



**CENTRO DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA Y BIOINGENIERIA

**DISEÑO DE MEZCLAS CARBOTÉICAS A BASE DE GLIADINA Y
PECTINA DE BAJO METOXILO PARA SU CARACTERIZACIÓN
QUÍMICA Y FÍSICA**

TESIS

Que presenta

NAYELLI HERNANDEZ ESPINOSA

Para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA

Directora de Tesis:

DRA. EMMA GLORIA RAMOS RAMÍREZ

CIUDAD DE MEXICO

SEPTIEMBRE, 2018

El presente trabajo de investigación fue desarrollado en el Laboratorio de Toxicología de Alimentos del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Cinvestav-IPN), Unidad Zacatenco, bajo la dirección de la Dra. Emma Gloria Ramos Ramírez.

La M. en C. Nayelli Hernández Espinosa agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca con registro número 235815.

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados por la oportunidad de desarrollarme académica y profesionalmente mediante mis estudios de Doctorado en Ciencias en el programa de Biotecnología y Bioingeniería.

A la Dra. Emma Gloria Ramos Ramírez, por la dirección y apoyo profesional del presente proyecto, así también a mi comité tutorial integrado por el Dr. Juan Alfredo Salazar Montoya, el Dr. Graciano Calva Clava, la Dra. Teresa Mancilla Percino y el Dr. Roberto Javier Peña Bautista por sus comentarios, guía acertada y profesional para el desarrollo del presente trabajo de investigación.

A la Biol. M. Pilar Méndez Castrejón, al Ing. Miguel Márquez Robles y al Sr. Alejandro Aranda Olvera, por el apoyo técnico en la realización de este trabajo

DEDICATORIA

*A mis seres amados, por ser el ancla y apoyo,
por estar siempre a mi lado.*

*“Dale vida a los sueños que alimentan el alma,
no los confundas nunca con realidades vanas.
Dale vida a tus sueños aunque te llamen loco,
no los dejes que mueran de hastío, poco a poco.
Dale vida a los sueños que tienes escondidos,
descubrirás que puedes vivir estos momentos
con los ojos abiertos y los miedos dormidos,
con los ojos cerrados y los sueños despiertos”.*

Mario Benedetti

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE TABLAS	xi
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Mezclas Carbohidrato-Proteína	2
1.2 Gliadina	5
1.3 Pectina	6
1.3.1 Pectina de Bajo Metoxilo	8
1.4 Caracterización de carbohidratos y proteínas	8
1.4.1 Calorimetría (Lukas y LeMaire, 2009; Raudino et al., 2013)	8
1.4.2 Reología.....	10
1.4.3 Viscosidad Intrínseca.....	11
1.4.4 Curvas de Titulación.....	12
1.4.5 Potencial Zeta	13
1.4.6 Espectroscopía Infrarroja.....	15
1.4.7 Dicroísmo Circular	16
1.4.8 Formación de Geles carbohidrato-proteína	18
JUSTIFICACIÓN	20
HIPOTESIS	21
OBJETIVO GENERAL	21
Objetivos específicos.....	21
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
2.1 Determinación de viscosidad intrínseca	23
2.2 Determinación de Nitrógeno Total.....	25
2.3 Extracción selectiva de gliadinas y gluteninas por electroforesis SDS-PAGE	27

2.4 Precipitación de gliadina cruda.....	29
2.5 Obtención de pectinas de bajo metoxilo por vía química.....	29
2.5.1 Determinación del grado de esterificación	29
2.6 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	30
2.7 Determinación de propiedades reológicas	30
2.8 Curvas de titulación	30
2.9 Potencial zeta.....	31
2.10 Solubilidad de gliadina	31
2.11 Mezclas carbohidrato-proteína	32
2.12 Espectroscopía de infrarrojo ATR-FT/IR.....	32
2.13 Dicroísmo circular (DC).....	33
2.14 Formación de Geles de PBM y Gliadina	33
2.14.1 Tinción de la Proteína.....	34
2.14.2 Procedimiento para la elaboración de geles	34
2.14.3 Determinación de estructura de geles	35
3. RESULTADOS Y DISCUSION	36
3.1 Determinación de viscosidad intrínseca en gliadina.....	37
3.2 Solubilidad de gliadina	39
3.3 Desesterificación de pectina cítrica y cuantificación de grupos metoxilo.....	41
3.4 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	42
3.5 Comportamiento al flujo y viscoelástico de Gliadina en solución	47
3.6 Curvas de titulación	50
3.7 Potencial zeta para gliadina y pectina de bajo metoxilo (PBM).....	52
3.8 Solubilidad de gliadina	53
3.9 Evaluación de potencial zeta con nuevo agente dispersante	54
3.10 Espectros de IR en gliadina y pectina de bajo metoxilo.....	56
3.11. Preparación de mezclas carbohidrato-proteína.....	58
3.12 Preparación de mezclas carbohidrato-proteína.....	62

3.13 Análisis de las mezclas mediante Espectroscopía Infrarroja.....	63
3.14 Dicroísmo circular (DC).....	72
3.15 Evaluación de las propiedades reológicas	73
3.16. Elaboración de Geles	76
3.16.1 Microscopia Confocal.	76
3.16.2 DSC (Calorimetría Diferencial de Barrido).....	79
CONCLUSIONES.....	83
RECOMENDACIONES	85
REFERENCIAS	86

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de los cuatro posibles sistemas obtenidos al mezclar disoluciones de proteína con polisacáridos	4
Figura 2. Representación estructural propuesta para pectina de alto metoxilo.	7
Figura 3 Componentes del calorímetro	9
Figura 4. Parámetros encontrados en un termograma	10
Figura 5. Diagrama de viscosímetro Ubbelohde	12
Figura 6. Visualización de la doble capa. La vista izquierda muestra el cambio en la densidad de carga alrededor del coloide. La derecha muestra la distribución de iones positivos y negativos alrededor del coloide cargado	14
Figura 7. Rotación del plano lumínico. A) Vectores de los componentes del haz de luz antes de llegar a la muestra; B) Vectores después de interactuar con los sólidos de la muestra; C) Vectores absortos en forma diferencial.	16
Figura 8. Diferencias en los espectros obtenidos por Dicroísmo Circular. Línea sólida, α -hélice; línea de punteado largo, hoja β ; línea punteada, giros β ; línea punteada de cruz 3-hélice o poly (Pro) II hélice; línea punteada con líneas cortas, estructura irregular.....	18
Figura 9. Viscosímetro Ubbelohde.....	24
Figura 10. Grafica para la determinación de la viscosidad intrínseca.....	25
Figura 11. Viscosidad intrínseca de gliadina en disolución	38
Figura 12. Gel de corrimiento de gliadina y glutenina	40
Figura 13. Disminución de la cantidad de grupos metoxilos en pectina cítrica	41
Figura 14. Comparación de propiedades térmicas entre gliadina (SIGMA) y gliadina con mayor grado de pureza.	42
Figura 15. Termograma de gliadina cruda (SIGMA) mostrando su temperatura de desnaturalización	43
Figura 16. Termograma de gliadina precipitada con NH ₄ Ac/MeOH mostrando su punto de desnaturalización.	43
Figura 17 Comparación de termogramas con diferentes temperaturas de transición vítrea.....	44
Figura 18. Comparación de propiedades térmicas de pectinas de alto y bajo metoxilo.....	45
Figura 19. Comparación de propiedades térmicas de pectinas de alto metoxilo bajo diferentes métodos de extracción y desmetoxilación.....	47

Figura 20. Comportamiento al flujo de gliadina (1 y 3%) en dispersión con propanol al 70%.	48
Figura 21. Comportamiento al flujo de dispersiones de gliadina (1 y 3%) en propanol al 70%.	48
Figura 22. Barrido de frecuencia de dispersiones de gliadina (1 y 3%) en propanol al 70%...49	49
Figura 23 Barrido de amplitud en dispersiones de gliadina al 1 y 3%	49
Figura 24 Curva de Creep para dispersión de gliadina al 3%	50
Figura 25 Análisis de curvas de titulación de gliadina.....	51
Figura 26. Potencial Zeta de pectina de bajo metoxilo	52
Figura 27. Potencial zeta de gliadina en función del pH.....	53
Figura 28. Solubilidad de la Gliadina en diferentes disolventes. A y B Buffer Fosfato de Sodio pH= 5.75; C y D Buffer de Ácido Acético al 1% pH=3.5.....	54
Figura 29. Potencial zeta (mV) con respecto al cambio de pH	54
Figura 30. Potencial zeta de gliadina dispersada en diferentes buffer's.....	55
Figura 31. Comparación de Potencial Zeta para Pectina de Bajo Metoxilo en dos agentes dispersantes.....	56
Figura 32. Espectros de infrarrojo para gliadina en dispersión	57
Figura 33. Espectro infrarrojo de la pectina de bajo metoxilo dispersa en agua desionizada y ácido acético.	57
Figura 34. Espectro infrarrojo de la gliadina y estructuras de pectina de bajo metoxilo dispersa en agua desionizada y ácido acético	58
Figura 35 Aminoácidos de interés, presentes en la estructura de la gliadina	60
Figura 36 Rango de pH para realizar la mezcla carbohidrato-proteína.....	62
Figura 37. Espectro de IR para gliadinas a diferentes pH's	63
Figura 38. Espectros de IR para PBM en función del pH.	64
Figura 39. Espectro de IR de la mezcla PBM:gliadina a pH 3.0.....	65
Figura 40. Espectro de IR de la mezcla PBM:gliadina a pH 3.5.....	65
Figura 41. Espectro de IR de la mezcla PBM:gliadina a pH 4.0.....	66
Figura 42. Espectro de IR para PBM:gliadina a pH 4.0 en al región de 1340 a 1850 cm^{-1}	67
Figura 43. Espectro de IR para PBM:gliadina a pH 4.0 en la región de 2900 a 3650 cm^{-1}	68

Figura 44. Espectros de IR para gliadina (A) y pectina de bajo metoxilo (B) a 6 diferentes concentraciones 1-6%	69
Figura 45. Espectros de IR para. A) Gliadina y B) pectina de bajo metoxilo en estado sólido.	69
Figura 46. Espectro de IR para gliadina cruda	70
Figura 47. Comparación de los espectros en el IR correspondientes a controles y mezcla PBM:Gliadina a pH 4.0	71
Figura 48. Comparación de los espectros en el IR correspondientes a controles y mezcla PBM:Gliadina a pH 3.5	71
Figura 49. Comparación de espectros de IR para gliadina en estado sólido y en disolución...72	
Figura 50. CD de gliadina y pectina de bajo metoxilo:gliadina	73
Figura 51. Comportamiento al flujo de gliadina y PBM (controles) y mezclas PBM:gliadina a diferentes pH's.....	74
Figura 52. Viscosidad de gliadina y PBM (controles) y mezclas PBM:gliadina a diferentes pH's.	74
Figura 53 Barrido de amplitud y frecuencia de mezclas PBM:gliadina a pH A)3.0 y B)3.5 ...75	
Figura 54 Curvas de Creep para dispersiones de gliadina, PBM y mezclas PBM:gliadina a diferentes pH's.....	75
Figura 55. Vista frontal de los geles carbohidrato-proteína	77
Figura 56. Vista de costado y perfil del gel carbohidrato-proteína	77
Figura 57. Vista del anverso del gel carbohidrato-proteína.....	78
Figura 58. Observación en Microscopía Confocal para geles de proteínas de suero teñidas con Fast Green FCF: (a) 8% de proteína y 10mM de CaCl ₂ ; (b) 8% de proteína, 1% de PBM y 5mM de CaCl ₂ ; (c) 8% de proteína, 1% de PBM y 10mM de CaCl ₂	78
Figura 59. Termograma obtenido para la gliadina cruda de trigo (Sigma) y gliadina precipitada con acetato de amonio (purificada).....	80
Figura 60. Termograma correspondiente a la pectina bajo metoxilo	81
Figura 61. Termograma correspondiente al gel carbohidrato-proteína	82

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tipos y características de gliadinas.	6
Tabla 2. Solubilidad de la gliadina en diferentes bufer's.	31
Tabla 3. Referencias bibliográficas que estudian interacciones carbohidrato-proteína.	32
Tabla 4. Concentraciones carbohidrato-proteína propuestas para elaboración de geles	34
Tabla 5. Valores de viscosidad intrínseca de gliadina en disolución	37
Tabla 6. Valores de viscosidad, densidad y tiempo de paso en viscosímetro Ubbelohde de Etanol.....	38
Tabla 7. Valores de viscosidad específica y viscosidad específica en función de la concentración de gliadina	38
Tabla 8. Propiedades calorimétricas de gliadina	44
Tabla 9. Transiciones térmicas en pectina cítrica de alto y bajo metoxilo.....	46
Tabla 10. Transiciones térmicas determinados en PBM, gliadina (sigma y purificada) y Gel carbohidrato-proteína.....	79

RESUMEN

Las interacciones químicas y físicas entre los carbohidratos y las proteínas se favorecen durante la obtención de alimentos, almacenamiento, su trayecto por el tracto gastrointestinal, o durante sus procesos de distribución, metabolización y excreción. Recientemente, la investigación en el área de alimentos se ha enfocado en la identificación de las posibles interacciones, con el fin de mejorar el diseño de nuevos alimentos con propiedades funcionales que proporcionen una buena calidad, se ha enfocado en algunas biomoléculas por su capacidad de generar estructuras complejas con propiedades funcionales de interés durante la obtención de alimentos, entre ellas se encuentran proteínas, polisacáridos, lípidos, azúcares y minerales. El presente proyecto tuvo como objetivo diseñar mezclas carbohidrato-proteína a base de pectina de bajo metoxilo y gliadina para el estudio de sus interacciones químicas y la caracterización de sus propiedades físicas y químicas. Para ello, se realizó una purificación de gliadina comercial Sigma separándola de la glutenina, favoreciendo el diseño y caracterización de la interacción carbohidrato-proteína. Se evaluaron las propiedades físicas (Calorimetría Diferencial de Barrido, comportamiento al flujo y viscoelástico,) y químicas (curvas de titulación, potencial zeta, espectroscopía de infrarrojo cercano ATR-FT/IR y dicroísmo circular) de cada una de las biomoléculas. La gliadina es una proteína donde predominan los grupos alifáticos en la cadena lateral, los cuales no son polar, pero también existen cadenas laterales de aminoácidos que a pH ácido presentan carga positiva. Los resultados de las pruebas espectrofotométricas y dicroísmo circular permiten concluir que a pH 4.0 y una proporción 2:1 (pectina de bajo metoxilo:gliadina) la interacción entre los biopolímeros de interés en éste estudio, tiene lugar.

ABSTRACT

The chemical and physical interactions between carbohydrates and proteins are favored during the obtaining of food, storage, their passage through the gastrointestinal tract, or during their distribution, metabolization and excretion processes. Recently, research in the area of food has focused on the identification of possible interactions, in order to improve the design of new foods with functional properties that provide a good quality, has focused on some biomolecules due to its capacity to generate complex structures with functional properties of interest during the production of food, among them are proteins, polysaccharides, lipids, sugars and minerals. The objective of this project was to design carbohydrate-protein mixtures based on low methoxyl pectin and gliadin for the study of their chemical interactions and the characterization of their physical and chemical properties. To do this, a purification of Sigma commercial gliadin was made separating it from glutenin, favoring the design and characterization of the carbohydrate-protein interaction. The physical properties (Differential Scanning Calorimetry, flow behavior and viscoelastic) and chemical properties (titration curves, zeta potential, near infrared spectroscopy ATR-FT / IR and circular dichroism) of each of the biomolecules were evaluated. Gliadin is a protein where the aliphatic groups in the side chain predominate, which are not polar, but there are also side chains of amino acids that present positive charge at acidic pH. The results of the spectrophotometric and circular dichroism tests allow us to conclude that at pH 4.0 and a 2: 1 ratio (low methoxyl pectin: gliadin) the interaction between the biopolymers of interest in this study takes place.

1. INTRODUCCIÓN

En los alimentos destacan dos grandes grupos de nutrientes: 1) los micronutrientes, que aparecen en pequeñas cantidades pero que son componentes esenciales para una alimentación adecuada (He, Zn, Ca, I, Ac. Fólico, entre otros) y 2) los macronutrientes, que constituyen la parte principal del alimento, entre los que se encuentran agua, proteínas, lípidos y carbohidratos (Badui, 2006). Las interacciones químicas y físicas entre estos grupos de nutrientes se favorecen durante la elaboración de alimentos, durante el almacenamiento y durante su trayecto por el tracto gastrointestinal o durante sus procesos de distribución, metabolización y excreción. Debido a lo anterior, la investigación actual en alimentos se ha enfocado en la identificación de las posibles interacciones, con el fin de mejorar el diseño de nuevos alimentos con propiedades funcionales que proporcionen una calidad óptima (Schmitt *et al.*, 1998). Recientemente, la industria de alimentos ha enfocado su atención en algunas biomoléculas por su capacidad de generar estructuras complejas con propiedades funcionales de interés durante la obtención de alimentos, entre ellas se encuentran proteínas, polisacáridos, lípidos, azúcares y minerales. En este contexto, las proteínas y polisacáridos representan a los dos biopolímeros más ampliamente utilizados en esta industria, durante los procesos de fabricación, las propiedades funcionales intrínsecas de estos componentes individuales, así como las propiedades resultantes debidas a su interacción, determinan la estructura, textura y estabilidad final de los materiales alimenticios.

1.1 Mezclas Carbohidrato-Proteína

Las investigaciones de Flory-Huggin's (1953) ofrecieron la primera explicación general sobre la compatibilidad e interacción química de carbohidratos y proteínas, también formuló una teoría que lleva su nombre sobre el comportamiento de los polímeros en solución (Schmitt *et al.*, 1999). Actualmente, en numerosas investigaciones se ha establecido que la formación o las modificaciones de las interacciones carbohidrato-proteína dependen de varios factores como: la carga y la naturaleza de los biopolímeros, pH, fuerza iónica y temperatura del medio e incluso la presencia de surfactantes (Ghosh y Bandyopadhyay, 2012).

Las principales interacciones entre biopolímeros alimentarios son de naturaleza electrostática, debido a su dependencia al pH y valores de fuerza iónica. La carga iónica es el factor más importante que afecta a la coacervación compleja, otro factor es la proporción de cada biopolímero donde el grado de coacervación está alterado en función de la cantidad disponible de cada biopolímero para interactuar (Schmitt C. *et al.*, 2011). Los coacervados son resultado

de interacciones electrostáticas y puentes de hidrógeno, básicamente es la formación de un complejo macromolecular que interactúa para formar agregados neutralizados (Doublier J. et al., 2000).

A través de diferentes estudios se ha determinado que los parámetros fisicoquímicos intrínsecos que tienen gran influencia sobre las interacciones son pH, fuerza iónica, densidad de carga, concentración y proporción de cada polisacárido. Los parámetros externos que pueden funcionar como factores de procesamiento son temperatura, velocidad de cizalla, tiempo de cizallamiento y la presión, los cuales han demostrado influir en el desarrollo del fenómeno de coacervación (Schmitt y Turgeon. 2011). Al mezclar una solución de proteína con una de polisacárido se puede observar algunos comportamientos que se presentan en la Figura 1. La interacción de los dos biopolímeros puede ser segregativa (los biopolímeros se excluyen unos a otros y entonces se definen como incompatibles) o asociativa (los biopolímeros interaccionan unos y otros). De acuerdo a la Figura 1, en disoluciones diluidas la mezcla es estable debido al efecto predominante de la entropía de mezclado entre la proteína y el polisacárido pueden ser cosolubles (sistema b) (Rodríguez y Pilosof, 2011).

En condiciones en las que existe atracción entre las moléculas de los distintos biopolímeros (estos poseen carga neta opuesta) las atracciones electrostáticas pueden llevar a la formación de complejos solubles, obteniéndose un sistema de una sola fase. En este caso se considera el efecto de solubilidad por complejamiento (Ver sistema c, en Figura 1). También puede ocurrir que los complejos que se forman resulten no solubles. Estos, denominados “coacervados”, precipitan y por lo tanto, se generan dos fases separadas: una fase “coacervada” que contiene a los complejos y otra fase diluida, con baja concentración de ambos biopolímeros. Este fenómeno se llama “coacervación compleja”, y es un fenómeno de complejamiento (Ver sistema d, en Figura 1) (Rodríguez y Pilosof, 2011).

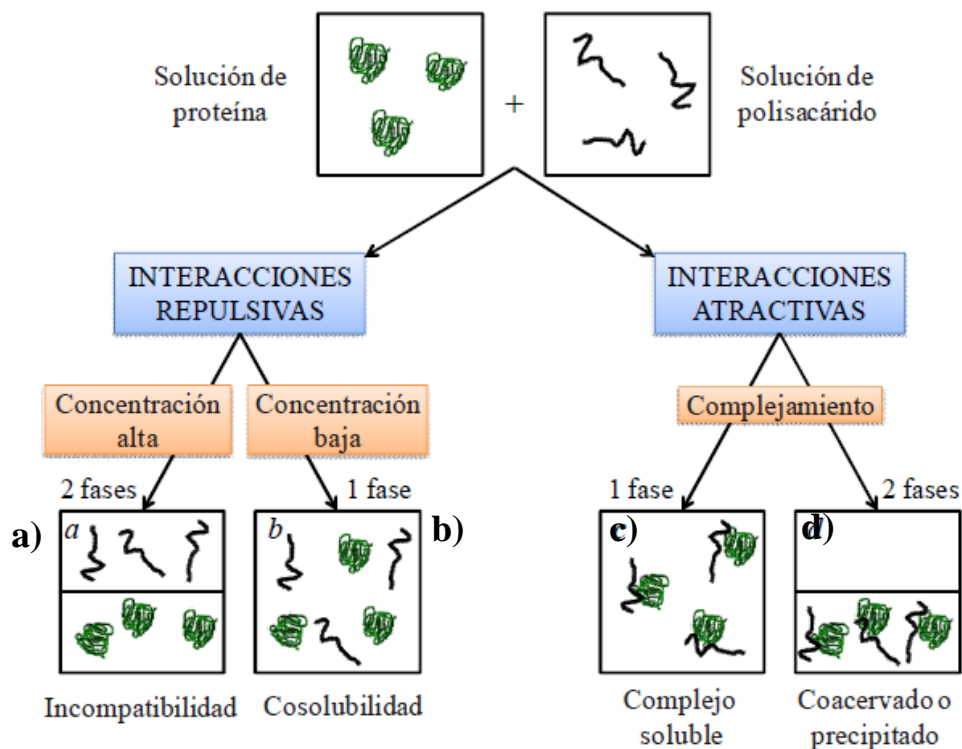


Figura 1. Representación esquemática de los cuatro posibles sistemas obtenidos al mezclar disoluciones de proteína con polisacáridos

En condiciones donde predominan las fuerzas de repulsión entre los biopolímeros (por ejemplo, si ambos poseen la misma carga neta), puede obtenerse un sistema de dos fases (emulsión agua en agua) en el cual ambos componentes macromoleculares están concentrados en diferentes fases. Esto se debe a la incompatibilidad termodinámica entre proteínas y polisacáridos en medio líquido, entonces se está en presencia de un fenómeno de segregación: sistema (a). La diferencia entre los sistemas líquidos de dos fases (a) y (d) reside en que en los distintos sistemas los biopolímeros están concentrados juntos en una fase inferior (d) o en diferentes fases (a). Entonces, las disoluciones acuosas de mezclas de biopolímeros son susceptibles a la separación de fases por dos de los siguientes mecanismos: i) coacervación compleja o ii) incompatibilidad termodinámica (Rodríguez y Pilosof, 2011).

Las propiedades funcionales de estas interacciones han sido reconocidas recientemente y han sido desarrollados diferentes usos en la industria, destaca la Industria de Alimentos, el área Biotecnológica, Medicina, Farmacia y la Industria Cosmética. Sin embargo, destacan tres importantes aplicaciones de coacervados: a) la purificación de macromoléculas, b) microencapsulación de moléculas activas y c) que estos pueden ser utilizados como materiales

nuevos, como ingredientes (formulación de alimento), o como biomateriales (protección de los alimentos y el envasado, injertos en Medicina) (Schmitt et al., 2011).

Recientemente, el uso de coacervación compleja ha destacado, para el caso de gliadina de trigo, se tiene registro de dos investigaciones, donde el objetivo fue lograr estos coacervados entre la proteína con polisacáridos. Seifert et al. (1995) estudió la posible interacción y el grado de la misma entre polisacáridos (galactomananos) con la proteína de trigo (gliadina) y gliadina hidrolizada, mediante la técnica de ultracentrifugación analítica. Secundo y Guerrieri (2005) utilizando Espectroscopia Infrarroja con Transformadas de Fourier, demostraron que es posible lograr interaccionar a la gliadina con algún polisacárido (dextrina), determinando el efecto de la temperatura y el pH del medio donde se llevó a cabo la interacción. Este trabajo es parte de una serie de investigaciones en el campo de la enfermedad celiaca, que es una enfermedad debida a una respuesta autoinmune que produce la gliadina en formulaciones de pan, alimento valioso con micro y macronutrientes (carbohidratos, proteínas, fibra, hierro, zinc y vitaminas).

1.2 Gliadina

Las proteínas presentes en el endospermo de trigo fueron las primeras en ser caracterizadas, debido a su abundancia e importancia económica. Los primeros estudios fueron reportados en los primeros años de la década de los 20's, Osborne mediante un estudio sistemático desarrolló una clasificación para las proteínas presentes en cereales con base en el método de extracción y solubilidad (Osborne, 1907). A partir de esta década en adelante, el estudio de las proteínas del endospermo se convirtió en un tema de interés para diferentes grupos de trabajo, a la vez permitió el avance en el estudio y la descripción de su comportamiento.

La Tabla 1 resume los tipos y las características generales de las gliadinas, pertenecientes al grupo de las prolaminas. Específicamente, las gliadinas, también conocidas como proteínas monoméricas por sus agregados simples de polipéptidos se caracterizan por estar asociadas al incremento de viscosidad y extensibilidad en las masas de trigo (Uthayakumaran *et al.*, 1999). Son proteínas de almacenamiento en trigo ricas en prolina y glutamina, solubles en alcohol (etanol, 1 y 2-propanol), con masas moleculares que varían desde 20,000 – 70,000 Da (Shewry and Halford, 2002). La mayoría de estas proteínas están presentes como monómeros y han sido clasificados en cuatro grupos de acuerdo a su movilidad en geles de electroforesis (α -, β -, γ -, ω -gliadinas); sin embargo, investigaciones recientes reflejan que las α - y β -

gliadinas pertenecen al mismo grupo (Wieser, 2007). Las γ - y ω -gliadinas son codificadas por genes del loci (*Gli-1*) presente en el brazo corto de los cromosomas del grupo 1, estos genes están estrechamente ligados a los que codifican para las G-BPM (*Glu-3*) influyendo directamente en las características de fuerza de gluten. Las α - y β -gliadinas son codificadas por genes del loci *Gli-2* localizadas en el brazo corto de los cromosomas del grupo 6.

Tabla 1. Tipos y características de gliadinas.

Componentes	PM (%total)	Polímero o monómero	Composición parcial de aminoácidos (%)
APM prolaminas	65-90 000 (6-10%)	Polímeros	30-35% Gly, 10-16% Pro, 0.5-1.5% Cys, 0.7-1.4% Lys
Prolaminas ricas-S γ -gliadinas α -gliadinas	30-45 000 (70-80%)	Monómeros Monómeros Polímeros	30-40% Gln, 15-20% Pro, 2-3% Cys, <1.0% Lys
Prolaminas pobres-S ω -gliadinas	30-75 000 (10-20%)	Monómeros Polímeros	40-50% Gln, 20-30% Pro, 8-9% Phe, 0-0.5% Lys, 0-<0.5% Cys

(Shewry y Harlford, 2002)

APM: Alto Peso Molecular; BPM: Bajo Peso Molecular; Gly: Glicina; Pro: Prolina; Cys: Cisteína; Lys: Lisina; Gln: Glutamina; Phe: Fenilalanina

1.3 Pectina

Las pectinas son ácidos pectínicos de elevado peso molecular y soluble en agua, Munarin et al. (2012) proponen que este biopolímero se compone de al menos tres dominios de polisacáridos: Homogalacturonanos (HGA), Ramnogalacturonano-I (RG-I) y Ramnogalacturonano-II (RG-II), siendo HGA el mayor componente de los polisacáridos en pectina, estructurado por α -(1-4)-D-ácido galacturónico (1,4- α -D-GalpA) el cual se encuentra parcialmente metilado-esterificado y algunas veces parcialmente acetilado-esterificado. RG-I se compone de disacáridos, unidades ácido galacturónico-ramnosa (1,4 - α -D-GalpA-1, 2 - α -l-Rhap-)_n, 20-80% de los residuos Rhap están sustituido con oligosacáridos neutros, principalmente arabinofuranosa y galactosa (α -L-Araf y β -D-Galp). Además, fucosa,

glucopiranososa y 4-O-metil-glucopiranososa (α -L-Fucp, β -D-GlcpA, y 4-O-metil- β -D-GlcpA) podrían encontrarse como residuos terminales de las cadenas laterales. El dominio RG-I es también llamado ‘región ramificada’. RG-II tiene una estructura más compleja: presenta una pequeña cadena que consiste en residuos de 1,4- α -D-GalpA, y cadenas laterales de diferentes azúcares, como la ramnosa, ácido galacturónico, galactosa, arabinofuranosa, fucosa, apiofuranose (α -L-Rhap, α -D-GalpA, α - o β -D-Galp, α -L-Araf, α -L-Fucp, β -D-Apif) y muchos otros (Visser y Voragen, 1996).

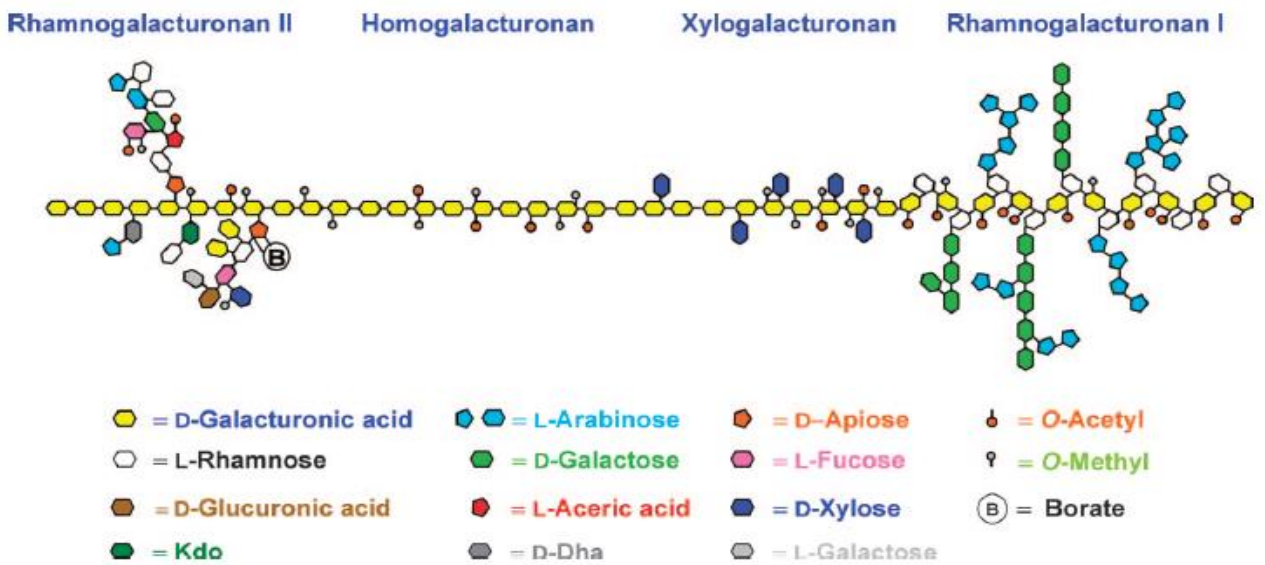
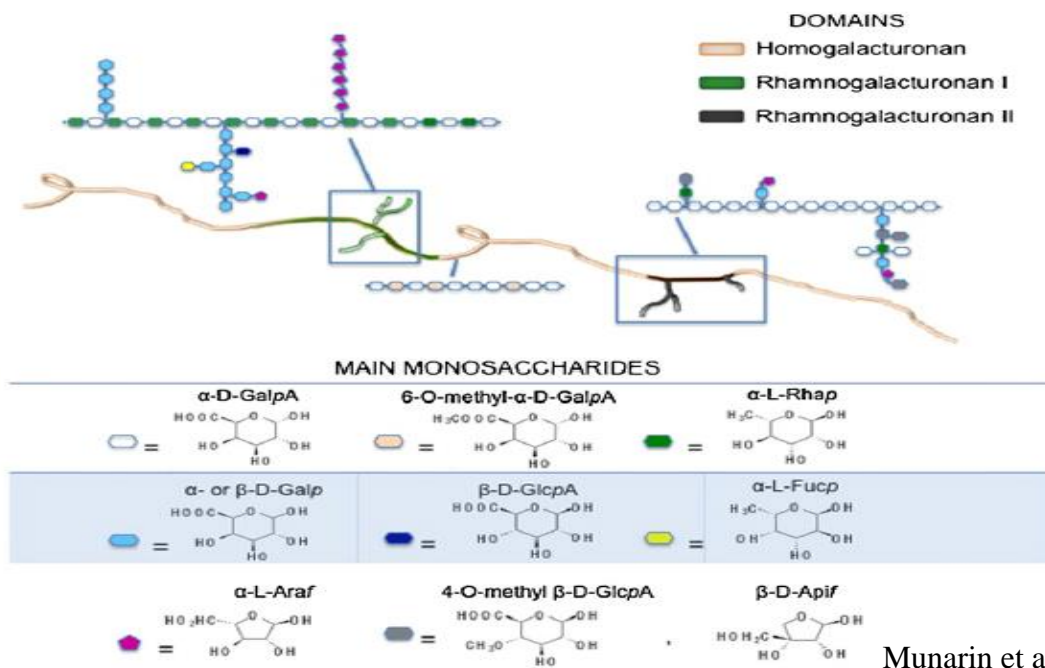


Figura 2. Representación estructural propuesta para pectina de alto metoxilo.

1.3.1 Pectina de Bajo Metoxilo

La relación de residuos metil-esterificados (6-O-metil- α -D-GalpA) determinados en la cadena principal (HGA) unidos al total de unidades de ácido carboxílico, se denomina grado de esterificación (GE). Dependiendo del grado de esterificación, las pectinas se clasifican como de bajo metoxilo (BM, GE <50%) o de alto metoxilo (AM, GE > 50%), mostrando diferentes propiedades. Las pectinas de bajo metoxilo tienen la mayoría de los grupos carboxilo libres. En realidad, sólo 20-40% de los grupos carboxilo están esterificados. Por tanto, la mayoría están disponibles para formar enlaces cruzados con iones divalentes, si se forman suficientes enlaces cruzados, se puede obtener una red tridimensional (gel). Las pectinas de bajo metoxilo pueden formar geles en presencia de iones divalentes sin necesitar azúcar o ácido (Munarin et al., 2012).

El grado de esterificación (GE) es un índice del número de grupos carboxilo esterificados que se encuentran en la cadena del ramnogalacturonano. El GE puede ser definido como el porcentaje del número total de grupos carboxilo esterificado, en relación al total de unidades de ácido galacturónico (los cuales presentan grupos carboxilo) presentes en la molécula, siendo el máximo teórico 100 %. Las pectinas pueden clasificarse comercialmente en pectinas de alto metoxilo (PAM) con un GE de 50-90% y pectinas de bajo metoxilo (PBM) con un GE de 25 a 50% (Kerstesz, 1951; BeMiller, 1986). Las pectinas de bajo metoxilo (PBM) son obtenidas por modificación de las pectinas de alto metoxilo (PAM) mediante una reacción de desesterificación controlada comúnmente efectuada por un método químico, aunque también puede realizarse por método enzimático (Munarin et al., 2012).

