



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA
Y BIOINGENIERÍA

**Caracterización de geles binarios a base de mucina,
grenetina e hidrolizados de soya empleando técnicas
calorimétricas y fototérmicas**

Tesis que presenta

Azucena López López

Para obtener el de grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

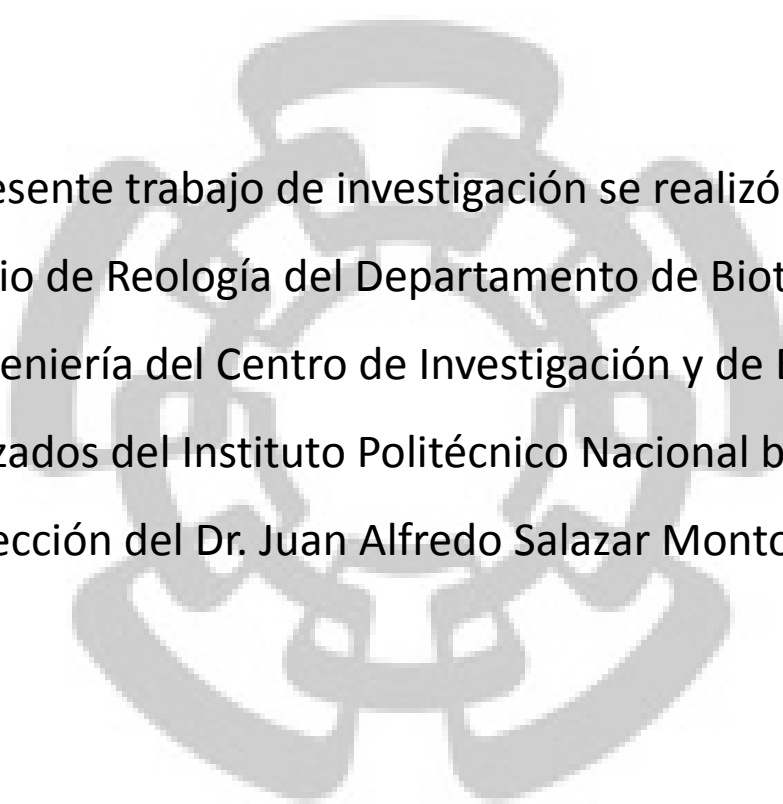
EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA

Director de la tesis

Dr. Juan Alfredo Salazar Montoya

México, D.F.

Diciembre, 2015.



El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Reología del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección del Dr. Juan Alfredo Salazar Montoya.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la Beca 366892 otorgada durante el periodo de 01 de Septiembre de 2013 a 31 de Agosto de 2015 con la cual fue posible desarrollar el presente trabajo de investigación.

A mi Director de Tesis Dr. Juan Alfredo Salazar Montoya por su dirección, asesoría y consejos durante el desarrollo de este proyecto.

A la Dra. Emma Gloria Ramos Ramírez por sus consejos, apoyo y sugerencias en el desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Alfredo Cruz Orea por su asesoría y apoyo brindado durante la elaboración del proyecto.

Al Ing. Miguel Márquez Robles del Laboratorio de Reología de Alimentos por su apoyo técnico en el manejo de los equipos del Laboratorio.

A la Ing. María Dolores Díaz Cervantes del Laboratorio de Reología de Alimentos por su apoyo técnico en el manejo de los equipos de Laboratorio.

A la Biol. María del Pilar Méndez Castrejón del Laboratorio de Toxicología de Alimentos por su apoyo técnico en el manejo de los equipos del Laboratorio.

A la Lic. Margarita Lizeth Alvarado Noguez del Laboratorio de Técnicas Fototérmicas del Departamento de Física por su apoyo en el manejo de los equipos del Laboratorio.

A mis compañeros de generación de Maestría y compañeros de Laboratorio.

DEDICATORIA

A mis padres

Filiberto López Hernández y Georgina López Krauletz

A mis hermanos

María del Carmen, Cesáreo, Anabel y Orquídea

A mi abuela

Amalia

CONTENIDO

Listado de Figuras.....	v
Listado de Tablas.....	ix
Notación.....	xi
Resumen.....	xiii
Abstract.....	xiv
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1. Glicoproteínas	2
1.2 Mucinas.....	3
1.2.1 Estructura de las mucinas	3
1.3 La soya.....	7
1.3.1 Características físicas de la soya.....	8
1.3.2 Composición química de la soya.....	9
1.3.2.1 Proteínas de soya	11
1.3.3 Harina de soya	12
1.3.4 Concentrado de proteína de soya	13
1.3.5 Aislados de proteína de soya	14
1.4 Grenetinas.....	16
1.4.1 Estructura de la grenetina	16

1.5 Geles.....	20
1.5.1 Proceso de gelificación	22
1.5.1.1 Temperatura.....	22
1.5.1.2 Presión.....	23
1.5.1.3 Fuerza iónica.....	24
1.5.1.4 pH.....	24
1.5.1.5. Presencia de enzimas	25
1.5.1.6. Grado de polimerización	25
1.5.2 Tipos de geles.....	26
1.5.2.1 Geles de proteínas.....	26
1.5.2.2 Geles de polisacáridos	26
1.5.2.3 Geles a partir de grenetinas	27
1.6 Mezclas de geles	28
1.7 Viscosidad intrínseca	31
1.8 Calorimetría.....	32
1.8.1 Calorimetría diferencial de barrido	33
1.8.1.1 Funcionamiento.....	34
1.9 Técnicas fototérmicas	36
1.9.1 Espectroscopia fotoacústica.....	37

2. JUSTIFICACIÓN	44
3. HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	46
4. OBJETIVO GENERAL	48
4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	48
5. MATERIALES Y MÉTODOS	50
5.1 Materiales.....	50
5.2 Estrategia Experimental	50
5.3 Métodos	52
5.3.1 Preparación de las mezclas	52
5.3.2 Obtención de geles de mucina cruda y purificada.....	53
5.3.3 Incorporación de las proteínas animales o vegetales a geles de mucina cruda o purificada	53
5.3.4 Obtención de geles de soya y grenetina de res	54
5.3.4.1 Aislado de soya	54
5.3.4.2 Concentrado de soya	54
5.3.4.3 Harina de soya	55
5.3.4.4 Grenetina de piel de res	55
5.3.3.5 Determinación de humedad de los geles obtenidos.....	56
5.3.5 Determinación del peso molecular de mucinas	56

5.3.6 Calorimetría diferencial de barrido	59
5.3.7 Obtención del espectro de absorción óptico de los sistemas binarios mucinas- proteínas	61
5.3.8 Determinación de la efusividad térmica de los geles de mucinas, proteínas de soya y grenetinas de res	63
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	69
6.1 Termogramas de las mucinas, aislados de soya y grenetinas de res	69
6.2 Peso molecular de mucinas	80
6.3 Termogramas de geles de mucinas	83
6.4 Análisis por DSC de los geles de soya y grenetina de res	85
6.5 Efecto de la incorporación de las proteínas animales y vegetales a los geles de mucina cruda y purificada	88
6.6 Espectro de absorción óptico de los sistemas binarios mucinas-proteínas.....	92
6.7 Cálculo de la efusividad térmica de los geles complejos mediante técnicas fototérmicas.....	98
7. CONCLUSIONES	104
8. RECOMENDACIONES	109
9. BIBLIOGRAFÍA	111

Listado de Figuras

Figura 1. Estructura general de las mucinas	5
Figura 2. Representación de la mucina gástrica de cerdo	6
Figura 3. Componentes principales de una semilla de soya	9
Figura 4. Estructura del colágeno	17
Figura 5. Estructura de triple hélice del colágeno. A) Vista a lo largo del eje molecular; B) Vista lateral de la molécula de colágeno.	18
Figura 6. Esquema de la estructura tridimensional de un gel	21
Figura 7. Proceso de gelificación mediante calor	23
Figura 8. Proceso de gelificación mediante iones	24
Figura 9. Proceso de gelificación en grenetina	27
Figura 10. Termograma obtenido por calorimetría diferencial de barrido.....	35
Figura 11. Diseño de Celda fotoacústica	38
Figura 12. Señal fotoacústica en función de la frecuencia de modulación para el silicio	40
Figura 13. Relación de amplitud R para el agua destilada y la muestra de referencia	41
Figura 14. Estrategia experimental	51
Figura 15. Viscosímetro tipo Ubbelohde	57
Figura 16. Determinación gráfica de la viscosidad intrínseca	59

