenan extracts I. Structure analysis. *Food Hydrocolloids*. 15: 441-452.
- FALSHAW, R.; BIXLER, H. y JOHNDRO, K. 2003. Structure and performance of comercial κ-II carrageenan extracts. Part III. Structure analysis and performance in two dairy applications of extracts from the New Zeland red seaweed, *Gigartina atropurpurea*. *Food Hydrocolloids*. 17: 129-139.
- FENNEMA, O. 2000. Química de los Alimentos. Ed. Acribia S. A. Zaragoza. España. 1095 p.
- FOOD AGRICULTURAL ORGANIZATION, FAO, 1987. Production and Utilization of Products from Commercial Seaweeds. Roma. FAO FISHERIES TECHNICAL PAPER 288
- GELYMAR. 2005a. Carrageninas. (Disponible en: www.gelymar.com).
- GELYMAR. 2005b. Determinación de humedad e impurezas en algas. GEL-AF-010. Versión 01. Manual de métodos fisicoquímicos.

- GELYMAR. 2005c. Determinación cualitativa de carragenina Kappa en algas. Método Resorcinol. GEL-AQ-013. Versión 01. Manual de métodos químicos.
- GELYMAR. 2005d. Índice de leche. GEL-AR-021. Versión 01. Manual de métodos reológicos.
- GELYMAR. 2005e. Determinación de rendimiento en carrageninas. GEL-AQ-020. Versión 01. Manual de métodos químicos.
- GELYMAR. 2005f. Memoria Anual Innovación.
- GELYMAR. 2004a. Viscosidad en agua al 1,5% a 75 °C. GEL-AR-001. Versión 02. Manual de métodos reológicos.
- GELYMAR. 2004b. Viscosidad en agua al 2% + 0,2% KCl a 75 °C. GEL-AR-002. Versión 02. Manual de métodos reológicos.
- GELYMAR. 2002. Carragenina; extracción y aplicaciones. 15 p.
- GELYMAR. 2001a. Fuerza de gel en agua al 1,5% a 20 °C. GEL-AR-009. Versión 05. Manual de métodos reológicos.
- GELYMAR. 2001b. Fuerza de gel en agua al 2% + 0,2% KCl a 25 °C. GEL-AR-010. Versión 05. Manual de métodos reológicos.
- GLICKSMAN, M. 1969. Gum technology in the food industry. Ed. Academic. New York. EE.UU. 590 p.
- GONZALEZ, J. y MENESES, I. 1996. Differences in the early stages of development of gametophytes and tetrasporophytes of *Chondracanthus chamissoi* (C.Ag.) Kützing from Puerto Aldea, northern Chile. *Aquaculture*. 143:91-107.
- HOFFMANN, R.; GIDLEY, M.; COOKE, D. y FRITH, W. 1995. Effect of isolation procedures on the molecular composition and physical properties of *Eucheuma cottonii* carrageenan. *Food Hydrocolloids*. 9 (4) : 281-289.
- HURTADO, A. y AGBANI, R. 2000. The farming of seaweed *Kappaphycus*. Aquaculture extension manual. Aquaculture Department, Southeast Asian Fisheries Development Center. 32: 25p.
- INTERNATIONAL MIGRATION REVIEW. IMR International. 1999. Carrageenan Profile. *Hydrocolloid Review*. 2:15-62.
- LANGENDORFF, V.; CUVELIER, G.; LAUNAY, B. y PARKER, A. 1997. Gelation and flocculation of casein micelle/carrageenan mixtures. *Food Hydrocolloids*. 11 (1): 35-40.
- LUXTON, D. 1993. Cultivation, tissue culture. *Hydrobiologia*. (260/261) 1: 365-371.
- MANGIONE, M.; GIACOMAZZA, D.; BULONE, D.; MARTORANA, V.; CAVALLARO, G. y SAN BIAGIO, P. 2005. K⁺ and Na⁺ effects on the gelation properties of κ-carrageenan. *Biophysical Chemistry*. 113: 129-135.
- MILLANE, R.; CHANDRASEKARAN, R. y ARNOTI, S. 1988. The molecular of Kappa carrageenan and comparison with iota carrageenan. *Carbohydrate Research*. 182: 1-17.
- NICKERSON, M.; PAULSON, A. y HALLET, F. 2004. Dilute solution properties of κ-carrageenan polysaccharides: effect of potassium and calcium ions on chain conformation. *Carbohydrate Polymers*. 58: 25-33.
- OTAÍZA, R.; ABADES, S. y BRANTE, A. 2001. Seasonal changes in abundance and shifts in dominance of life history stages of carrageenophyte *Sarcothalia crispata* (Rhodophyta, Gigartinales) in south central Chile. *Journal of Applied Phycology*. 13: 161-171.
- RIOFRÍO, O. 2003. Efecto de la variabilidad térmica sobre la biología vegetativa y reproductiva de *Chondracanthus chamissoi* (C. Agardh) Kützing