1.4 Caracterización de carbohidratos y proteínas

1.4.1 Calorimetría

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) es una técnica que se emplea para estudiar qué ocurre cuando un biopolímero es calentado. También se ha definido como la medida de la cantidad de calor que cede o absorbe un cuerpo en el curso de un proceso físico o químico (Lukas y LeMaire, 2009).

El calorímetro es el equipo que se utiliza para cuantificar las diferencias de calor emitidas por la muestra que se está estudiando (Figura 3). Este equipo cuenta con dos soportes, en uno de ellos, se coloca la muestra polimérica mientras que el segundo permanece la referencia

(vacío). Cada soporte se apoya sobre la parte superior de un calefactor. La computadora enciende los calefactores y les indica que calienten los soportes a una velocidad específica, (rampa de calentamiento). La computadora se asegura totalmente de que la velocidad de calentamiento sea exactamente la misma a lo largo de todo el experimento.

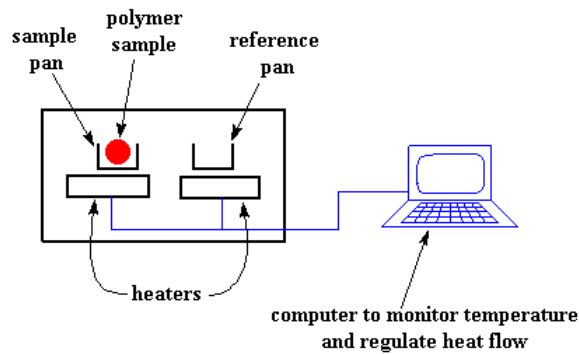


Figura 3 Componentes del calorímetro

Los parámetros que pueden determinarse son:

Capacidad Calorífica. Cuando se agrega una cierta cantidad de calor, la temperatura del polímero se incrementará en una cierta cantidad y este calor necesario para producir ese determinado incremento se llama capacidad calorífica, o C_p (Raudino et al., 2013).

Temperatura de Transición Vítrea: Se tiene un mayor flujo de calor y se obtiene un incremento en la capacidad calorífica del polímero. Esto sucede porque el polímero ha sufrido la transición vítrea. Debido a este cambio de capacidad calorífica que se presenta en la transición vítrea, se puede utilizar la DSC para determinar la temperatura de transición vítrea de un polímero (T_g) (Raudino et al., 2013).

Cristalización: Los polímeros poseen una gran movilidad, cuando alcanzan la temperatura adecuada, han ganado la suficiente energía como para adoptar una disposición sumamente ordenada, que se llaman cristales. Cuando los polímeros se disponen en esos ordenamientos cristalinos, liberan calor. Esta caída en el flujo de calor puede considerarse como una gran depresión en la curva de flujo (Raudino et al., 2013).

Fusión: Cuando se alcanza la temperatura de fusión del polímero, o T_m , los cristales poliméricos comenzarán a separarse; es decir, se funden. Las cadenas abandonan sus arreglos ordenados y comienzan a moverse libremente (Raudino et al., 2013).

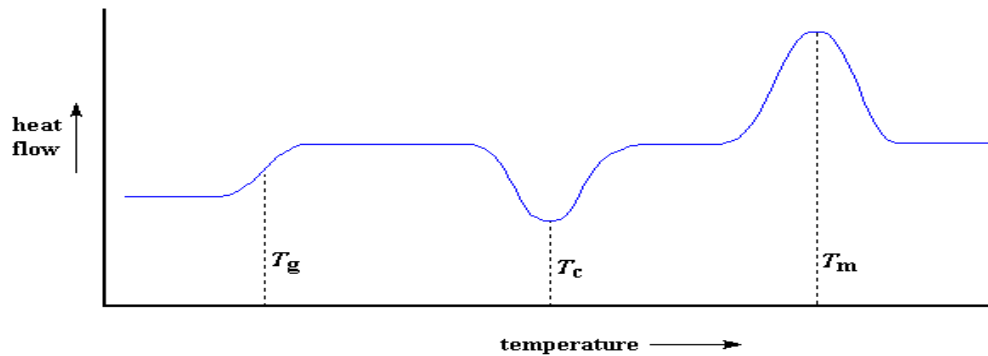


Figura 4. Parámetros encontrados en un termograma

1.4.2 Reología

La reología (del griego *reos*, fluir y *logos*, estudio) es la ciencia que estudia el flujo y la deformación de la materia, describe la interrelación entre fuerzas, deformaciones y tiempo. La reología es aplicable a todos los materiales, desde los gases hasta los sólidos.

El filósofo griego Heraclito describió la reología como *panta rei* –todas las cosas fluyen-. Traducido a términos reológicos esto significa que si se espera tiempo suficiente todo fluirá. La reología de fluidos es utilizada para describir la consistencia de diferentes fluidos, normalmente mediante dos componentes, la viscosidad y la elasticidad. Por viscosidad se entiende la resistencia a fluir o el “espesamiento” y por elasticidad la “pegajosidad” o “estructura”. La reología es entonces la rama de la física que estudia el comportamiento de los fluidos sometidos a diferentes tipos de esfuerzos (McOsco, 1994).

La determinación de las propiedades reológicas en alimentos resulta de importancia fundamental en los procesos de elaboración y manufactura de alimentos, específicamente en procesos de planta, cálculo de requerimientos de bombeo, establecer dimensiones de tuberías y válvulas, realizar mezclas, operaciones básicas con transferencia de calor, masa y cantidad de movimiento. También, es necesaria en el aprovechamiento para el control instrumental de calidad del material antes de procesarse, productos intermedios durante la manufactura y

productos finales. Además, evaluar la calidad de preferencia del consumidor por medio de correlaciones entre las propiedades reológicas y los estudios sensoriales. Permiten también elucidar la estructura o composición de los alimentos y analizar los cambios estructurales que se presentan durante el proceso (Muller, 1978).

1.4.3 Viscosidad Intrínseca

La viscosidad intrínseca es un parámetro relacionado con el peso molecular del polímero o del grado de polimerización. También se le llama número limitante de viscosidad. Los alimentos fluidos contienen cantidades significativas de compuestos de alto peso molecular disueltos (polímeros) y/o sólidos en suspensión que presentan un comportamiento no Newtoniano. Frecuentemente, estos contribuyen significativamente a la estructura y viscosidad de los alimentos. Un fluido Newtoniano es aquel cuya viscosidad puede considerarse constante conforme aumenta el esfuerzo de corte o cizalla; es decir, su tasa de deformación es lineal. Carece de propiedades elásticas, es incomprensible, principalmente (Muller, 1978).

En soluciones diluidas, las cadenas de estos polímeros están separadas y la viscosidad intrínseca $[\eta]$, depende de las dimensiones de las cadenas del polímero en disolución. Por lo anterior, la viscosidad intrínseca $[\eta]$ indica el volumen hidrodinámico del polímero, lo cual refleja importante características moleculares (Rao, 1999). Se le denomina también número de viscosidad límite, representando un parámetro preciso y sencillo. Su determinación estará en función de la estructura del compuesto, de las características del disolvente y de la temperatura (Harding, 1997).

Un dispositivo útil para determinar la viscosidad intrínseca es el viscosímetro “suspended level” o Ubbelohde (Figura 5), llamado así porque el líquido extraído inicialmente en el bulbo superior no está conectado al depósito, lo mismo que el capilar. En combinación con el tubo regulador de presión, asegura que la diferencia de presión entre la parte superior del bulbo y la parte inferior del capilar sea debida a la presión hidrostática, es decir, el peso del líquido.

La relación propuesta por Mark-Houwink-Kuhn-Sakurada (MHKS) describe la dependencia existente entre la viscosidad intrínseca y el peso molecular $[\eta] = KM^a$, las constantes K y a dependen de la temperatura y del sistema polímero-disolvente (Harding, 1997). Diferentes biopolímeros han sido caracterizados usando la técnica de la viscosidad intrínseca, tal es el

caso de algunas proteínas y galactomananos, biopolímeros de interés en la elaboración de alimentos.

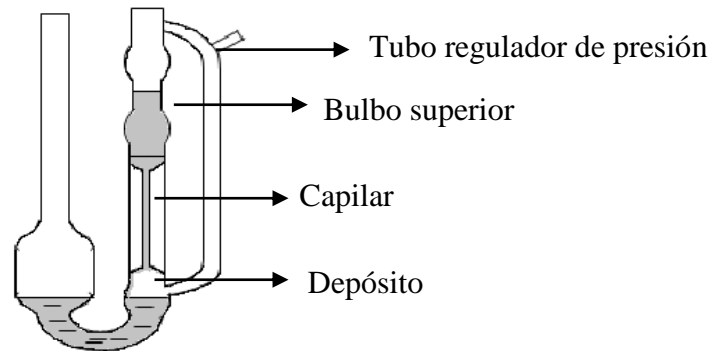


Figura 5. Diagrama de viscosímetro Ubbelohde

1.4.4 Curvas de Titulación

Debido a que los aminoácidos contienen grupos ionizables, la forma iónica predominante de estas moléculas en disolución depende del pH. Esto les va a proporcionar a los aminoácidos ciertas propiedades ácido-base que condicionaran a las propiedades ácido-base de las proteínas. La titulación o valoración de una proteína muestra el efecto del pH sobre su estructura. La titulación, también es una herramienta útil para determinar la reactividad de las cadenas laterales de los aminoácidos (Smith y March, 2007).

Además, las curvas de valoración proporcionan la medida del pKa de cada uno de los grupos que se ioniza, nos indica de la relación que existe entre la carga neta del aminoácido y el pH de la disolución (es el punto isoeléctrico); por lo tanto, se infiere que a cualquier valor de pH mayor que el pI, el aminoácido posee carga neta negativa y se desplazara hasta el electrodo + (ánodo) en un campo eléctrico y a pH inferior al pI, el aminoácido tendrá carga neta + y se desplazara hacia el polo - (cátodo) en un campo eléctrico (Tanford y Roxby, 1972).

1.4.5 Potencial Zeta

El potencial Zeta es el potencial eléctrico que existe en el plano de corte de la partícula, con una distancia corta de la superficie. Las partículas coloidales dispersas en una disolución están cargadas eléctricamente gracias a sus características iónicas y características de bipolaridad. El desarrollo de una red de carga eléctrica en la superficie de la partícula puede afectar la distribución de iones en una región interfacial vecina, y provocar un aumento de la concentración de iones contrarios (iones de carga contraria a las partículas) cerca de la superficie (Clogston, y Patri, 2010).

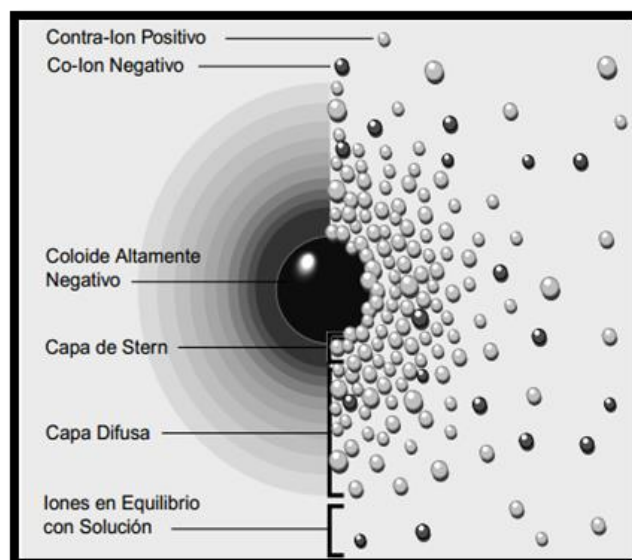
Cada partícula dispersa en una disolución se rodea de iones cargados con carga opuesta que se denomina capa fija. Fuera de esta capa fija existen distintas composiciones de iones de polaridad opuesta, formando un área nebulosa. De esta manera se crea una capa doble eléctrica en la región de interfase partícula-líquido. La capa doble consiste de dos partes: una región interna que incluyen iones unidos fuertemente a la superficie y una externa, o región de difusión donde la distribución de iones se determina por un balance de fuerzas electrostáticas y movimiento térmico aleatorio. De esta forma, el potencial en esta región decae con la distancia desde la superficie, hasta que a cierta distancia se vuelve cero.

La utilización del equipo Zetasizer Nano hace posible la determinación de tres parámetros de moléculas en disolución, a saber: tamaño de partícula, potencial Zeta y peso molecular en un amplio intervalo de concentraciones. El potencial zeta se determina mediante las técnicas de electroforesis y Laser Doppler Velocimetry. Es una medida utilizada frecuentemente en química coloidal. Indica el potencial necesario para penetrar la capa iónica que se encuentra alrededor de una partícula, con la finalidad de desestabilizar a esta. Se trata de una potencia electrostática que existe entre las capas que se encuentran situadas en torno a la partícula (Hunter, 1981).

En el modelo de doble capa, que se conoce como potencial zeta, al punto donde se unen las dos capas, la capa difusa y la capa Stern (Figura 5). Debido a que en dicho modelo no es posible determinar la carga superficial, ni tampoco el potencial, el potencial zeta se utiliza para indicar los posibles cambios que se producen en el potencial de la superficie, así como en las fuerzas de repulsión existente entre los coloides. La relación entre el potencial zeta y el potencial de superficie, depende de la cantidad de iones presentes en la disolución. Así por

ejemplo, en el caso del agua, la doble capa provoca que el potencial zeta tenga una aproximación aceptable del potencial de superficie. Cabe recordar que la capa Stern, hace referencia a la atracción que sufre el coloide negativo de la solución, la cual inicialmente provoca que algunos iones positivos se dispongan conformando una capa rígida, la cual se sitúa rodeando la superficie del coloide. Dicha capa rígida es lo que se conoce como capa Stern.

El modelo de doble capa se utiliza frecuentemente, para visualizar el entorno o atmósfera iónica que se encuentra en las proximidades de un coloide cargado; además, explica el funcionamiento de las fuerzas de repulsión eléctricas. El modelo de doble capa se entiende como una serie de etapas que tienen lugar en torno al coloide negativo, cuando los iones que se encuentran neutralizando las cargas, son separados improvisadamente. Hay iones positivos que se encuentran atraídos por el coloide negativo, pero que a la vez son rechazados por la capa Stern, al mismo tiempo que otros iones con igual carga, intenta acercarse al coloide, hecho que crea un cierto equilibrio dinámico. Este equilibrio existe como resultado de la formación de una capa, conocida como difusa, de contraiones (iones que acompañan a los iones con la finalidad de mantener la neutralidad en sus cargas), los cuales tiene una presencia alta en la superficie, concentración que va disminuyendo a medida que se agranda la distancia, hasta conseguir de nuevo un equilibrio.



(Zeta-Meter, Inc.)

Figura 6. Visualización de la doble capa. La vista izquierda muestra el cambio en la densidad de carga alrededor del coloide. La derecha muestra la distribución de iones positivos y negativos alrededor del coloide cargado

1.4.6 Espectroscopía Infrarroja

La espectroscopía infrarroja (FT/IR, Fourier Transform Infrared Spectroscopy) se ha convertido en una importante herramienta en la evaluación de la composición química y estructural de pequeñas moléculas, de ahí que se haya adaptado su uso a sistemas biológicos. Ha resultado útil en el estudio de la estructura de proteínas, sus mecanismos de reacción y determinación del plegamiento de las mismas. También, mediante la espectroscopía infrarroja es posible identificar cepas bacterianas e incluso diferenciar y clasificar microorganismos.

Básicamente todos los enlaces polares presentan una absorción de luz infrarroja. El espectro infrarrojo se representa como la inversa de la longitud de onda (ν^{-1}), la cual es proporcional a la transición de energía y tiene como unidades cm^{-1} . Las coordenadas horizontales de un espectro van desde altos a bajos valores de longitud de onda de acuerdo con una recomendación de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC).

Los espectros infrarrojos de proteínas y polipéptidos muestran diferentes bandas conocidas como bandas amida, estas representan diferentes bandas vibracionales pertenecientes a los péptidos que están presentes. El conocimiento actual de estos espectros se basa principalmente en el análisis que inició Miyazawa y colaboradores (Miyazawa et al., 1958; Miyazawa, 1967) con el estudio de N-metilacetamida y se extendió posteriormente a estudiar sistemas más complejos.

La banda Amida I es la más intensa de las bandas de absorción en proteínas, se encuentra entre 1600 y 1700 cm^{-1} y está asociada principalmente con la vibración de tensión del $\text{C}=\text{O}$ (70-85%) y relacionada con la conformación del esqueleto polipeptídico y el patrón de enlaces de H. La banda Amida II se relaciona con la vibración de flexión del enlace N-H (40-60% de la energía potencial) y con la vibración de tensión de los enlaces C-N (18-40%) y del C-C (10%). Esta banda también es sensible a la conformación de la cadena (Kirby y Hasselbrink, 2004).

La banda Amida I, sobre 3500 cm^{-1} y la banda amida B, sobre 3100 cm^{-1} , se originan por resonancia Fermi entre el primer compuesto armónico o sobretodo de la banda Amida II y la vibración de tensión del enlace N-H. Este modo de vibración no es dependiente de la

conformación pero es muy sensible a la fuerza del enlace de H; así la banda A cae entre 3225 y 3280 cm^{-1} para longitudes de enlace de H entre 2.69 y 2.85 Å (Surewicz et al., 1993).

1.4.7 Dicroísmo Circular

El dicroísmo circular (DC) es una técnica de espectroscopía de absorción electrónica, basada en el cambio de configuración electrónica molecular de un estado fundamental a un estado excitado, debido a la absorción de radiación electromagnética polarizada. La teoría de dicroísmo circular fue desarrollada por Biot Neumann y Fresnel Snatzke (1990).

Un rayo de luz polarizado en un plano puede considerarse formado por dos componentes polarizados circularmente, uno a la derecha y el otro a la izquierda. Estos componentes están en fase y son de la misma amplitud. Al pasar por un medio ópticamente activo, cada componente interactúa de manera diferente con los centros quirales de las moléculas presentes. La interacción de la radiación con la muestra induce un desfaseamiento y un cambio de magnitud diferenciales en ambos componentes circularmente polarizados de la luz, y estos fenómenos provocan una rotación del plano de polarización en un ángulo α y la distorsión de este plano genera una elipse.

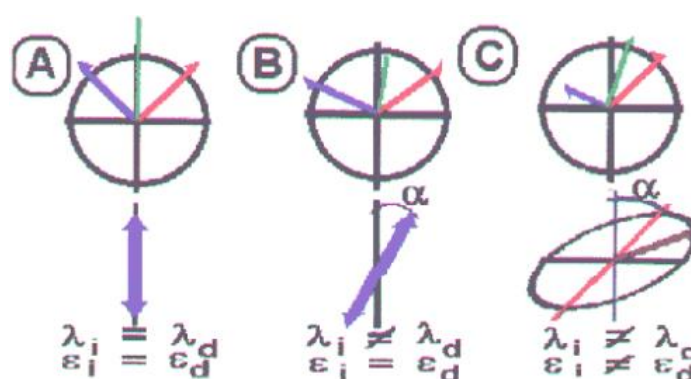


Figura 7. Rotación del plano lumínico. A) Vectores de los componentes del haz de luz antes de llegar a la muestra; B) Vectores después de interactuar con los sólidos de la muestra; C) Vectores absorbidos en forma diferencial.

Los espectros de dicroísmo circular se obtienen generalmente en las regiones del ultravioleta cercano (250 a 350 nm) y lejano (180 a 250 nm) de la radiación electromagnética. En la región del ultravioleta cercano, los cromóforos más importantes son los grupos aromáticos de

las cadenas laterales de triptofano, tirosina, y fenilalanina. Ya que la asimetría en estos grupos químicos, se debe exclusivamente a su entorno y como los residuos aromáticos se encuentran distribuidos en toda la macromolécula, los espectros en esta región son un reflejo de la conformación global de la proteína. Además las señales en esta región son extremadamente sensibles a los cambios en la conformación (Kelly S. *et al.*, 2005).

α -hélices:

En la estructura de hélice α la secuencia aminoacídica gira alrededor de un eje y las cadenas laterales quedan en la superficie de la hélice. Cada giro tiene una unidad repetitiva de 3.6 aminoácidos. La hélice se encuentra estabilizada por enlaces de hidrógeno de los grupos amida, entre el hidrógeno unido al nitrógeno (electropositivo) del residuo (i) y el átomo de oxígeno (electronegativo) del residuo (i+4).

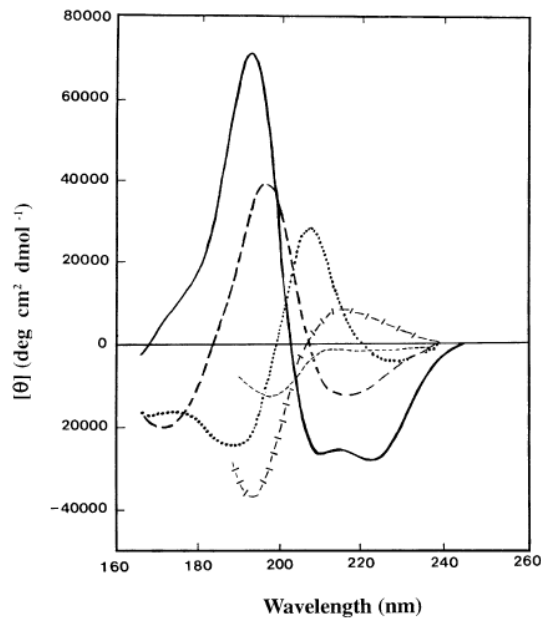
Las hélices son anfipáticas; tienen una zona polar en la superficie y una zona hidrofóbica en la cara interna. Los espectros muestran un doble mínimo a 222nm y 208nm, y un máximo intenso a 191nm. El máximo presenta una intensidad alta debido a la asimetría intrínseca de hélice. Las intensidades de las 3 bandas reflejan el grado de abundancia de la estructura helicoidal en la proteína (Whitmore y Wallace, 2007).

Lámina β :

La cadena polipeptídica está prácticamente extendida en forma de lámina. La distancia axial entre los aminoácidos es de 3.5 Å y está estabilizada por puentes de hidrógeno entre grupos NH y CO de las diferentes cadenas polipeptídicas. Las cadenas adyacentes en la hoja β pueden estar dirigidas en la misma dirección (hojas β paralelas) o en direcciones opuestas (hojas β antiparalelas). Las proteínas con estructura 2ria mayoritariamente β presentan un máximo simple y un mínimo simple, pero sus espectros son muy variables porque las hojas pueden ser paralelas o antiparalelas y por la variación en el largo y ancho (Whitmore y Wallace, 2007).

Banda positiva entre 190 y 200nm

Banda negativa entre 210 y 225nm



(Kelly S. et al., 2005)

Figura 8. Diferencias en los espectros obtenidos por Dicroísmo Circular. Línea sólida, α -hélice; línea de punteado largo, hoja β ; línea punteada, giros β ; línea punteada de cruz 3-hélice o poly (Pro) II hélice; línea punteada con líneas cortas, estructura irregular.

1.4.8 Formación de Geles carbohidrato-proteína

Se denomina fluido complejo a aquellos fluidos formados por dos o más componentes macromoleculares (polímeros, biopolímeros, sustancias de alto peso molecular) que interactúan física y químicamente permitiendo una estructuración del sistema (Zhu et al., 2009).

Las disoluciones poliméricas o biopoliméricas, mezclas de biopolímeros, partículas en suspensión, emulsiones, cristales líquidos y muchos biofluidos como la sangre, son ejemplos de fluidos complejos. Dentro de este concepto ha propuesto la clasificación de las soluciones “carbotéicas”, en las cuales los componentes que se encuentran interactuando son carbohidratos y proteínas. Las propiedades físicas de estos fluidos complejos son considerablemente diferentes de los fluidos simples (Manero et al., 2007).

Los complejos carbohidratos-proteínas se originan de las interacciones electrostáticas entre macromoléculas con cargas opuestas. Estas interacciones inducen la formación de las distintas entidades supramoleculares, como los complejos, complejos de agregación y coacervados (Antonov y Zhuravleva, 2012). La naturaleza de los complejos carbohidrato-proteína está

determinada por factores que afectan la entropía del sistema, como la estructura y el peso molecular de los biopolímeros. Los complejos también son afectados por fuerzas entálpicas, que se rigen por la naturaleza y la densidad de carga de los biopolímeros y la relación molar del carbohidrato y de la proteína.

Sin embargo, durante las últimas décadas se ha incrementado el interés en la gelificación de mezclas de complejos carbohidrato-proteína reflejando: a) un papel clave de los hidrocoloides utilizados como aditivos alimentarios y b) el desarrollo de nuevos métodos de procesamiento en alimentos.

El comportamiento de gelificación de mezclas de carbohidrato-proteína generalmente se divide en tres etapas: formación de enlaces covalentes entre los dos biopolímeros, las interacciones electrostáticas polication-polianión y la formación del gel compuesto debido a la exclusión mutua de cada componente. Las interacciones favorables en estos sistemas se presentan entre polisacáridos aniónicos y proteínas que se encuentran por debajo de su punto isoeléctrico, cuando las proteínas tienen numerosos dominios cargados positivamente. De esta forma con los dominios aniónicos del polisacárido se forman “zonas de unión”, dando lugar al aumento de la temperatura de gelificación, temperatura de fusión y fuerza de gel (Hua, 2003).

Cuando las interacciones no se llevan a cabo, las disoluciones concentradas de dos biopolímeros (proteína-proteína, carbohidrato-proteína o polisacárido-polisacárido) frecuentemente presentan turbidez, gradualmente se separan en dos capas traslúcidas, cada una de las cuales contiene más de un biopolímero que del otro. Sin embargo, al enfriar la mezcla antes de la separación de las fases se forman geles compuestos, donde el biopolímero gelificante forma una red en fase continua y el segundo se limita a formar inclusiones en la fase discontinua (Chronakis et al., 1997). Los geles formados por varios agentes gelificantes pueden ser clasificados en tres grupos, llamados geles “rellenos”, geles mixtos y geles complejos (Zasytkin et al., 1997).

1. Los geles “rellenos” contienen una o varias redes independientes de polímeros o biopolímeros que forman una fase continua “llena” por partículas dispersas. Estas últimas pueden ser de naturaleza y estado de la materia diferente, es decir, sólido, líquido o gaseoso. Existen otros dos tipos de geles de biopolímeros “rellenos”, monofásicos y bifásicos. Los primeros son aquellos formados por una red de un biopolímero y otro biopolímero (relleno)

en forma de moléculas o agregados moleculares. Los geles de dos (o más) fases de biopolímeros constan de una red continua llena de partículas dispersas (Tolstoguzov, 1990).

2. Los geles “mixtos” constan de dos (o más) redes independientes. Ambas redes abarcan todo el sistema, pero no existe ninguna interacción entre ellos (Tolstoguzov, 1990). De acuerdo con Morris (1985), los geles mixtos se han denominado como geles con redes interpenetrantes.

3. Los geles complejos son aquellos que implican una asociación directa entre los biopolímeros y posteriormente la formación de la red (Tolstoguzov, 1995).

JUSTIFICACIÓN

Los carbohidratos y proteínas son biopolímeros naturales utilizados ampliamente como ingredientes funcionales, el interés en la interacción química de estas biomoléculas se ha incrementado en la última década por contribuir con importantes propiedades funcionales durante el proceso de elaboración de alimentos.

La gliadina de trigo ha sido de interés para numerosas investigaciones como parte esencial en la formación del gluten; sin embargo, hasta el momento ha sido escasamente estudiada su capacidad para interactuar con carbohidratos vegetales, formando microestructuras con propiedades funcionales de interés.

En este sentido, resulta necesario explorar la posible interacción carbohidrato-proteína y los efectos de variables como concentración, pH, temperatura, para determinar el comportamiento físico y funcional.

HIPOTESIS

De acuerdo a lo anteriormente expuesto, se proponen las siguientes hipótesis

H1. Mediante el estudio de las propiedades físicas y químicas de los biopolímeros de interés se pueden detectar interacciones químicas entre ellos

H2. Las interacciones entre carbohidratos complejos como la pectina de bajo metoxilo y la gliadina, proteína del gluten, determinarán las propiedades físicas y químicas de las mezclas.

OBJETIVO GENERAL

Diseñar mezclas carbohidrato-proteína a base de pectina de bajo metoxilo y de gliadina para el estudio de sus interacciones químicas y la caracterización de sus propiedades físicas y químicas.

Objetivos específicos

- Caracterizar las propiedades físicas, químicas y funcionales de los materiales: pectina de bajo metoxilo y de gliadina.
- Diseñar mezclas carbohidrato-proteína en función de concentración, pH y temperatura.
- Determinar y caracterizar las posibles interacciones empleando métodos físicos y químicos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El proyecto se dividió en tres etapas experimentales:

1. La primera etapa estuvo relacionada directamente con la caracterización de las propiedades físicas y químicas de la gliadina y la pectina de bajo metoxilo.
2. En la segunda etapa, de acuerdo a las propiedades de los biopolímeros obtenidos durante la primera etapa, se prepararon las mezclas carbohidrato-proteína tomando en cuenta la concentración de los biopolímeros en disolución, la temperatura y el pH.
3. La tercera etapa consistió en la caracterización de las propiedades físicas y químicas de las mezclas. Para esta caracterización se usaron técnicas como espectrofotometría (ATR-FTIR), calorimetría (DSC), reología (caracterización de viscoelasticidad) y potencia zeta (mV) y dicroísmo circular (DC).

2.1 Determinación de viscosidad intrínseca

El estudio fue realizado a partir de gliadina cruda de trigo, grado reactivo (Sigma-Aldrich, USA), dispersando en etanol al 50% con 0.2% de DTT (dithiothreitol). Las concentraciones de gliadina cruda empleadas fueron: 0.05, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 y 1.2 %, agitando a 500 rpm durante 1 h y reposando toda la noche.

Ecuación de Mark-Houwink para calcular el peso molecular (Rao, 1999)

$$[\eta] = KM^a \quad (1)$$

Donde: $[\eta]$ = viscosidad intrínseca;

“K” y “a” = constantes específicas del sistema en estudio (polímero-disolvente) a una temperatura específica y M = Peso molecular

Ecuación para viscosidad intrínseca (Rao M.A., 1999)

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\eta_{sp}}{c} \quad (2)$$

Donde C = concentración del polímero y η_{sp} = Viscosidad específica. Dependerá de la concentración del polímero, para determinar las propiedades intrínsecas de la cadena del polímero se debe extrapolar a concentración cero.

Ecuación para viscosidad específica (Rao, 1999)

$$\eta_{sp} = \frac{\eta_{sol'n} - \eta_{solvent}}{\eta_{solvent}} \quad (3)$$

Donde $\eta_{solvent}$ = Viscosidad del disolvente y $\eta_{sol'n}$ = Viscosidad de la solución

Cálculo para determinar la viscosidad de la solución (Rao, 1999)

$$\rho^1 \cdot \eta_1 \cdot t^1 = \rho^2 \cdot \eta_2 \cdot t^2 \quad (4)$$

Donde ρ = densidad (g/cm^3); η = viscosidad ($\text{Pa}\cdot\text{s}$) y t = tiempo (seg) que tarda la solución en recorrer el bulbo pequeño del viscosímetro Ubbelohde (Figura 9), desde la línea dibujada superior hasta la línea inferior

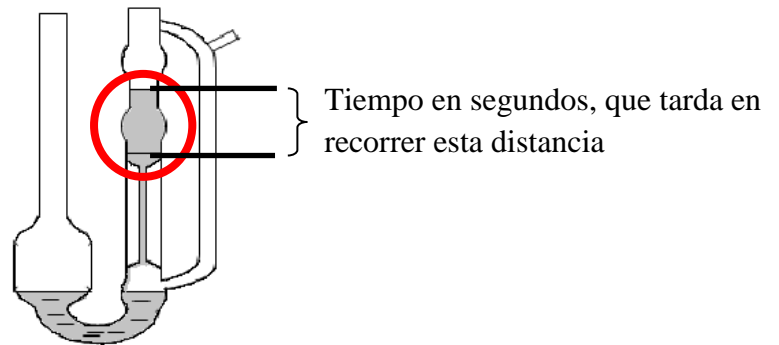


Figura 9. Viscosímetro Ubbelohde.

Para calcular la densidad de la solución, se utilizó el equipo Marca: Analite, Modelo 2141 Surface Tension Meter, y los resultados fueron expresados en g/cm^3 .

Determinación de Viscosidad Intrínseca (Rao, 1999)

Con la ecuación $\frac{\eta_{sp}}{c}$ como muestra la Figura 10, es necesario construir una gráfica donde el objetivo es extrapolar la recta a concentración "0" y en ésta se obtiene el valor de viscosidad intrínseca.

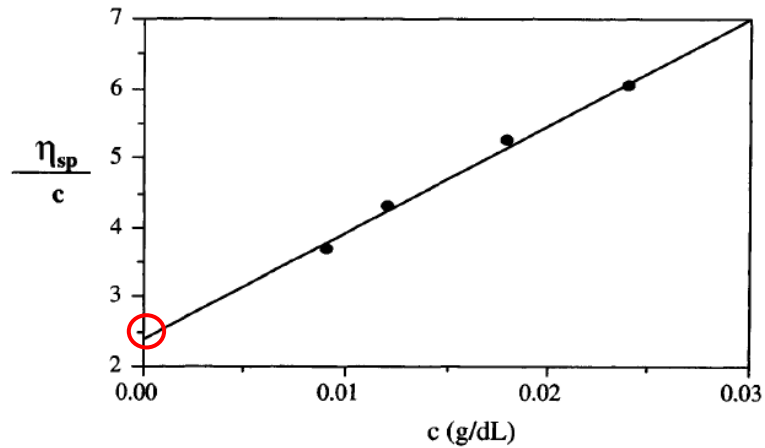


Figura 10. Gráfica para la determinación de la viscosidad intrínseca

2.2 Determinación de Nitrógeno Total.

Pesar 50 mg de muestra en un matraz microkjeldhal, adicionando 2 g de mezcla catalizadora y 2.5 mL de ácido sulfúrico, poner a digerir la muestra en el equipo de digestión con extractor de vapores hasta que clarifique, manteniendo el calentamiento de 1.5-2 h y dejar enfriar. El residuo se disuelve con una pequeña cantidad de agua destilada, tratando de lavar el matraz microkjeldhal de 2-3 veces; depositándolo en un tubo para destilador (A.O.A.C, 1970).

En un matraz Erlenmeyer se colocan 5 mL de la disolución de ácido bórico al 5% con 2 gotas de indicador en la terminal del condensador, cuidando que ésta quede dentro de la solución. El tubo con muestra se coloca en el destilador y se adicionan 10 mL de disolución de hidróxido de sodio - tiosulfato de sodio. Se inicia la destilación por arrastre de vapor, colectando aproximadamente de 75-100 mL de destilado. Esta disolución se titula con ácido clorhídrico 0.01N hasta que vire el color del indicador de verde a violeta.

Para cada determinación se utiliza un blanco de reactivos siguiendo el mismo procedimiento.

Preparación de reactivos:

1. Ácido Sulfúrico
2. Catalizador ($\text{HgO-K}_2\text{SO}_4$). Pesar 50 g de sulfato de potasio, adicionar 2 g de óxido de mercurio y mezclar en un molino de bolas hasta obtener un polvo completamente homogéneo.