Figura 17. Calorímetro Diferencial de Barrido (TA Instruments 2010)	60
Figura 18. Celda utilizada en el calorímetro diferencial de barrido.....	61
Figura 19. Componentes del espectrómetro fotoacústico	62
Figura 20.a) Arreglo experimental fotoacústico b) Sección transversal de la celda fotoacústica con la muestra.....	64
Figura 21. Celda fotoacústica con el sistema aire-silicio-muestra.....	65
Figura 22. Fuente de calor incidiendo en el sistema aire-silicio-muestra	66
Figura 23. Celda fotoacústica con el sistema aire-silicio.....	66
Figura 24. Termograma correspondiente a la mucina cruda y purificada	69
Figura 25. Termograma del ácido siálico	71
Figura 26. Termograma de las proteínas de soya.....	72
Figura 27. Temperatura de fusión de componentes de la soya	73
Figura 28. Entalpía de fusión de los componentes de la soya	74
Figura 29. Termogramas de grenetinas de res	76
Figura 30. Transiciones térmicas de las mezclas mucina cruda-proteínas de soya y grenetinas de res (1:1).	77
Figura 31. Termogramas de las mezclas mucina purificada-proteínas de soya y grenetinas de res (1:1).....	79
Figura 32. Viscosidad reducida (específica/concentración) de la mucina cruda	81
Figura 33. Viscosidad reducida (específica/concentración) de la mucina purificada..	82

Figura 34. Termogramas de geles de mucinas cruda y purificada.....	83
Figura 35. Termogramas de geles de proteínas de soya a) harina; b) concentrado; c) aislado.....	86
Figura 36. Comportamiento térmico del gel de grenetina	87
Figura 37. Termograma de los geles mucina cruda-proteínas de soya	88
Figura 38. Comportamiento térmico de los geles mucina cruda-grenetinas	89
Figura 39. Transiciones térmicas de los geles mucina purificada- proteínas de soya	90
Figura 40. Termogramas de los geles mucina purificada-grenetinas.....	91
Figura 41. Espectro de absorción óptico de geles de mucinas cruda y purificada	92
Figura 42. Espectro de absorción óptico de geles de proteínas de soya, aislado, concentrado y harina.....	93
Figura 43. Señal fotoacústica vs longitud de onda en los geles de grenetina	94
Figura 44. Señal fotoacústica vs la absorción para geles de mucina cruda-proteínas de soya y grenetinas de res	95
Figura 45. Espectro de absorción óptico de geles de mucina purificada-proteínas de soya	96
Figura 46. Espectro de absorción óptico de geles de mucina purificada-grenetinas..	97
Figura 47. Señal fotoacústica vs longitud de onda del ácido siálico, mucina cruda y mucina purifica en polvo	97
Figura 48. Ajuste para la obtención de efusividad en geles de harina de soya.....	99

Figura 49. Ajuste para la obtención de efusividad en geles de mucina purificada-aislado
de soya99

Listado de Tablas

Tabla 1. Composición proximal de la soya.....	10
Tabla 2. Métodos utilizados para el estudio de las características de geles	30
Tabla 3. Condiciones para seleccionar el método de encapsulado	35
Tabla 4. Mezclas de mucinas-proteínas en polvo	52
Tabla 5. Parámetros térmicos de componentes individuales	70
Tabla 6. Parámetros térmicos de mezclas mucina cruda-proteínas.....	78
Tabla 7. Parámetros térmicos de mezclas mucina purificada-proteínas	79
Tabla 8. Determinación de la viscosidad reducida en la mucina cruda.....	80
Tabla 9. Determinación de la viscosidad reducida en la mucina purificada	81
Tabla 10, Constantes K y α para mucina de cerdo	82
Tabla 11. Peso molecular obtenido en mucinas.....	83
Tabla 12. Parámetros térmicos obtenidos de los geles de mucinas	84
Tabla 13. Transiciones térmicas obtenidas en geles de soya.....	85
Tabla 14. Parámetros térmicos de grenetina de piel de res.....	87
Tabla 15. Transiciones térmicas de geles de mucinas incorporados con proteínas de soya	89
Tabla 16. Parámetros térmicos de geles de mucinas incorporados con grenetinas ..	91

Tabla 17. Valores obtenidos de efusividad en geles de mucinas (cruda y purificada),
proteínas de soya, grenetinas de res y mezclas de mucinas-proteínas de soya y
grenetinas de res100

Notación

T	Temperatura
°C	Grados centígrados
K	Conductividad térmica
ρ_i	Densidad del material
c_i	Calor específico del material
$\alpha_i = \kappa_i / \rho_i c_i$	Difusividad térmica del material
$a_i = (\omega / 2\alpha_i)^{1/2}$	Coefficiente de difusión térmica del material
λ	Longitud de onda térmica
$b = e_b / e_s$	Relación de efusividad entre el material de respaldo y la muestra
e_b	Efusividad del material de respaldo
e_s	Efusividad de la muestra
Ω	Frecuencia angular
Q	Flujo de calor
ΔH	Entalpía
C_p	Capacidad calorífica
U	Energía interna
Q	Calor
K	Constante de Huggins y kraemer
η	Viscosidad intrínseca
$\eta_{rel} = \eta / \eta_s$	Viscosidad relativa
$\eta_{sp} = (\eta - \eta_s) / \eta_s$	Viscosidad específica

η_s	Viscosidad del solvente
η_{ap}	Viscosidad aparente
η_{red}	Viscosidad reducida
T	Tiempo
SF	Señal Fotoacústica
P	Parámetro de ajuste

Resumen

Las mucinas son glicoproteínas con alto peso molecular, fuertemente glicosiladas y en conjunto con elementos como el agua, sales y lípidos constituyen las secreciones mucosas que cubren ciertas superficies del cuerpo. Estas, exhiben una tendencia a formar geles, característica atribuida a la presencia de las glicoproteínas (mucinas). Por otra parte, se ha observado que las mezclas de mucosas y biopolímeros, entre ellos las proteínas, exhiben una mayor resistencia, teniendo implicaciones físicas importantes como la mejora en la textura y estabilidad. En el presente proyecto se realizó la adición de proteínas de soya y grenetina de res a mucina de estómago de cerdo cruda y purificada, para lo cual se realizaron mezclas en relación 1:1, se adicionó agua al 70% y se indujo la formación de geles mediante calor, posteriormente se refrigeraron por 24 hrs. Mediante técnicas de calorimetría diferencial de barrido y espectroscopía fotoacústica fue posible estudiar las propiedades físicas de estas mezclas. A partir de los termogramas obtenidos se determinaron parámetros térmicos como temperaturas de transición, entalpías y capacidad calorífica. Mediante las técnicas fototérmicas se obtuvieron los espectros de absorción óptico de las mezclas, en general los valores donde se observó mayor SF indica una mayor absorción de radiación electromagética, también se determinó la efusividad térmica, mostrando valores de $1750 (Ws^{\frac{1}{2}}/m^{2\circ}C)$ para la mucina purificada y de $1421 (Ws^{\frac{1}{2}}/m^{2\circ}C)$ para la mucina cruda; en las mezclas mucina cruda-proteínas de soya se observó en promedio los mayores valores de efusividad térmica en el rango de $2670 - 1598 (Ws^{\frac{1}{2}}/m^{2\circ}C)$, las mezclas mucina cruda-grenetinas $1703 - 1935 (Ws^{\frac{1}{2}}/m^{2\circ}C)$, las mezclas mucina purificada-proteínas (soya y res) $1417 - 1679 (Ws^{\frac{1}{2}}/m^{2\circ}C)$ respectivamente.

Abstract

Mucins are high molecular weight glycoproteins, heavily glycosylated and with elements such as water, salts and lipids constitute the mucus covering certain surfaces of the body. Mucus exhibit a tendency to form gels, characteristic attributed mainly to the presence of glycoproteins (mucin). Moreover, it has been observed that blends of mucus and biopolymers, including proteins, exhibit greater strength and has important physical implications as improved texture and stability. In this project, crude and purified mucin were mixed with proteins (soy and gelatin) in ratio 1:1, water at 70% was added to each of the mucin-protein blends and were heated for gel formation, the samples were then put into a refrigerator and held for 24 h for gel formation. By differential scanning calorimetry and photoacoustic spectroscopy it was possible to study the physical properties of these blends. From Thermograms obtained, thermal parameters as transition temperatures, enthalpy and heat capacity were determined. Optical absorption spectra in mixtures were obtained, using a photothermal technique. Higher absorbance was indicative of higher electromagnetic absorption and consequently higher heat production, thermal effusivity was also determined, with values of 1750 ($Ws^{\frac{1}{2}}/m^2\text{ }^{\circ}C$) for purified mucin and 1421 ($Ws^{\frac{1}{2}}/m^2\text{ }^{\circ}C$) for crude mucin. Crude mucin-soy proteins blends showed thermal effusivity values ranging from 2670 to 1598 ($Ws^{\frac{1}{2}}/m^2\text{ }^{\circ}C$), crude mucin and gelatin blends with effusivity values 1703 – 1935 ($Ws^{\frac{1}{2}}/m^2\text{ }^{\circ}C$), purified mucin and proteins (soy and beef) showed effusivity values of 1417 and 1679 ($Ws^{\frac{1}{2}}/m^2\text{ }^{\circ}C$) respectively.

I INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Glicoproteínas

Las modificaciones pos-traduccionales de proteínas con oligosacáridos se presentan a través de un proceso conocido como glicosilación, donde la formación de uniones glicosídicas es catalizada entre aminoácidos específicos y cadenas de carbohidratos (Galuska *et al.*, 2015).