- (Rhodophyta) en la Bahía de Ancón, Perú. Tesis Lic. Cs. Biol. Lima. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Ciencias Biológicas.
- SANTELICES, B. 1989. Algas marinas de Chile: distribución, ecología, utilización y diversidad. Universidad Católica de Chile. Santiago. 399 p.
- VAN de VELDE, F.; PEPPELMAN, H.; ROLLEMA, H. y TROMP, R. 2001. On the structure of κ /I hybrid carrageenans. *Carbohydrate Research*. 331: 271-283.
- VAN de VELDE, F.; ANTIPOVA, A.; ROLLEMA, H.; BUROVA, T.; GRINBERG, N.; PEREIRA, L.; GILSENAN, P.; TROMP, R.; RODOLPH, B. y GRINBERG, V. 2005. The structure of κ /I hybrid carrageenan II. Coil helix transitions as a function of chain composition. *Carbohydrate Research*. 340: 1113-1129.
- VIANA, A.; NOSEDA, M.; DUARTE, M. E. y CEREZO, A. 2004. Alkali modification of carrageenan. Part V. The iota-nu hybrid carrageenan from *Eucheuma denticulatum* and its cyclization to iota-carrageenan. *Carbohydrate Polymers*. 58: 455-460.
- VILLANUEVA, R.; MENDOZA, W.; RODRIGUEZA, M.; ROMERO, J. y MONTAÑO, M. 2004. Structure and functional performance of *gigartinacean* kappa-iota hybrid carrageenan and *solieracean* kappa-iota carrageenan blends. *Food Hydrocolloids*. 18: 283-292.
- WHISTLER, R. y BeMILLER, J. 1993. *Industrials Gums: Polysaccharides and their derivatives*. 3^a edition. Academic Press. San Diego. EE.UU.
- XU, S.; STANLEY, D.; GOFF, H.; DAVIDSON, V. y MAGUER, M. 1992. Hydrocolloid / milk gel formation and properties. *Journal of Food Science*. 57 (1): 96-102.
- ZAMORANO, J. 2004. Las carrageninas y su orientación hacia el valor agregado. *Revista AQUA*. (on line) <http://www.aqua.cl>. (13 de diciembre de 2005).
- ZAMORANO, J. y WESTERMEIER, R. 1996. Phenology of *Gigartina skottsbergii* (Gigartinaceae, Rhodopyta) in Ancud Bay, southern Chile. *Hydrobiologia*. 326/327: 253-258.