3. Solución de NaOH 60%-Na₂S₂O₃ 5 %. Disolver completamente 600 g de hidróxido de sodio en aproximadamente 600 mL de agua destilada, enseguida disolver 50 g de tiosulfato de sodio y aforar a 1 L.
4. H₃BO₃ 5% (p/v). Pesar 50 g de ácido bórico, disolverlos en agua destilada y aforar a 1 L.
5. HCl 0.01N. 1 mL de ácido clorhídrico diluirlo en agua destilada y aforar a 1 L. Normalizar con borato de sodio utilizando rojo de metilo como indicador.
6. Rojo de metilo 0.2 % (p/v). Disolver 200 mg de rojo de metilo en etanol absoluto y aforar a 100 mL.
7. Azul de metileno 0.2 % (p/v). Pesar 100 mg de azul de metileno y diluir en 50 mL de etanol absoluto.
8. Solución indicadora (rojo de metilo-azul de metileno). Mezclar 100 mL de solución alcohólica de rojo de metilo 0.2 % con 50 mL de azul de metileno 0.2 %.

Cálculos

$$\%N = \frac{(V_2 - V_1)(eqN) N}{M} \times 100 \quad (5)$$

Donde: % N = Porcentaje de nitrógeno total; V₁ = Volumen de HCl gastado en titular el blanco (mL); V₂ = Volumen de HCl gastado en titular la muestra (mL); eqN = 14.007; N = Normalidad de HCl (0.01N) y M = Peso de la muestra (mg)

Para conocer el valor de la proteína cruda a partir del contenido de nitrógeno se utiliza un factor, que varía según el origen de la proteína, por ejemplo:

f = 6.25 (proteína animal)

f = 6.38 (proteína de leche o derivados)

f = 5.7 (algunos vegetales)

$$\% P.C. = \%N \times f \quad (6)$$

Donde: %P.C. = Porcentaje de proteína cruda; % N = Porcentaje de nitrógeno total y f=Factor de conversión 5.7

2.3 Determinación selectiva de gliadinas y gluteninas por electroforesis SDS-PAGE

Para la separación e identificación de gliadinas se utilizó el método de Singh et al., (1991). En el procedimiento se usaron 5 mg de gliadina cruda comercial marca Sigma.

La preparación de soluciones para extracción se realiza de la siguiente forma:

Solución 1: Buffer TRIS-HCl 0.08M, pH 8.0. Pesar 4.8 g de Trisma-Base, 20 g de SDS, disolver en 500 mL de agua destilada y ajustar el pH.

Solución 2: Propanol, 50%.

Solución 3: Mezclar 500 mL de solución 1 y 2

Solución 4: En 10 mL de solución 3, poner 200 mg de DTT (dithiothreitol) y mezclar

Solución 5: En 10 mL de disolución 3, adicionar 140 μ L de Vinilpiridina y mezclar

Solución 6: Preparación de buffer para gluteninas: Disolver 12 mL de glicerol en 36 mL de agua destilada, adicionar 0.7 g de TRIS, 1 g de SDS y 6 mg de azul de bromofenol. Ajustar el pH a 6.8.

Solución 7: Preparación de buffer para gliadinas: Disolver 12 g of glicerol en 36 mL de agua destilada. Adicionar 0.7 g TRIS, 1 g SDS, y 6 mg de azul de bromofenol. Ajustar el pH a 8.0.

Para realizar el corrimiento de gliadinas se inició con la adición de la solución 7, para el corrimiento de gluteninas con la solución 6.

La concentración del gel fue al 15% de acrilamida y se colocó en diferentes pozos del gel de electroforesis 3, 5, 6, 8 y 12 μ L de la disolución de extracción (gliadinas y gluteninas). El corrimiento se realizó a 12.5 mA durante 19 horas. El marcador de peso molecular utilizado fue Protein Marker, Broad Range (2-212kDa) No. P7702S, Marca: BioLabs. Antes de usarlo es necesario calentar el marcador a baño maría en ebullición de 3-5 min. Se colocaron 15 μ L al gel.

A 20 mg de harina se adicionan 0.75 mL de propanol al 50% en solución 2 y se mezcla durante 30 min a 65°C a 1400 rpm. La mezcla se centrifuga por 2 min a 10 000 rpm. En este paso el protocolo puede tomar dos rutas, extracción de gluteninas o gliadinas. A) Para el caso de *gliadinas* es necesario guardar el sobrenadante y evaporarlo durante 4 a 5 horas a 65°C, después se adiciona 0.3 mL de solución de extracción, se mezclan durante 5min/90°C/1400rpm, la mezcla se centrifuga durante 5min/10 000 rpm y se toman 8 μ L para

aplicar al gel. B) Para el caso de *gluteninas*, el sobrenadante se descarta y al pellet se adiciona 0.1 mL DTT al 1.5% en solución 4 y se agitan durante 30 min a 65°C/1400 rpm, la mezcla resultante se centrifuga durante 2min/10 000 rpm, el sobrenadante es descartado y el pellet se mezcla con 0.1 ml V.P al 1.4% en solución 5 y se mezcla por 15 min/65°C/1400 rpm, se centrifuga durante 5 min a 13 000 rpm. Se toman 180 µL de sobrenadante y se adicionan 180 µL de solución de extracción 6, mezclar durante 5min/90°C/1400rpm, centrifuga durante 5min/10 000rpm y se toman 8 µL para aplicar al gel.

Es importante destacar que la preparación del gel dependerá del tipo de bandas que se desee examinar con detalle. 9 o 10% de acrilamida es lo que se usa normalmente para proteínas de alto peso molecular; sin embargo, si se requiere una mayor separación de bandas se recomienda 13%.

Fórmula para determinar la concentración del gel:

$$\text{Concentración de Acrilamida} = \frac{\text{g Acrilamida} + \text{g Bis-Acrilamida}}{\text{volumen total de solución (ml)}} \times 100 \quad (7)$$

$$\text{Concentración de bis-acrilamida} = \frac{\text{bis-Acrilamida}}{\text{g Acrilamida} - \text{g bis-Acrilamida}} \times 100 \quad (8)$$

Para la obtención del gel al 13%: 24.7 mL de TRIS pH 8.5 (reactivo 1); 21.1 mL de Stock de Acrilamida para corrimiento de geles (reactivo 2); 0.65mL de SDS al 10% y 17.21 mL de agua destilada. Dónde: Reactivo 1: Disolver 30 g de TRISMA BASE en 220 mL de agua destilada. Ajustar pH 8.5 con HCl concentrado. Aforar a 250 mL con agua destilada. Reactivo 2: Pesar 0.52 g de bis-acrilamida y 39.48 g de acrilamida. Disolver en aproximadamente 70 mL de agua destilada y aforar a 100 mL, homogenizar y filtrar antes de usar. A esta mezcla se necesita sacar el aire con sonicación de 2-4 min. Inmediatamente, se filtra la mezcla (papel de filtro). Añadir 1,3 mL de persulfato de amonio al 1.5% y 30 µL de TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletlenodiamina), mezclar suavemente durante 5 s y entonces verter la solución de gel.

Buffer para tanque de corrimiento

Mezclar 400 mL del buffer para tanque con 3.6 L de agua destilada. Poner aproximadamente 2.5 L de buffer por tanque, este volumen permitirá el corrimiento de dos geles.

Buffer para Tanque (TRIS-Glicina)

Poner 30 g de TRIS en un vaso de 1 L. Adicionar 887 mL de agua destilada y agitar. Mientras la disolución se agita poner 144 g de glicina y 10 g de SDS. El pH debería ser de 8.3, si es un poco más alto, no ajustar.

2.4 Precipitación de gliadina cruda

500 mg de gliadina cruda comercial, se lavan con 10 ml de isopropanol al 70 %, entonces se centrifuga a 4000 rpm/15 min y al sobrenadante se adiciona NH₄Ac/MeOH en proporción 4:1 (NH₄Ac/MeOH: alcohol rico en gliadina). Reposar a temperatura de congelación (-20 °C/48 h) permitiendo que las proteínas precipiten. Transcurrido este tiempo, se centrifuga a 4000 rpm/15 min y se liofilizan (DuPont et al., 2005).

2.5 Obtención de pectinas de bajo metoxilo por vía química

Se prepara una dispersión con pectina de alto metoxilo al 2% y poner esta dispersión en baño frío (2°C ± 1), se adiciona NaOH 0.25N hasta que la dispersión de pectina alcance un pH de 11.5 (inicio de la desesterificación). Tomar muestras de 100 mL cada 20 min durante 3 h aproximadamente y a cada toma de muestra adicionar HCl 4 M hasta alcanzar un pH de 4, en este momento se vierte etanol absoluto en proporción 2:1 y se pone a secar el gel formado con corriente de aire (Vivar-Vera, 2005).

2.5.1 Determinación del grado de esterificación

500mg de pectina desesterificada, molida y tamizada se dispersan en 250mL de agua libre de CO₂, se adicionan 5 gotas de fenoftaleína y la valoración se realiza con NaOH 0.05N (valoración inicial). Añadir a la solución 10mL de NaOH 0.5N y dejar reposar durante 20min, una vez transcurrido el tiempo se agregan 10 mL de HCl 0.5N y se agita vigorosamente hasta que desaparezca el color. Se adicionan 5 gotas de fenoftaleína y la valoración se realiza con NaOH 0.05N (valoración final) (Schultz y Schweiger, 1965).

El grado de esterificación se calcula según la ecuación:

$$GE = \frac{B}{A + B} \quad (9)$$

2.6 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Se usó un equipo de DSC (TA Instruments DSC Cell. Modelo:2010, USA) con una rampa de calentamiento de 10 grados/min y atmósfera de nitrógeno. Se evaluó la gliadina cruda (gliadina A) y la gliadina con mayor grado de pureza (gliadina B) colocando entre 8 a 10 mg de cada una en cápsulas de aluminio. Las determinaciones se realizaron en un intervalo de temperaturas de -50 a 40°C. Las muestras fueron determinadas por triplicado calculando la temperatura de desnaturalización de la proteína y su entalpía (ΔH) expresada en J/g. Los resultados fueron reportados con los valores de las medias \pm su desviación estándar.

2.7 Determinación de propiedades reológicas

Para la primera parte del análisis, se realizaron dispersiones al 1 y 3% de gliadina extraída con alcohol isopropílico al 70% y precipitada con NH_4Ac . La segunda parte se realizó usando como soluciones control dispersiones de gliadina al 0.5 y 1% en Ácido Acético 0.01M y dispersiones de Pectina de Bajo Metoxilo (PBM) al 0.5%. Se prepararon mezclas PBM:Gliadina en una relación 2:1 ajustando a tres pH's (3.0, 3.5 y 4.0).

El estudio se a 25°C en un reómetro de bajo esfuerzo (LS100, Paar Physica, Germany). Las mediciones de comportamiento al flujo se llevaron a cabo para determinar la viscosidad aparente sobre la velocidad de corte en un intervalo de 350 hasta 700 s^{-1} a 25°C. El barrido de amplitud fue llevado desde 0.7 hasta 1.2 Pa para obtener la región de linealidad a 1Hz a 25°C. El barrido de frecuencia fue conducido bajo un estrés controlado de 0.1 a 5Hz y 25°C. La geometría utilizada fue placas paralelas con un diámetro de 50mm y un radio de 25mm.

2.8 Curvas de titulación

Se siguió el protocolo presentado por Kenchington y Ward (1954), diseñado para estudiar con proteínas y obtener las curvas de valoración. La concentración de proteína fue de 0,1%. Se usó un Titulador automático, modelo TitrLab 900 donde las disoluciones que fueron utilizadas para la estandarización del pH en las soluciones NaOH y HCl 0.01N.

2.9 Potencial zeta

Con ayuda de un equipo Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Reino Unido), se coloca 1mL de la disolución de interés en celdas desechables especiales para Zetasizer Nano (celdas de poliestireno marca Sarstedt AG & Co, Reino Unido; las cuales solo puede usarse 3-5 veces dependiendo de la molécula). Los datos fueron colectados en el equipo, siguiendo la metodología propuesta por Gilsenan et al., (2003) con el software Zetasizer NanoSampler (ver. 7.11, 25/09/2014,

<https://www.malvernpanalytical.com/en/support/product-support/software/Zetasizer-family-software-update-v7-11>), donde los resultados son colectados en mV. . Se prepararon soluciones de NaOH 0.01N y HCl 0.01N para modificar el pH de las biomoléculas en disolución.

2.10 Solubilidad de gliadina

Para seleccionar el nuevo agente solubilizante fue necesario observar dos factores de interés: ser compatible con la proteína y los polisacáridos y permitir la expresión de la carga de las biomoléculas (potencial zeta –mV-) a través de los cambios de pH. Para ello, fue necesario probar con buffer's probados en diferentes investigaciones, la Tabla 2 los resume

Tabla 2. Solubilidad de la gliadina en diferentes bufer's.

Referencia	Bufer
Secundo F. y Guerrieri N. (2005) <i>J. Agric. Food Chem.</i> 53:1757-1764	Agua Destilada
Seifert A., et al., (1995) <i>Carbohydrate Polymers</i> 28:325-332.	25mL Na ₂ HPO ₄ (6.586 g/L) 40mL KH ₂ PO ₄ (5.036 g/L)
Chourpa I., et al., (2006) <i>Biomacromolecules</i> 7:2616-2623	1% (v/v) solución de Ácido Acético
Sánchez A. et al., (1998) <i>J. Agric. Food Chem.</i> 46:4539-4544	0.1N NaOH ... 25,000 rpm / 90 seg

2.11 Mezclas carbohidrato-proteína

Para poder seleccionar fue necesario realizar una revisión bibliográfica que ayudara a definir parámetros de estudio. Las investigaciones que permitieron definir estos, se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3. Referencias bibliográficas que estudian interacciones carbohidrato-proteína.

Referencia	Concentración	pH	T°
Harnsilawat, et al. (2006) <i>Food Hydrocolloids</i> 20: 577-585.	β -lactoglobulina (0.1%) Alginato de Sodio (0-0.1%)	3.0 – 7.0	30°C \pm 0.1
Schmitt, et al. (1999) <i>Food Hydrocolloids</i> 13: 483-496.	β -lactoglobulina : Goma de Acacia (8:1) (2:1) (1:1)	3.6 – 5.0	20°C \pm 4.0
Bengoechea, et al. (2011) <i>Food Hydrocolloids</i> 25:1227-1232.	Lactoferrina (0.2%) Pectina (0 – 0.15%)	3.5 – 8.0	25°C
Zhao, et al. (2009) <i>J. Colloid and Interface Sci.</i> 332:345-353	Albumina de Bovino (40 mg/mL) Alginato de Sodio (4.8%)	6.8	25°C \pm 0.5
Song, et al., (2010) <i>Food Hydrocolloids</i> 24:98-104.	Fracción rica en gliadina extraída a partir de gluten Metilcelulosa (20g/L)		
Liang, et al., (2009) <i>Biopolymers</i> 93:418-428	α -Gliadina (150 mg/L) Poly(SS) y Poly(HEMA-co-SS) (7 – 500 mg/L)		
Chourpa, et al., (2008) <i>Biomacromolecules</i> 7:2616-2623	α -Gliadina y Globulina : Goma Arabica (10mg/mL): (10mg/mL)	2.5 – 4.0	30°C \pm 0.1
Secundo y Guerrieri. (2005) <i>J. Agric. Food Chem.</i> 53:1757-1764	Gliadina : Dextrina (1:1)		25°C

2.12 Espectroscopía de infrarrojo ATR-FT/IR

Se obtuvieron espectros del carbohidrato y proteína por separado, así también de sus mezclas, además fueron comparados contra algunos controles. Se usó un espectro FT-IR modelo 640, (marca Varian, USA) en un intervalo de longitud de onda entre 400 a 4000 cm⁻¹ realizando un 'background' antes de cada análisis. Se le conoce al background como colecta de fondo, se realiza para descartar el CO₂ presentes en el ambiente. Se colocó entonces con una micropipeta una gota de la muestra de interés sobre el detector para obtener el espectro.

2.13 Dicroísmo circular (DC)

Para esta técnica, se realizaron ensayos con gliadina a pH 4.0 dispersada en ac. acético al 0.01M para observar la estructura de la proteína bajo estas condiciones. Además, se evaluó la mezcla pectina de bajo metoxilo: gliadina en una relación 2:1 y un pH de 4.0.

Para absorción del espectro UV, se obtuvo en un rango de 190 a 1100 nm con un espectrofotómetro con arreglo de diodos, esto se hizo con la finalidad de observar que tan saturada estaba la muestra y entonces realizar las lecturas de DC. Para DC, se colectaron espectros de 200 a 800 nm en el espectropolarímetro de UV-Vis (Jasco J-815). Los resultados fueron obtenidos y analizados en Excel para después ser graficados en el programa KaleidaGraph (ver. 3.0.5 para Windows, Synergy Software).

2.14 Formación de Geles de PBM y Gliadina

Debido a que la gliadina de trigo es soluble en ácido acético fue necesario disminuir la concentración de éste para aminorar su aroma característico para ser usados en la industria alimentaria. Por ello, diferentes ensayos demostraron que al trabajar a una concentración 0.001M la proteína logra dispersarse completamente. (Anteriormente la concentración que se utilizaba de ac. acético era de 0.1M) (Basadas en Guerrero, 2012 y Beaulieu et al., 2001).

De acuerdo con la Tabla 4 se propusieron tres concentraciones para PBM y una para proteína. En la industria de alimentos se trabaja con distintas concentraciones de gomas dependiendo del uso alimentario, por ello, se proponen estas concentraciones que se encuentran dentro del intervalo de interés. Respecto a la proteína, se trata de una concentración suficiente para enriquecer algún alimento.

Tabla 4. Concentraciones carbohidrato-proteína propuestas para elaboración de geles

Pectina de Bajo Metoxilo	Gliadina
0.5 %	0.5 %
1 %	0.5%
1.5 %	0.5%

Ácido Acético 0.001M; pH del medio 4.5; concentración de Cloruro de Calcio 40mg/g de pectina de bajo metoxilo y concentraciones de Polímeros

2.14.1 Tinción de la Proteína.

Para emplear la técnica de Microscopia Confocal, es necesario teñir o unir a la proteína un compuesto cromóforo que refleje su fluorescencia al aplicar luz UV a determinada longitud de onda y observar la estructura del gel. Se decidió el uso de Verde rápido FCF (Fast Green FCF), se trata de un colorante que se presenta en forma de sal disódica de la familia de los triarilmetanos. Es común encontrarlo en algunas decoraciones reposteras, confitería (en la coloración de caramelos y gominolas), así como en salsas emulsionadas (mahonesas, cremas para ensaladas, entre otros) y algunas veces se emplea como colorante trazador.

La tinción se realizó disolviendo 0.001% (w/w) de Fast Green FCF en la dispersión de gliadina (ac. acético 0.001M). Se agitó durante 6 h a temperatura ambiente.

2.14.2 Procedimiento para la elaboración de geles

La PBM se dispersa en ac. acético 0.001M permitiendo que se hidrate durante 24 h. Por separado, se dispersa gliadina purificada de trigo en ac. acético 0.001M durante 24 h. Transcurrido este tiempo, se mezcla la PBM:gliadina en una proporción 1:2 y se deja en agitación durante 20 min a temperatura ambiente. Entonces, se adiciona a la mezcla carbohidrato-proteína cloruro de calcio a una concentración de 40 mg/g de pectina de bajo metoxilo y se coloca en agitación constante durante 25 min. La disolución es vertida en anillos de cobre y almacenada a 10 °C durante 12 h para ser analizadas con la técnica de microscopia confocal y calorimetría diferencial de barrido.

2.14.3 Determinación de estructura de geles

Microscopia Confocal

Para ello se empleó la técnica de Microscopia Confocal (Leica Microsystems, TCS SP8 AOBS ACOUSTO-OPTICAL BEAM SPLITTER DMI6000, Alemania). La técnica propuesta fue recomendada por Beaulieu et al., (2001); donde se obtienen micrografías que permiten observar la “estructuración del gel”.

Se utilizó el lente 63x realizando un barrido entre los 600 y 700nm. Fast Green FCF absorbe a los 633nm y a esta longitud de onda se realizaron las lecturas. Al tratarse de un gel se realizaron algunos cortes longitudinales (usando una delgada hoja de metal con doble filo) lo más pequeño posibles para analizarlos en el equipo.

Calorimetría Diferencial de Barrido

El método de determinación fue al reportado en la sección 2.6 (pag. 30), la diferencia fue la temperatura de barrido que se realizó entre los 20 y 350°C.

3. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1 Determinación de viscosidad intrínseca en gliadina

Sun *et al.*, (2009) propusieron que la viscosidad intrínseca de la gliadina varía dependiendo de la temperatura y la concentración (Tabla 5). También, mencionan que estos resultados se deben a que los alcoholes desestabilizan la estructura nativa de las proteínas, promoviendo la formación de estructuras α -hélices, las cuales son menos densas que las estructuras secundarias presentes en proteínas globulares.

La tabla 6 presenta los valores de viscosidad, densidad y tiempo (segundos que tarda en recorrer la distancia descrita en el viscosímetro Ubbelohde, ver Figura 9) para el Etanol, debido a que fue el alcohol empleado en esta prueba para solubilizar a la gliadina. De acuerdo a la Tabla 7 se realizaron disoluciones de gliadina a diferentes concentraciones, las cuales fueron analizadas en el viscosímetro Ubbelohde. Los resultados fueron sustituidos en las fórmulas 1-4 –(sección 2), los cuales se pueden observarse en la Tabla 7; a partir de estos, fue posible construir la gráfica (Figura 11) para viscosidad intrínseca de gliadina en disolución.

La Figura 11 muestra la viscosidad específica en función de la concentración de gliadina en disolución con etanol al 50%. A una temperatura de 25°C se encontró una viscosidad intrínseca para gliadina de 4.5 ml g⁻¹

Tabla 5. Valores de viscosidad intrínseca de gliadina en disolución

Temperatura °C	$[\eta]$ ml g ⁻¹	Concentración (gL ⁻¹)
15	6.9	145
20	8.6	116
25	13.9	72
30	14.1	71

Tabla 6. Valores de viscosidad, densidad y tiempo de paso en viscosímetro Ubbelohde de Etanol

Etanol	
Viscosidad (Pa·s)	0.001074
Densidad (g/cm ³)	0.7852
Tiempo (seg)	46.8

Tabla 7. Valores de viscosidad específica y viscosidad específica en función de la concentración de gliadina

Concentración (%) de gliadina en 50mL de etano	Densidad (g/cm ³)	Tiempo (seg)	Viscosidad de la solución (Pa·s)	Viscosidad específica	Viscosidad específica / concentración
0.05	0.935	76.3	0.0021	0.002	0.047
0.4	0.936	78.0	0.0021	0.041	0.103
0.6	0.9375	81.0	0.0022	0.083	0.138
0.8	0.9387	85.4	0.0023	0.143	0.178
1.0	0.937	88.8	0.0024	0.169	0.169
1.2	0.942	95.4	0.0026	0.2586	0.2155

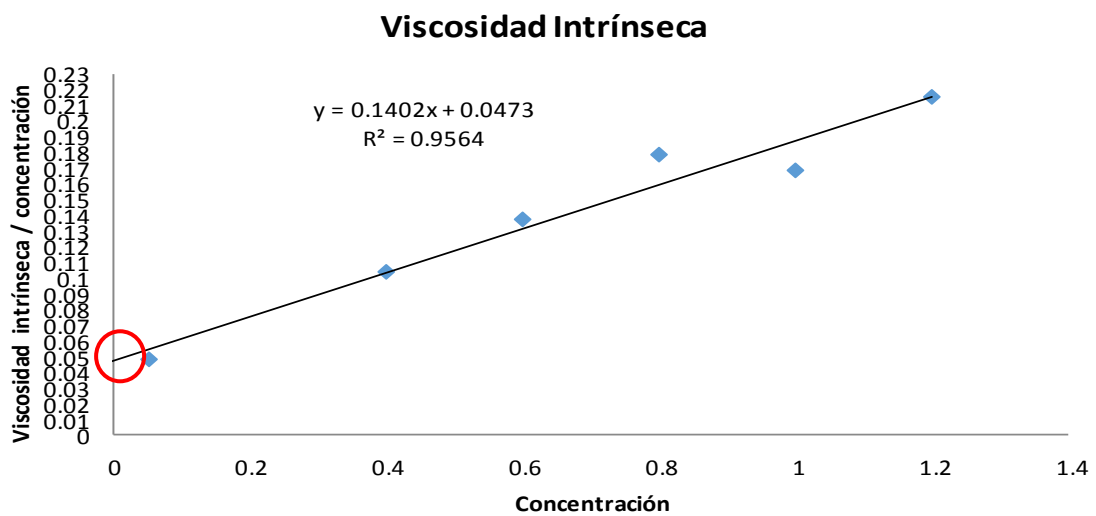


Figura 11. Viscosidad intrínseca de gliadina en disolución

3.2 Solubilidad de gliadina

En un matraz aforado con 50mL de solución etanol:agua (50:50) y una concentración al 1% de gliadina (SIGMA) se llevaron a agitación por 1 h a 25°C, el resultado fue que la gliadina no se disolvió en la solución de etanol:agua, observándose pequeños gránulos al fondo del matraz.

Sapirstein y Fu (1998) realizaron un fraccionamiento de las proteínas de trigo mediante solubilización. A la primera fracción la llamaron, fracción rica en proteínas monoméricas (rica en gliadina), o fracción soluble en alcohol, usando propanol al 50 %; a la segunda fracción se le llamó fracción insoluble en alcohol (rica en gluteninas), extrayéndolas con propanol al 50 % y 1% de DTT (dithiothreitol). Hernández-Espinosa et al., (2013) reportaron que 1% de DTT representa un gasto innecesario para solubilizar la fracción rica en gluteninas, reportó que con el 0.2 % de DTT en propanol al 50% es posible obtener los mismos resultados de solubilidad.

En una segunda prueba de solubilidad se adicionó 50mL de solución etanol:agua (50:50), 0.2 % DTT y 1% de gliadina (SIGMA) poniendo en condiciones de agitación por 1 h a 25°C. Los resultados fueron completamente diferentes, la gliadina se disolvió por completo. Esto permite concluir que en la gliadina cruda comercial (SIGMA) existen restos de glutenina, lo cual fue necesario comprobar mediante un gel de corrimiento mediante la técnica de electroforesis SDS-PAGE.

El gel de corrimiento se muestra en la Figura 12, donde se presentan los pesos moleculares del marcador de proteína, así mismo la identificación de cada uno de los carriles. Singh et al., (1991), exhibe imágenes de corrimiento en electroforesis SDS-PAGE, identificando las bandas, asignándoles valor mediante letras y tipificando las proteínas. Con base en esta investigación, fue marcado el gel de corrimiento (Figura 12), donde se presentan de lado izquierdo los cuatro tipos de gliadina (α -, β , γ , ω), a la vez, de lado derecho se identifican a las gluteninas de alto y bajo peso molecular.

Se usaron dos controles (carriles 1, 2, 16 y 17). Opata, una variedad de trigo harinero, de color rojo y endospermo semi duro; Pitic, variedad de trigo harinero de color rojo pero endospermo suave; estas dos variedades han sido utilizadas como controles por su variabilidad en bandeo. Los carriles 3-8 del gel muestra la composición de la gliadina cruda (SIGMA), siendo la

misma proteína pero en diferentes condiciones de corrimiento. Los carriles 10-15 expone la contaminación de gluteninas presentes en la muestra de gliadina cruda, siendo la misma muestra a diferentes condiciones de corrimiento.

Mediante la Figura 11 es posible confirmar la hipótesis propuesta anteriormente, la gliadina cruda (SIGMA) presenta una alta presencia (30-35 %) de glutenina de bajo peso molecular, de ahí la alta solubilización con un agente reductor (DTT). Los carriles 3-8 muestran a una proteína normal (gliadina); es decir, con sus cuatro componentes (α -, β -, γ -, ω); además, con un peso molecular entre 27-66.4 kDa, lo cual concuerda con lo reportado por Sun et al., (2009), quienes obtuvieron un rango de 30-80 kDa.

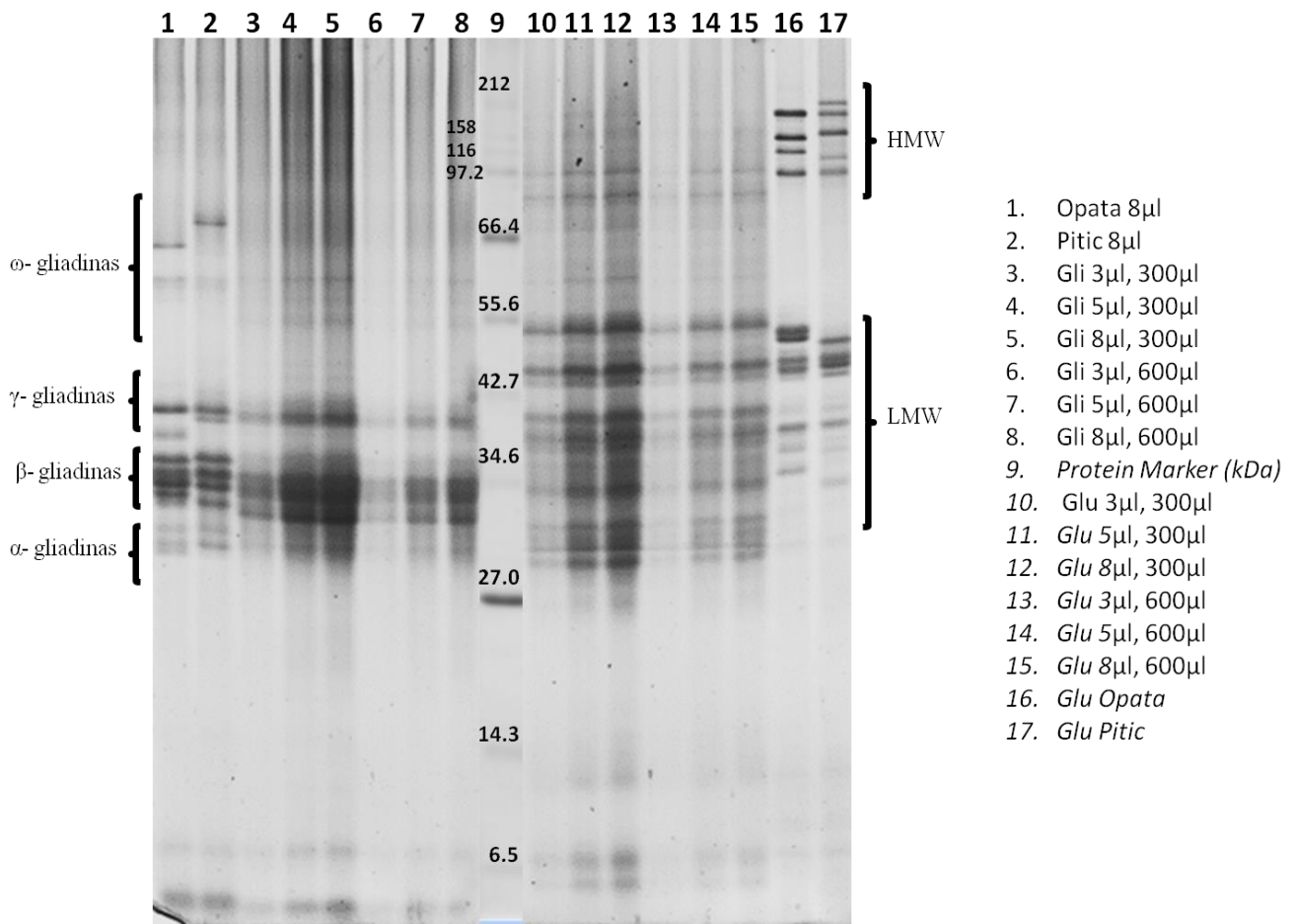


Figura 12. Gel de corrimiento de gliadina y glutenina

3.3 Desesterificación de pectina cítrica y cuantificación de grupos metoxilo

Se decidió trabajar con pectina cítrica de bajo metoxilo por su propiedad de gelificar sin altas concentraciones de azúcar (como sucede en la pectina cítrica de alto metoxilo), siendo de interés poder diseñar interacciones químicas entre este polisacárido y una proteína que pueda ser utilizada en la fabricación de alimentos con bajo contenido de azúcares.

Una vez iniciado el proceso de desesterificación se tomaron muestras cada 20 minutos deteniéndose el proceso al disminuir el pH (sección de metodología). La cuantificación de grupos metoxilos presentes en cada una de las muestras desesterificadas ayudó a construir la gráfica que se muestra en la Figura 13.

Se considera una pectina de bajo metoxilo aquellas que contienen menos del 50% de estos grupos unidos a sus cadenas (Vivar-Vera 2005). Por lo anterior se observa que a partir del minuto 80 de desesterificación se obtiene una pectina cítrica de bajo metoxilo (Figura 13). Para el caso de esta investigación se trabajó con pectinas con 30% de grupos metoxilo.

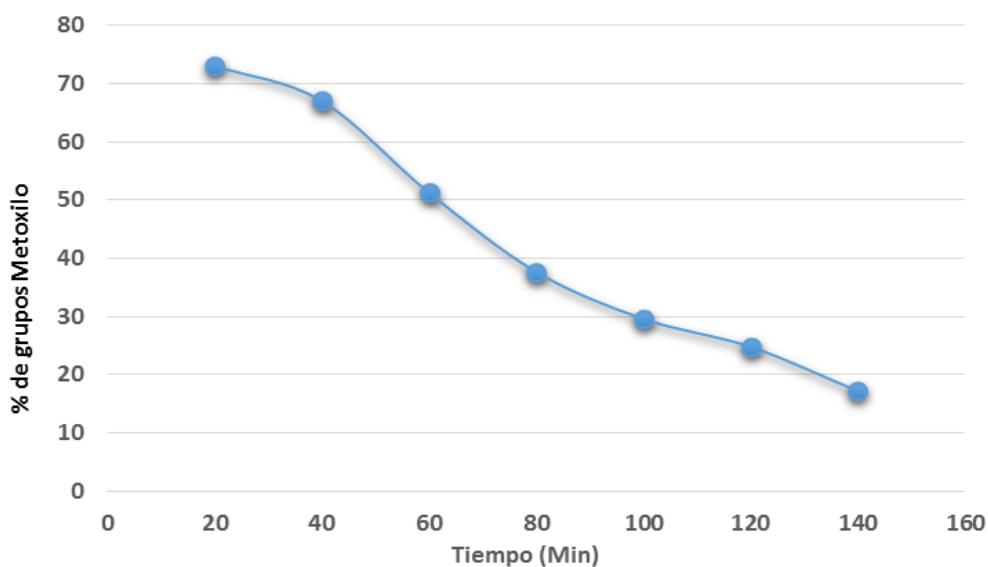


Figura 13. Disminución de la cantidad de grupos metoxilos en pectina cítrica

3.4 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

El termograma 1 (Figura 14) compara a la gliadina cruda marca Sigma y a la gliadina precipitada con acetato de amonio (Ver sección 2.4).