Basándose en el tipo de enlace entre las cadenas polipeptídicas y sus cadenas de oligosacáridos, las glicoproteínas se agrupan en tres clases principales, 1) las que contienen un enlace o-glicosídico (o-enlazadas), que incluyen la cadena lateral hidroxilo de serina o treonina y un azúcar como N-acetilglucosamina, 2) las que contienen un enlace N-glicosídico (N-enlazadas), que involucran al nitrógeno amino de la asparagina y N-acetilglucosamina y 3) las enlazadas al aminoácido carboxilo terminal de una proteína mediante una porción fosforil-etanolamina unida a un oligosacárido, que a su vez se enlaza por medio de glucosamina a fosfatidilinositol (Mcguckin y Thornton, 2012).

Las glicoproteínas resultantes en este proceso tienen una gran importancia biológica ya que son una clase de moléculas que presentan diversas funciones; por ejemplo, casi todas las proteínas plasmáticas de seres humanos son glicoproteínas, muchas proteínas de membranas celulares contienen cantidades considerables de carbohidratos, varias sustancias del grupo sanguíneo y algunas hormonas son glicoproteínas y adicionalmente se encuentran en casi todos los organismos desde bacterias hasta seres humanos (Robert *et al.*, 2010).

1.2 Mucinas

La mucosa es una compleja secreción adherente, sintetizada por células especializadas en el epitelio de todos los organismos expuestos al ambiente externo. La mucosa está compuesta principalmente de agua (95%), también contiene sales, lípidos, fosfolípidos y colesterol; sin embargo, el principal componente que le otorga la viscosidad, elasticidad y propiedades de gelificación es la glicoproteína denominada mucina (Bansil y Turner, 2006).

Las mucinas contienen grandes dominios ricos en residuos de serina y treonina, están fuertemente glicosilados, y son expresadas principalmente en células epiteliales, son un componente importante de la interface entre el exterior y tejidos de la mucosa en las que proporcionan lubricación, hidratación y una barrera biológica y física a las toxinas potenciales, partículas y patógenos, las cadenas laterales de oligosacáridos contribuyen del 50 al 90% de su masa, debido a que en la región amino y carboxilo terminal de los aminoácidos, existen uniones o-glicosidales y algunos sitios de N-glicosilación, los cuales contribuyen a la dimerización y subsecuente polimerización para formar multímeros. Estos polipéptidos son usualmente muy grandes, de 200 a 900 KDa, la densa glicosilación aumenta entonces, el tamaño molecular y restringe el acceso de proteasas a mucinas (Libao-Mercado y De Lange, 2007; MCGuckin y Thornton, 2012).

1.2.1 Estructura de las mucinas

Las mucinas son glicoproteínas con dos características principales: 1) Un alto contenido de oligosacáridos O-enlazados (el contenido de carbohidrato de mucinas por lo general es mayor del 50%) y 2) presencia de secuencias de aminoácidos

repetitivas (en tándem) en el centro de sus esqueletos polipeptídicos, a los cuales las cadenas de glucanos están fijadas en agrupaciones, con alto contenido de serina, treonina y prolina. Si bien predominan los O-glucanos, las mucinas a menudo tienen cadenas de N-glucano (Robert et al., 2010). En la Figura 1 se observa la estructura general de las mucinas.

El peso molecular de las mucinas varía entre 0.5 y 20 MDa, los principales carbohidratos presentes son N-acetilgalactosamina, N-acetilglucosamina, fucosa, galactosa y ácido siálico (ácido N-acetilneuramínico), (Bansil y Turner, 2006).

Existen dos familias de mucinas estructuralmente distintas, la primera está compuesta de mucinas formadoras de geles (secretadas), mucinas que son completamente extracelulares y que forman estructuras oligoméricas, la otra es de mucinas unidas a la membrana; al igual que las mucinas secretadas, las mucinas unidas a la membrana están hechas de al menos un dominio similar; es decir, una gran parte constituida de repeticiones en “tándem”, enriquecida de residuos de prolina y de aminoácidos hidroxilo que llevan los O-glicanos (Desseyn *et al.*, 2008; Hattrup y Gendler, 2008).

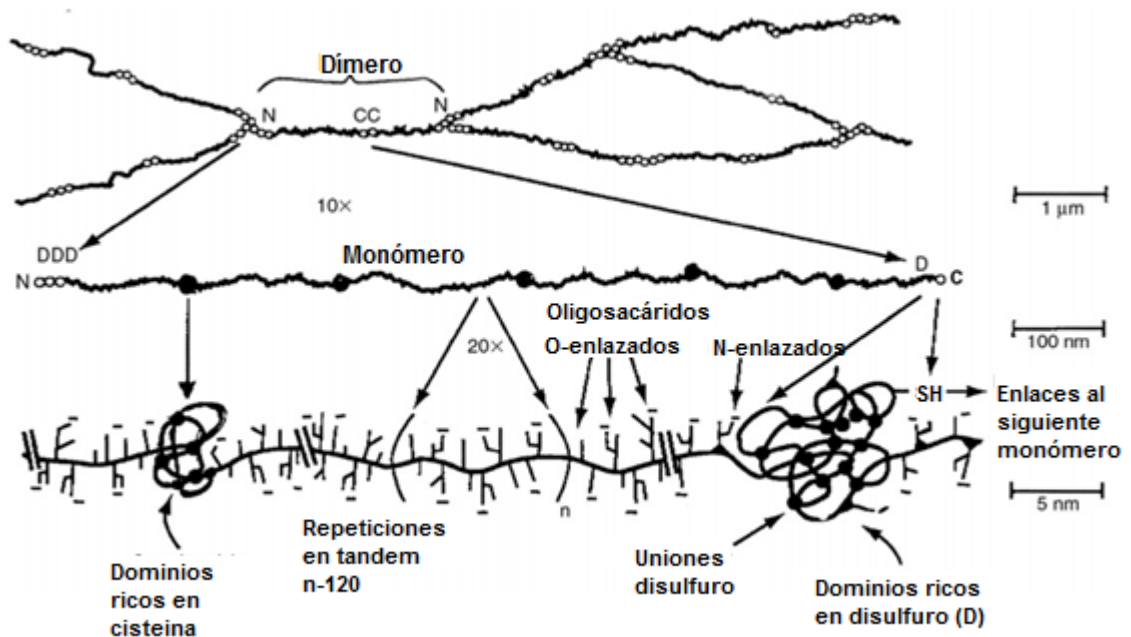
Mucinas secretoras formadoras de geles (MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6 y MUC19) se han identificado en humanos, mucinas estructuralmente relacionadas se han descrito en otros mamíferos, anfibios y peces e incluso invertebrados (Perez-Vilar y Mabolle, 2007).

Debido a su gran tamaño, alto contenido de carbohidratos, estructura extendida y naturaleza polimérica las mucinas formadoras de gel dotan a las secreciones mucosas con una alta viscosidad y una diversidad química para interactuar, atrapar y transportar microorganismos, partículas y sustancias químicas nocivas. En la mucosa gástrica, las

propiedades hidrodinámicas de las mucinas formadoras de gel previenen a la mucosa del daño por ácidos (Perez-Vilar y Mabolo, 2007; Voynow y Rubin, 2009).

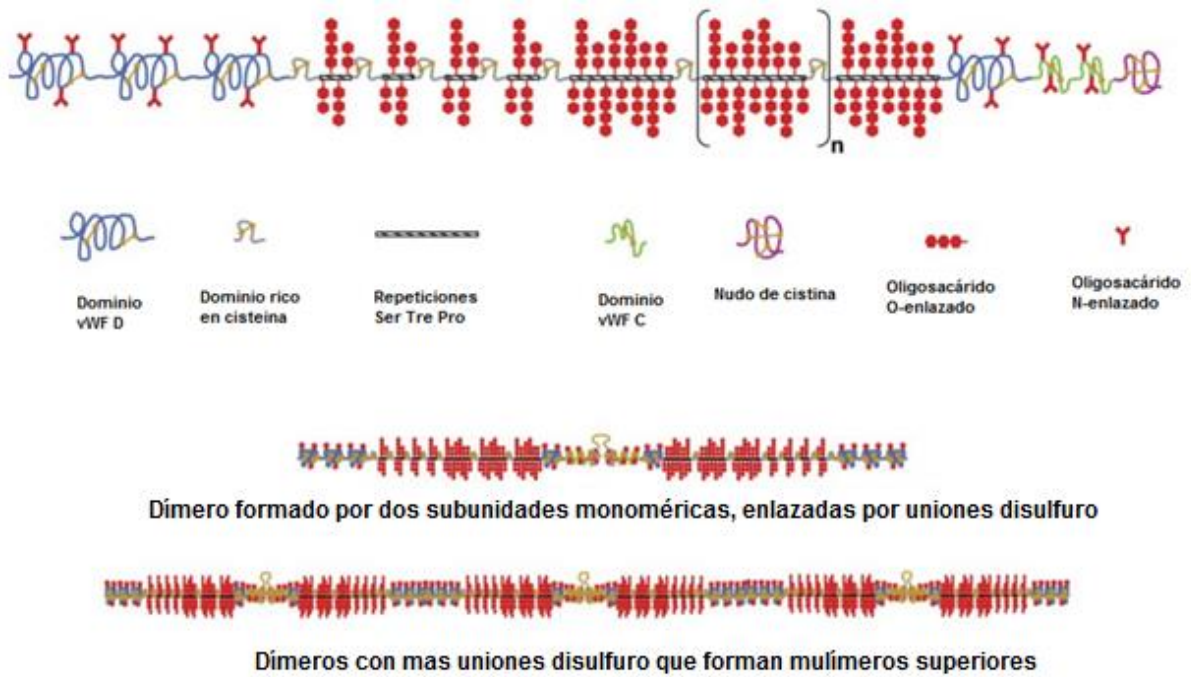
Todas las mucinas transmembranales contienen proteínas de tipo 1, proteínas con un dominio que abarca la membrana, pero también caracterizados por otros dominios proteicos (Lang *et al.*, 2007).