ANEXOS

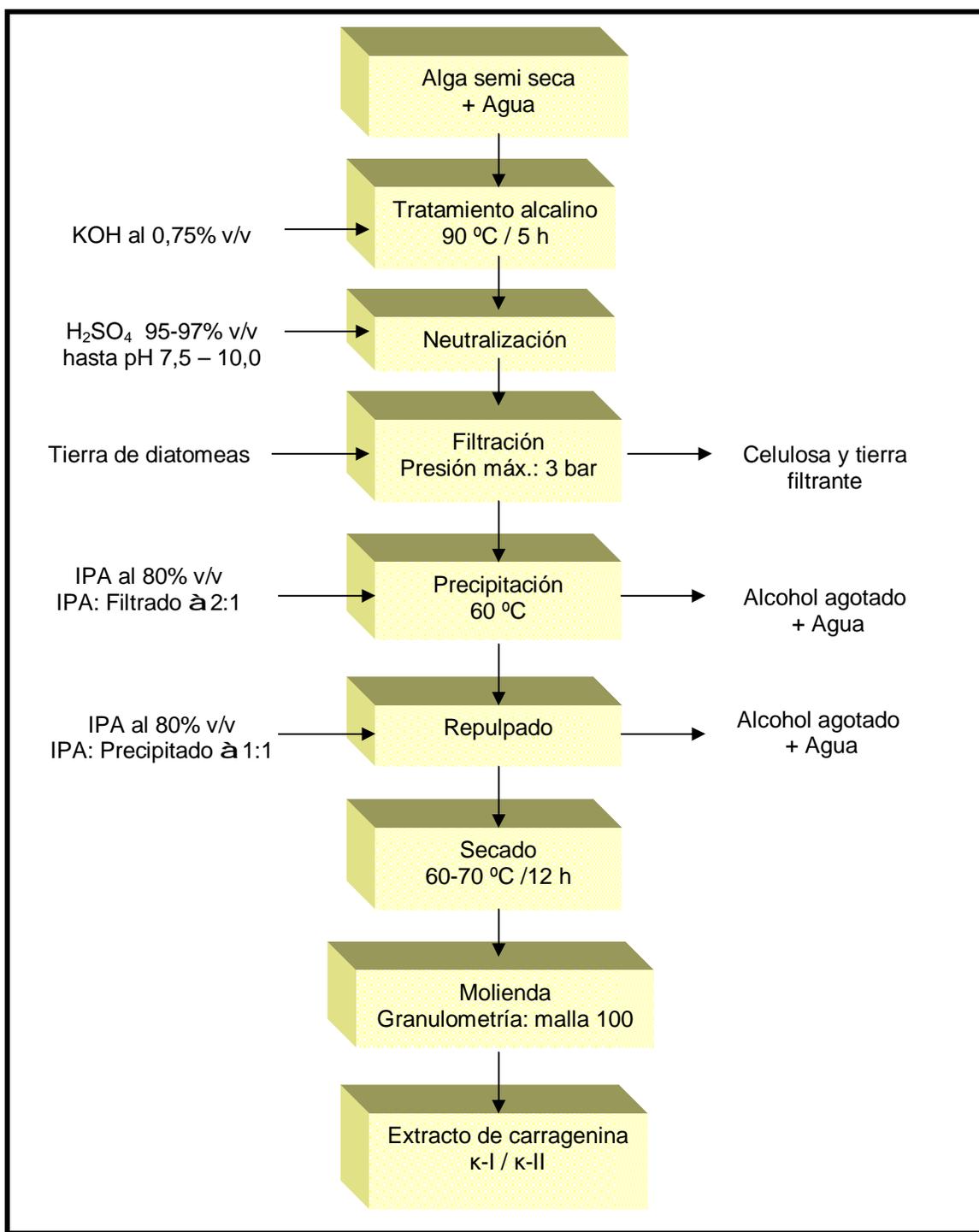
ANEXO 1

Fuerza de gel y su deformación en agua al 1,5% de extractos de carragenina κ -I / κ -II con distintos tiempos de tratamiento alcalino

Tiempo (h)	Ensayo 1		Ensayo 2		Ensayo 3		Promedio	
	A	B	A	B	A	B	A	B
1	--		33	7,34	--			
2	78	6,89	80	8,55	--		79 \pm 1	7,71 \pm 1,17
3	139	8,96	149	8,89	149	9,45	146 \pm 6	9,10 \pm 0,31
4	153	11,62	168	9,33	153	12,10	158 \pm 9	11,02 \pm 1,46
5	165	12,05	187	12,03	172	11,62	175 \pm 11	11,90 \pm 0,24
6	135	9,96	220	14,02	195	13,22	183 \pm 44	12,40 \pm 2,15
7	80	6,89	137	13,21	119	8,51	112 \pm 29	9,54 \pm 3,28

A: Fuerza de Gel (g / cm²); B: Deformación (mm)

ANEXO 2

Diagrama de proceso de elaboración de extractos de carragenina κ -I / κ -II

ANEXO 3

Planilla de control de proceso de elaboración de carragenina

Ensayo:

Fecha:

Algas

Especie de alga	Humedad (%)	Peso base seca (g)	Peso base húmeda (g)

Proceso de elaboración

	Condiciones		Mediciones	
Tratamiento alcalino	Volumen disolución (ml)	4000	Temperatura (°C)	
	Concentración de alga -b.s (%)	3		
	Peso algas (g)	120		
	Concentración KOH (%)	0,75		
	Temperatura (°C)	90		
	Tiempo (h)	5		
Neutralización	pH	7,5 - 9,0	pH inicial pH final ácido gastado (ml)	
Filtrado	Prop. Tierra filt./ MP (Kg/ Kg)	0,5 - 1,0	Viscosidad empaste (cP)	
	Temperatura (°C)	≥ 90	T ° de gelificación (°C)	
	Presión (bar)	hasta 3		
Precipitado	Concentración de IPA	80	T ° de precipitación (°C)	
	Razón filtrado / IPA	1/2	Apreciación gral de la fibra	
Repulpado	Razón precipitado / IPA	1/1		
Secado	Temperatura (°C)	60	Peso seco (g)	
	Tiempo (h)	12	Rendimiento (%)	