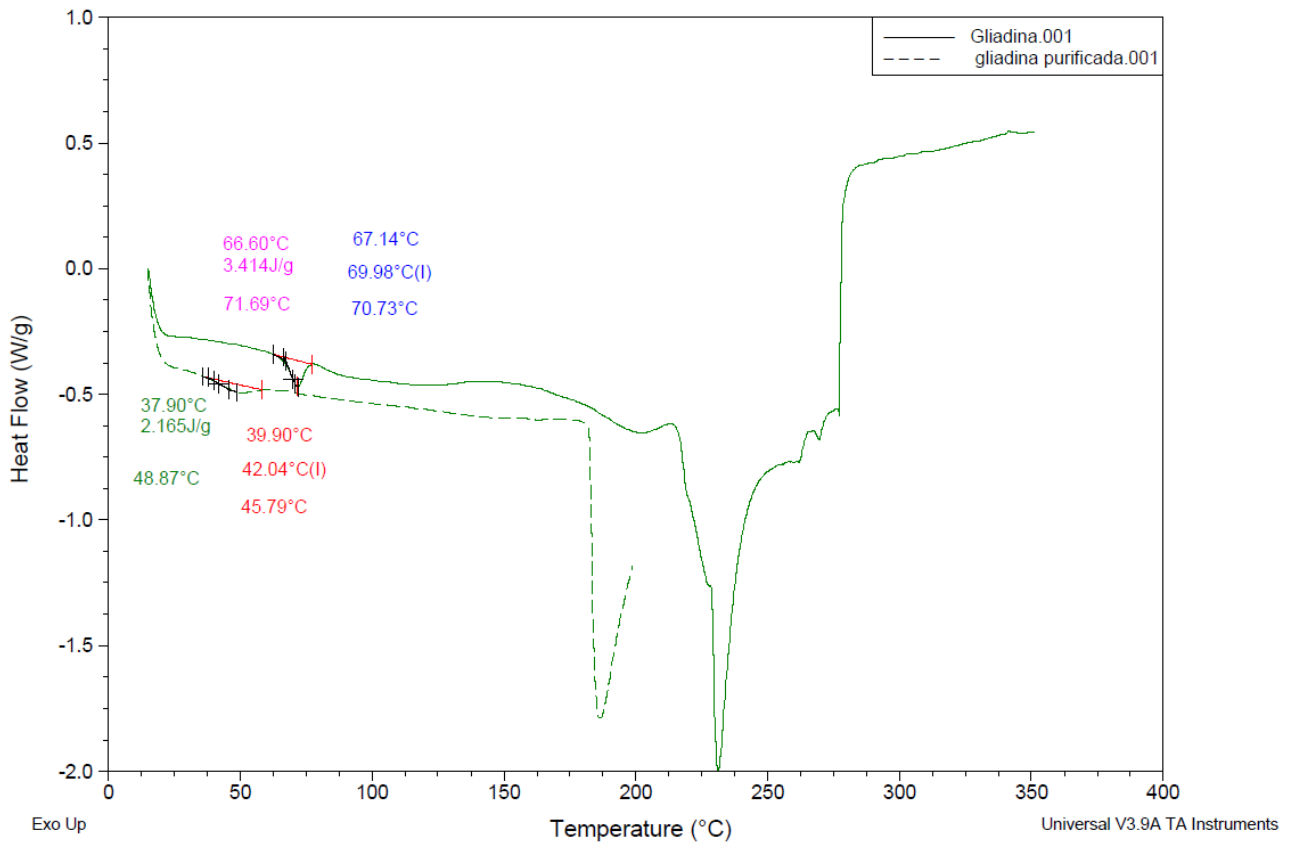


Figura 14. Comparación de propiedades térmicas entre gliadina (SIGMA) y gliadina con mayor grado de pureza.

El las Figuras 15 y 16 se presenta un acercamiento en el punto de desnaturalización, encontrándose una depresión de la curva. Así mismo, el Tabla 8 resume los datos obtenidos de estos termogramas.

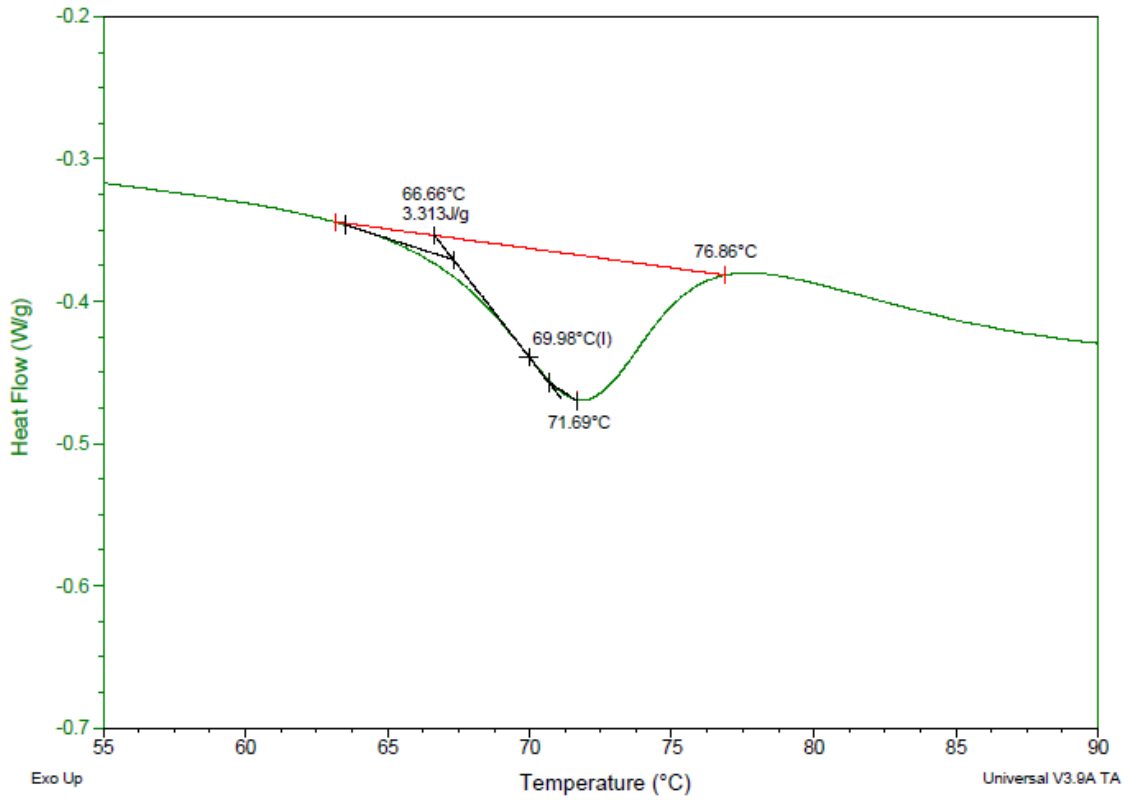


Figura 15. Termograma de gliadina cruda (SIGMA) mostrando su temperatura de desnaturalización

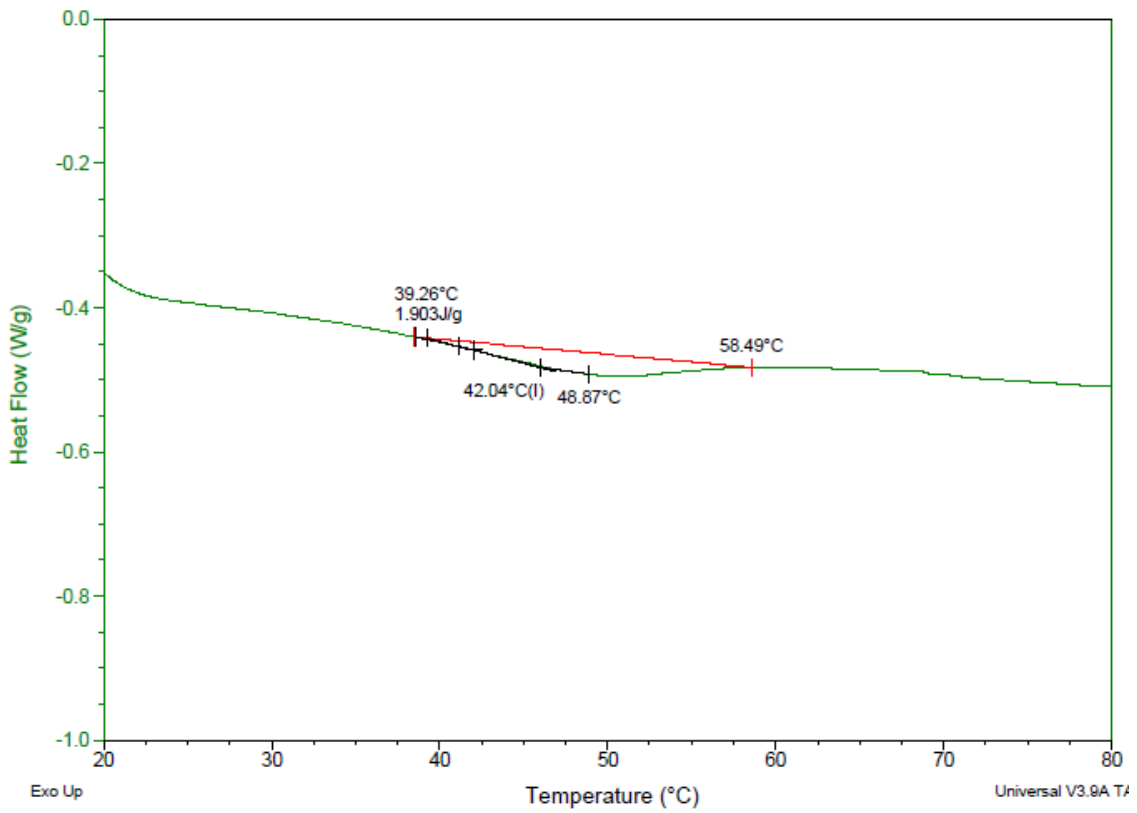


Figura 16. Termograma de gliadina precipitada con NH₄Ac/MeOH mostrando su punto de desnaturalización.

Tabla 8. Propiedades calorimétricas de gliadina

Transición vítrea	Gliadina Cruda (SIGMA)	Gliadina precipitada con NH ₄ Ac
Rango de Temperatura	66.6-76.9 °C	39.3-58.5 °C
<i>T_g</i>	69.9°C	42.1°C
ΔH	3.31 J/g	1.91 J/g
<i>C_p</i>	-0.321 J/g °C	-0.099 J/g °C

Existe una clara diferencia entre las propiedades térmicas de la gliadina comercial y la gliadina purificada (Tabla 8). El pico de transición vítrea representa la temperatura de desnaturalización de la gliadina, al ser menor en la gliadina precipitada (42.1°C) señala un mejor grado de pureza.

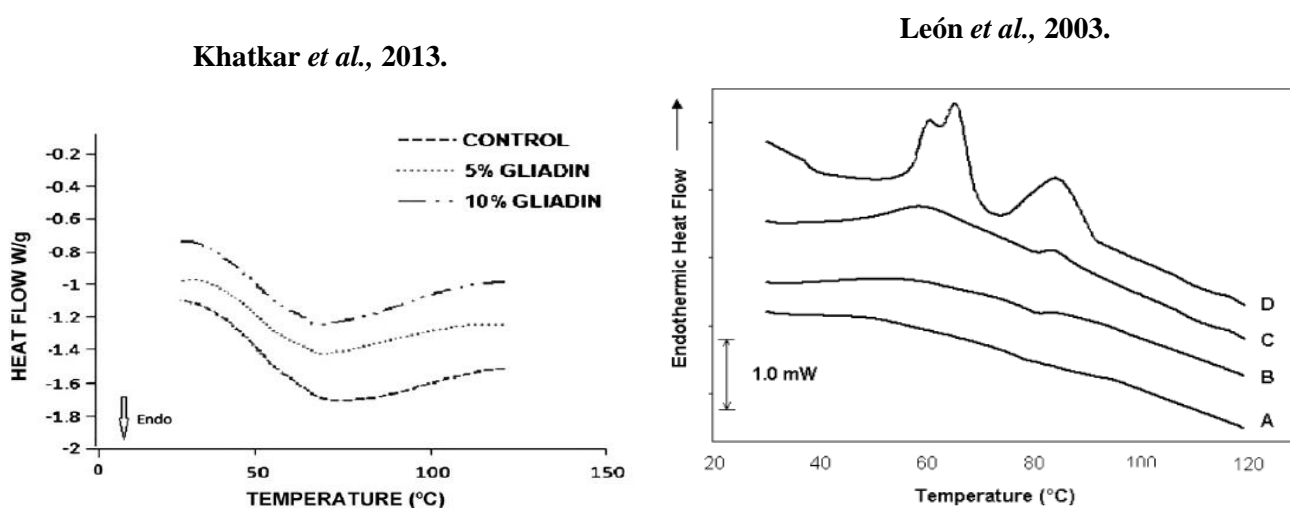


Figura 17 Comparación de termogramas con diferentes temperaturas de transición vítrea

Han sido pocas las investigaciones que han estudiado las propiedades térmicas de la gliadina. En la literatura existen referencias (León et al., 2003 y Khatkar B.S, 2013) en las que se presentan termogramas con diferentes temperaturas de transición vítrea (Figura 17); sin embargo, estas variaciones resultan de los diferentes métodos de extracción de gliadina y a métodos de purificación utilizados. A pesar de esto, se le tiene como valioso antecedente del comportamiento térmico de la gliadina.

La Figura 18 compara el comportamiento térmico de la pectina cítrica de alto y bajo metoxilo. Para realizar esta prueba se usó una rampa de 10°C y una temperatura que llegó a los 320°C, temperaturas que permitieron observar el comportamiento de este polisacárido en su punto de degradación térmica. Los datos obtenidos en las transiciones encontradas se resumen en la Tabla 9.

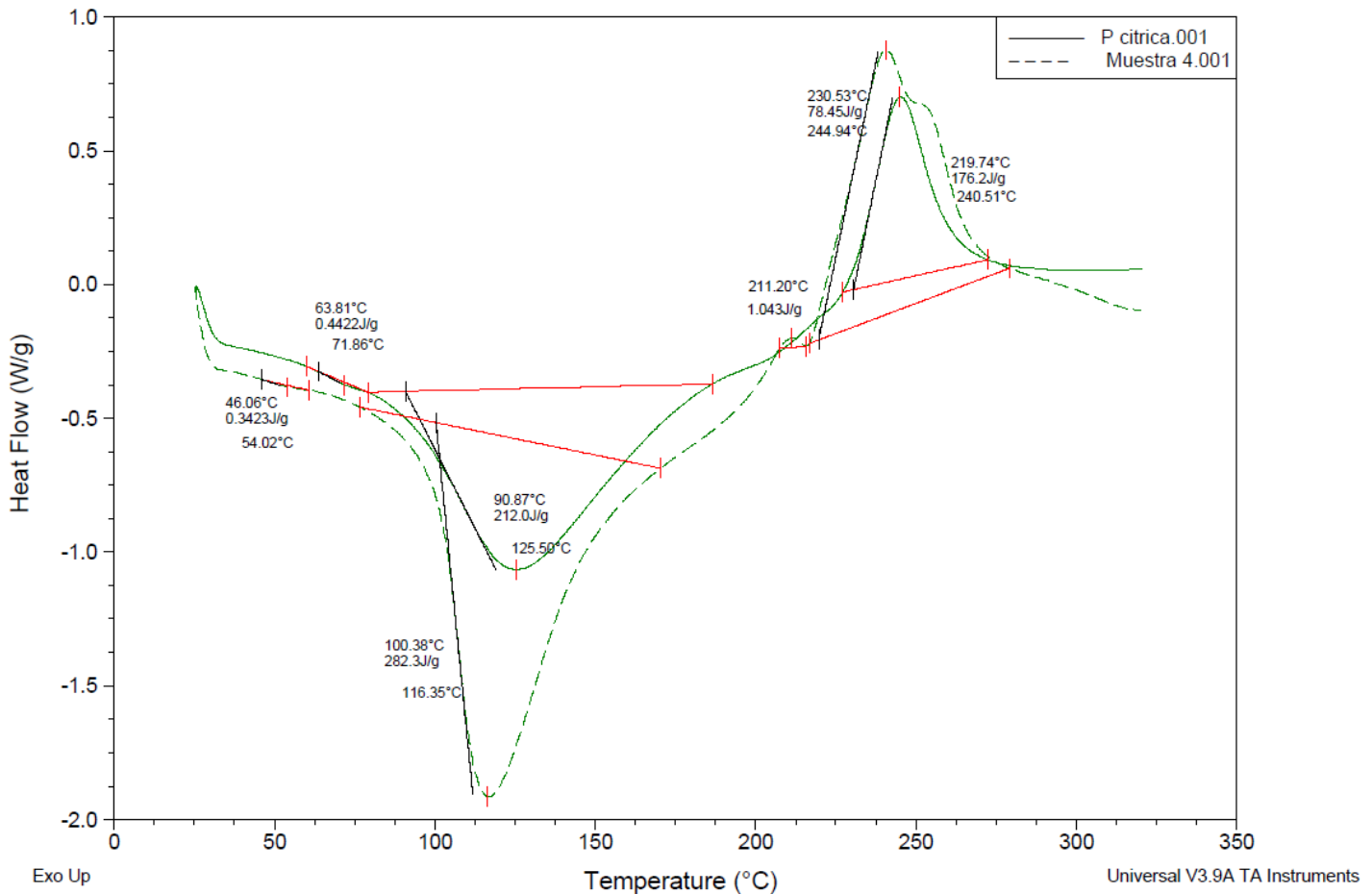


Figura 18. Comparación de propiedades térmicas de pectinas de alto y bajo metoxilo

También, respecto al comportamiento térmico de pectina son pocos los antecedentes encontrados. La mayoría de las investigaciones se han realizado con la pectina en disolución o cual no es comparable con la metodología. Sin embargo, Einhorn-Stoll y Kunzek (2009) determinaron la temperatura de descomposición térmica en promedio a 250°C para pectina cítrica con diferentes tratamientos (Figura 19). Para el caso de esta investigación la temperatura de descomposición promedio fue de 242°C, muy cercana a lo que se reporta en la literatura.

Tabla 9. Transiciones térmicas en pectina cítrica de alto y bajo metoxilo.

		P. Cítrica	P. Cítrica de bajo metoxilo
Temp. de transición vítrea	Rango de Temp	64.5 – 71.3 °C	45.3 – 66.6 °C
	Tg	66.1 °C	50.6 °C
	ΔH	0.386 J/g	0.587 J/g
	Cp	-0.057 J/g °C	-0.027 J/g °C
Evaporación de agua	Rango de Temp	90.9 – 182.6 °C	106.7 – 192.5 °C
	ΔH	206.6 J/g	276.5 J/g
	Cp	-2.253 J/g °C	-3.222 J/g °C
Desintegración de la muestra	Rango de Temp	230.9-267.1 °C	215.8 – 265.9 °C
	ΔH	75.1 J/g	157.9 J/g
	Cp	-2.074 J/g °C	-3.151 J/g °C

La Tabla 9 resume las diferencias térmicas encontradas entre la pectina cítrica de alto y bajo metoxilo. Se observa que el intervalo de temperatura en el que tiene lugar la transición vítrea es menor en pectinas de bajo metoxilo, mientras que su ΔH es mayor. El ΔH y la Cp resultaron con un amplio intervalo de diferencia mayores en la pectina de bajo metoxilo, el mismo fenómeno se repite cuando llegan al punto de desintegración.

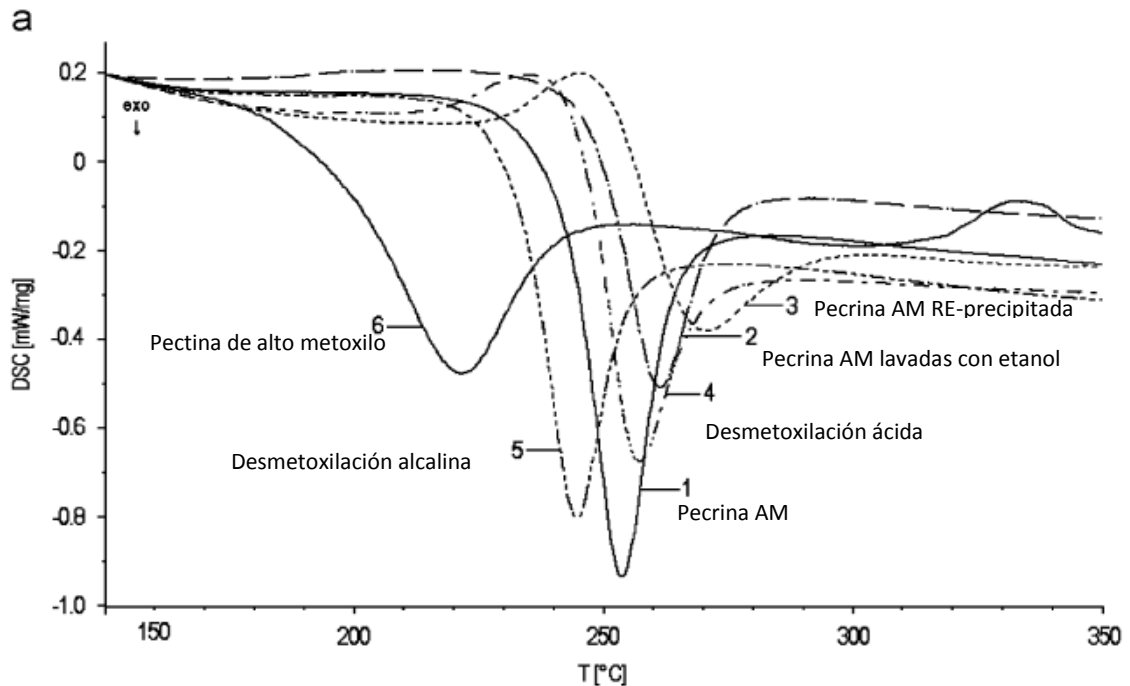


Figura 19. Comparación de propiedades térmicas de pectinas de alto metoxilo bajo diferentes métodos de extracción y desmetoxilación

3.5 Comportamiento al flujo y viscoelástico de gliadina en solución

Se caracterizó la gliadina en concentraciones de 1 y 3%. Aunque la gliadina ya no será solubilizada en alcohol, la evaluación del comportamiento reológico valdrá como punto de partida y estudio comparativo de la proteína. Los estudios que reportan comportamiento reológico de gliadina lo hacen en solución con alcohol isopropílico evaluando diferentes condiciones.

La Figura 20 muestra el comportamiento al flujo de esta proteína en disolución, mientras que la Figura 21 presenta la viscosidad aparente contra la velocidad de cizalla para las mismas dispersiones (gliadina al 1 y 3%). Tal como corroboran las figuras, la gliadina en dispersión se comporta como un fluido Newtoniano, es decir, la viscosidad del fluido es independiente de la velocidad de corte, este comportamiento había sido reportado previamente por Sun et al., (2009). Para la concentración a 1% se obtuvo una viscosidad de 4.88 mPa s, y a 3% la viscosidad aumento a 5.71 mPa s.

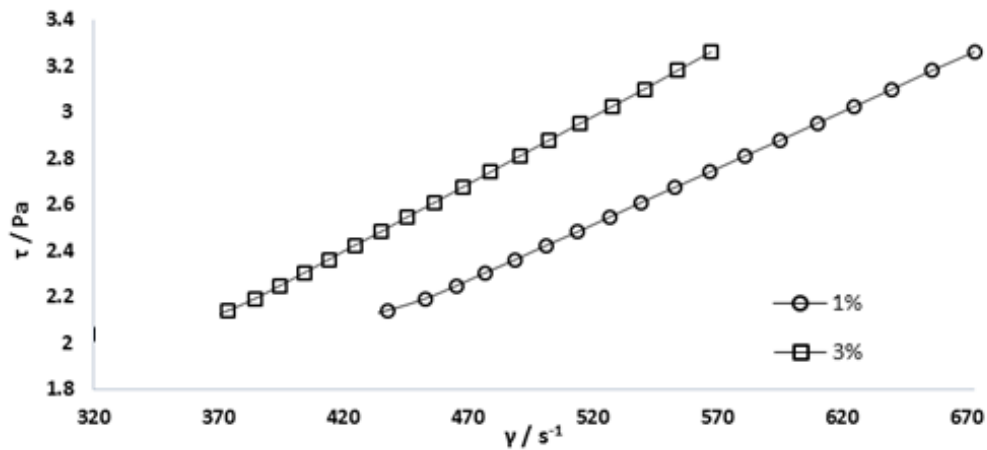


Figura 20. Comportamiento al flujo de gliadina (1 y 3%) en dispersión con propanol al 70%.

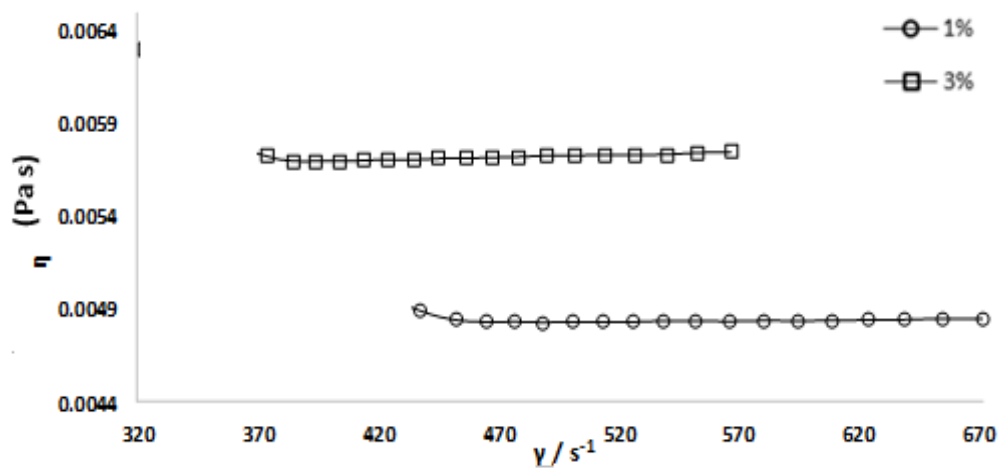


Figura 21. Comportamiento al flujo de dispersiones de gliadina (1 y 3%) en propanol al 70%.

Las Figuras 22 y 23 presentan un barrido de frecuencia para dispersiones de gliadina a dos diferentes concentraciones. Es interesante notar que su comportamiento es similar predominando el módulo de almacenamiento (G') sobre el módulo de pérdida (G''). Para la concentración a 1% G' estuvo en un rango de 0.0013-1.93 Pa y para G'' de 0.0039-0.687 Pa, en la concentración de 3% el rango de G' fue 0.091-3.27 Pa, mientras que para G'' 0.0197-0.572Pa.

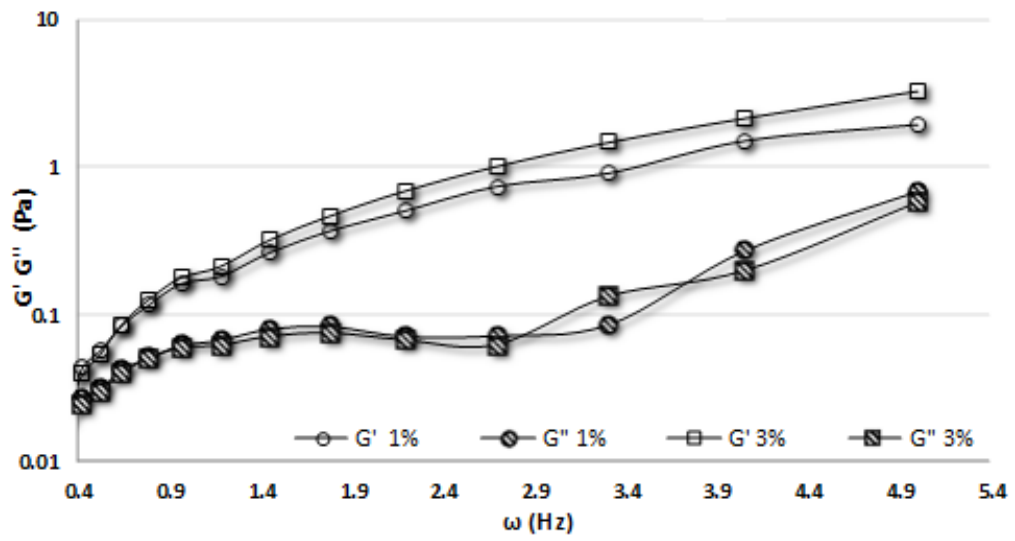


Figura 22. Barrido de frecuencia de dispersiones de gliadina (1 y 3%) en propanol al 70%.

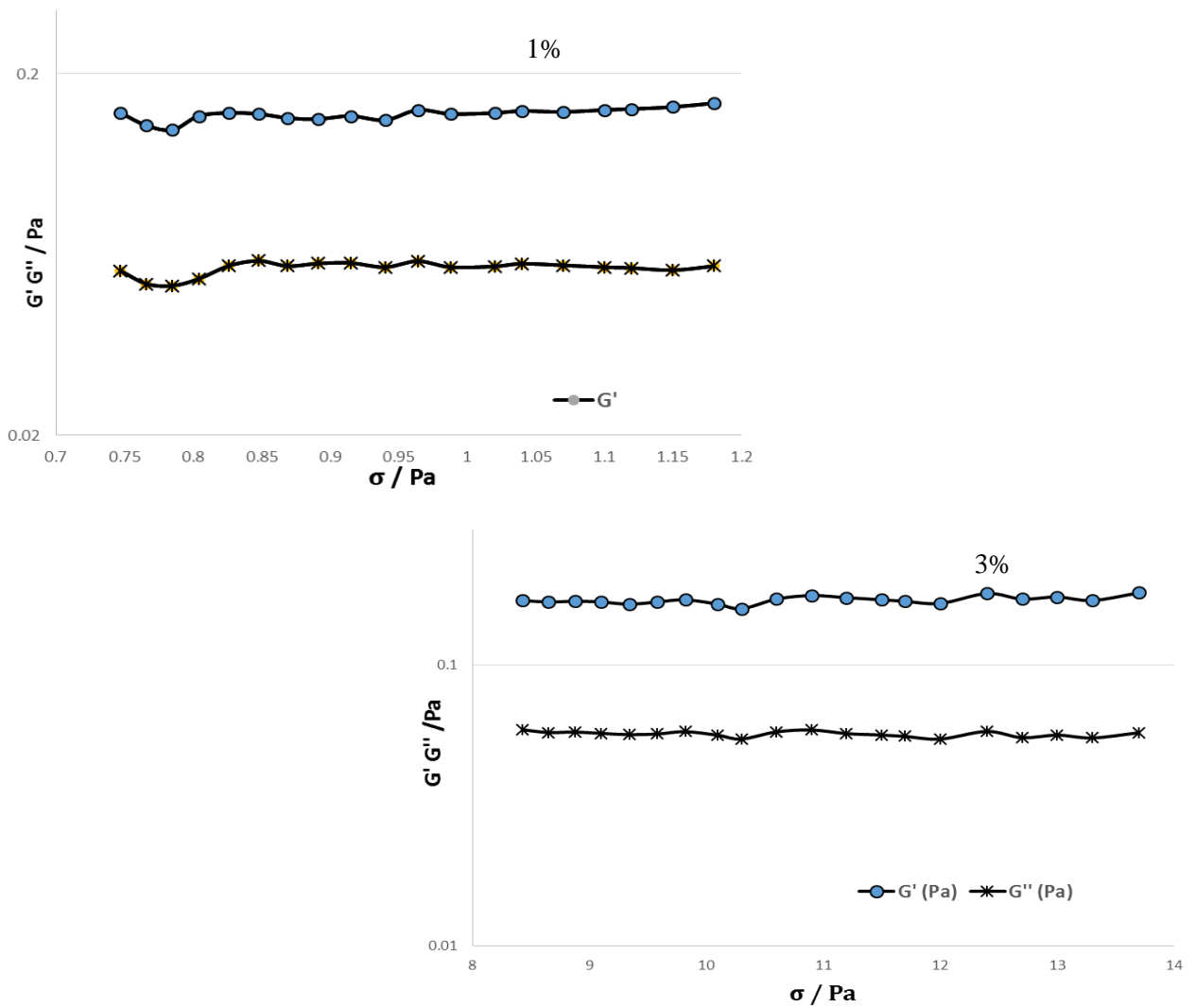


Figura 23 Barrido de amplitud en dispersiones de gliadina al 1 y 3%

Estos resultados sugieren que el carácter viscoso de la gliadina predomina a estas concentraciones (Xu, et al., 2007), aunque sus propiedades no son las de un fluido viscoso completamente homogéneo como el aceite o el glicerol. Sun et al., (2008) proponen que la predominancia de G' se debe a que la gliadina en solución con propanol forma interacciones intermoleculares complejas y Martling et al., (2004) mostraron que la gliadina en solución a $\leq 70^\circ\text{C}$ podría encontrarse en una forma más entrecruzada que la original, debido a la formación de algunos entrecruzamientos. De acuerdo con la clasificación propuesta por Clark y Ross-Murphy (1987), la gliadina en dispersión se comporta como gel débil.

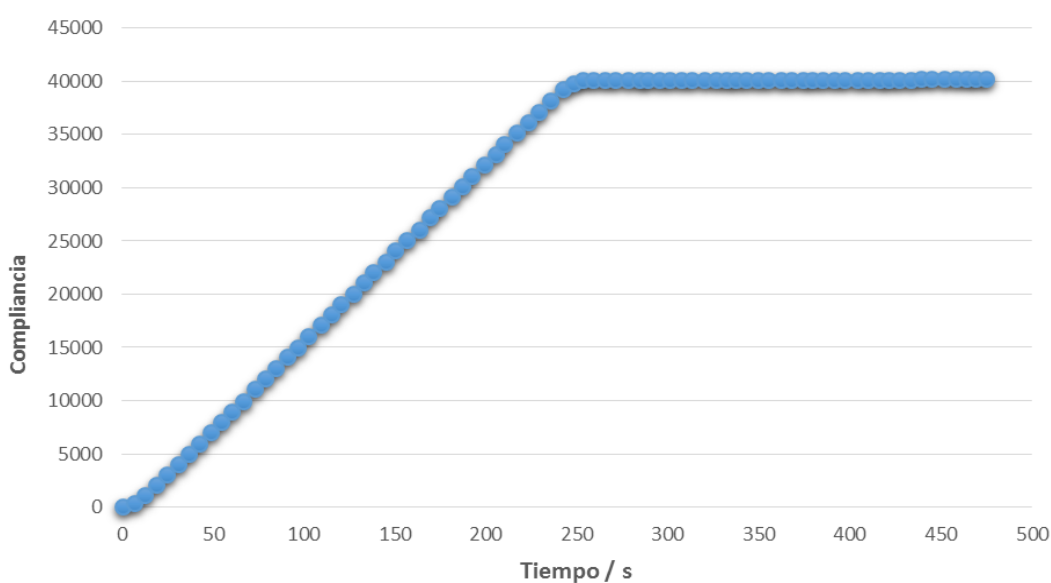


Figura 24 Curva de Creep para dispersión de gliadina al 3%

De acuerdo a la curva de creep obtenida a una concentración de gliadina al 3% (Figura 24) se infiere que la disolución se comporta como un líquido viscoelástico, un material viscoso ideal donde no existe recuperación.

3.6 Curvas de titulación

Se obtuvieron dos curvas, una resultante de la valoración con NaOH y la segunda realizando la titulación con HCl y la Figura 25 las conjunta. Es posible observar el comportamiento general de la gliadina, proteína de reserva presente en el trigo; es decir, mediante estas curvas puede determinarse el punto isoeléctrico, sus pH's de desnaturalización y los pK's de la proteína.