Las mucinas humanas formadoras de geles contienen dominios VWD (von Willebrand D) y dominios "C-terminal cisteína-knot" que son los responsables de la oligomerización de estas moléculas. El nudo de cisteína es responsable de la dimerización en el retículo endoplásmico, y en el caso de la mucina submaxilar porcina el tercer dominio VWD en su parte N-terminal es responsable por la trimerización en las últimas etapas de la ruta de secreción (Bansil y Turner, 2006; Lang *et al.*, 2007).



(Cone, 2009)

Figura 1. Estructura general de las mucinas



(Bansil y Turner, 2006)

Figura 2. Representación de la mucina gástrica de cerdo

El estudio de mucinas ha sido de gran interés a lo largo de los años, debido a las propiedades de lubricación, barrera física protectora de superficies epiteliales y la capacidad de gelificación que presentan. Allen *et al.*, (1976) llevaron a cabo el análisis de la estructura de la mucosa gástrica de cerdo, encontrando que el principal componente que proporcionaba propiedades de gelificación a la mucosa era una glicoproteína, que se denominó mucina, la cual contenía residuos ricos en serina, treonina y prolina unidos a cadenas de carbohidratos. A partir de estos estudios, se determinó que, el promedio de las concentraciones de glicoproteínas aisladas directamente del estómago de cerdo fue de aproximadamente 30-40 mg/ml.

Estudios realizados por Fogg *et al.*, (1996); Perez-Vilar *et al.*, (1996); estudiaron las propiedades físicas y químicas de esta glicoproteína, en la parte química se encontró que enlaces disulfuro actúan para formar dímeros, encontrando, además, 2-3 subunidades, cada una conteniendo 3-4 regiones glicosiladas. En la parte física, se realizó un análisis de mucina del colon de cerdo mediante exclusión en Sefarosa, determinando que diferentes polímeros de mucinas están compuestos de subunidades de tamaños variados. Estudios físicos adicionales se han llevado a cabo, como los realizados por Kočevár-Nared *et al.*, (1997), evaluando y comparando las propiedades reológicas de mucina cruda (Sigma) y mucina aislada de la mucosa gástrica de cerdo, determinando que la mucina aislada mostró el comportamiento de un gel más fuerte que el obtenido en la mucina cruda. En la Figura 2 se observan los componentes principales de la mucina gástrica de cerdo.

Dentro del grupo de trabajo, Delgado Reyes, (2013), llevó a cabo el estudio del efecto de la concentración, pH, temperatura y cationes en las propiedades viscoelásticas, térmicas y ópticas de geles de mucinas de estómago cerdo, reportando que a concentraciones de 55% y pH 2, la mucina se comporta como un gel débil.

Como se observa, se han realizado estudios de mucinas; sin embargo, existe muy poco referente al análisis de las interacciones de estas mucinas con otros compuestos poliméricos, como las proteínas de diversas fuentes.

1.3 La soya

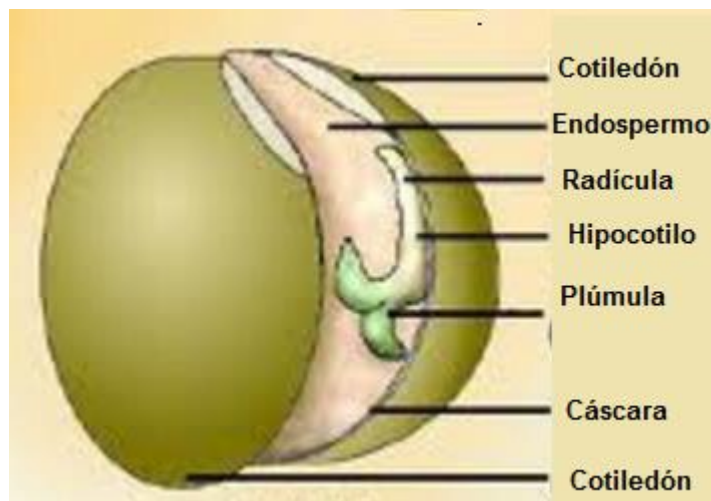
El frijol de soya, (*Glycine max*) perteneciente a la familia de las leguminosas y a la subfamilia *Papilionoideae*, tiene su origen de cultivo en China, este país fue el mayor productor y exportador durante la primera mitad del siglo XX (Qiu y Chang, 2010).

En la década de 1950 la producción del frijol de soya se desarrolló rápidamente en los Estados Unidos, el cual, en la actualidad, es el más grande productor de esta leguminosa (Qiu y Chang, 2010; FAO, 2015). En el periodo de 1996 al 2004 hubo un gran incremento en la producción de soya, en países como EUA, Brazil, China, entre otros, con un incremento del 123%, aumentando de 39 millones de Toneladas que se producían en 1996 a aproximadamente 87 millones de toneladas en el 2004 (FAO, 2007). Según el departamento de agricultura de Estados Unidos, para el 2014 la producción anual de frijol de soya fue de 320.49 millones de Toneladas, de los cuales 105.81 producidas por Estados Unidos, Brazil 100 millones de Toneladas, Argentina 57 millones, China 11.5 millones, India 11 millones, Paraguay 8.8 millones, Canadá 5.95 y otros países 20.436 millones de Toneladas (FAO, 2015).

1.3.1 Características físicas de la soya

La forma de las semillas de soya varía, desde esférica a elongada, e incluso aplanada. El color de las semillas puede ser amarillo, verde, marrón o negro. Las variedades que se usan en la industria son amarillas, la presencia de semillas de otros colores en grandes cantidades se considera un defecto. El tamaño de la semilla se expresa como el número de semillas por unidad de volumen o peso (FAO, 2015). La estructura de la semilla consiste en la cubierta de la semilla (cáscara) y dos cotiledones, más dos estructuras adicionales de menor peso: el hipocotilo y plúmula representan el 2% del peso. El cotiledón representa el 90% del peso de las semillas y contiene prácticamente todo el aceite y las proteínas presentes (FAO, 2015). Análisis microscópicos en esta sección revelan la presencia de cuerpos proteícos y cuerpos lipídicos (o esferosomas) que constituyen las unidades de almacenamiento de las proteínas y el aceite respectivamente, (Kangii *et al.*, 1991; FAO, 2015).

La cáscara representa aproximadamente el 8% del peso de la semilla y mantiene los cotiledones unidos, además de funcionar como capa protectora (McDonald, 2013; FAO, 2015). Los componentes de la semilla de soya, se representan en la Figura 3.



(McDonald, 2013)

Figura 3. Componentes principales de una semilla de soya

1.3.2 Composición química de la soya

La composición de la soya puede variar de acuerdo a la variedad y a las condiciones de crecimiento, con cantidades de proteína entre el 40% y el 45% y de lípidos entre 18 y 20% (FAO, 2015). Los valores de la composición química proximal de las semillas de soya se presentan en la Tabla 1.

Los lípidos del frijol de soya (aceite de soya crudo) consisten de 96% de triglicéridos, 2% de fosfolípidos, 1.6% de insaponificables, 0.5% de ácidos grasos libres y pequeñas cantidades de pigmentos carotenoides (Qiu y Chang, 2010).

Tabla 1. Composición proximal de la soya

Parte de la semilla	peso de la semilla (%)	Proteína Nx6.25 (%)	Lípidos (%)	Carbohidratos (%)	Cenizas (%)
Cotiledón	90	43	23	43	5.0
Cáscara	8	9	1	86	4.3
Hipocotilo	2	41	11	43	4.4
Semilla entera	100	40	20	35	4.9

Tomado de (FAO, 2015); datos reportados en base seca

El aceite de soya se clasifica como semi-seco debido a su alto contenido de ácidos linoleico y linolenico. La presencia del ácido linolenico es el principal responsable del deterioro oxidativo que se presenta en el aceite de soya (Goldberg y Stacey, 2008; FAO, 2015).