ANEXO 4**Rendimiento de carragenina**

Repetición	Rendimiento total (%) *		
	T1 (control)	T2	T3
1	41,83	38,00	26,53
2	40,47	40,40	30,75
3	41,60	36,00	32,87
4	40,39	39,00	31,19
5	41,36	36,30	32,64
Promedio	41,13 ± 0,66	37,94 ± 1,85	30,80 ± 2,55

* Valores indican el rendimiento total de carragenina expresado en base seca

ANEXO 5

Análisis estadístico del rendimiento total

- Prueba de Homogeneidad de Varianza

Estadístico de Levene	gl1	gl2	p-valor
1,494	2	12	0,263

El p-valor ($\geq 0,05$) indica que las varianzas de los tratamientos son homogéneas, por lo tanto, es posible realizar el análisis de varianza.

- ANDEVA

	Suma de cuadrados	gl	Cuadrado medio	F	p-valor
Entre los grupos	280,007	2		40,545	0,000
Dentro de los grupos	41,437	12	3,453		
Total	321,444	14			

El p-valor ($\leq 0,05$) indica que existen diferencias significativas en el rendimiento total entre los distintos tratamientos a un nivel de confianza del 95%

- Diferencia de medias - Test de Tukey

	Tratamiento	Nº datos	Subgrupos para $\alpha = 0.05$		
			a	b	c
Tukey HSD	1	5	41,13	37,94	30,80
	2	5			
	3	5			

Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas al 95% de confianza, entre tratamientos.

ANEXO 6

Viscosidad en agua a 75 °C de disoluciones de carragenina al 1,5% y al 2% + 0,2% KCl

Tratamiento	Repetición	Viscosidad (cP)	
		Disolución al 1,5%	Disolución al 2% + 0,2% KCl
1	1	199,5	273,5
	2	110,0	216,0
	3	123,5	228,0
	4	183,5	254,0
	5	178,0	243,0
	Promedio	159 ± 39	243 ± 22
2	1	55,5	107,0
	2	39,5	72,5
	3	51,0	90,0
	4	86,0	178,0
	5	88,5	163,5
	Promedio	64 ± 22	122 ± 46
3	1	163,5	293,0
	2	142,5	255,5
	3	168,0	342,5
	4	183,0	258,0
	5	209,0	366,5
	Promedio	173 ± 24	303 ± 50

ANEXO 7

Análisis estadístico de la viscosidad en agua al 1,5% de carragenina

- Prueba de homogeneidad de varianza

Estadístico de Levene	gl1	gl2	p- valor
3,006	2	12	0,087

El p-valor ($\geq 0,05$) indica que las varianzas de los diferentes tratamientos son homogéneas, por lo tanto, es posible efectuar el análisis de varianza.

- ANDEVA

	Suma de cuadrados	gl	Cuadrado medio	F	p-valor
Entre los grupos	35157,233	2	17578,617	19,845	0,000
Dentro de los grupos	10629,700	12	885,808		
Total	45786,933	14			

P-valor ($\leq 0,05$) indica que existen diferencias significativas en la viscosidad en agua al 1,5% de los distintos tratamientos, a un nivel de confianza del 95%.

- Diferencia de medias - Test de Tukey

	Tratamiento	Nº datos	Subgrupos para $\alpha = 0.05$	
			a	b
Tukey (HSD)	1	5	158,9	64,1
	2	5		
	3	5	173,2	

Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas con un 95 % de confianza entre los tratamientos.

ANEXO 8

Análisis estadístico de la viscosidad en agua al 2% de carragenina + 0,2% KCl

- Prueba de homogeneidad de varianza

Estadístico de Levene	gl1	gl2	p-valor
3,469	2	12	0,065

El p-valor ($\geq 0,05$) indica que las varianzas de los diferentes tratamientos son homogéneas, por lo tanto, es posible realizar en análisis de varianza

- ANDEVA

	Suma de cuadrados	gl	Cuadrado medio	F	p-valor
Entre los grupos	35157,233	2	42431,117	24,794	0,000
Dentro de los grupos	10629,700	12	1711,350		
Total	45786,933	14			

El p-valor ($\leq 0,05$) indica que existen diferencias significativas, con un 95% de confianza, en la viscosidad en agua al 2% + 0,2% KCl entre los distintos tratamientos.