En la Figura 25 se observa que la desnaturalización de la proteína se da a los pH's de 3.0 y 11.7; el pK₁ se encuentra a pH 4 donde todos los grupos aparecen protonados (carboxilo y amino) y el grupo amino presenta una carga positiva neta; el pK₂ se encuentra a pH 9.7 en este punto el carboxilo sigue disociado (COO⁻) y el amino pierde un protón (-NH₂), existe carga negativa; y el punto isoeléctrico se encuentra a pH 6.8; es decir, el carboxilo permanece cargado negativamente y el grupo amino también con carga positiva (*zwitterion*).

Respecto a las propiedades químicas de la proteína son escasa las investigaciones que abordan el tema, Thewissen *et al.* (2011) menciona un pI de la gliadina a pH de 7.8, basándose en una investigación de 1963; sin embargo, al consultar tal investigación, este dato no se encuentra reportado. Tague (1925) usando la técnica de curvas de titulación reportó que el pI de la gliadina se encuentra a pH 6.5.

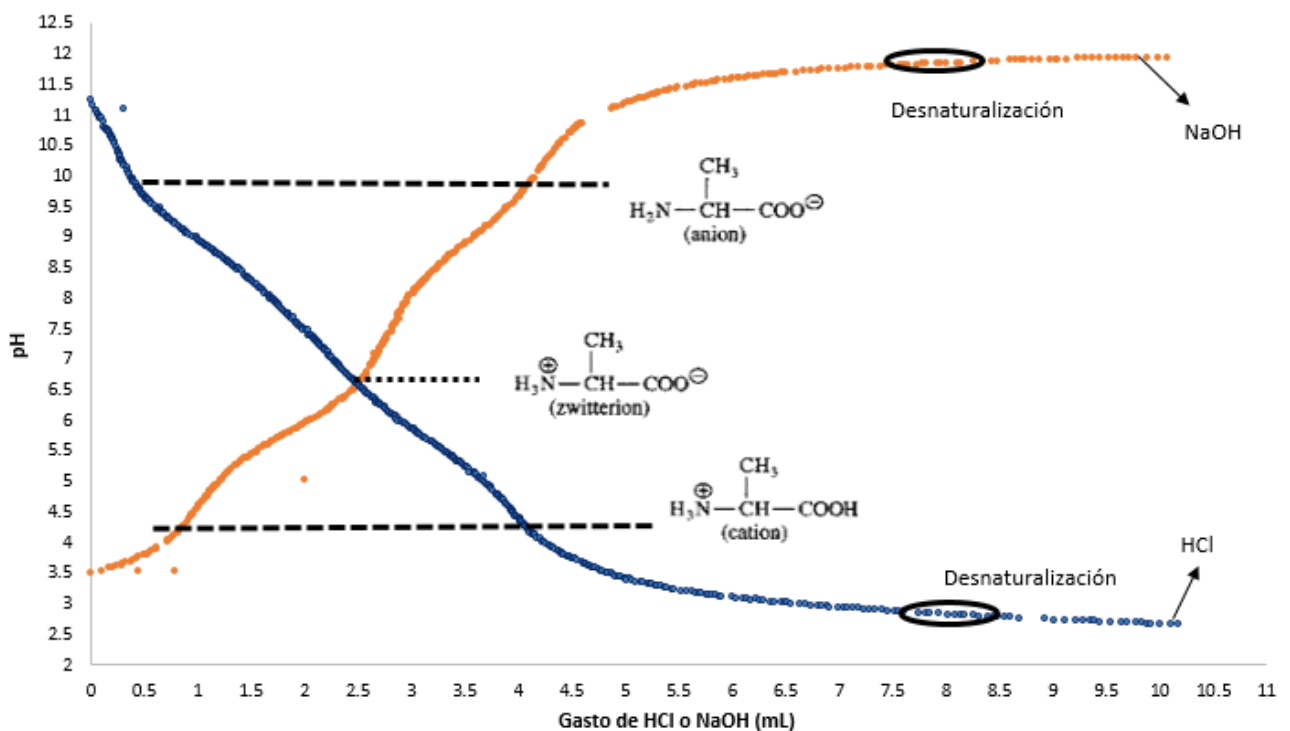


Figura 25 Análisis de curvas de titulación de gliadina

3.7 Potencial zeta para gliadina y pectina de bajo metoxilo (PBM)

La Figura 26, presenta a la PBM fue dispersada en agua desionizada y el comportamiento obtenido con respecto al cambio de pH es similar al conseguido en otras investigaciones. Aunque hay muy pocos estudios que reporten el potencial zeta para este polisacárido, Gilsenan et al., (2003), presentó una gráfica que desarrollo por titulación y muestra el cambio en la carga de este polisacárido con respecto al cambio en el pH. También Bengoechea et al., (2011), publicó el potencial zeta de la pectina de alto metoxilo de un rango amplio de pH (2-10)

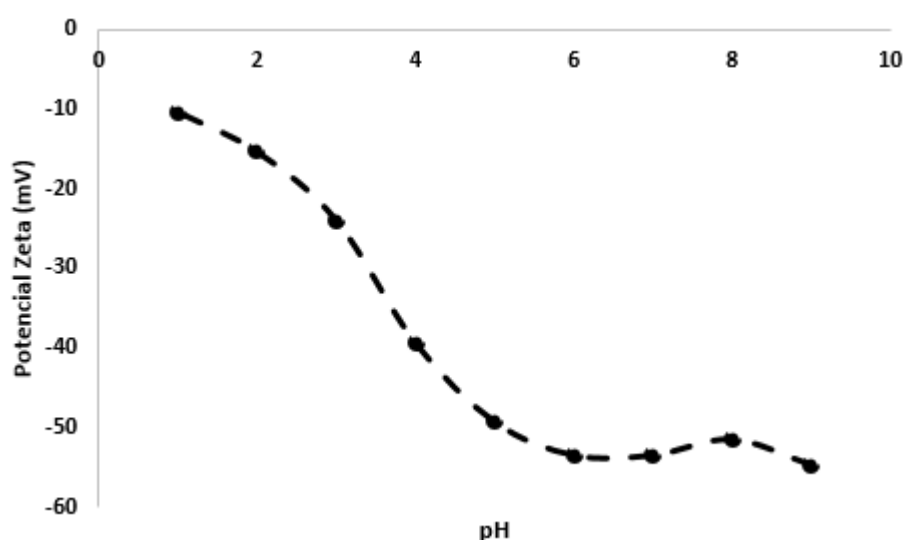


Figura 26. Potencial Zeta de pectina de bajo metoxilo

Para el caso de la gliadina se propusieron dos agentes solubilizantes, uno de ellos es 1-propanol al 70% y el otro NaCl 2%. Al determinar el potencial zeta de estas soluciones se observa para aquellas solubilizadas en alcohol un comportamiento esperado; es decir, por arriba del punto isoeléctrico de la proteína se esperan cargas negativas y por debajo del pI positivas; sin embargo, en la figura se puede ver que al solubilizar la gliadina en NaCl no es posible evaluar el potencial zeta pues se comporta con carga negativa siempre, seguramente esto se debe a la alta ionización del medio al realizar esta determinación. Lo anterior sugiere encontrar algún otro agente solubilizante diferente al alcohol y que no interfiera con la carga neta de la proteína. Ducelet al., (2004) ha realizado el único reporte encontrado que presenta el potencial zeta de una de las fracciones de la gliadina, a saber, la fracción alfa.

El pH tiene un papel clave en la formación de complejos carbohidrato-proteína, debido a su efecto sobre el grado de ionización de los grupos funcionales presentes en los biopolímeros (es decir, los grupos amino y carboxílicos). Por esta razón, considerando una mezcla que contiene un polisacárido aniónico y una proteína por debajo de su pI, los dos biopolímeros llevan exactamente cargas opuestas netas resulta en un máximo de atracción electrostática (Schmitt C. *et al.*, 1998). La Figura 27 presenta el comportamiento catiónico y aniónico de la proteína y los polisacáridos elegidos, demostrando que podría ser viable la interacción química entre ellos.

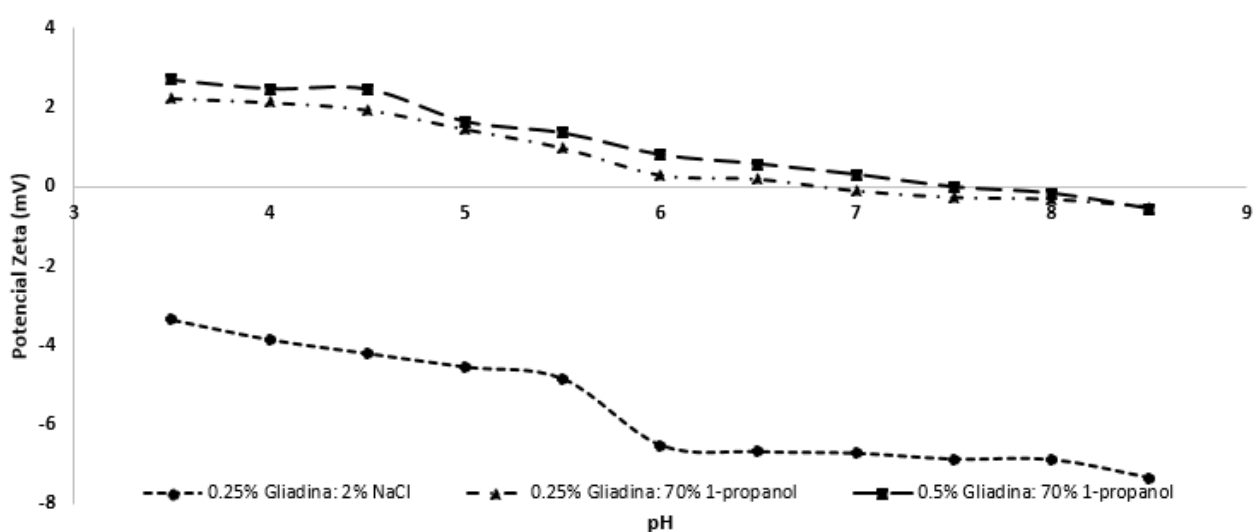


Figura 27. Potencial zeta de gliadina en función del pH

3.8 Solubilidad de gliadina

Para solubilizar a la proteína se prepararon diferentes soluciones buffer y se obtuvieron los siguientes resultados:

En la Figura 28 se observa que el buffer fostato no permitió la correcta solubilización de la proteína, quedando porciones de la misma pegadas en las paredes del vaso, lo mismo ocurrió cuando se intentó solubilizar con agua desionizada a diferentes pH's. Sin embargo, el mejor buffer resultó ser el ácido acético al 0.1%, logrando una dispersión uniforme de la proteína como lo había reportado Chourpa I., et al., (2006).

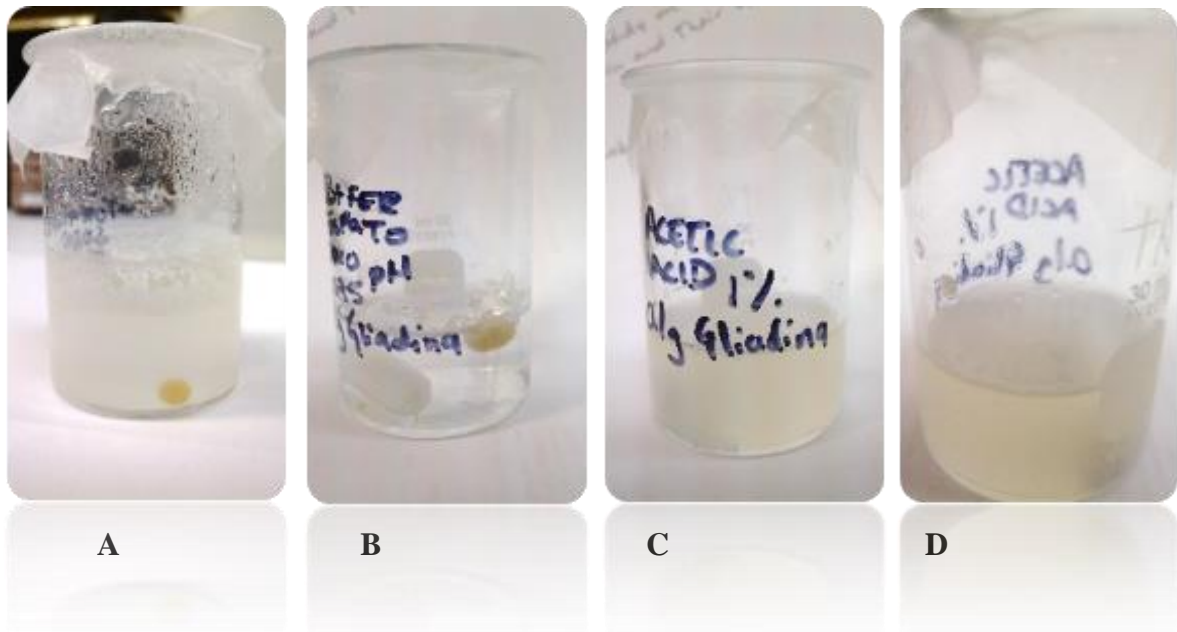


Figura 28. Solubilidad de la Gliadina en diferentes disolventes. A y B Buffer Fostato de Sodio pH= 5.75; C y D Buffer de Ácido Acético al 1% pH=3.5.

3.9 Evaluación del potencial zeta en dispersiones de gliadina y pectina de bajo metoxilo en ác. acético con nuevo agente dispersante

Se seleccionó una solución de Ácido Acético como nuevo agente dispersante, por lo tanto, fue necesario determinar el potencial zeta de los biopolímeros en dispersión (gliadina y pectina de bajo metoxilo). La Figura 29 los muestra con respecto al cambio en el pH.

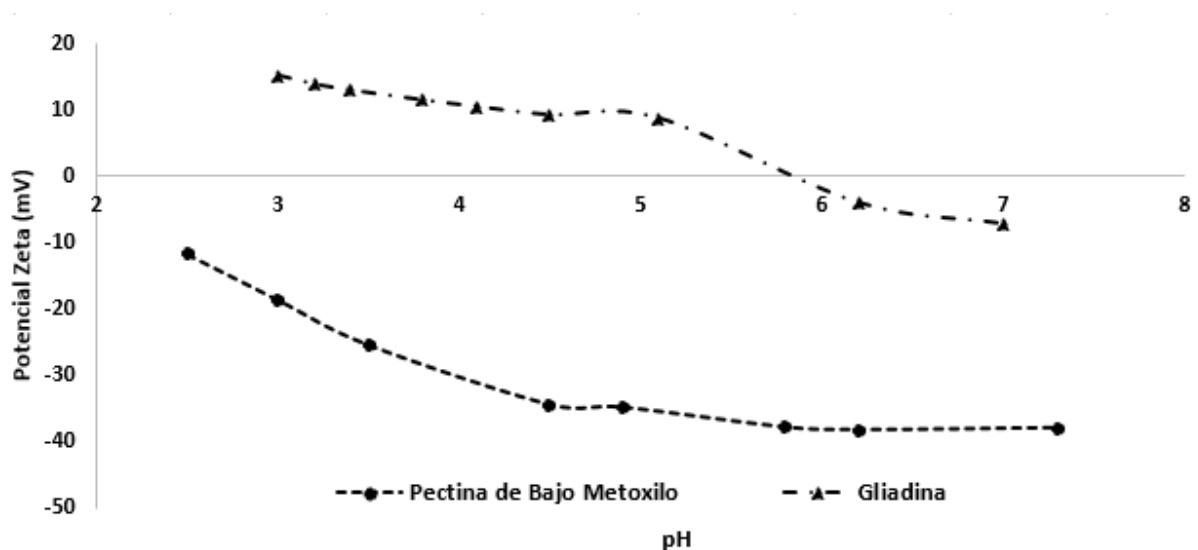


Figura 29. Potencial zeta (mV) con respecto al cambio de pH

Además, se realizó una comparación del cambio de potencial zeta con respecto al cambio de pH de la gliadina que fue dispersada en diferentes soluciones buffer (Figura 30).

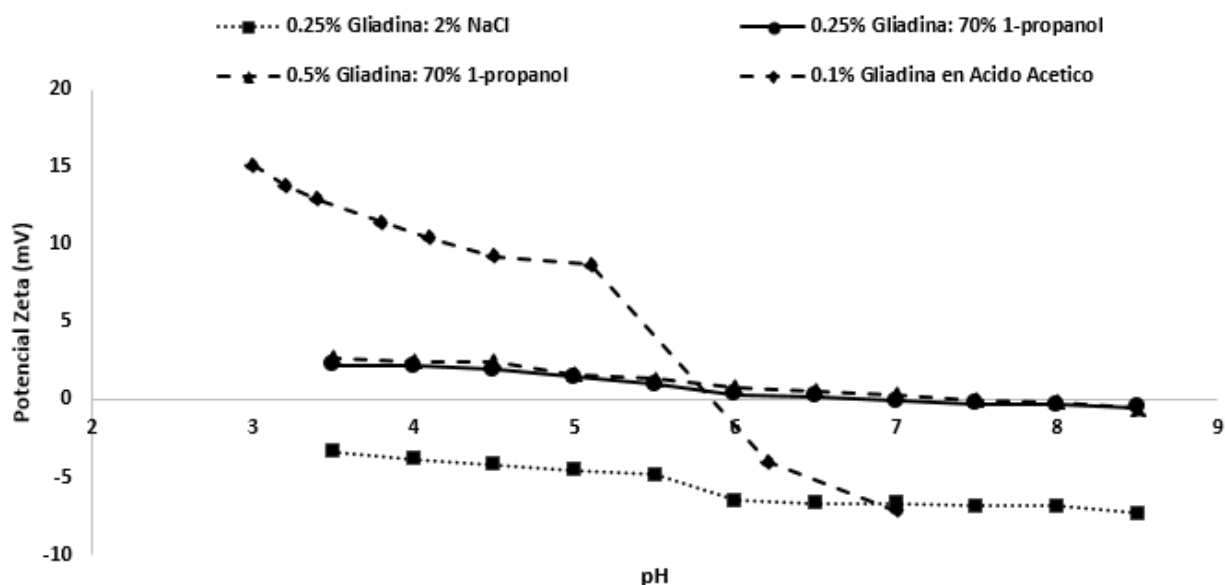


Figura 30. Potencial zeta de gliadina dispersada en diferentes buffer's

El isopropanol al 70% resulta ser el mejor agente dispersante de la proteína; sin embargo, para la preparación de las mezclas carbohidrato-proteína afectaría la dispersión, debido a que el isopropanol rompe los puentes de hidrógeno presentes entre la pectina de bajo metoxilo y el agua, precipitándola y favoreciendo la formación de un gel, por ello fue necesario encontrar otro medio donde los polisacáridos pudieran ser también dispersados. Como se observa en la Figura 30, se adicionó NaCl el cual permite una buena dispersión pero no permite expresar la carga neta de la proteína, lo anterior debido al alto grado de ionización del Cl^- . En la misma figura se observa el efecto del ácido acético (1%) como un buen agente dispersante para las tres biomoléculas, permitiéndoles expresar su carga (mV), parámetro fundamental en la realización de interacciones proteína-polisacárido. La Figura 31 presenta el cambio en la carga de la PBM con respecto al pH y al medio en dispersión.

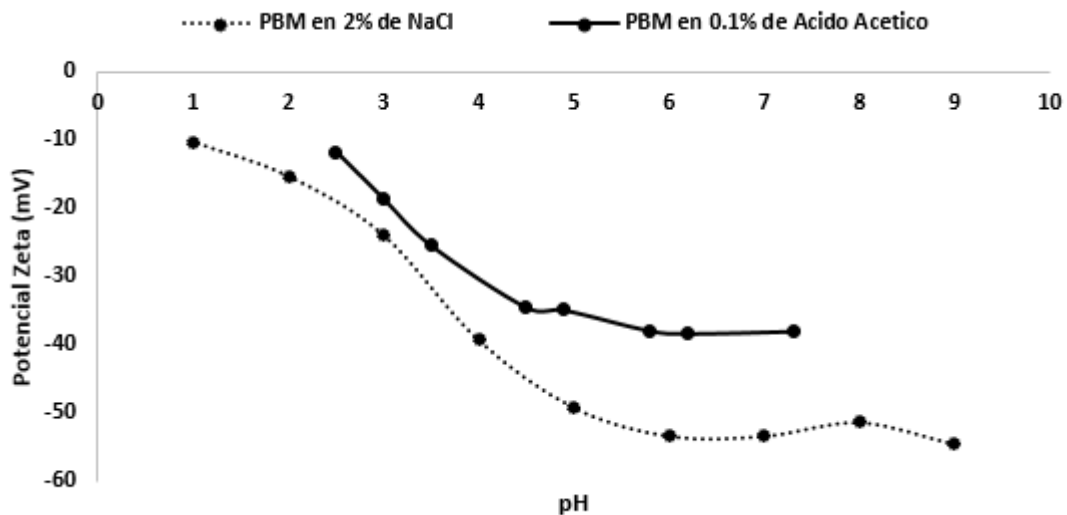


Figura 31. Comparación de Potencial Zeta para Pectina de Bajo Metoxilo en dos agentes dispersantes.

La pectina de bajo metoxilo (PBM), un polisacárido aniónico que contiene a los grupos carboxilo como grupos funcionales, mostró una carga negativa en todo el rango de pH estudiado. Lopes da Silva & Rao (2006) demostraron que la constante de ionización intrínseca de la pectina (pK_o) es independiente de la concentración, el grado de metoxilación y polimerización, este ha sido reportado en un rango de 2.9-3.2, valor cercano al pK_o del ácido galacturónico. De acuerdo a la Figura 31, se observa que la pendiente máxima de potencial zeta encontrada para la PBM se encuentra cerca de 3.0, aunque en ambos bufer's la pectina de bajo metoxilo presenta suficiente carga negativa para poder interactuar con un biopolímero cargado positivamente, se eligirá al ác. acético como agente dispersante.

3.10 Espectros de IR en gliadina y pectina de bajo metoxilo

Dentro de la caracterización de los biopolímeros, se obtuvieron los espectros de infrarrojo de Gliadina y Pectina de Bajo Metoxilo en el equipo ATR-FT/IR. Además, se propuso la dispersión de estos en diferentes agentes dispersantes y la comparación de los mismos. La Figura 31 presenta los espectros obtenidos de la dispersión de Gliadina en NaCl y Ac. Acético, no se observan diferencias significativas presentándose una banda en 1632 y 1638 nm. La Figura 31 muestra los espectros obtenidos de PBM en dispersión con agua destilada y ácido acético, resulta evidente que se presenta un comportamiento muy parecido entre ambos espectros.

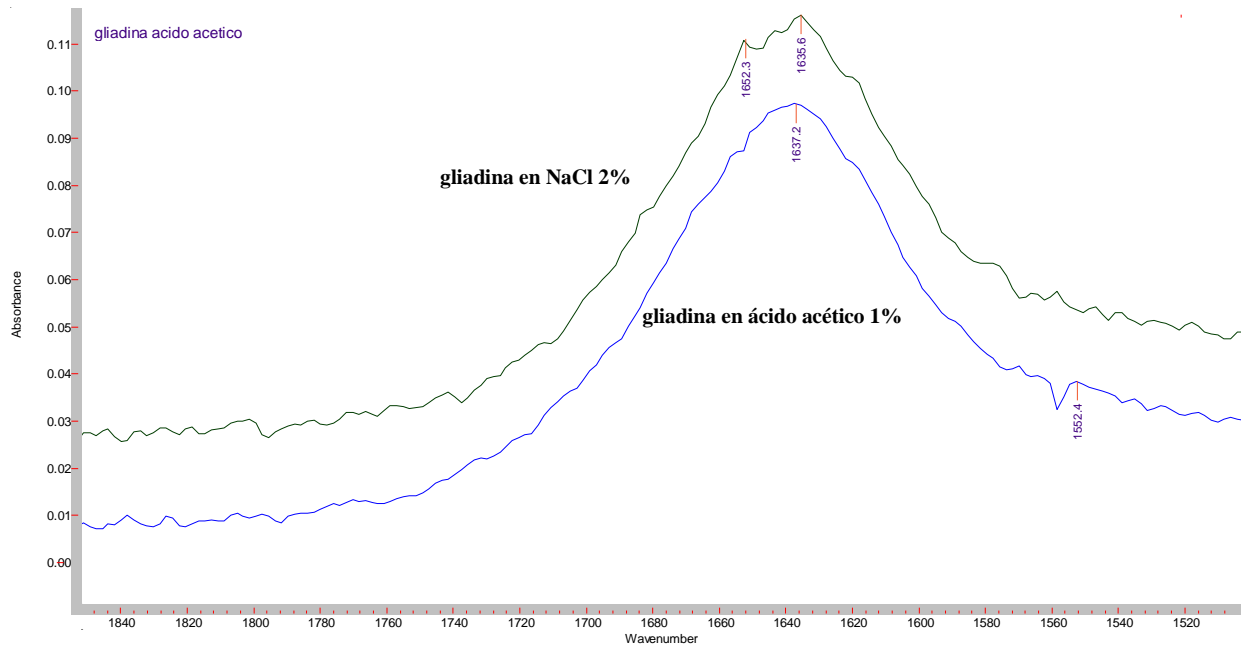


Figura 32. Espectros de infrarrojo para gliadina en dispersión

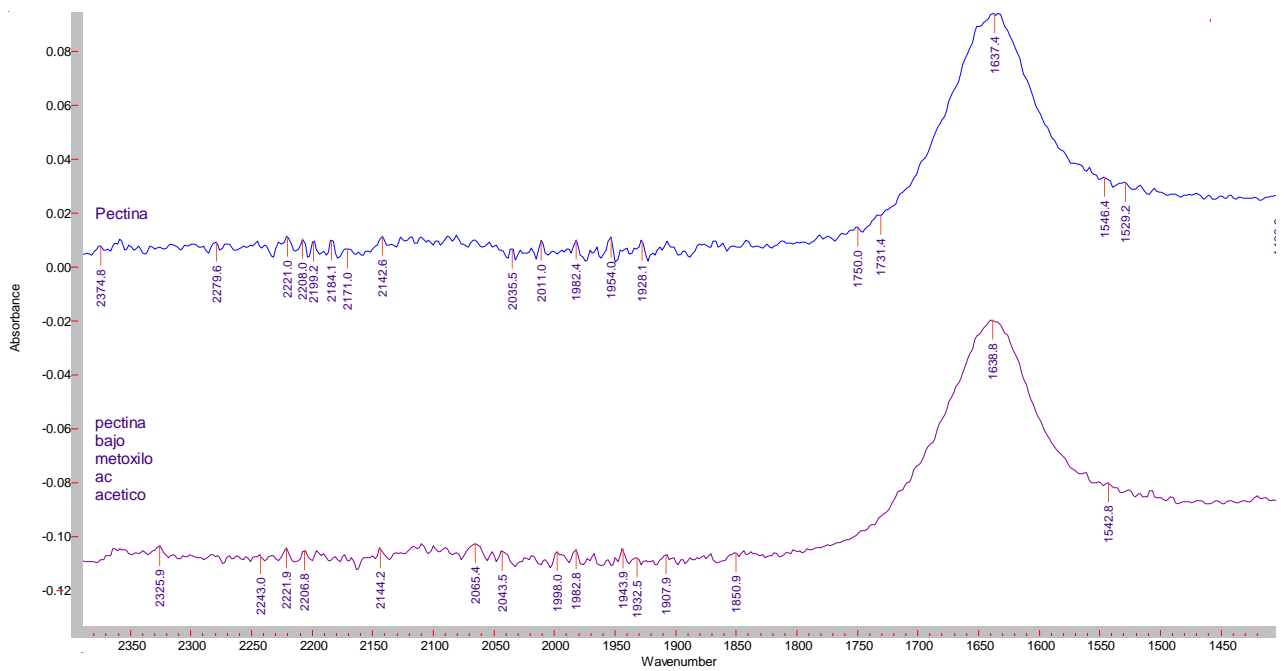


Figura 33. Espectro infrarrojo de la pectina de bajo metoxilo dispersa en agua desionizada y ácido acético.

3.11 Preparación de mezclas carbohidrato-proteína

De acuerdo a los resultados obtenidos, fue necesario realizar una determinación de la estructura de los biopolímeros de interés para realizar la planeación de las mezclas PBM-gliadina. Un análisis de la Figura 34 sugiere que la banda emitida entre los 1650-1652 nm indica una conformación hélice-alfa, mientras que la banda observada entre los 1625-1635 nm se trata de una conversión de algunas estructuras hélice-alfa a hoja beta.

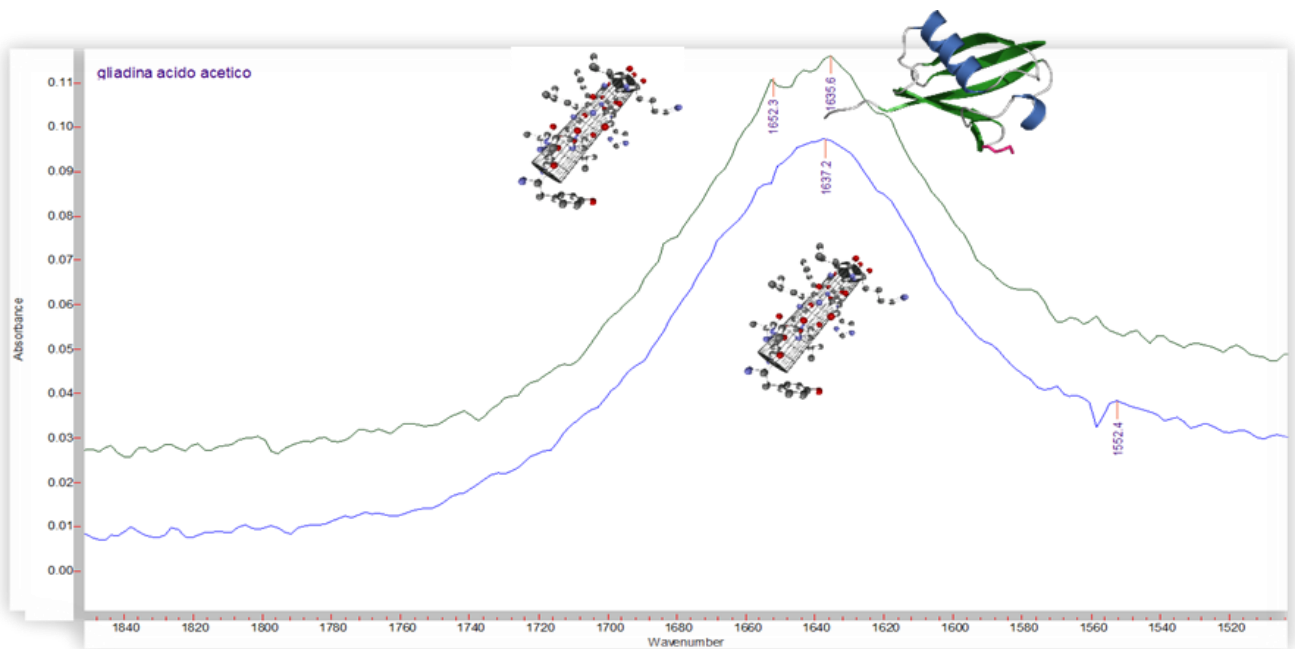
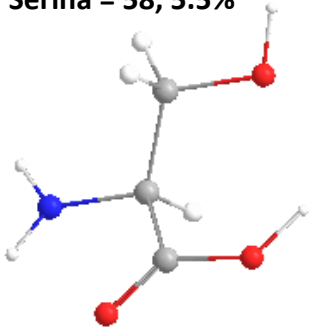


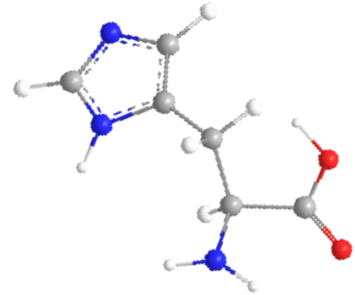
Figura 34. Espectro infrarrojo de la gliadina y estructuras de pectina de bajo metoxilo dispersa en agua desionizada y ácido acético

Rasheed et al., (2014), informaron que la secuencia de aminoácidos de la gliadina, está compuesta por aproximadamente 1,049 aminoácidos siendo la Glutamina, Prolina, Leucina, Fenilalanina, Serina e Isoleucina los de mayor proporción. Sin embargo, la mayoría de los aminoácidos presentes corresponden a alifáticos no polares que, por sus características, no presentan ninguna carga en dispersión. Existen también, aminoácidos de interés que ayudarán a formar las mezclas con la PBM y por sus sitios activos puedan formar interacciones electrostáticas con algunos sitios del polisacárido, estos aminoácidos se presentan en la Figura 35.

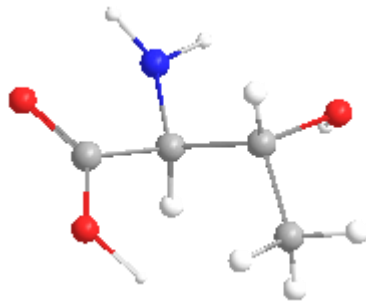
Serina = 58, 5.5%



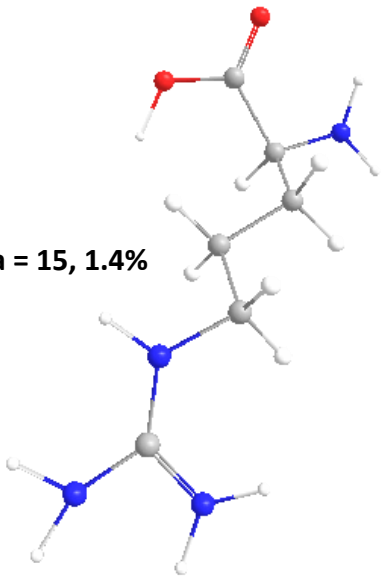
Histidina = 13, 1.2%



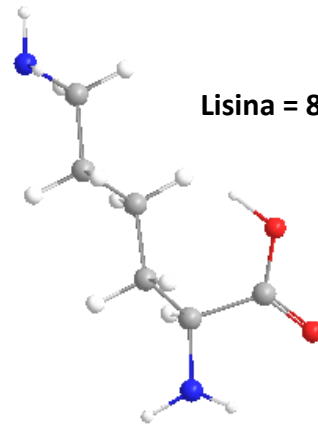
Treonina = 20, 1.9%



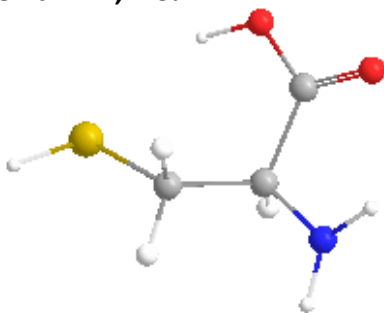
Arginina = 15, 1.4%



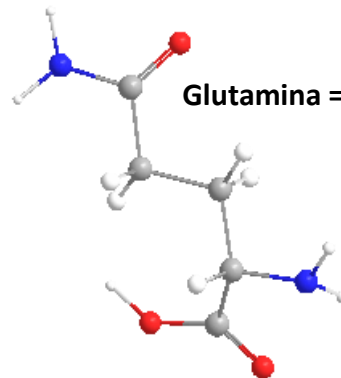
Lisina = 8, 0.8%



Cisteina = 14, 1.3%



Glutamina = 425, 40.5%



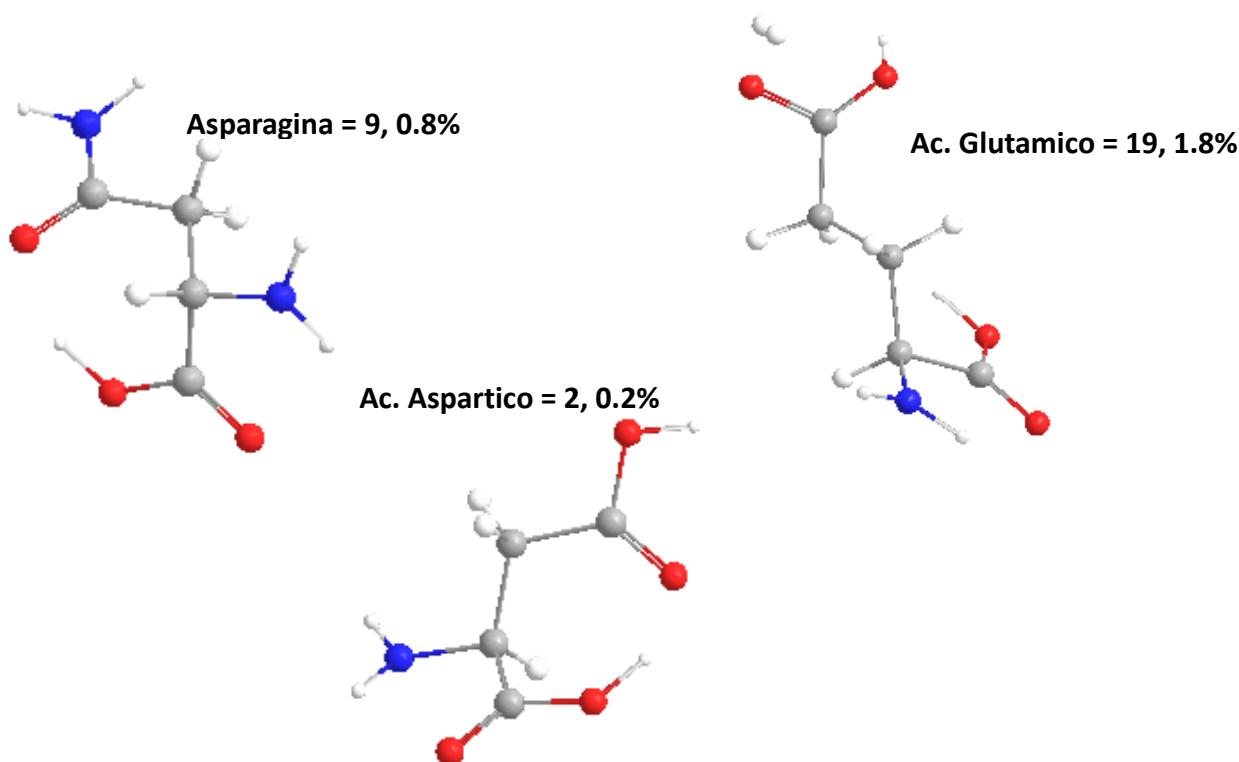


Figura 35 Aminoácidos de interés, presentes en la estructura de la gliadina

A partir de la aproximación en el conocimiento de la estructura de los biopolímeros involucrados en la mezcla, fue necesario calcular la cantidad molar de sitios de interés en la proteína y la PBM para determinar la proporción de ambos biopolímeros en dispersión.