La soya contiene aproximadamente el 30% de carbohidratos, los cuales se pueden dividir en dos grupos: azúcares solubles (sacarosa, estaquiosa y rafinosa) e insolubles “fibra”. La parte insoluble es una mezcla de polisacáridos y sus derivados, consistiendo principalmente de hidratos de carbono de la pared celular: celulosa y hemicelulosa (Badui, 2006; FAO, 2015).

El contenido de minerales en la soya (cenizas) es aproximadamente de 4%, los principales constituyentes son; el Potasio, Calcio y Magnesio, en cantidades trazas se encuentra Hierro, Zinc y Cobre (Mbaherekire *et al.*, 2003).

En cuanto al contenido de humedad, para un correcto mantenimiento y viabilidad de la soya, se sugiere un contenido de humedad de 12 – 13%, por encima de este nivel es susceptible al ataque por hongos, especialmente en época de calor, por debajo de esa humedad los granos tienden a agrietarse y dividirse durante la manipulación, una

proporción grande de los granos partidos se considera un defecto, ya que puede inducir una mayor enranciamiento durante el almacenamiento (FAO, 2015).

1.3.2.1 Proteínas de soya

Como en las leguminosas, la mayor parte de las proteínas de soya son globulinas, en general las proteínas de las leguminosas son ricas en aminoácidos esenciales tales como lisina, treonina, isoleucina, leucina, fenilalanina y valina; sin embargo, son deficientes en metionina y cisteína (Badui, 2006).

Una forma de caracterizar las fracciones de proteínas de soya es por su constante de sedimentación. Cuatro fracciones se han estudiado ampliamente, se conocen como 2S, 7S, 11S y 15S, (S significa unidades Svedberg), el coeficiente numérico es la constante de sedimentación característico en agua (20 °C), (FAO, 2015).

Las fracciones 7S y 11S constituyen aproximadamente el 70% del contenido total de proteína en la soya, la relación 11S/7S puede variar de 0.5 a 3 (Sousa *et al.*, 1995). La fracción 2S consiste de polipéptidos de bajo peso molecular (8,000 a 20,000 Daltones), la fracción 7S es bastante heterogénea, su componente principal es la beta-conglicina (peso molecular de 150,000). La fracción 11S consiste de glicina, la proteína principal de la soya, tiene un peso molecular de 320,000-350,000 y se conforma de 12 subunidades unidas a través de puentes de hidrógeno y uniones disulfuro. La fracción 15S es probablemente un dímero de la glicina (Mbaherekire *et al.*, 2003; FAO, 2015).

El frijol de soya tiene una gran variedad de usos, la extracción de la soya con agua, se utiliza para la producción de leche de soya, la precipitación con agua de los extractos se usa para obtener la cuajada de soya (Tofu), a partir del proceso de fermentación se

obtiene pasta de soya (miso), salsa de soya (sho-yu), cuajada de soya fermentada (su-fu), por mencionar algunos (FAO, 2015).

Las proteínas de soya se han utilizado comúnmente en los productos alimenticios para mejorar su textura, aprovechando su capacidad de formar un gel con una buena capacidad de retención de agua después del calentamiento. Las proteínas de soya se obtienen a partir de la leguminosa y se clasifican de acuerdo a su contenido de proteína (Li *et al.*, 2014).

1.3.3 Harina de soya

Las harinas son la forma menos refinada de la soya, se obtiene a partir de las semillas de soya tostadas y molidas finamente (contiene un mínimo de 40% de proteína), esta harina puede tener grasas en la que se conservan todos los aceites naturales y desengrasada en donde se eliminan los aceites durante el procesamiento, la harina de soya desengrasada proporciona un porcentaje ligeramente mayor de proteínas y calcio (Bansil y Turner, 2006; FAO, 2015).

Las proteínas de soya tienen la capacidad de formar geles, a través de varios mecanismos que implican ciclos de calentamiento-enfriamiento (Jian *et al.*, 2014). Se ha demostrado que el calentamiento causa una ruptura irreversible de la estructura cuaternaria de la globulina 11S y una subsiguiente división en subunidades generando un estado intermedio transitorio en forma de un agregado soluble que rápidamente se convierte en gel (Badui, 2006; Bhattacharya y Jena, 2007).

Los geles basan su estructura en el fenómeno de asociación-disociación de las proteínas, lo que a su vez está determinado por diversos factores, como la temperatura, la fuerza iónica y el tipo de sal (Bainy *et al.*, 2008).

Las fuerzas que hacen posible la formación de geles son diversas, y algunas influyen más en una cierta fracción proteínica. Las fracciones 7S y 11S interaccionan cuando se calientan y producen rápidamente un estado de dispersión; sin embargo, en forma individual, la 7S genera geles por medio de puentes de hidrógeno, mientras que las provenientes de la fracción 11S lo hacen gracias a la creación de interacciones electrostáticas con iones divalentes y de enlaces disulfuro, además de este tipo de interacciones influyen las fuerzas hidrófobas (Banerjee y Bhattacharya, 2012). Las fracciones proteicas son sensibles a agentes desnaturizantes como pH extremo, temperatura, concentración de sales, entre otras. El efecto del calor es el más importante, debido a la reducción de la solubilidad de las proteínas, lo que puede llegar a inducir la gelificación (Badui, 2006).

Se han realizado estudios con harina de soya, como el realizado por Morales y Kokini, (1997); donde se analizaron los componentes 7S y 11S presentes en la soya mediante calorimetría diferencial de barrido, a partir de los termogramas obtenidos se observaron dos picos de desnaturización correspondientes a estos componentes.

1.3.4 Concentrado de proteína de soya

El concentrado de soya es un producto más refinado que la harina y contiene un mínimo de 65% de proteína, para su elaboración se eliminan hidratos de carbono de las harinas, para su elaboración se pueden seguir tres procesos, el primero utiliza una solución de etanol al 80% para quitar ciertas fracciones solubles, como son los oligosacáridos, parte de las cenizas y otras sustancias de menor peso molecular; bajo estas condiciones, las proteínas y los polisacáridos precipitan debido a que son insolubles en alcohol y se pueden recuperar para obtener un concentrado proteico

final. El segundo proceso implica una extracción de las proteínas en su punto isoeléctrico, en el que las globulinas y los polisacáridos se insolubilizan y precipitan, y posteriormente se neutralizan y se secan. El tercer método utiliza calor húmedo para desnaturalizar e insolubilizar los polipéptidos de la harina, seguido de un lavado con agua para eliminar los azúcares y otras moléculas pequeñas (Badui, 2006).

Los concentrados de soya son utilizados en la elaboración de productos en el área de alimentos, por sus características nutricionales y funcionales, nutricionalmente las características por las que se considera atractivo son, su alto contenido de proteína y el contenido de “fibra dietaria”; los valores nutricionales se expresan como índice de eficiencia de proteínas, el cual es ligeramente menor que en las harinas de soya, probablemente debido al efecto de menor fraccionamiento durante el proceso de extracción.

Se han realizado estudios con concentrados de soya, como el realizado por Kumar *et al.*, (2004), utilizando calorimetría diferencial de barrido y análisis termogravimétricos.

En los análisis de calorimetría diferencial de barrido, se observó una amplia transición endotérmica, observada por debajo de los 120 °C, específicamente 68 °C, el cual es un valor mayor a lo observado en los aislados de soya 60.1°C, este resultado fue asociado a la presencia de carbohidratos en los concentrados de soya.

1.3.5 Aislados de proteína de soya

Los aislados de soya, es la presentación con el mayor contenido de proteína, contiene aproximadamente el 90% de proteína de soya en base seca. Para la producción de estos aislados se usa como base harina de soya desengrasada u hojuelas de soya (Badui, 2006).

El proceso para la obtención de los aislados de soya se basa en la solubilización de las proteínas a un pH neutro o ligeramente alcalino y la precipitación por acidificación hacia la región isoeléctrica, cerca de un pH 4.5, lo que hace precipitar la mayor parte de las proteínas, el suero (fracción soluble), se separa por centrifugación, posteriormente se lava y se neutraliza con hidróxido de sodio para volverla a solubilizar y, por último, se seca por aspersion, se obtiene un compuesto más soluble en agua que la proteína en su punto isoeléctrico (FAO, 2015).

Los aislados de proteína de soya se han producido, principalmente, para fines industriales, como adhesivos para la industria de recubrimiento de papel antes de la segunda guerra mundial y para la industria alimentaria a principios de los años cincuenta (Qiu y Chang, 2010).

Algunas aplicaciones de los aislados de soya en alimentos son: el uso como productos texturizados (mejora de textura) y para reemplazar la carne, en emulsiones, proteínatos por su gran contenido de humedad, como estabilizantes, en fórmulas infantiles, donde los sólidos de la leche son reemplazados por soya, por mencionar algunos (Renkema y Van Vliet, 2002; FAO, 2015).

Debido a la importancia que ha demostrado este aislado de soya, se han llevado a cabo estudios de sus propiedades físicas, como el realizado por Li et al., (2014), mediante calorimetría diferencial de barrido, realizando un análisis de mezclas de aislados de soya y almidón de maíz, observándose transiciones térmicas en estas mezclas, demostrando además, que los aislados de soya mejoraron la estabilidad del almidón de maíz y aumentaron sus temperaturas endotérmicas.