- Diferencia de medias - Test de Tukey

	Tratamiento	Nº datos	Subgrupos para $\alpha = 0.05$	
			A	b
Tukey HSD	1	5	242,9	
	2	5		122,2
	3	5	303,1	

Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas con un 95 % de confianza entre los tratamientos.

ANEXO 9

Fuerza de gel y su deformación en agua al 1,5% y al 2% + 0,2% KCl

Tratamiento	Repetición	Disolución al 1,5%		Disolución al 2% + 0,2% KCl	
		Fuerza de Gel (g / cm ²)	Deformación (mm)	Fuerza de Gel (g / cm ²)	Deformación (mm)
1	1	164	13,23	432	10,05
	2	169	10,34	480	6,41
	3	172	12,73	502	7,36
	4	179	15,63	547	10,88
	5	168	14,15	454	14,22
	Promedio	170 ± 6	13,22 ± 1,95	483± 44	9,78 ± 3,09
2	1	205	19,18	501	11,15
	2	209	19,27	483	10,08
	3	216	19,97	561	11,09
	4	230	19,99	547	10,11
	5	178	20,00	627	10,88
	Promedio	207 ± 19	19,68 ± 0,42	544 ± 56	10,66 ± 0,53
3	1	104	9,52	289	5,88
	2	151	11,76	374	6,14
	3	132	9,58	325	5,43
	4	130	10,59	269	5,34
	5	152	12,05	387	6,50
	Promedio	133 ± 20	10,70 ± 1,18	329 ± 51	5,86 ± 0,49

ANEXO 10

Análisis estadístico de fuerza de gel en agua al 1,5% de carragenina

- Prueba de homogeneidad de varianza

Estadístico de Levene	gl1	gl2	p-valor
1,547	2	12	0,252

El p-valor ($\geq 0,05$) indica que las varianzas de los diferentes tratamientos son homogéneas, por lo tanto, es posible efectuar el análisis de varianza.

- ANDEVA

	Suma de cuadrados	gl.	Cuadrado medio	F	p-valor
Entre los grupos	13616,566	2	6808,283	26,252	0,000
Dentro de los grupos	3112,176	12	259,348		
Total	16728,742	14			

El p-valor ($\leq 0,05$) indica que existen diferencias significativas con un 95% de confianza en la fuerza de gel en agua al 1,5% entre los distintos tratamientos

- Diferencia de medias - Test de Tukey

	Tratamiento	Nº datos	Subgrupos para $\alpha = 0.05$		
			a	b	c
Tukey HSD	1	5	170,3	207,6	133,8
	2	5			
	3	5			

Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas con un 95 % de confianza entre los tratamientos.

ANEXO 11

Análisis estadístico de la deformación de los geles en agua al 1,5% de carragenina

- Prueba de homogeneidad de varianza

Estadístico de Levene	gl1	gl2	p-valor
2,043	2	12	0,172

El p-valor ($\geq 0,05$) indica que las varianzas de los diferentes tratamientos son homogéneas, por lo tanto es posible efectuar el análisis de varianza.

- ANDEVA

	Suma de cuadrados	gl.	Cuadrado medio	F	p-valor
Entre los grupos	214,693	2	107,346	59,878	0,000
Dentro de los grupos	21,513	12	1,793		
Total	236,206	14			

El p-valor ($\leq 0,05$) indica que existen diferencias significativas con un 95% de confianza en la deformación de los geles en agua al 1,5 % entre los distintos tratamientos.

- Diferencia de medias - Test de Tukey

	Tratamiento	Nº datos	Subgrupos para $\alpha = 0.05$		
			a	b	c
Tukey HSD	1	5	13,216	19,682	10,700
	2	5			
	3	5			

Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas con un 95 % de confianza entre los tratamientos.

ANEXO 12

**Análisis estadístico de la fuerza de gel en agua al 2% de carragenina
+ 0,2% KCl**

- Prueba de homogeneidad de varianza

Estadístico de Levene	gl1	gl2	p-valor
0,156	2	12	0,857

El p-valor ($\geq 0,05$) indica que las varianzas de los diferentes tratamientos son homogéneas, por lo tanto es posible efectuar el análisis de varianza.

- ANDEVA

	Suma de cuadrados	gl	Cuadrado medio	F	p-valor
Entre los grupos	122832,133	2	61416,067	23,569	0,000
Dentro de los grupos	31269,600	12	2605,800		
Total	154101,733	14			

El p- valor ($\leq 0,05$) indica que existen diferencias significativas con un 95% de confianza en la fuerza de gel al 2% + 0,2% KCl entre los distintos tratamientos.