Cálculos de molaridad para ácido acético: Solución 1

Preparación: 10ml de agua desionizada al 0.1% de ácido acético = 0.01mL

Pureza= 96% SIGMA; Densidad= 1.05 g/cm³; PM= 60.05 g/mol

$$\text{Fórmula: } mL \text{ de Ac. acético} = \frac{\text{Molaridad} \times \text{Peso Molecular} \times \text{Volumen} \times 100}{\text{Pureza} \times \text{Densidad} \times 1000} \quad (10)$$

$$= \frac{0.01ml \text{ CH}_3\text{COOH}}{10mL} \times \frac{1.05g/cm^3}{1ml \text{ CH}_3\text{COOH}} \times \frac{96g \text{ CH}_3\text{COOH}}{100g \text{ CH}_3\text{COOH}} \times \frac{1 \text{ mol}}{60.05g/mol} = \frac{1008}{60050} = 0.0167 \text{ mol/L}$$

Para realizar la propuesta de interacción es necesario calcular los moles de proteína y carbohidratos dispersos en la solución de ácido acético al 0.01M.

Cálculos de molaridad para Gliadina de Trigo: Solución 2

1 Dalton = 1 g/mol; Peso Molecular = 30 – 74 kDa; promedio = 50 000 Da = 50 000 g/mol
 0.1g de proteína en 10 ml de solución 1

$$\text{Molaridad} = \frac{n}{V} = \frac{\text{Cantidad de soluto}}{\text{Volumen de disolución}} \quad (11)$$

$$\frac{0.1\text{g de gliadina}}{10\text{mL}} \times \frac{1\text{ mol de gliadina}}{50\,000\text{ g/mol}} \times \frac{1000\text{ml}}{1\text{L}} = \frac{100}{500\,000} = 2^{-4}\text{ mol/L}$$

= 2×10^{-6} mol/10 mL o 2 micromolar de gliadina dispersa en 10mL de la solución 1

De acuerdo a la bibliografía, se sabe que los dos aminoácidos presentes en esta proteína que pudieran ayudar a formar interacciones con los carbohidratos, debido a su carácter polar son la glutamina presente en un 40.5% a lo largo de la cadena y serina presente en un 5.5%.

2×10^{-6} mol/10 mL ----- 100%

X ----- 40.5%

X= 8.1×10^{-7} moles de Glutamina presentes en la dispersión = 0.81 micromoles

2×10^{-6} mol/10 mL ----- 100%

X ----- 5.5%

X= 1.1×10^{-7} moles de Serina presentes en la dispersión = 0.11 micromoles

Cálculos de molaridad de la pectina de bajo metoxilo: Solución 3

Peso Molecular = 96 kDa ...

0.1g de PBM en 10 ml de solución 1

$$\text{Molaridad} = \frac{n}{V} = \frac{\text{Cantidad de soluto}}{\text{Volumen de disolución}}$$

$$\frac{0.1\text{g de PBM}}{10\text{mL}} \times \frac{1\text{ mol de PBM}}{96\,000\text{ g/mol}} \times \frac{1000\text{ml}}{1\text{L}} = \frac{100}{960\,000} = 1.04^{-4}\text{ mol/L}$$

= 1.04×10^{-6} mol/10 mL o 1.04 micromolar de PBM dispersa en 10mL de la solución 1

Se ha estudiado una pectina de bajo metoxilo de aproximadamente 20% de metoxilación

1.04×10^{-6} mol/10 mL ----- 100%

X ----- 80%

X= 8.32×10^{-7} moles de PBM presentes en la dispersión = 0.832 micromoles

Por lo tanto, se tienen aproximadamente 0.832 micromoles de posibles sitios activos (COO^-) donde pudieran interaccionar los aminoácidos de carga positiva. De lo anterior, se sugiere que se tienen aproximadamente 0.9 micromoles de aminoácidos cargados con 0.8 micromoles de grupos aniónicos en la pectina, por ello se plantea utilizar con una concentración carbohidrato (PBM) : proteína (gliadina) de 2:1 ó 2:1.5

3.12 Preparación de mezclas carbohidrato-proteína

En una relación 2:1 (PBM-Gliadina) en dispersión en ácido Acético se prepararon las mezclas. La Figura 36 muestra el rango de pH elegido, donde los biopolímeros presentan carga opuesta suficiente para interaccionar entre ellas.

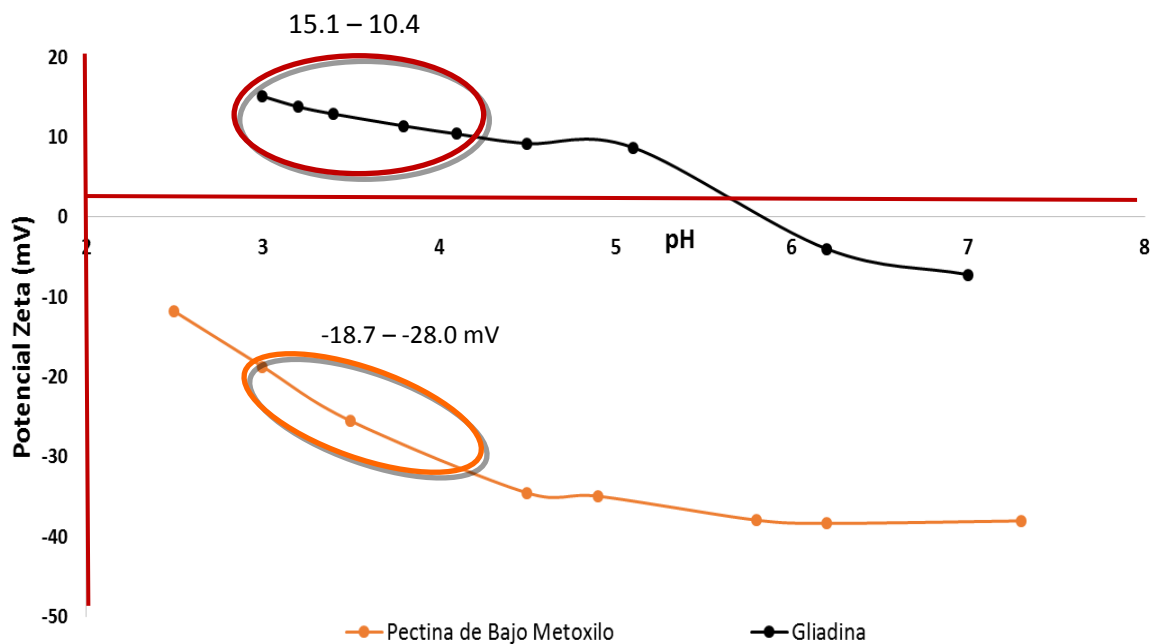


Figura 36 Rango de pH para realizar la mezcla carbohidrato-proteína.

3.13 Análisis de las mezclas mediante Espectroscopía Infrarroja

Inicialmente se evaluaron los controles (PBM y Gli) a diferentes pH's para observar si existían cambios significativos en el comportamiento de los biopolímeros en dispersión conforme variaba el pH. La Figura 37 presenta los espectros obtenidos para gliadina a pH 3.0, 3.5 y 4.0; mostrando entre ellos ligeras diferencias. La gliadina es una proteína monomérica con algunos puentes disulfuro y está conformada en su mayoría por una estructura α -hélice y por secciones repetitivas de dominios β -reversa (Secundo y Guerrieri, 2005). Lo anterior permite establecer que probablemente estos cambios observados en los espectros de la gliadina se deben a la disminución del pH provocando algunos cambios en la conformación de la proteína.

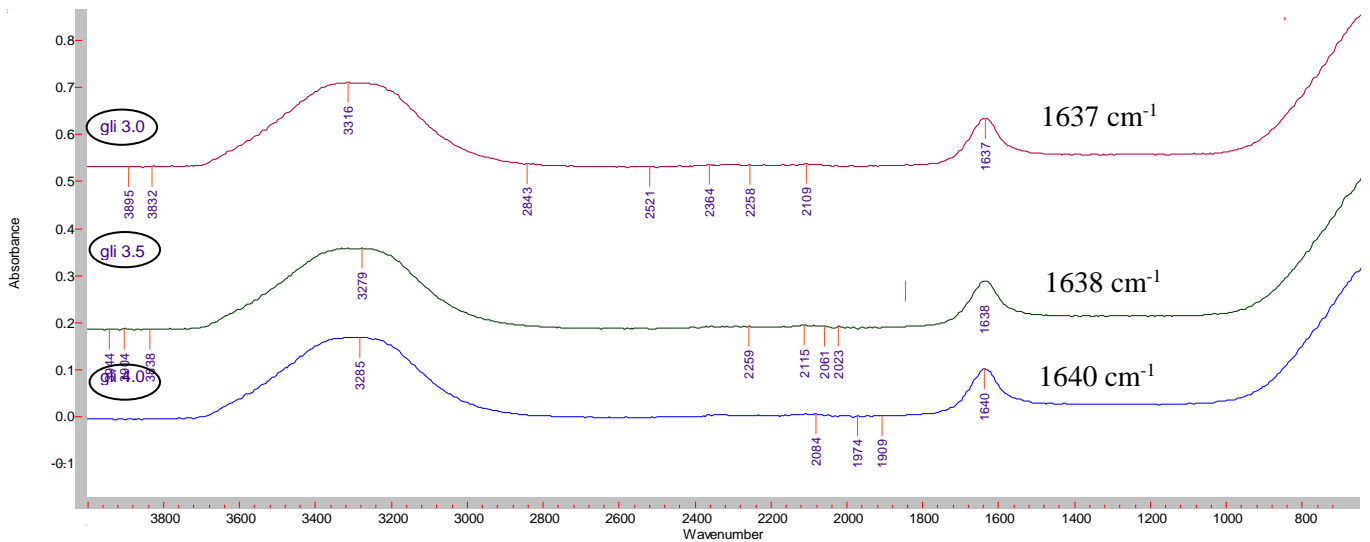


Figura 37. Espectro de IR para gliadinas a diferentes pH's

Para el caso de la PBM, la Figura 38 muestra el comportamiento de este polisacárido con respecto a la variación del pH. Es evidente que no existe ningún cambio significativo en los espectros debidos a esta variación, lo cual permite concluir que es una estructura más estable, permanece constante frente algunos cambios en las condiciones de experimentación, como lo fue para el pH.

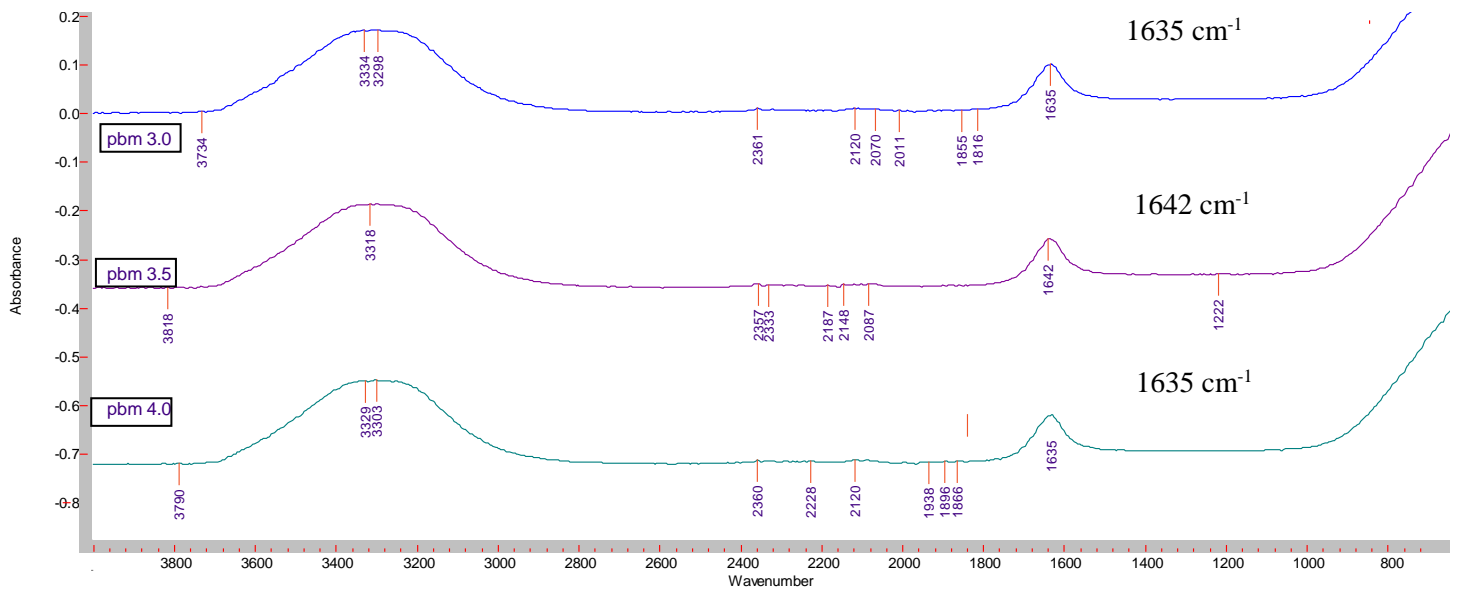


Figura 38. Espectros de IR para PBM en función del pH.

Las Figuras 39, 40 y 41 presentan los espectros obtenidos para la mezcla PBM:Gli y sus controles a pH 3.0, 3.5 y 4.0, respectivamente. Se observa una banda intensa en la región de los 1600 a 1700 cm^{-1} la cual corresponde a la región de las amidas primarias, debida a las vibraciones de los grupos carbonilo presente en la estructura secundaria de esta proteína (Secundo y Guerrieri 2005; Shriner et al., 2001). Para el caso de gliadina se observa una banda en los 1637 cm^{-1} , esto sucede regularmente (región de 1620-1630 cm^{-1}) en proteínas en presencia de una estructura hoja- β , las diferencias se presentan en los hidrógenos que se encuentran unidos a las hebras que se forman en la estructura hoja- β (Mangavel C. *et al.*, 2001).

Para el caso de la PBM se presenta bandas intensas, en las regiones 3000-3600 cm^{-1} y 1600-1700 cm^{-1} . Para la región entre 1600 y 1700 cm^{-1} se debe a las vibraciones de tensión del grupo carbonilo de ésteres y ácido carboxílico (Fellah A. *et al.*, 2009). Además, de acuerdo a investigaciones anteriores se ha concluido que dependiendo de la intensidad de la banda es posible determinar si el α -D- ácido galacturónico se encuentra como monómero, dímero, trímero o polímero. (Fellah A. *et al.*, 2009).

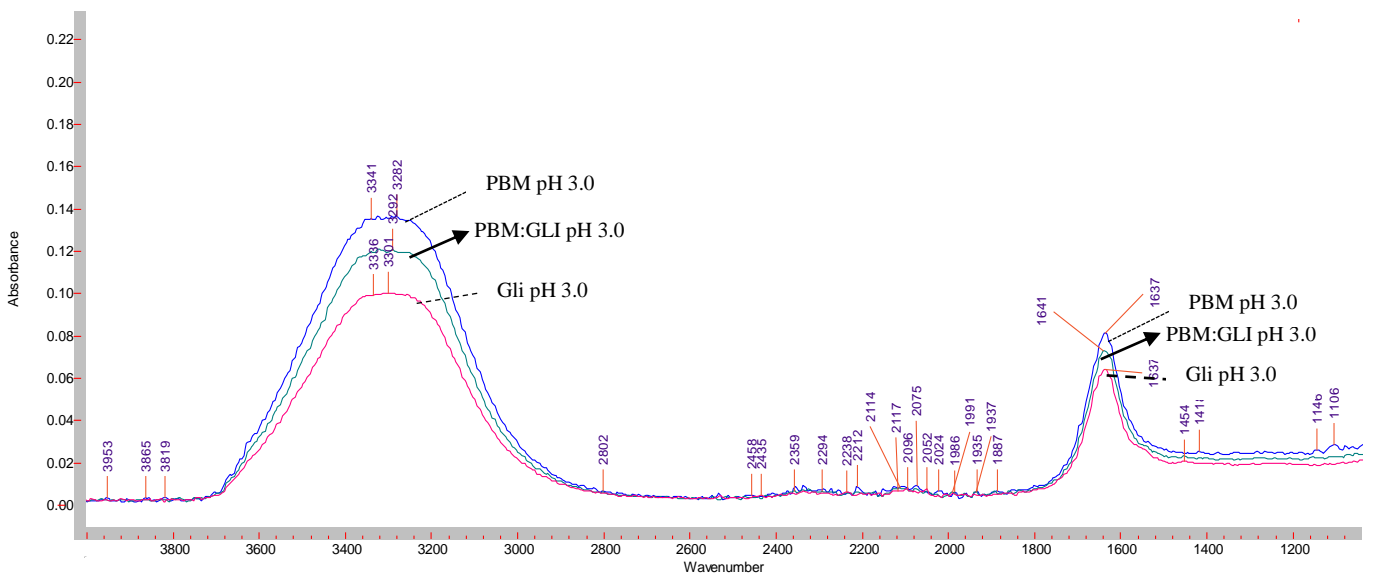


Figura 39. Espectro de IR de la mezcla PBM:gliadina a pH 3.0

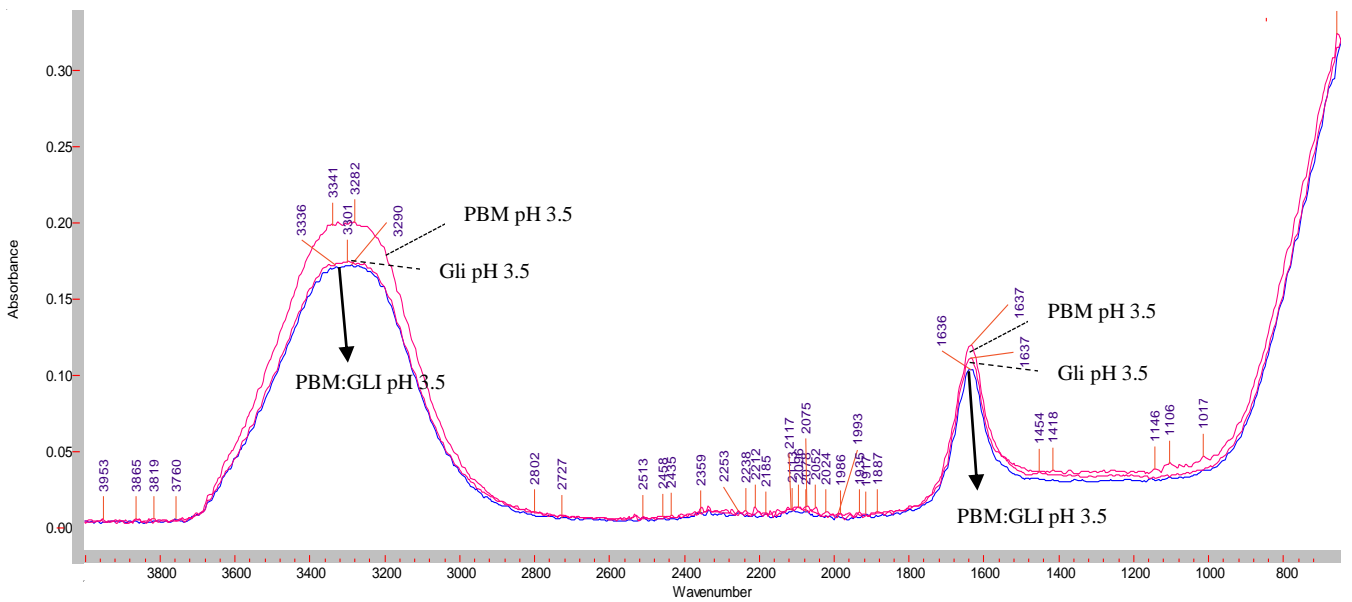


Figura 40. Espectro de IR de la mezcla PBM:gliadina a pH 3.5

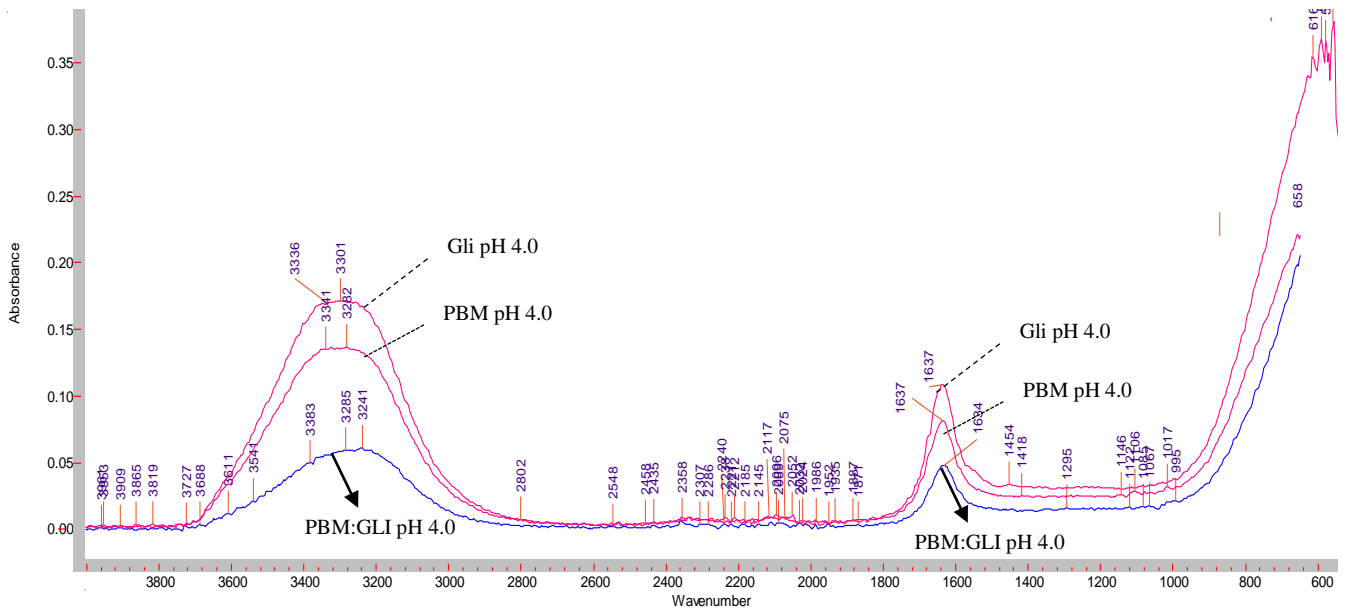


Figura 41. Espectro de IR de la mezcla PBM:gliadina a pH 4.0

Diversas investigaciones han utilizado la herramienta FT-IR para explicar algunos de los cambios conformacionales que existen en una proteína durante la interacción con un carbohidrato, aunque aún no está claro y no existe una correlación directa en los cambios de los espectros debidos a este tipo de interacción, el uso de FT-IR ofrece información útil para investigar los cambios estructurales que ocurren en la proteína y así explicar este tipo de interacciones. La interpretación del espectro surge de la forma de la banda y la intensidad de la misma (Zhao *et al.*, 2009).

La Figura 42 muestra la región entre los 1500 y 1700 cm^{-1} , esta banda pertenece a la región amida I. La gliadina muestra una banda en 1637cm^{-1} y de acuerdo a lo discutido anteriormente sugiere una estructura hoja- β , sin embargo, también existe un pequeño pico a los 1660cm^{-1} donde pudieran presentarse pequeñas zonas con estructura α -hélice, estructura nativa de la gliadina, pero la dispersión en ácido acético permite que predomine la estructura hoja- β .

Cuando se realizaron las mezclas carbohidrato:proteína es probable que los aminoácidos cargados cationicamente en la gliadina se asociaran o interactuaran con los grupos carboxilo de la PBM. Las Figuras 42 y 43 presentan a la mezcla PBM:gliadina con una clara disminución de la banda (región $1600\text{-}1700\text{cm}^{-1}$) con respecto al comportamiento de los

controles, probablemente indica una completa disminución de la estructura α -hélice y un aumento de hoja- β también observado por el aumento en la longitud del hombro en la Figura 43 en la región de los 3000 a 3600 cm^{-1} .

Estas variaciones detectadas pueden estar relacionadas con un cambio estructural significativo de la proteína, así como del medio dispersante en el que se encuentra la mezcla, donde la movilidad de los polímeros se reduce impulsado por las interacciones electrostáticas (Zhao *et al.*, 2009). Vale la pena señalar que los que los cambios espectrales son mucho más notorios en la mezcla a pH 4.0 que a 3.5 y 3.0; comparando con los resultados obtenidos con potencial zeta sería necesario validar la mezcla a pH 3.75 donde se presenta la mayor carga.

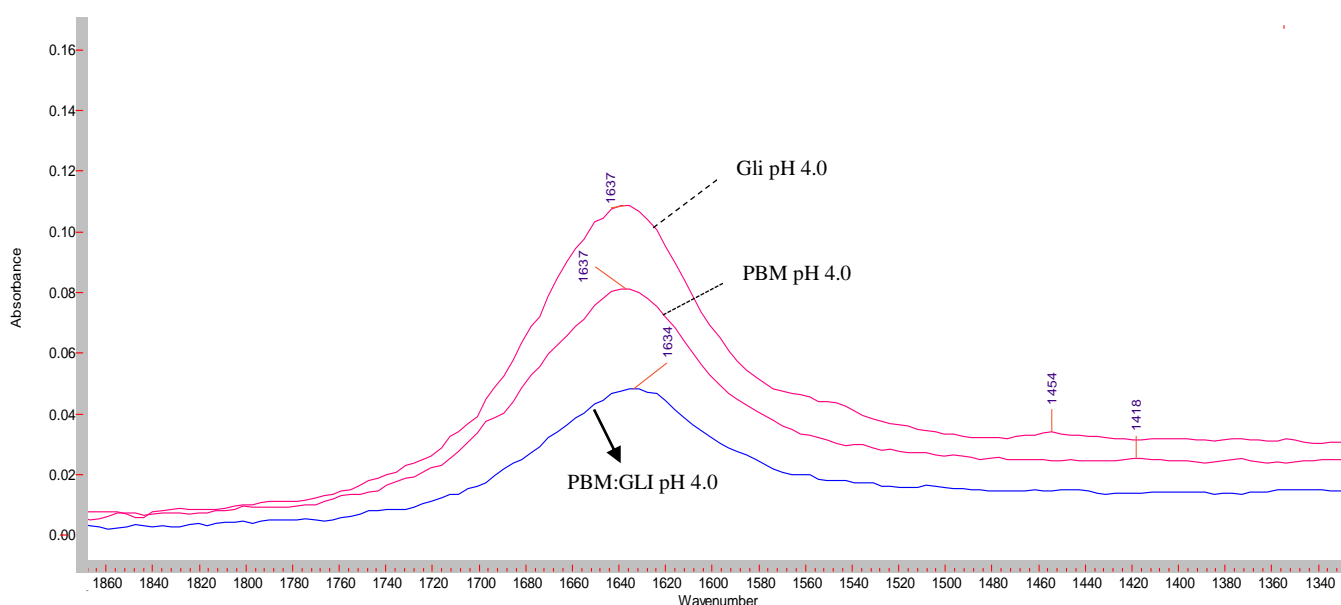


Figura 42. Espectro de IR para PBM:gliadina a pH 4.0 en el región de 1340 a 1850 cm^{-1}

Teniendo en cuenta que anteriormente se habían presentado espectros donde no se observaba diferencia espectral entre los controles (gliadina y PBM), el blanco (ac. acético 0.01M) y las mezclas PBM:gliadina (pH 3.0, 3.5 y 4.0); se decidió aumentar la concentración de las biomoléculas y obtener los espectros.

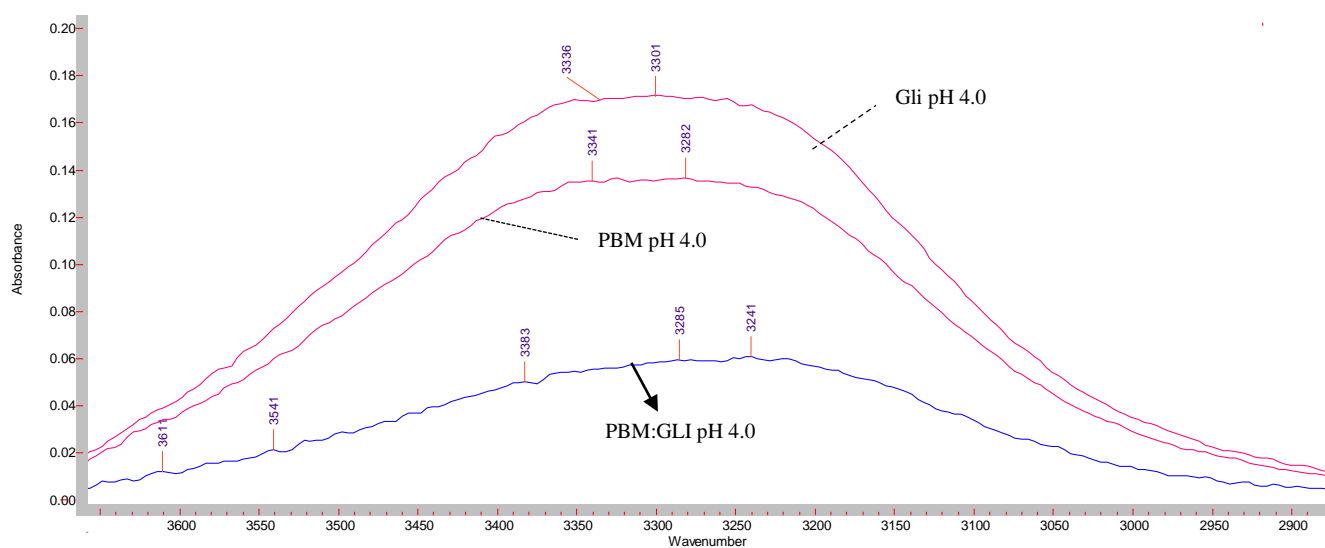


Figura 43. Espectro de IR para PBM:gliadina a pH 4.0 en la región de 2900 a 3650 cm^{-1}

La Figura 44 muestra los resultados obtenidos, donde decidió llegar hasta un 6% en concentración del biopolímero. Cada gráfica (A y B) tiene 6 espectros, correspondientes a 6 diferentes porcentajes pero es evidente que no se obtuvieron diferencias espectrales debidas al aumento de la concentración.

Para ver si estas diferencias no se debían a algún error en la lectura del equipo, se obtuvieron los espectros para la gliadina y PBM en estado sólido (muestras purificadas y liofilizadas). La Figura 45 se muestra las diferencias de los espectros obtenidos con respecto a las dispersiones, donde es evidente observar la presencia de grupos funcionales para las bandas obtenidas. A partir de estos resultados, fue posible hacer comparaciones más específicas y determinar la posible interacción.