Las propiedades de gelificación de los aislados de soya también se han estudiado, esto por la importancia de los geles y los procesos de gelificación en los alimentos, estudios realizados por Hermansson, (1986) y Bhattacharya y Jena, (2007); en el proceso de gelificación de aislados de soya demostraron que esta gelificación se induce mediante calor, principalmente, donde participan reacciones de desnaturalización, disociación-asociación y agregación, utilizando, para la formación de geles de soya, concentraciones del 15 -30 %.

1.4 Grenetinas

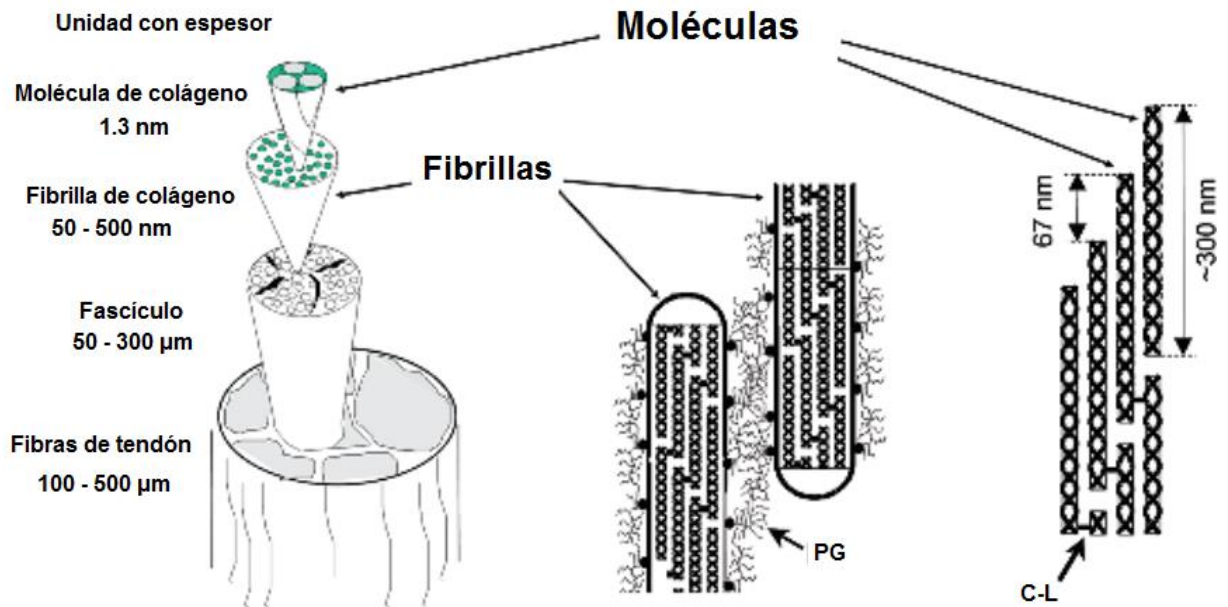
La grenetina es un biopolímero obtenido de la degradación del colágeno, en particular de la unidad fundamental del colágeno, las varillas de tropocolágeno (Normand *et al.*, 2000). El colágeno es la proteína más abundante en los vertebrados y constituye el 25% de la masa total de proteínas en los animales, se encuentra en la piel, huesos, cartílago y en los vasos sanguíneos (el tejido conectivo de animales), (Latinovic *et al.*, 2010).

1.4.1 Estructura de la grenetina

El tropocolágeno es una estructura en triple hélice compuesta de tres cadenas polipeptídicas separadas, con un peso molecular aproximado de 110 000 daltons (Clark y Ross-Murphy, 1987; Mori *et al.*, 2013).

En la Figura 4 se observa la estructura del colágeno, donde algunas de las unidades, fibras, fascículo, fibrillas y finalmente moléculas de colágeno se detallan, así como las interacciones entre fibrillas y moléculas. La matriz rica en proteoglicanos se indica como PG y las interacciones entre moléculas de colágeno se indican como C-L. Los

tejidos ricos en colágeno se basan en las fibrillas de colágeno como base de construcción (Hulmes, 2008).



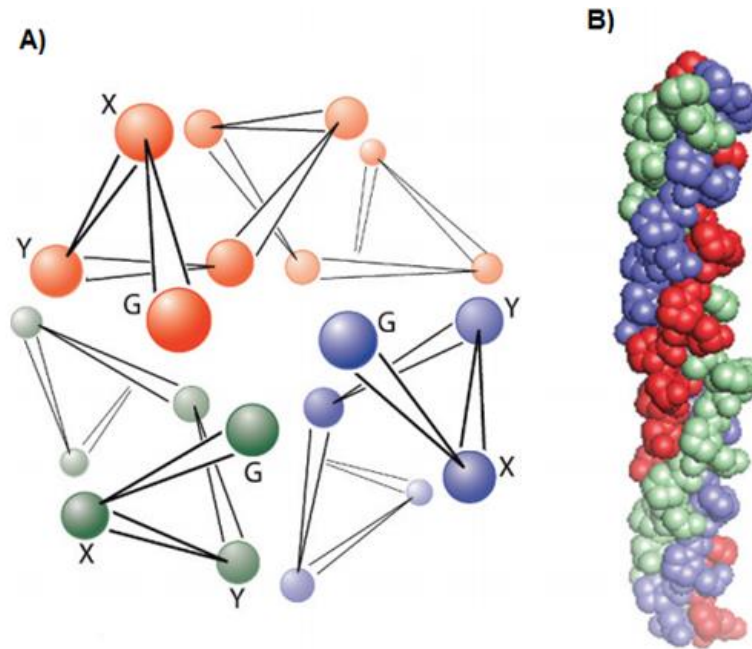
(Hulmes, 2008)

Figura 4. Estructura del colágeno

La matriz rica en proteoglicanos se indica como PG y las interacciones entre moléculas de colágeno se indican como C-L

Estas fibrillas tienen un espesor de 50 a cientos de nanómetros que se ensamblan de manera jerárquica en estructuras macroscópicas (Cowin y Doty, 2007). En el nivel más bajo se encuentran las moléculas de colágeno, las cuales son cadenas de proteínas de triple hélice con una longitud de aproximadamente 300 nm (Cowin y Doty, 2007; Hulmes, 2008). En la Figura 5 se observa la estructura del colágeno, A) es la vista a lo largo del eje molecular (carbonos α únicamente), mostrando las cadenas polipeptídicas individuales; cada una de las cadenas polipeptídicas contiene una o más

regiones caracterizada por repeticiones de aminoácidos (Gly-X-Y), donde X y Y puede ser cualquier aminoácido; B) vista lateral, donde se muestra el giro helicoidal (Hulmes, 2008).



(Hulmes, 2008)

Figura 5. Estructura de triple hélice del colágeno. A) Vista a lo largo del eje molecular; B) Vista lateral de la molécula de colágeno.

A pesar de que el contenido de aminoácidos varía de un tipo de colágeno a otro, siempre se encuentran grandes cantidades de prolina e hidroxiprolina así como también glicina (Gómez-Guillén *et al.*, 2011). Es posible encontrar también aminoácidos polares, el contenido de prolina del tropocolágeno es importante debido a que favorece la formación de hélices en las cadenas individuales de polipéptidos y por lo tanto la estructura de triple hélice de las varillas de tropocolágeno (Clark y Ross-Murphy, 1987).

La fuente de donde proviene, como huesos, cartílagos y piel; la edad del animal y el tipo de colágeno, todos son factores que influyen en las propiedades de las grenetinas; el colágeno nativo insoluble debe ser pre-tratado, antes de convertirse a su forma disponible para extracción, a temperaturas mayores a 45 °C (Gómez-Guillén et al., 2011).

Para la obtención de grenetina, la materia prima de origen animal es sometida a un tratamiento previo, con ácido o álcali, que genera una ruptura parcial de los enlaces. Dependiendo del método de procesamiento se pueden obtener dos tipos de grenetinas, denominadas tipo A (punto isoeléctrico a un pH 8-9) y tipo B (punto isoeléctrico a un pH 4-5) obtenidos por tratamiento ácido y alcalino respectivamente, obteniéndose diferentes grados Bloom, una medida estándar utilizada para indicar la resistencia mecánica de geles en grenetinas (Peng *et al.*, 2008), se lleva a cabo una extracción con agua, entre (50-100°C), produciéndose cadenas menos estructuradas correspondientes a la grenetina. La extracción dependen principalmente de tres factores: temperatura, tiempo y pH (Schrieber y Gareis, 2007).

Las grenetinas difieren de otras proteínas, en que hay una ausencia de orden interno, y en disolución acuosa se obtiene un arreglo aleatorio de sus cadenas polipeptídicas. La característica principal de las grenetinas es su solubilidad en agua y la capacidad de formar geles termorreversibles. En las grenetinas ocurren transiciones (enrollamiento de hélices) que corresponden a transiciones sol –gel (Sobral y Habitante, 2001).