- Diferencia de medias - Test de Tukey

	Tratamiento	Nº datos	Subgrupos para $\alpha = 0.05$	
			a	b
Tukey HSD	1	5	483,0	
	2	5	543,8	
	3	5		328,8

Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas con un 95 % de confianza entre los tratamientos.

ANEXO 13

Análisis estadístico de la deformación de los geles en agua al 2% de carragenina + 0,2% KCl

- Prueba de homogeneidad de varianza

Estadístico de Levene	gl1	gl2	p-valor
6,238	2	12	0,014

El p-valor ($\geq 0,05$) indica que las varianzas de los diferentes tratamientos son homogéneas, por lo tanto es posible efectuar el análisis de varianza.

- ANDEVA

	Suma de cuadrados	gl	Cuadrado medio	F	p-valor
Entre los grupos	65,438	2	32,719	9,751	0,003
Dentro de los grupos	40,266	12	3,355		
Total	105,704	14			

El p-valor ($\leq 0,05$) indica que existen diferencias significativas con un 95% de confianza en la deformación de los geles al 2% + 0,2% KCl entre los distintos tratamientos.

- Diferencia de medias - Test de Tukey

	Tratamiento	Nº datos	Subgrupos para $\alpha = 0.05$	
			a	b
Tukey HSD	1	5	9,784	5,858
	2	5	10,662	
	3	5		

Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas con un 95 % de confianza entre los tratamientos.

ANEXO 14

Índice de leche

Tratamiento	Repetición	Concentración de carragenina (ppm) ¹	Decantación ²	Viscosidad (s) ³	Índice de leche calculado (ppm) ⁴	Índice de leche promedio (ppm) ⁴
1	1	200	3	29,3	213	201 ± 11
		250	1	33,87		
	2	200	2	26,3	193	
		250	2	30,18		
	3	200	2	27,46	197	
		250	1	33,34		
2	1	180	4	27,83	208	209 ± 13
		230	2	29,95		
	2	180	5	25,78	222	
		230	2	29,7		
	3	180	3	26,67	197	
		230	2	31,75		
3	1	180	2	27,13	188	188 ± 5
		230	1	31,84		
	2	180	2	27,02	183	
		230	1	32,43		
	3	180	3	28,18	192	
		230	1	32,75		

1 concentración de carragenina utilizada en el ensayo correspondiente

2 N° de decantación de acuerdo a lo señalado en el punto 3.5.4.6 de Material y Método. N° > indica > decantación de cacao.

3 Tiempo de escurrimiento de la leche con cacao a 10° C, a través de la copa Krimko.

4. Valor obtenido a través de interpolación y corresponde al calculado para producir una viscosidad de Zhan igual al estándar

ANEXO 15

Análisis estadístico del Índice de leche

- Prueba de homogeneidad de varianza

Estadístico de Levene	gl1	gl2	p-valor
1,252	2	12	0,351

El p-valor ($\geq 0,05$) indica que las varianzas de los diferentes tratamientos son homogéneas, por lo tanto es posible efectuar el análisis de varianza.

- ANDEVA

	Suma de cuadrados	gl	Cuadrado medio	F	p-valor
Entre los grupos	696,889	2	348,444	3,613	0,093
Dentro de los grupos	578,667	12	96,444		
Total	1275,556	14			

El p-valor. ($\geq 0,05$) indica que no existen diferencias significativas, con un 95% de confianza, en el índice de leche entre los distintos tratamientos.

ANEXO 16

Determinación del contenido de humedad y cenizas

Tratamiento	Repetición	Humedad (%)	Cenizas (%)
1	1	6,50	31,02
	2	4,99	34,19
	3	4,97	32,46
	4	4,97	34,69
	5	6,50	32,81
	Promedio y Desv. estándar	5,59 ± 0,83	33,03 ± 1,46
2	1	5,97	31,75
	2	6,40	31,58
	3	4,00	32,82
	4	6,42	30,41
	5	6,97	29,32
	Promedio y Desv. estándar	5,95 ± 1,15	31,18 ± 1,34
3	1	5,45	29,84
	2	5,47	30,52
	3	5,47	31,58
	4	4,41	29,74
	5	4,97	28,87
	Promedio y Desv. estándar	5,15 ± 0,47	30,11 ± 1,01