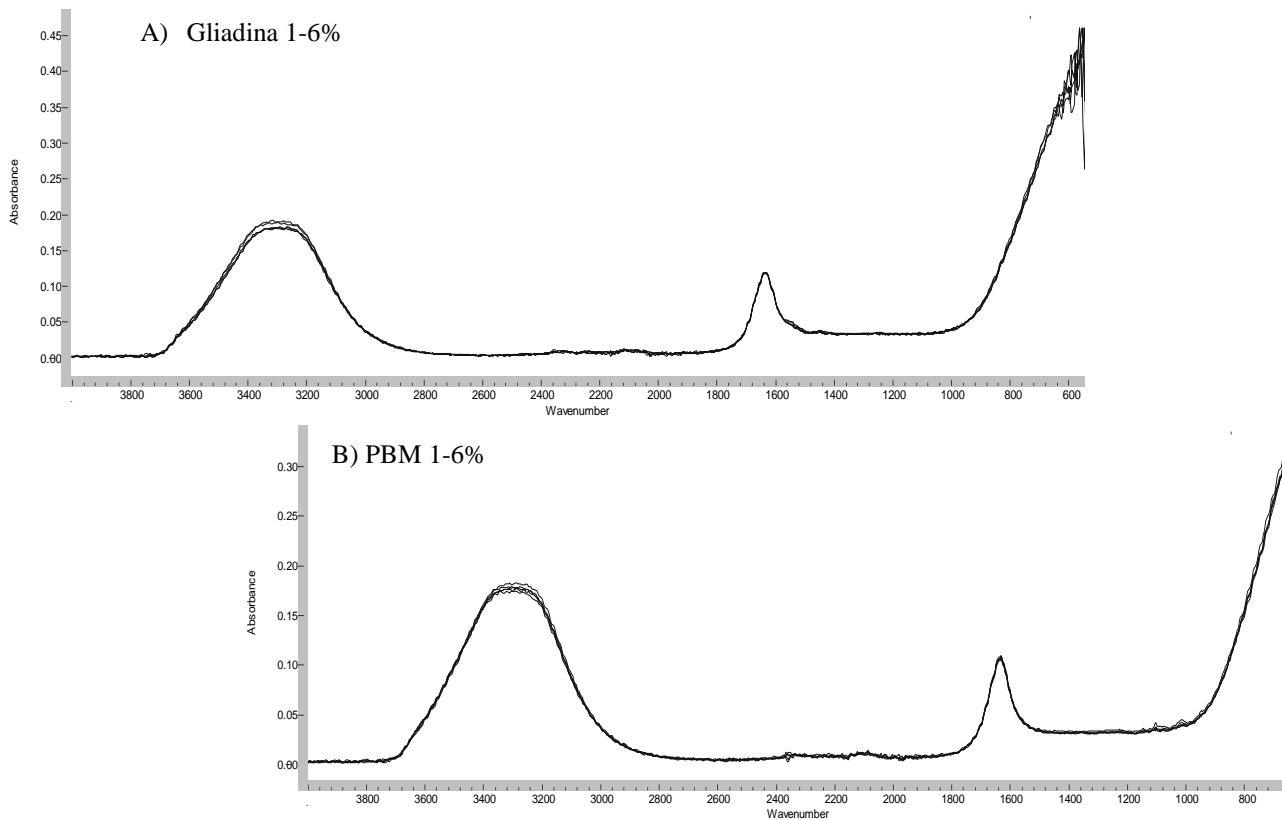


Figura 44. Espectros de IR para gliadina (A) y pectina de bajo metoxilo (B) a 6 diferentes concentraciones 1-6%

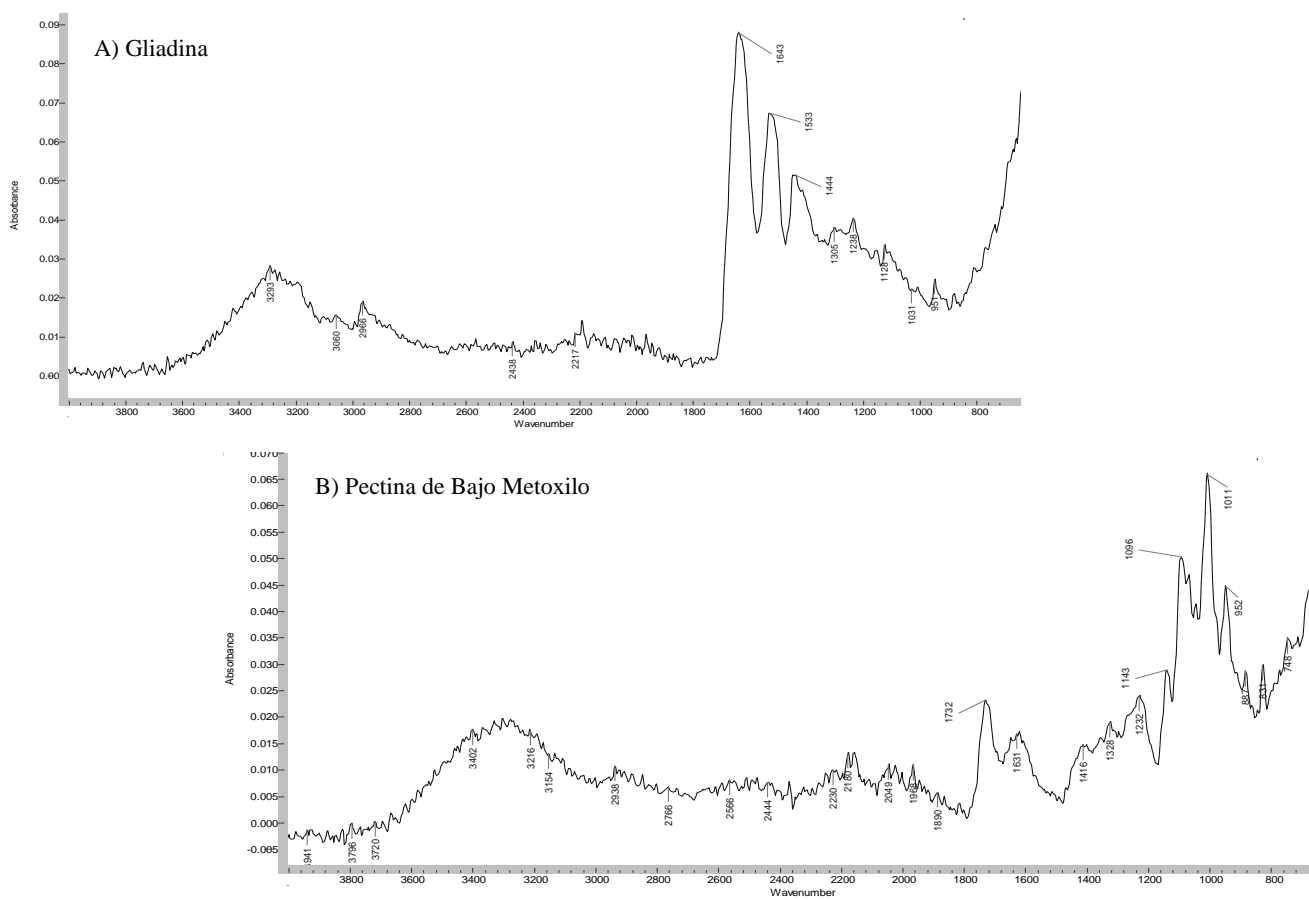


Figura 45. Espectros de IR para. A) Gliadina y B) pectina de bajo metoxilo en estado sólido.

La Figura 46 presenta el espectro para gliadina purificada y liofilizada. El análisis que se realizó fue el siguiente: A) corresponde a puentes de hidrogeno formados entre la proteína y el medio en dispersión, además de los enlaces N-H stretching presentes, B) corresponde a la banda de tensión en los enlaces C-H, C) región amida I correspondiente a los carboxilos de amida, D) región amida II vibrando los enlaces N-H bending. La letra E) corresponde probablemente a la región amida III. Este espectro de IR correspondiente a gliadina cruda presenta una banda ancha en 3293 cm^{-1} debido a puentes de hidrógeno del grupo C=O y N-H.

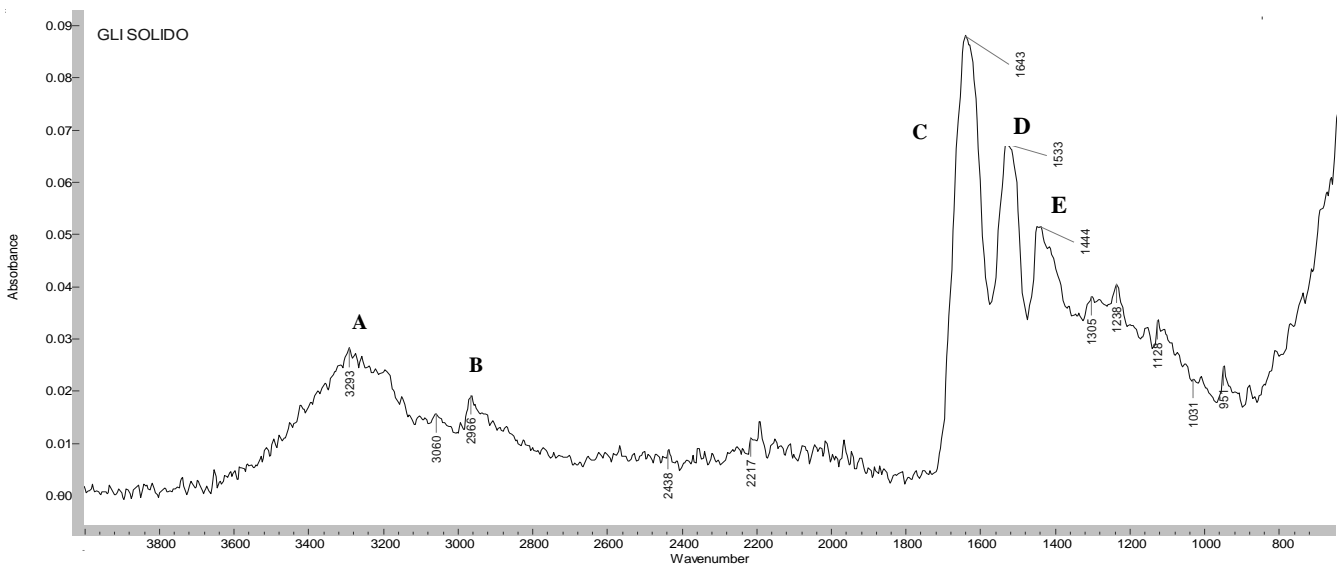


Figura 46. Espectro de IR para gliadina cruda

Las Figuras 47 y 48 muestran las comparaciones entre los controles (gliadina y PBM sólidos) y las mezclas PBM:Gliadina a dos diferentes pH's (3.5 y 4.0). Resulta evidente la diferencia de comportamiento entre los espectros, de esta forma puede decirse que en la región de los $3000\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$ donde se presentan los puentes de hidrógeno, existe un cambio en la intensidad así como un desfase de la banda, entonces, para el caso de la mezcla a pH 3.5 la intensidad de la banda que presenta en esta región, se traduce en la presencia de puentes hidrógeno debidos a la mezcla y posible interacción carbohidrato:proteína.

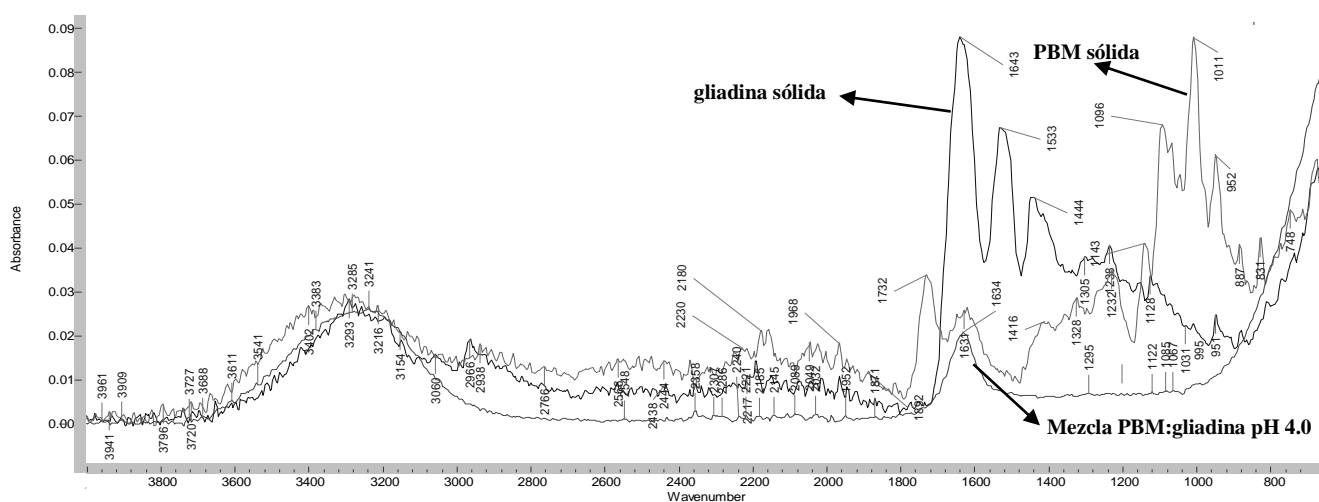


Figura 47. Comparación de los espectros en el IR correspondientes a controles y mezcla PBM:Gliadina a pH 4.0

La región amida II (1533 cm^{-1}) de la gliadina se pierde cuando existe la mezcla PBM:Gliadina (Figuras 47 y 48) probablemente este comportamiento se deba a la formación de nuevos enlaces entre el carbohidrato y la proteína; sin embargo, resulta interesante observar que este comportamiento también se presenta en el espectro de la gliadina en dispersión (Figura 49) lo cual puede estar indicando que el grupo amino peptídico se encuentra formando puentes de hidrógeno con el medio dispersante (ac. acético 0.01M).

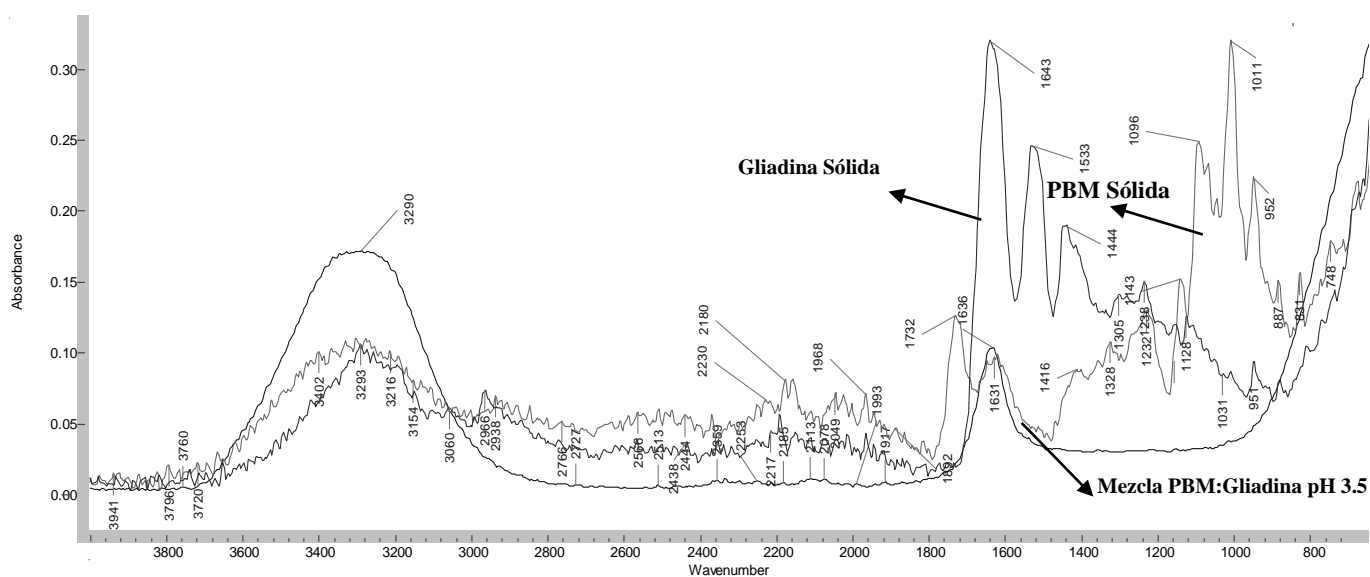


Figura 48. Comparación de los espectros en el IR correspondientes a controles y mezcla PBM:Gliadina a pH 3.5

Lo que respecta a la región Amida I (1643 cm^{-1}) el cambio espectral observado en presencia de la mezcla carbohidrato-proteína, sugiere la formación de enlaces por fuerzas electrostáticas entre el ácido carboxílico de la amida y el grupo carboxilo del carbohidrato cargado negativamente bajo las condiciones estudiadas .

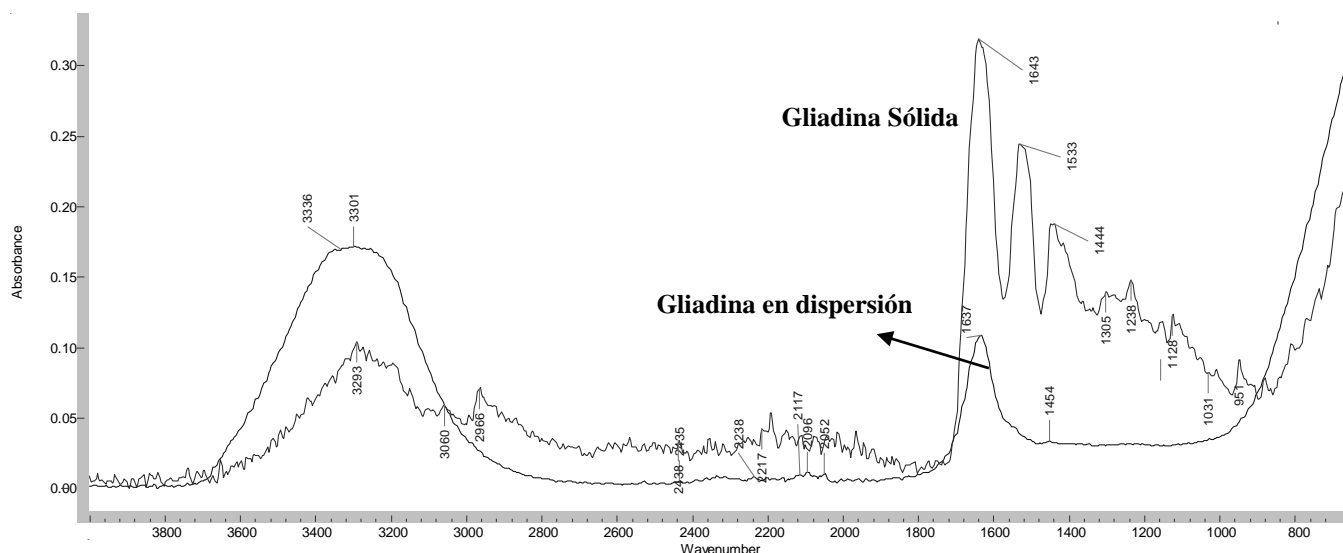


Figura 49. Comparación de espectros de IR para gliadina en estado sólido y en disolución.

3.14 Dicroísmo circular (DC).

En la Figura 50 se observan los espectros resultantes de la gliadina en disolución a pH 4.0 y la mezcla PBM:gliadina pH 4.0.

Para el caso del espectro de gliadina, se utilizó con una concentración de 0.005mM de proteína. Kelly et al, (2005), informan que la forma del espectro que corresponde a la estructura hoja beta en proteínas debe presentarse una banda negativa a los 218nm, lo cual puede observarse en la Figura 47, por lo tanto, la gliadina en dispersión con ac. acético al 0.01M se tiene una estructura secundaria de hoja beta. Así mismo, cuando la mezcla PBM:gliadina es analizada se presenta una banda negativa a los 229 nm, esto representa un cambio con respecto al control (gliadina), también se ve un cambio de energía en el que son leídos cada uno de los espectros (-395.15 gliadina contra -214.56 para la mezcla).

Es evidente, entonces, que ocurre un cambio para el espectro de la mezcla (PBM:gliadina) con respecto al de la gliadina (control) presentados en la Figura 47. El desfase observado en la longitud de onda para las muestras y la diferencia de energía presentada por cada una de ellas

sugiere la presencia de una interacción entre las dos biomoléculas con la presencia de enlaces químicos (posiblemente fuerzas electrostáticas o puentes de hidrógeno) que están provocando un cambio en el espectro con respecto al control (gliadina).

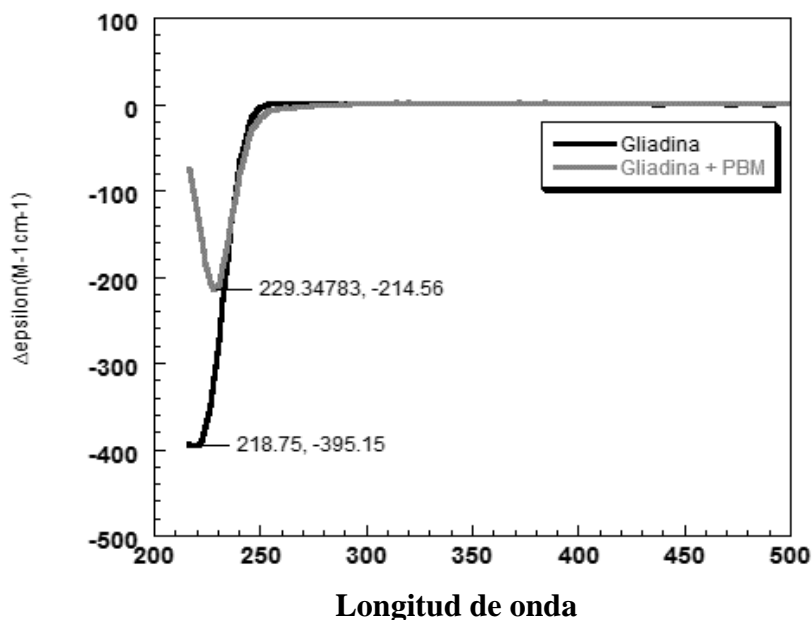


Figura 50. CD de gliadina y pectina de bajo metoxilo:gliadina

3.15 Evaluación de las propiedades reológicas

La determinación de comportamiento al flujo permite determinar el estado del fluido en cuestión. Puede tratarse de fluidos Newtonianos, no Newtonianos, pseudoplásticos y dilatantes. Para el caso de los controles (gliadina y PBM en disolución) y las mezclas estudiadas, la Figura 51 muestra el comportamiento resultante de las mismas bajo las condiciones estudiadas; puede observarse que todas ellas corresponden a un fluido Newtoniano. Para corroborar lo anterior, la viscosidad de las muestras se presenta en la Figura 52. Un fluido Newtoniano o también conocido como fluido viscoso lineal es aquel que presenta una viscosidad constante para cualquier valor de τ , esfuerzo de cizalla. Aquellos fluidos donde el esfuerzo cortante es directamente proporcional a la rapidez de deformación. Algunos ejemplos de fluidos newtonianos son el agua, el aire, la gasolina y el petróleo.

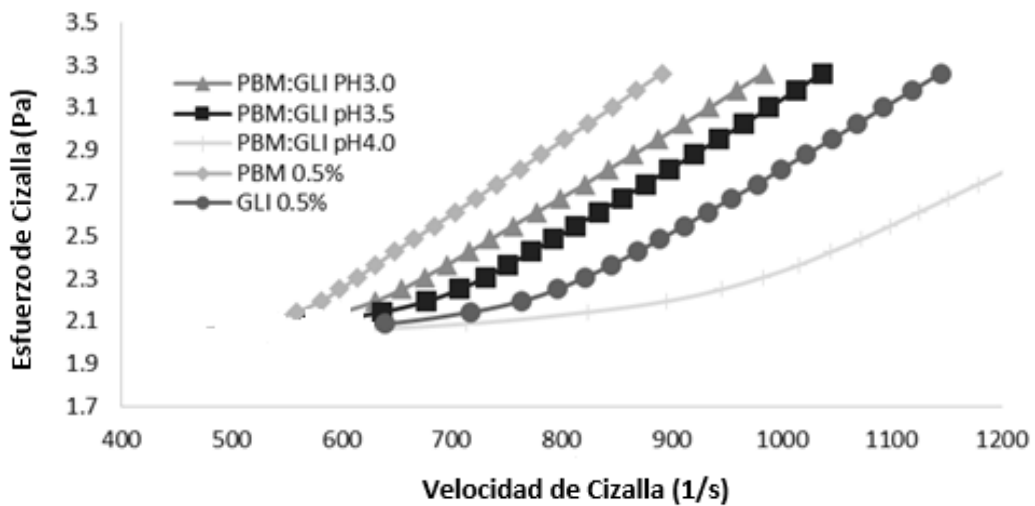


Figura 51. Comportamiento al flujo de gliadina y PBM (controles) y mezclas PBM:gliadina a diferentes pH's.

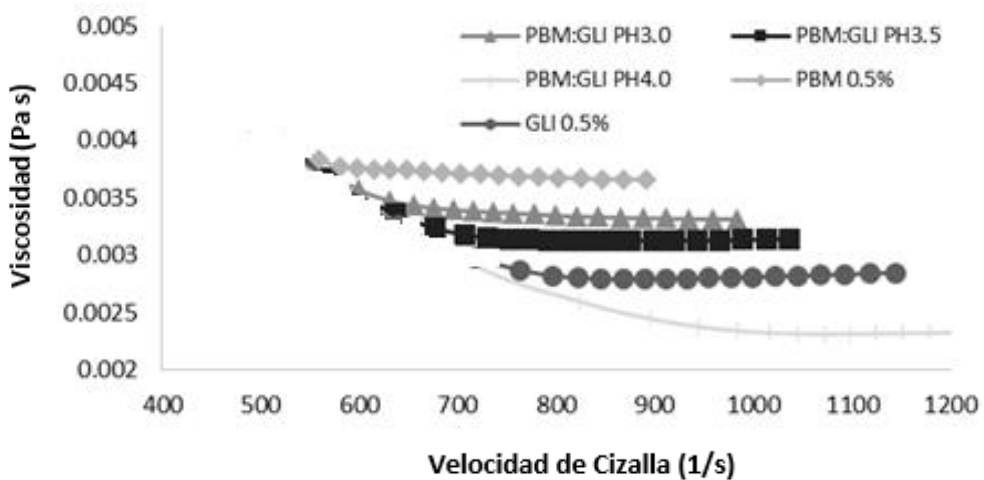


Figura 52. Viscosidad de gliadina y PBM (controles) y mezclas PBM:gliadina a diferentes pH's.

La Figura 53 muestra el barrido de amplitud y frecuencia de las mezclas PBM:gliadina a pH de 3.0 y 3.5, necesario para realizar las curvas de creep. El análisis de la curva creep (Figura 53) permite observar el comportamiento de un fluido cuando se le aplica una tensión o una carga a la muestra es posible medir las deformaciones que se van produciendo respecto al tiempo a una temperatura constante. En la Figura 53 permite observar los resultados obtenidos para las muestras analizadas; se trata de un líquido viscoelástico por ello no es posible observar ninguna deformación del sistema con respecto al esfuerzo aplicado. Los estudios dinámicos sugieren que la gliadina es una molécula parcialmente flexible.

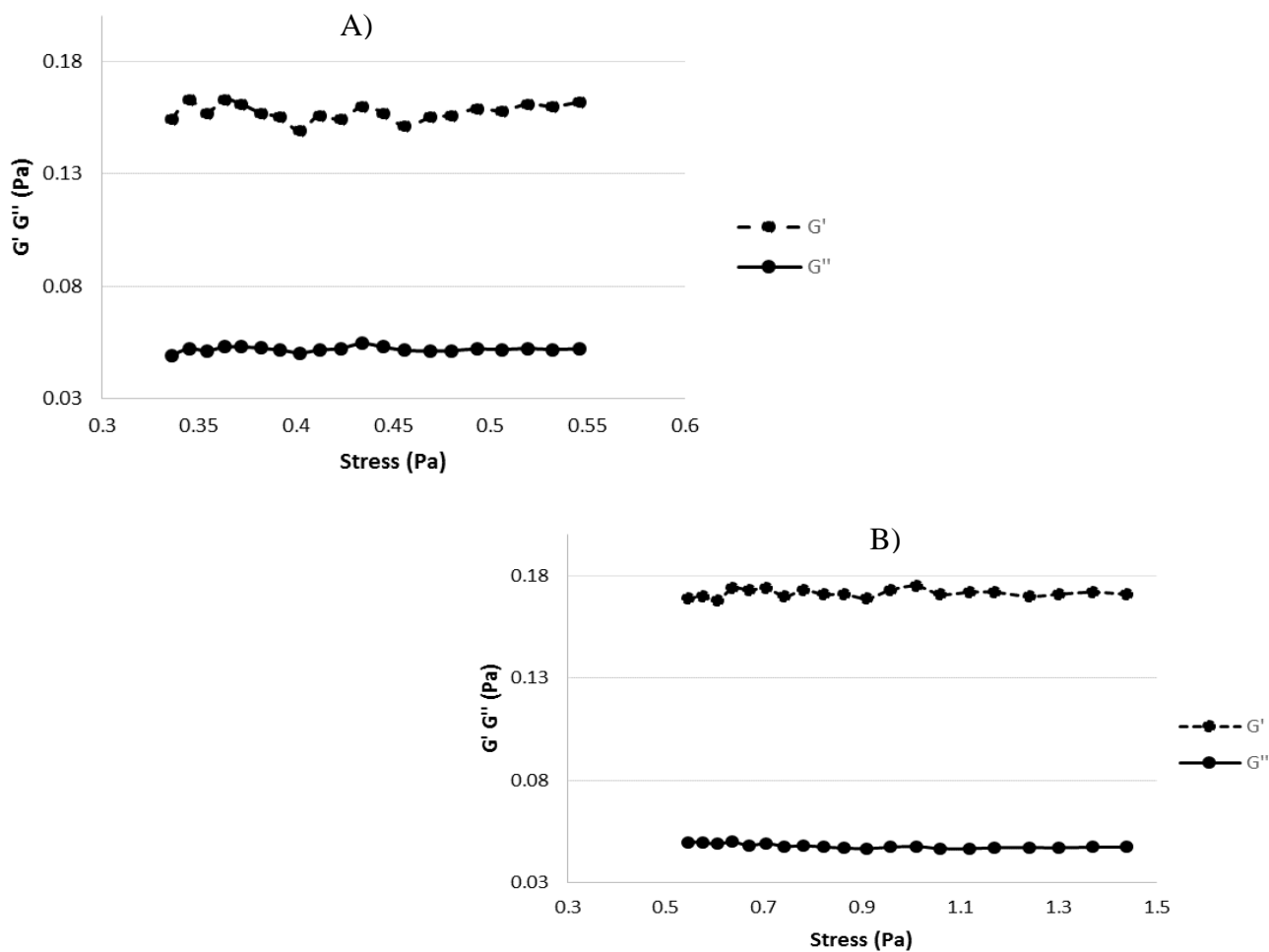


Figura 53 Barrido de amplitud y frecuencia de mezclas PBM:gliadina a pH A)3.0 y B)3.5

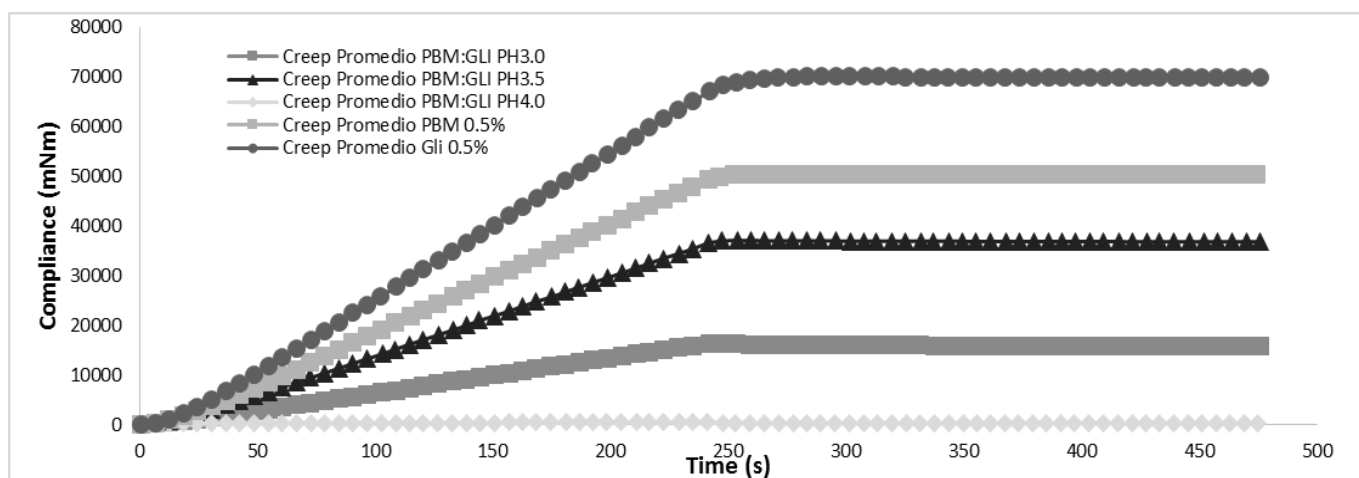


Figura 54 Curvas de Creep para dispersiones de gliadina, PBM y mezclas PBM:gliadina a diferentes pH's.

3.16. Elaboración de Geles

Las primeras concentraciones utilizadas de ac. acético (0.1M), además de tener un fuerte aroma propio de este ácido no permitía la gelificación de la PBM, su aspecto era de dispersiones macromoleculares altamente viscosas. Lo anterior sugirió que las altas concentraciones de ácido acético utilizadas afectaban la formación de la “caja de huevo” entre la PBM y el cloruro de calcio, por ello no se lograba la formación del gel.

Se decidió disminuir la concentración de ácido acético por dos razones: reducir el aroma de los geles para su uso alimentario y permitir la gelificación del hidrocoloide, a lo anterior se suma el permitir que la proteína no pierda su capacidad de dispersión a las mismas concentraciones. Todo lo anterior se logró a una concentración de 0.001M.

Visualmente, los geles elaborados con una concentración al 1.5% mostraron una firmeza y consistencia aceptable; sin embargo, para la industria de alimentos esta concentración sobrepasa los niveles aceptables. Para los geles al 0.5 y 1% de PBM se presentaron con buen aspecto pero se eligió el gel al 1% solamente para casos de estudio experimental.

3.16.1 Microscopia Confocal

En el laboratorio de Microscopía Confocal ubicado en el complejo LaNSE-Cinvestav, se estudiaron las muestras en un equipo Leica TCS-SPE Ryo Láser (Tipo Diodo), bajo las condiciones descritas en el apartado de metodología.

Los geles se prepararon con un grosor que varió entre las 80 y 140 micras, fue necesario colocarlos entre un porta y un cubre objetos, esto como parte del protocolo para el análisis. Para lograr una mejor observación de la estructura de los geles y efectuar animaciones 3D mediante el uso de fotografías, se programó el equipo para realizar entre 150 y 280 cortes (con el láser) y tomar entre 17 a 18 fotografías del gel. Una vez obteniéndolas, con ayuda del software (Leica Application Suite, Advanced Fluorescence Lite) es posible realizar animaciones y visualizar la estructuración del gel carbohidrato-proteína.

Las Figuras 55 a 57 muestran la cara frontal, lateral y el anverso del gel. Los puntos negros representan la fluorescencia emitida por el cromóforo unido a la proteína, puede observarse a esta embebida en la red tridimensional del gel con un acomodo homogéneo.