Se han llevado a cabo estudios con las grenetinas obtenidas a partir de la piel de cerdo, como el llevado a cabo por Slade y Levine, (1987), utilizando calorimetría diferencial

de barrido, encontrando que, la temperatura de transición para estas muestras, es arriba de los 200 °C, Pinhas et al. (1996) determinaron la temperatura de transición vítrea de la grenetina (origen no determinado) a 203 °C, Sobral y Habitante, (2001), obtuvieron temperaturas de transición vítrea a 220.2 °C, para grenetinas de piel de cerdo. Mendieta-Taboada *et al.*, (2008) realizaron un estudio de mezclas de grenetinas de piel de cerdo con alcohol de polivinilo, estudiando sus propiedades térmicas mediante calorimetría diferencial de barrido, determinando valores de transición vítrea de 43 y 49 °C. Dentro del grupo de trabajo Gomez Ocampo, (2010) realizó un estudio de las propiedades fisicoquímicas y estructurales de geles de grenetinas nativas y adicionadas con hidrocoloides.

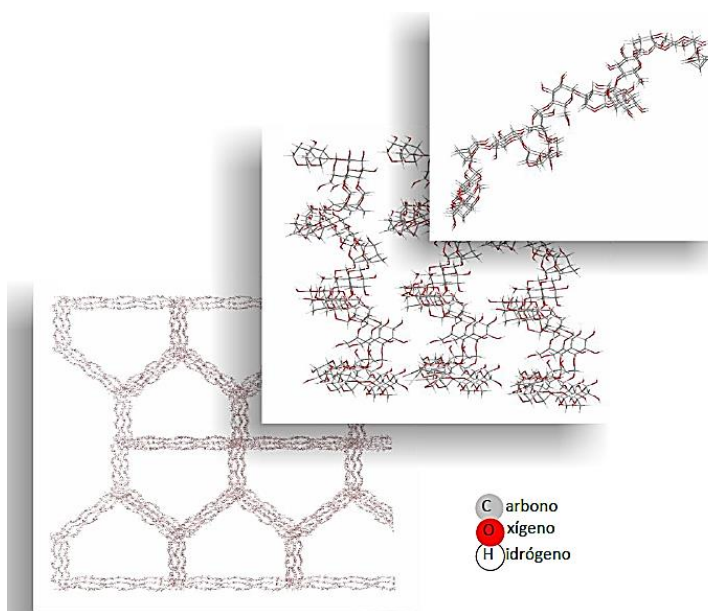
1.5 Geles

Existen varias definiciones de lo que es un gel, Flory (1953) definió un gel como moléculas entrelazadas para formar una red interconectada inmersa en un medio líquido. Hermans (1949) consideró a un gel como un sistema de dos componentes, formado por un sólido disperso o disuelto en una fase líquida, exhibiendo un comportamiento de sólido bajo deformación (Lopes Da Silva y Rao, 1999).

Otra definición indica que un gel puede ser un material blando, sólido y parecido a un sólido, que consiste de dos o más componentes, uno de ellos es un líquido, presente en una cantidad considerable (Ravanagh y Ross-Murphy, 1998).

Los geles son húmedos y suaves, y lucen como un material sólido; sin embargo, son capaces de someterse a una gran deformación en respuesta a cambios ambientales (Kwon *et al.*, 2006). En la Figura 6 se observa la estructura tridimensional de un gel.

Se han realizado diversos estudios en geles a partir de biopolímeros y proteínas, para determinar sus propiedades mecánicas y estructurales, además de sus propiedades físicas, esto último a través de técnicas como calorimetría diferencial de barrido y técnicas fototérmicas. Momoh *et al.*, (2010) realizó un estudio de las propiedades térmicas de geles de mucinas provenientes de caracoles africanos utilizando calorimetría diferencial de barrido, se determinaron las propiedades fisicoquímicas de estas mucinas y se determinó la temperatura de fusión en un rango de 58.58 °C a 61.17 °C y una segunda temperatura de transición de 126.85 °C a 138.39 °C.



(Rosas-Flores *et al.*, 2012)

Figura 6. Esquema de la estructura tridimensional de un gel

Se han realizado diversos estudios de geles de proteínas de soja como el realizado por Renkema y Van Vliet (2002), donde se analizó la formación de geles de soja

inducidos por calor; sin embargo, las propiedades físicas de estos geles se estudiaron mediante determinaciones reológicas.

1.5.1 Proceso de gelificación

La formación de un gel es un proceso que se lleva a cabo, a partir de una simple dispersión de un polímero o partícula en suspensión y controlando las condiciones de temperatura o composición de la solución (Roldan-Vargas *et al.*, 2013).

El proceso de conversión sol-gel generalmente involucra agregación de partículas o macromoléculas, con la eventual generación de una red que abarca el volumen total del contenedor (Banerjee y Bhattacharya, 2012).

La formación de geles se puede clasificar como reacciones de gelificación físicamente inducidas (calor y/o presión) y químicamente inducidas (ácido, iónico y/o enzimático). Las condiciones para la formación de un gel dependen principalmente de algunos factores físico-químicos como la temperatura, presión, fuerza iónica, pH, presencia de enzimas, calidad del disolvente y el grado de polimerización (Renard *et al.*, 2006; Banerjee y Bhattacharya, 2012).

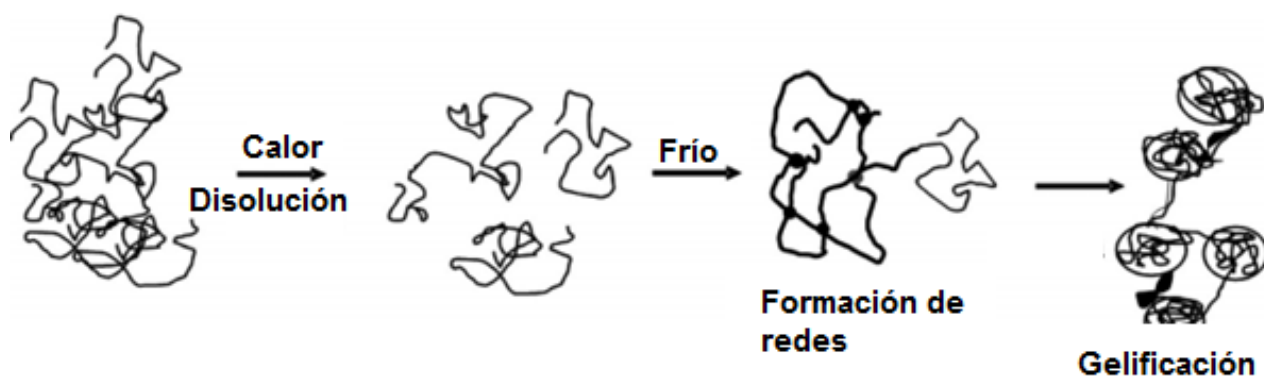
1.5.1.1 Temperatura

La gelificación inducida mediante calor, es probablemente el método más importante y común para la obtención de geles, se da en un proceso de dos etapas, un desdoblamiento o disociación de moléculas debido a la agregación de energía para exponer los sitios activos (Banerjee y Bhattacharya, 2012). La segunda etapa es la asociación y agregación de las moléculas para formar complejos de alto peso molecular. La primera etapa puede ser reversible, la segunda es generalmente un proceso irreversible (Banerjee y Bhattacharya, 2012).

Los puentes disulfuro (S-S) e interacciones hidrofóbicas son de gran importancia en este proceso. La velocidad de reacción global se puede determinar por el desdoblamiento o agregación dependiendo de la relación de las velocidades de reacción en un intervalo de temperatura particular (Banerjee y Bhattacharya, 2012). En la Figura 7 se observa el proceso de gelificación mediante inducción por calor.

1.5.1.2 Presión

Las altas presiones permiten un grado de libertad adicional en la modificación de las propiedades funcionales de las moléculas; las altas presiones se pueden utilizar como un proceso individual o en combinación con otros. En general las altas presiones favorecen las reacciones, que conducen a una reducción del volumen total del sistema. La presión provoca que el agua se disocie y el pH es más ácido bajo presión (Kasapis, 2007; Banerjee y Bhattacharya, 2012).



(Dahan y Sundararajan, 2013)

Figura 7. Proceso de gelificación mediante calor

1.5.1.3 Fuerza iónica

Los cationes monovalentes y divalentes como el sodio y calcio pueden incrementar la fuerza iónica en el gel (Yang *et al.*, 2013). Las fuerzas electrostáticas repulsivas entre las moléculas son reducidas o neutralizadas y por lo tanto la gelificación puede ocurrir (Banerjee y Bhattacharya, 2012; Yang *et al.*, 2013). En la Figura 8 se observa el proceso de gelificación mediante iones.

1.5.1.4 pH

Los cambios en el pH debido a la adición de ácidos o por la fermentación de microorganismos cambian la carga neta de la molécula y por lo tanto alteran las fuerzas de repulsión y atracción entre las moléculas y el disolvente (Renard *et al.*, 2006).