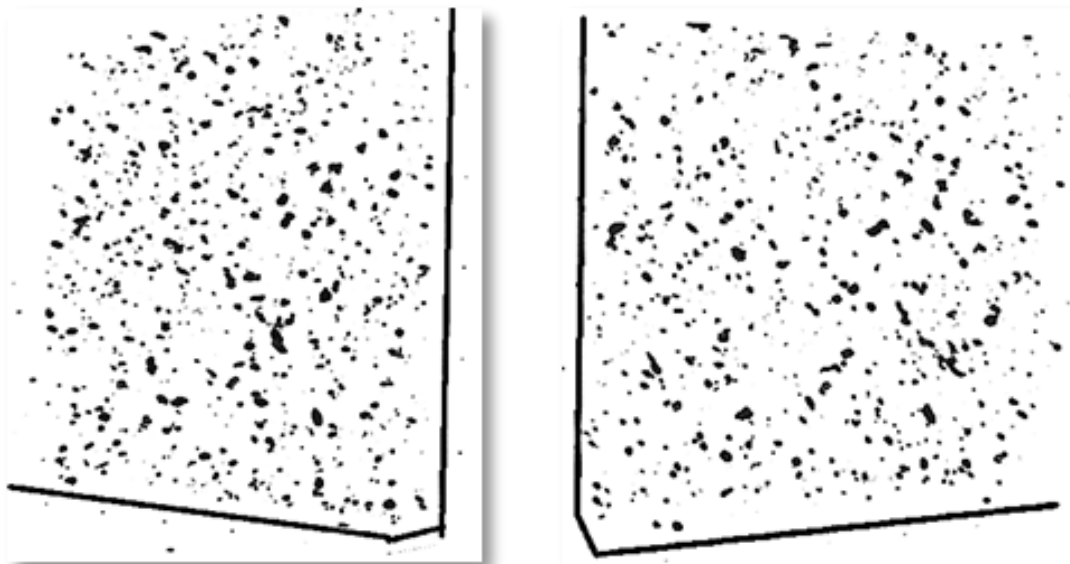


Figura 55. Vista frontal de los geles carbohidrato-proteína

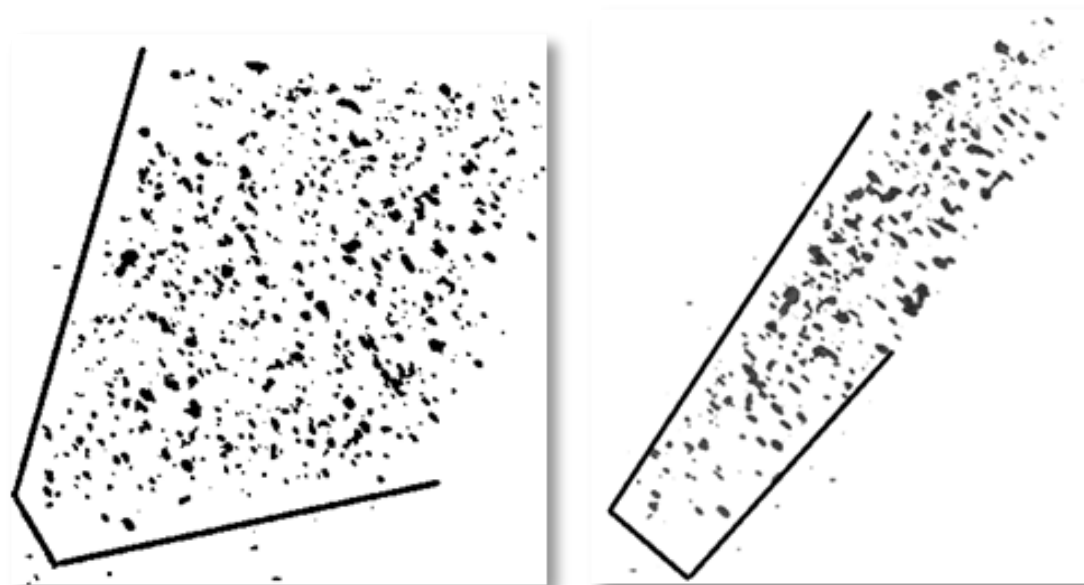


Figura 56. Vista de costado y perfil del gel carbohidrato-proteína

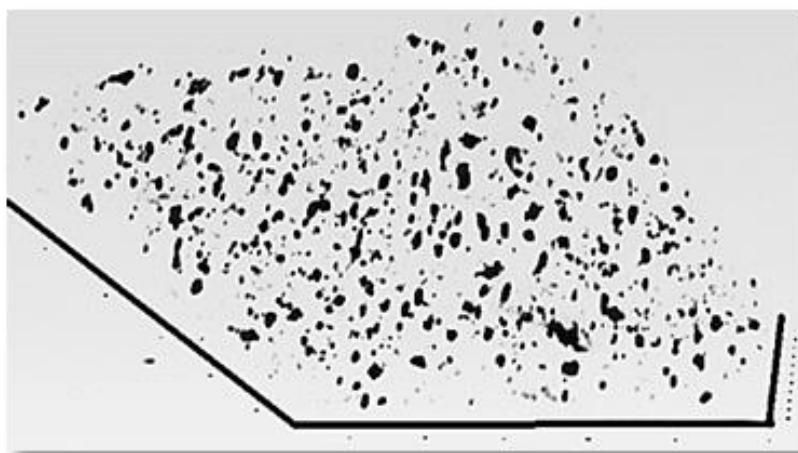


Figura 57. Vista del anverso del gel carbohidrato-proteína

Existen escasas investigaciones sobre los geles carbohidrato-proteína. Una de ellas fue reportada por Beaulieu *et al.* (2001), quienes obtuvieron geles con proteínas de suero y pectina de bajo metoxilo. Mediante la técnica de microscopía confocal (Figura 57), presentan la estructura de los geles que obtuvieron donde se observa a las proteínas del suero embebidas en el gel pero no distribuidas de forma homogénea como en el caso de este trabajo.

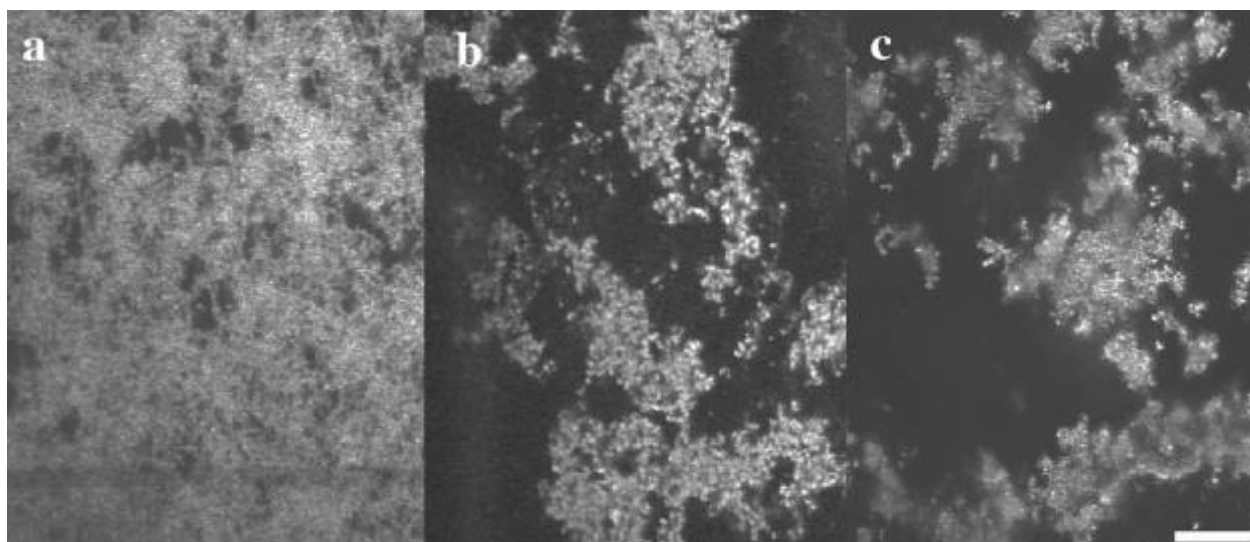


Figura 58. Observación en Microscopía Confocal para geles de proteínas de suero teñidas con Fast Green FCF: (a) 8% de proteína y 10mM de CaCl_2 ; (b) 8% de proteína, 1% de PBM y 5mM de CaCl_2 ; (c) 8% de proteína, 1% de PBM y 10mM de CaCl_2 .

3.16.2 DSC (Calorimetría Diferencial de Barrido)

La Tabla 10 resume los datos obtenidos a partir de la técnica de Calorimetría diferencial de barrido de muestras en estudio que son: pectina de bajo metoxilo, gliadina cruda , gliadina purificada y gel carbohidrato:proteína.

Tabla 10. Transiciones térmicas determinados en PBM, gliadina (sigma y purificada) y Gel carbohidrato-proteína.

		PBM	Gliadina SIGMA	Gliadina Purificada	Gel Carbohidrato-Proteína
Temp. de transición vítrea	Rango de Temp.	45.3 – 66.6 °C	66.6-76.9 °C	39.3–58.5 °C	
	Tg	50.6 °C	69.9°C	42.1°C	
	ΔH	0.587 J/g	3.31 J/g	1.91 J/g	
	Cp	-0.027 J/g °C	-0.321 J/g °C	-0.099 J/g °C	
Evaporación de agua	Rango de Temp.	106.7 – 192.5 °C			190.7 - 210.1 °C
	ΔH	276.5 J/g			1573 J/g
	Cp	-3.222 J/g °C			-81.1 J/g °C
Desintegración de la muestra	Rango de Temp.	215.8 – 265.9 °C			
	ΔH	157.9 J/g			
	Cp	-3.151 J/g °C			

La Figura 59 muestra el termograma obtenido de gliadina cruda marca Sigma con la gliadina precipitada con acetato de amonio (purificada) realizando un zoom a la zona de depresión de la curva (transición vítrea), el cual recuerda al punto de desnaturalización de la proteína. Además, estas diferencias de comportamiento señalan un mayor grado de pureza en la proteína.

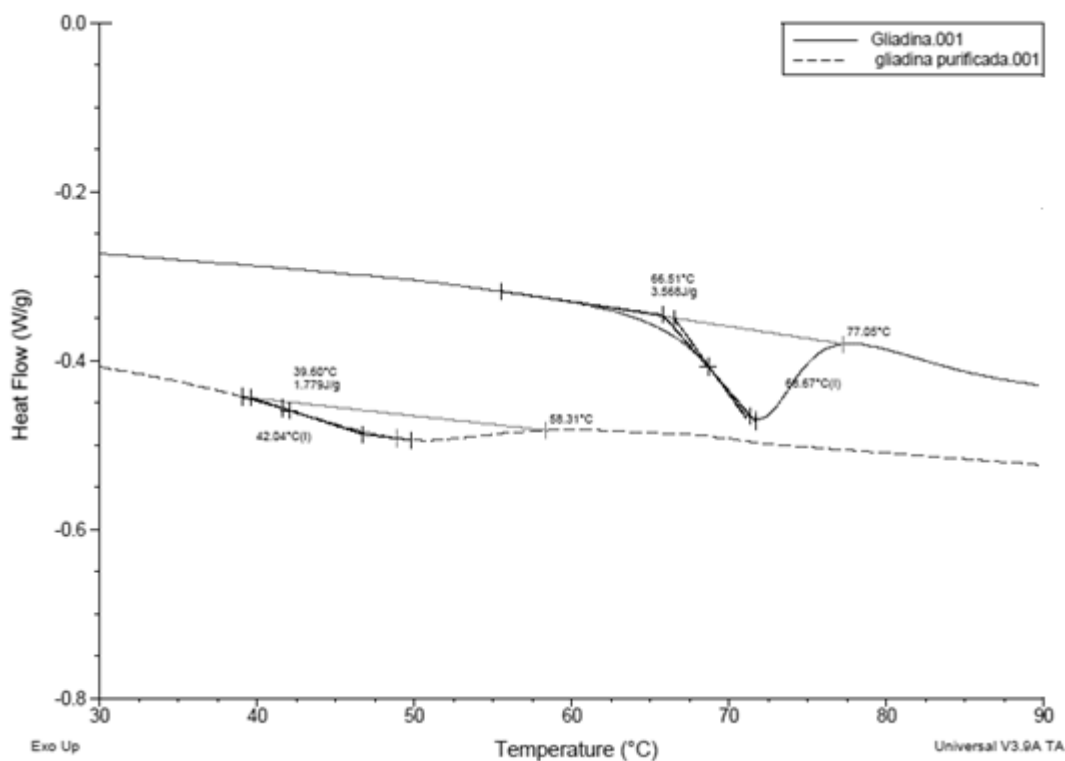


Figura 59. Termograma obtenido para la gliadina cruda de trigo (Sigma) y gliadina precipitada con acetato de amonio (purificada).

Han sido insuficientes las investigaciones que han estudiado las propiedades térmicas de esta proteína. En la revisión bibliográfica se han encontrado dos citas de León *et al.*, (2003) y Khatkar B.S (2013); cada uno presenta termogramas con diferentes temperaturas de transición vítrea (Ver Figura 17). Analizando estos datos las diferencias resultan de los diferentes métodos de extracción y purificaciones usadas para la gliadina, teniendo estos como antecedentes valiosos del comportamiento térmico de esta proteína.

La Figura 60 muestra el termograma correspondiente a la pectina cítrica de bajo metoxilo. Se utilizó una rampa de 10°C/min y una temperatura que llegó a los 320 °C, bajo estas condiciones fue posible observar el comportamiento de este polisacárido hasta llegar a degradación térmica. Los datos obtenidos en las transiciones encontradas se resumen en la Tabla 10.

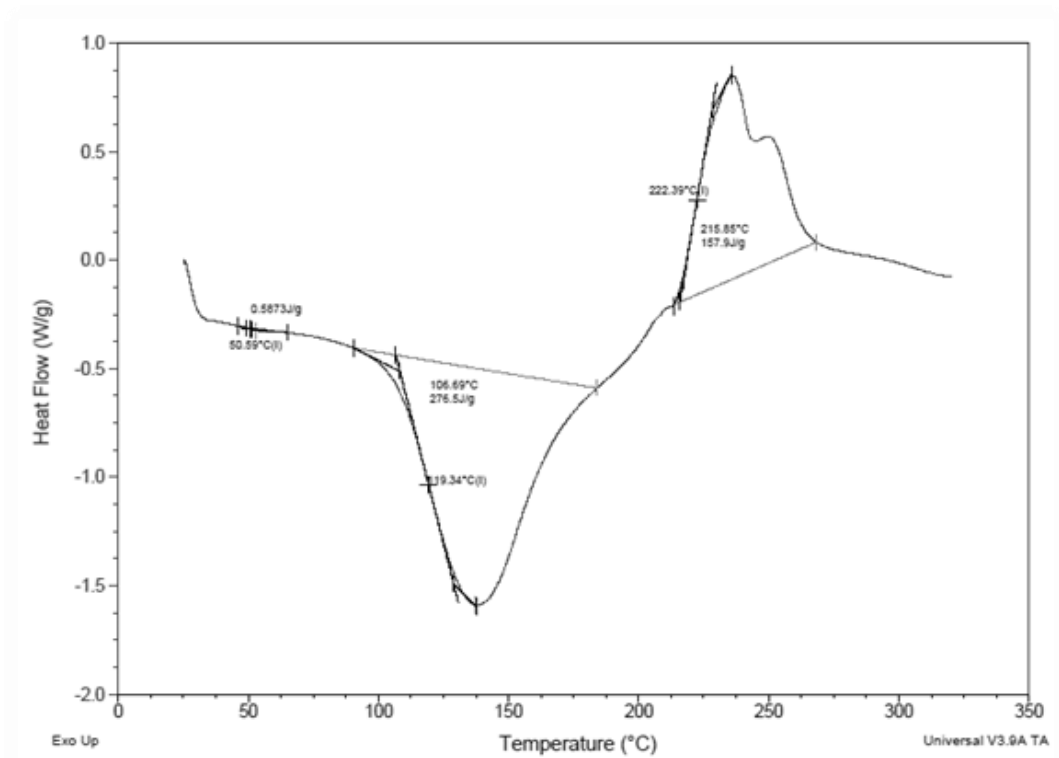


Figura 60. Termograma correspondiente a la pectina bajo metoxilo

Son pocos los antecedentes encontrados sobre la caracterización térmica encontrada para la pectina cítrica de alto y bajo metoxilo. La mayoría de las investigaciones se han realizado con la pectina en solución o cual no es comparable con esta metodología. Einhorn-Stoll y Kunzek (2009) determinaron la temperatura de descomposición térmica en promedio a 250°C para pectina cítrica con diferentes tratamientos (Véase Figura 19).

La Figura 61 presenta el termograma correspondiente al gel carbohidrato-proteína. El único pico que presenta pudiera sugerir que se trata de un gel que ha sido homogenizado correctamente (condiciones adecuadas de procesamiento), y probablemente se está dando algún tipo de interacción química entre los dos biopolímeros que están formando el gel. Lo anterior se deduce al comparar este termograma (Fig. 61) contra los controles (PBM y Gliadina) presentando un comportamiento completamente diferente a ellos.

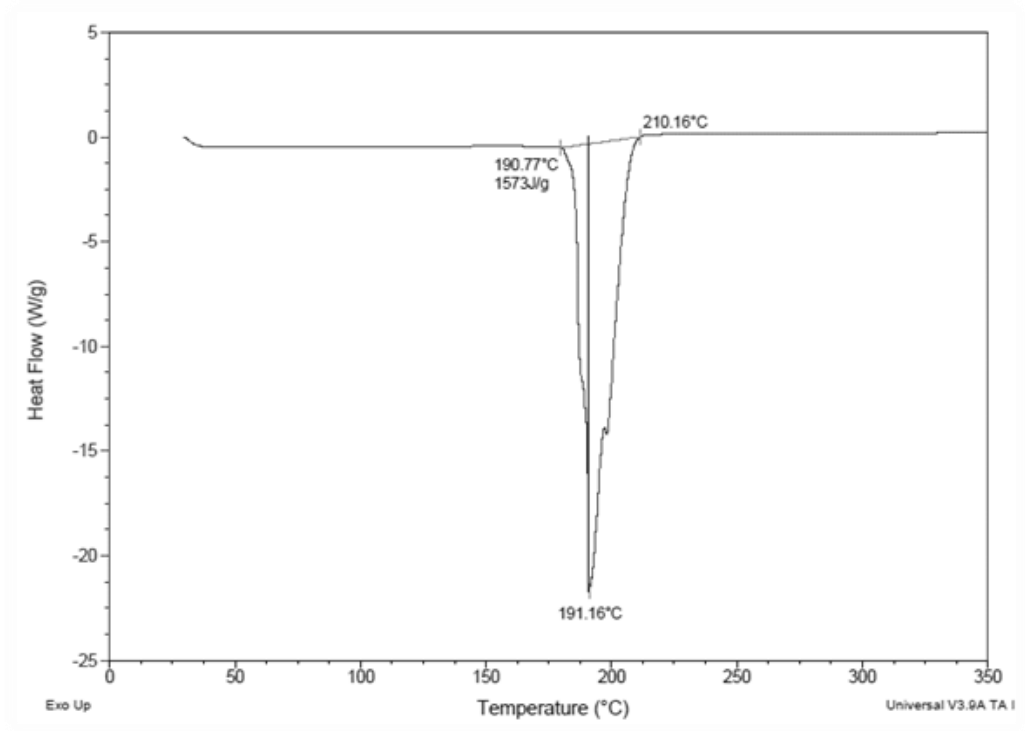


Figura 61. Termograma correspondiente al gel carbohidrato-proteína

CONCLUSIONES

- El gel de electroforesis permitió observar el alto porcentaje de contaminación que tiene la gliadina cruda marca Sigma.
- La viscosidad intrínseca encontrada para gliadina fue diferente a la reportada en la bibliografía por la contaminación de glutenina y el uso de un diferente disolvente.
- El uso del viscosímetro Ubbelohde resulta ser una técnica confiable para calcular el peso molecular de biopolímeros a través de la viscosidad intrínseca, así mismo, la técnica de electroforesis SDS-PAGE comprueba una vez más su utilidad al explorar, definir y caracterizar biomoléculas de interés.
- Como resultado de las pruebas de laboratorio presentadas y bajo las condiciones específicas estudiadas, es probable que exista una interacción electrostática carbohidrato-proteína
- La determinación de Potencial Zeta resultó ser de gran utilidad en la definición del rango de pH para la realización de las mezclas
- Aunque la Gliadina es una proteína que contiene en su estructura aminoácidos alifáticos apolares, bajo las condiciones trabajadas presenta una carga positiva que probablemente sea suficiente para interactuar con los biopolímeros.
- De acuerdo a los resultados de dicroísmo circular, la estructura de la gliadina en dispersión con Ácido Acético al 0.01M corresponde a una hoja beta.
- El cambio observado en el comportamiento del espectro CD (longitud de onda y el cambio de energía) para la mezcla PBM:Gli con respecto al de Gliadina (control), sugiere la presencia de una interacción carbohidrato:proteína.
- Los espectros FT/IR para gliadina y pectina de bajo metoxilo no presentan cambios con el aumento de la concentración
- Cuando hay interacción PBM:Gliadina, existe mayor cantidad de puentes de Hidrógeno reflejándose en la intensidad de la banda en la zona de los 3000 – 3500 nm
- El comportamiento al flujo de las mezclas PBM:Gli y controles (PBM y Gliadina) corresponde a fluidos newtonianos.
- La metodología propuesta para la elaboración de geles carbohidrato-proteína resultó conveniente para el caso de la PBM y gliadina. Hubo una gelificación del hidrocoloide debida a la formación de la “caja de huevo”, conformación resultante por la presencia de PBM y cloruro de calcio. Esta estructuración permitió a la proteína distribuirse

uniformemente y embeberse en esta red, probablemente formando interacciones químicas con el polisacárido o quedando atrapada por esta red tridimensional.

- El uso de Fast Green FCF como compuesto cromóforo y la técnica de microscopia confocal permitieron obtener imágenes donde se puede observar la morfología del gel carbohidrato-proteína.
- El termograma correspondiente al gel de estudio, muestra un cambio en el comportamiento (un solo pico) cuando se le compara contra los termogramas de los controles (biopolímeros individuales). Por medio de esta técnica (DSC) fue posible evaluar la respuesta del gel al flux térmico que se aplicó, donde la Tg es casi imperceptible y el pico pudiera sugerir una evaporación del gel o algún tipo de interacción entre el carbohidrato y la proteína.

RECOMENDACIONES

- Realizar la extracción de gliadina directamente de harina de trigo, purificar y estudiar su efecto en el diseño y caracterización de mezclas carbohidrato:proteína
- Continuar explorando las interacciones carbohidrato:proteína diversificando los polisacáridos, por ejemplo, se recomienda el uso del alginato de sodio
- Es necesario realizar pruebas inmunológicas con la mezclas pectinade bajo metoxilo: gliadina y corroborar parte de la fuerza de interacción entre estos biopolímeros

REFERENCIAS

- Antonov, Y. A., Zhuravleva, I. L. (2012). Macromolecular complexes of BSA with gelatin. *International Journal of Biological Macromolecules*. 51 (3): 319-328.
- A.O. A.C. 42.014.1970. Official methods of analysis. 11th. Ed. Association of Official Analytical Chemists. Washington, D.C. USA.
- Badui S. 2006. Química de los alimentos. Prentice-Hall, México. 736p.
- Beaulieu M., Turgeon S. L., Doublier J. L. (2001) Rheology, texture and microstructure of whey proteins/low methoxyl pectins mixed gels with added calcium. *International Dairy Journal*, 11:961-967.
- BeMiller, J. N. (1986). An Introduction to Pectins: Structure and Properties. En: Chemistry and Function of Pectins. Ed. by: Fishman, M. L. and Jen, J. Joseph. American Chemical Society. ACS Symposium Series. USA.
- Bengochea C., Jones O.G., Guerrero A. y McClements D.J. (2011) Formation and characterization of lactoferrin/pectin electrostatic complexes: impact of composition, pH and thermal treatment. *Food Hydrocolloids* 25:1227-1232.
- Chronakis, I. S., Kasapis, S., Abeysekera, R. (1997). Structural properties of gelatin-pectin gels. Part I: Effect of ethylene glycol. *Food Hydrocolloids* 11: 271-279.
- Choupra I., Ducl V., Richard J., Dubois P. y Boury F. (2006) Conformational modifications of α gliadin and globulin proteins upon complex coacervates formation with gum arabic as studied by Raman Microspectroscopy. *Biomacromolecules*, 7:2616-2623.
- Clark A.H., y Ross-Murphy B. (1987) Structural and mechanical properties of biopolymer gels. *Adv. Polymer Sci.* 83:57-192.
- Clogston J.D. y Patri A.K. (2010) Zeta potential measurement. En Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery. Pp 63-70. Methods in Molecular Biology. Book series Vol. 697.
- Doublier J.L., Garnier C., Renard D. y Sanchez C. (2000) Protein-polysaccharide interactions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 5:202-214.
- Ducl V., Richard J., Saulnier P., Popineau Y. y Boury F. (2004) Evidence and characterization of complex coacervates containing plant proteins: application to the microencapsulation of oil droplets. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*. 232, 239-247.
- DuPont F., Chan R., Lopez R. y Vensel W. (2005) Sequential extraction and quantitative recovery of gliadins, glutenins, and other proteins from small samples of wheat flour. *J. Agric. Food Chem.* 53: 1575-1584.

Einhorn-Stoll U. y Kunzek H. 2009. Thermoanalytical characterization of processing-dependent structural changes and state transitions of citrus pectin. *Food Hydrocolloids*. 23:40-52.

Fellah A., Anjukandi P., Waterland M.R. y Williams M. (2009) Determining the degree of methylesterification of pectin by ATR/FT-IR: methodology optimization and comparison with theoretical calculations. *Carbohydrate Polymers* 78:847-853.

Flory P. J. (1963) Principles of Polymer Chemistry. Cornell University Press, Ithaca, New York, N.Y.

Gilsenan P. M., Richardson R. K. y Morris E. R. (2003) Associative and segregative interactions between gelatin and low-methoxy pectin: Part 1. Associative interactions in the absence of Ca²⁺. *Food Hydrocolloids* 17:723-737.

Ghosh A. y Bandyopadhyay P. (2012) Biochemistry, Genetics and Molecular Biology. The Complex World of Polysaccharides. Polysaccharide-Protein Interactions and Their Relevance in Food Colloids. Desiree Nedra Karunaratne, ISBN 978-953-51-0819-1. Octubre 2012.

Guerrero T. F. Comportamiento reológico de fluidos complejos carboteicos y su aprovechamiento en la formación de geles. Tesis Maestría. Biotecnología CINVESTAV.

Harding S. 1997. The intrinsic viscosity of biological macromolecules. Progress in measurement, interpretation and application to structure in dilute solution. *Prog. Biophys. Molec. Biol.* Vol 68. No. 2/3. Pp. 207-262

Harnsilawat T., Pongsawatmanit R. y McClemens D. J. (2006) Characterization of β -lactoglobulin –sodium alginate interactions in aqueous solutions: A calorimetry, light scattering, electrophoretic mobility and solubility study. *Food Hydrocolloids* 20:577-585.

Hernández-Espinosa N., Posadas G., Cervantes F., González H.I., Santacruz A., Benítez I. y Peña R.J. (2013) Distribución de fracciones de proteína y su contribución a las características de calidad de trigo. *Rev. Fitotec. Mex.* Vol. 36 (2): 137 – 145.

Hua, Y. (2003). Gelling property of soy protein–gum mixtures. *Food Hydrocolloids* 17: 889-894.

Hunter R.J. (1981) Zeta potential. En Colloid Science: principles and applications. Academic Press. Inc.

Kelly S., Jess T. y Price N. (2005) How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta* 1751:119-139

Kenchington A. W. y Ward A. G. (1954) The titration curve of gelatin. *British Gelatin and Glue Research Association*.

Kertesz, Z. I. (1951). The Pectic Substances. Interscience Publishers. USA. pp. 628

Khatkar B.S., Barak S. y Mudgil D. 2013. Effects of gliadin addition on the rheological, microscopic and thermal characteristics of wheat gluten. *Int. J. of Biol. Macromolecules* 53:38-41.

Kirby B.J, y Hasselbrink E.F. (2004) Zeta potential of microfluidic substrates: 1. Theory, experimental techniques and effects on separations. *Electrophoresis*. Wiley Online Library. <https://doi.org/10.1002/elps.200305754>

León A., Rosell C. y Benedito de Barber C. 2003. A differential scanning calorimetry study of wheat proteins. *Eur Food Res Technol*. 217:13-16.

Liang L., Leroux J-C., y Subirade M. (2008) Interaction of α -gliadin with Poly (HEMA-co-SS): Structural characterization and biological implication. *Biopolymers* 91:169-178.

Lopoes da Silva J.A., y Rao M.A. (2006) Pectins: structure, functionality and uses en Food Polysaccharides and their applications. Capítulo 11. Segunda edición. p.353-397.

Lukas K., LeMaire P.K. (2009) Differential scanning calorimetry: fundamental overview. *Resonance*. 14(8):807-817.

Manero, O., Pérez-López, J. H., Escalante, J. I., Puig, J. E., Bautista, F. (2007). A thermodynamic approach to rheology of complex fluids: The generalized BMP model. *Journal of Non-Newtonian Fluids Mechanics* 146: 22-29.

Mangavel C., Barbot J., Popineau Y. y Guéguen J. (2001) Evolution of wheat gliadins conformation during film formation: a fourier transform infrared study. *J. Agric. Food Chem*. 49:867-872.

Martling S.E., Mulvaney S.J. y Cohen C. (2004) Effect of moisture content on viscoelastic properties of hydrated gliadin. *Cereal Chem* 81:207-219.

McOsco C.W. (1994) Rheology: principles, measurements and applications. 568p. John Wiley & Sons, Inc.

Muller H.G. (1978) Introducción a la reología de alimentos. 172p. Acribia Editorial.

Munarin F., Tanzi M.C. y Petrin P. (2012) Advances in biomedical applications of pectin gels. *Int. J. Biol. Macromolecules* 51:681-689.

Miyazawa, T. (1967) *Poly-a-Amino Acids* (Fasman, G. D., Ed.) pp 69-103, Marcel Dekker, New York.

Miyazawa T., Shimanouchi T., y Mizushima J. (1958) Normal vibrations of N-methylacetamide. *J. Chem. Phys.* 29, 61 1-616.

Osborne, T. B. (1907) The proteins of the wheat kernel. Carnegie Inst.: Washington, DC.

Rao M. A. 1999. Rheology of fluid and semisolid foods, principles and applications. Apen Publishers Inc. Gaithersburg, Maryland.

Rasheed F., Newson W., Plivelic T., Kuktaite R., Hedenqvist M., Gällstedt M. y Johansson E. (2014) Structural architecture and solubility of native and modified gliadin and glutenin proteins: non-crystalline molecular and atomic organization. *RSC Adv*. 4:2051-2060.

Raudino A., Sarpietro M.G., Pannuzzo M. (2013) Differential scanning calorimetry (DSC): theoretical fundamentals. *Drug-Biomembrane Interaction Studies*

Rodríguez J.M., y Pilosof A.M.R. (2011) Protein-polysaccharide interactions at fluid interfaces. *Food Hydrocolloids*. 25:1925-1937.

Sánchez A., Popineau Y., Mangavel C., Larré C. y Guéguen J. (1998) Effect of different plasticizers on the mechanical and Surface properties of wheat gliadin films. *J. Agric. Food Chem.* 46:4539-4544.

Sapirstein, H. D. and B. X. Fu. 1998. Intercultivar variation in the quantity of monomeric proteins, soluble and insoluble glutenin, and residue protein in wheat flour and relationship to breadmaking quality. *Cereal Chemistry* 75: 500-507.

Secundo F. y Guerrieri N. (2005) ATR-FT/IR study on the interactions between Gliadins and Dextrin and their effects on protein secondary structure *J. Agric. Food Chem.* 53:1757-1764

Scheller H., Jensen J., Sorensen S., Harholt J. y Geshi N. (2007) Biosynthesis of Pectin. *Physiologia Plantarum* 129:283-295.

Schmitt C. y Turgeon S. (2011) Protein/polysaccharide complexes and coacervates in food systems. *Advances in Colloid and Interface Science* 167:63-70.

Schmitt C., Sanchez C., Thomas F. y Hardy J. (1999) Complex coacervation between β -lactoglobulin and acacia gum in aqueous medium. *Food Hydrocolloids*, 13:483-496.

Schmitt C., Sanchez C., Desobry-Banon S. y Hardy J. (1998) Structure and technofunctional properties of protein-polysaccharide complexes: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 38:689-753.

Schultz, R., & Schwejger, T. (1965). Determination of the degree of esterification of pectin, determination of the ester methoxyl content of pectin by saponification and titration. *Methods in Carbohydrate Chemistry*. 5(189).

Secundo F. y Guerrieri N. (2005) ATR-FT/IR study on the interactions between gliadins and dextrin and their effects on protein secondary structure. *J. Agric. Food Chem.* 53: 1757-1764.

Seifert A., Heinevetter L., Cölfen H. y Harding S. (1995) Characterization of gliadin-galactomannan incubation mixtures by analytical ultracentrifugation. *Carbohydrate Polymers* 28:325-332.

Shewry P.R., Halford N.G. (2002) Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *J. Exp. Botany* 53:947-958.

Shriner R. L., Curtin D. Y., y Clayton R. (2001) Identificación sistemática de compuestos orgánicos. Editorial Limusa, 480pp.

Singh, N. K., K. W. Shepherd, and G. B. Cornish. (1991) A simplified SDS-PAGE procedure for separating LMW subunits of glutenin. *J. Cereal Sci.* 14: 203-208.

Smith M. B. y March J. (2007) March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms and structure. Sexta edición. 2007.

Song Y., Gao L., Li L. y Zheng Q. (2010) Influence of gliadins on rheology of methycellulose in 70% (v/v) aqueous ethanol. *Food Hyddrocolloids* 24:98-104.

Sriamornsak Pornsak. Chemistry of Pectin and its Pharmaceutical uses: A Review. Disponible en la red.

Sun S., Song Y., y Zheng Q. (2009) Rheological behavior of wheat gliadins in 50% (v/v) aqueous propanol. *Journal of Food Engineering* (90) 207-211.

Sun S., Song Y., y Zheng Q. (2008) pH-induced rheological changes for semi-dilute solutions of wheat gliadins. *Food Hydrocolloids*. 22:1090-1096.

Surewicz W.K., Mantsch H.H., Chapman D. (1993) Determination of protein secondary structure by Fourier Transform Infrared Spectroscopy: a critical assessment. *Biochemistry*. 32(2): 389-394.

Tanford C. y Roxby R. (1972) Interpretation of protein titration curves. Application to Lysozyme. *Biochemistry Vol. 11, No. 11, 2192-2198*.

Tague E. L. (1925) The iso-electric points of gliadin and glutenin. *J. Am. Chem. Soc.* 47(2):418-422.

Thewissen B.G., Celus I. Brijis K. y Delcour J. A. (2011) Foaming properties of wheat gliadin. *J. Agric. Food Chem.* 59:1370-1375.

Tolstoguzov, V. B. (1986). Functional properties of protein-polisaccharide mixtures. In: Functional properties of food macromolecules (Edited by J.R. Mitchell and D.A. Ledward). Elsevier Applied Science, London. pp 385-415.

Uthayakumaran S, P W Gras, F L Stoddard, F Bekes (1999) Effect of varying protein content and glutenin-to-gliadin ratio on the functional properties of wheat dough. *Cereal Chemistry* 76:389-394.

Visser J. y Voragen A.G., 1995. Pectins and Pectinases. Proceedings of an International Symposium, Wageningen, The Netherlands, December 3-7, 1995.

Vivar Vera Ma. De los Angeles. 2005. Obtención de pectinas de tejocote (*Crataegus pubescens*) de bajo metoxilo por vía enzimática y su caracterización. Tesis. Departamento de Biotecnología. CINVESTAV.

Whitmore L. y Wallace B.A. (2007) Protein secondary structure analysis from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases. *Biopolymers*. Wiley Online Library. <https://doi.org/10.1002/bip.20853>

Wieser H. (2007) Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiology*, 24:115-119.

Xu J., Bietz J. y Carriere C. (2007) Viscoelastic properties of wheat gliadin and glutenin suspensions. *Food Chem.* 101:1025-1030.

Zasyplin, D. V., Braudo, E. E., Tolstoguzov, V. B. (1997). Multicomponent biopolymer gels. *Food Hydrocolloids* 11: 159-170.

Zhao Y., Li F., Carvajal T. y Harris M. (2009) Interactions between bovine serum albumin and alginate: An evaluation of alginate as protein carrier. *J. Colloid and Interface Sci.* 332:345-353.

Zhu, H., De Kee, D., Frederic, K. (2009). A constitutive model for flow-induced anisotropic behavior of viscoelastic complex fluids. *Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics* 157: 108-116.

El jurado designado por el Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, aprueba la tesis que presenta para su examen final de Doctor en Ciencias en la Especialidad de Biotecnología, a la C. Nayelli Hernández Espinosa el 26 de Septiembre de 2018.

Dra. Emma Gloria Ramos Ramírez

Dr. Juan Alfredo Salazar Montoya

Dr. Graciano Calva Calva

Dra. Teresa Mancilla Percino

Dr. Roberto Javier Peña Bautista