La solubilidad de las sales cambia con el pH lo cual puede contribuir a la formación del gel (Banerjee y Bhattacharya, 2012).



(Renard *et al.*, 2006)

Figura 8. Proceso de gelificación mediante iones

1.5.1.5. Presencia de enzimas

La gelificación inducida mediante enzimas, se basa en la introducción de agentes covalentes artificiales de entrecruzamientos en proteínas de alimentos. Entre las reacciones catalizadas se encuentra la trans-glutaminasa (TG), peroxidasa y polifenol oxidasa, las cuales permiten entrecruzamientos en las proteínas (Banerjee y Bhattacharya, 2012).

1.5.1.6. Grado de polimerización

Si la concentración del polímero se encuentra arriba de la concentración crítica, el efecto de la masa molar es insignificante, pero si la concentración está en el rango de valores de la concentración mínima crítica, mientras mayor sea la masa molar, mayores serán los módulos en el polímero y más rápido será el proceso de gelificación (Banerjee y Bhattacharya, 2012).

Se han llevado a cabo diversos estudios para la inducción de geles, a partir de las metodologías descritas, Renard et al., (2006) llevó a cabo el estudio de la formación de geles de grenetinas, a partir de la inducción con calor y posterior enfriamiento, encontrando que la gelificación se induce por la reformación parcial de las triples hélices encontradas en el colágeno, durante el proceso de enfriamiento; Bhattacharya y Jena, (2007) observaron que la gelificación en proteínas de soya se induce mediante calor y analizaron también la adición de sales de calcio y magnesio que inducen la agregación de estas proteínas; Wang *et al.*, (2007), estudiaron las propiedades térmicas de los geles de aislados de soya inducidos mediante presión y temperatura, utilizando calorimetría diferencial de barrido.

1.5.2 Tipos de geles

1.5.2.1 Geles de proteínas

Existen dos clases principales de geles biopoliméricos, proteínas o polisacáridos. Las proteínas globulares, como la β -lactoglobulina, ovoalbúmina y proteínas de almacenamiento de plantas (soya, chícharo, entre otros), son bien conocidas por su capacidad de formación de geles, estos geles de proteínas globulares son generalmente, geles inducidos por calor (Renard et al., 2006).

La gelificación es una propiedad importante de las proteínas en las aplicaciones en alimentos. El proceso de gelificación mediante calor, involucra un desdoblamiento inicial tras el calentamiento y posteriormente una agregación de las moléculas de proteína (Wang *et al.*, 2015).

Muchos factores influyen en la formación de geles de proteínas, como el peso molecular de las proteínas, concentración de las proteínas, solubilidad, fuerza iónica y pH. Las propiedades de gelificación en las proteínas mediante el calor están fuertemente relacionados a su comportamiento térmico incluyendo principalmente la transición vítrea y la desnaturalización térmica (Renard et al., 2006).

La transición vítrea conduce a un incremento en la movilidad en las moléculas de las proteínas, durante la desnaturalización sucede un proceso de desdoblamiento completo o parcial de las proteínas (Wang et al., 2015).

1.5.2.2 Geles de polisacáridos

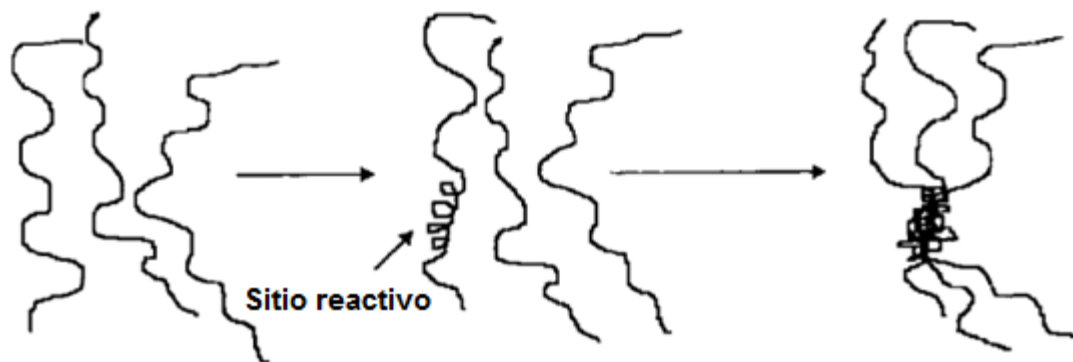
En contraste con los geles de proteínas globulares, la mayoría de los geles de polisacáridos son geles reversibles, inducidos por frío (Renard et al., 2006).

La formación de geles se presenta mediante transiciones de orden-desorden inducidas mediante el enfriamiento, y en este tipo de geles se asume que la gelificación se lleva a cabo en un nivel helicoidal, mediante la asociación de las ramificaciones, el número de ramificaciones tiene un papel importante en la fuerza del gel (Renard et al., 2006).

1.5.2.3 Geles a partir de grenetinas

La grenetina se comporta más como un gel de polisacárido, que como un gel de proteínas globulares, ya que el proceso de gelificación es un proceso termorreversible, que se lleva a cabo por calentamiento y enfriamiento (Mendieta-Taboada et al., 2008).

La grenetina exhibe una transición de desorden-orden después del enfriamiento. La gelificación se da por la reformación parcial de las triples hélices encontradas en el colágeno (Renard et al., 2006). En la Figura 9 se observa el proceso de gelificación en la grenetina.



(Renard et al., 2006)

Figura 9. Proceso de gelificación en grenetina

Se han llevado a cabo diversos estudios con geles a partir de proteínas y polisacáridos; Bajaj y Singhal (2007), estudiaron geles obtenidos a partir de aislados de soya y harina

de garbanzo, utilizando gomas de gelana y alginatos de sodio; Bhattacharya and Jena, (2008), obtuvieron geles a partir de proteína de soya, analizando las interacciones de sus dos componentes principales glicina y β -conglucina, se ha trabajado también con agentes gelificantes como el agar, la celulosa, carragenina, pectina, goma guar, goma de xantana, entre otros.

1.6 Mezclas de geles

Existe un creciente interés en el estudio del comportamiento de mezclas de geles, debido a la variedad de sus propiedades mecánicas y de textura, así como la posibilidad de manipular y cambiar estas propiedades (Walkenström y Hermansson, 1996).

Las mezclas de geles son una combinación de biopolímeros, con inclusión de diferentes solutos. La combinación de agentes gelificantes se usa frecuentemente en la industria alimentaria, ya sea para alcanzar una textura deseable o para llevar a cabo interacciones proteína-polisacárido, mientras se forma el gel (Banerjee y Bhattacharya, 2012). Como resultado de las mezclas de geles, se pueden obtener mezclas de dos componentes, donde uno de los componentes puede modificar las características del segundo componente sin propiciar ninguna interacción entre ellos (Banerjee y Bhattacharya, 2012). En otro tipo de geles, ambos polímeros son capaces de formar geles, produciendo tres tipos, a) los dos polímeros pueden interactuar, únicamente por interacciones mutuas; b) Se puede formar una red con separación de fases, las dispersiones concentradas de las mezclas de biopolímeros podría inducir una separación de fases, esto se observa por un fuerte cambio en el punto de fusión y propiedades elásticas; c) se puede formar una red acoplada a partir de ambos

polímeros, la gelificación se podría llevar a cabo cuando se da una interacción favorable entre las cadenas de los dos biopolímeros, a través de interacciones moleculares (Banerjee y Bhattacharya, 2012).

Los polisacáridos y las proteínas actúan como modificadores de textura y pueden actuar también como modelos de estudio de esta propiedad en los alimentos, además de que, por si mismos, son ingredientes importantes en estos alimentos (Nishinari, 1997). La variedad de comportamientos observados es debida, principalmente a, transiciones de fase, separaciones de fase y por un equilibrio orden-desorden que se lleva a cabo (Cesàro *et al.*, 1999).

Existen diferentes métodos para determinar las propiedades térmicas de alimentos y otros materiales biológicos (Banerjee y Bhattacharya, 2012).

En la Tabla 2 se presentan algunos de los métodos utilizados para llevar a cabo estudios de las características de los geles. La capacidad calorífica puede ser determinada por calorimetría diferencial de barrido, mediante métodos piroeléctricos y métodos fotoacústicos, es posible determinar la difusividad térmica, la efusividad térmica (coeficiente de penetración de calor) y el espectro de absorción óptico en muestras de interés (Szafner *et al.*, 2015).

Se han llevado a cabo estudios de mezclas de geles como el realizado por Lundin *et al.*, (2000), donde se estudiaron separaciones de fases en sistemas de biopolímeros mezclados. Nunes *et al.*, (2006) analizaron el comportamiento reológico y microestructuras de geles elaborados a partir de proteína de chícharo, k-carragenina y almidón.

Los resultados muestran que las condiciones establecidas para la formación del gel, tienen una influencia significativa en el proceso de separación de fases de proteínas de chícharo y k-carragenina y por lo tanto, en la estructura final y las propiedades de textura del gel mixto.

Li et al., (2014), llevaron a cabo estudios con mezclas de aislados de soya y almidón de maíz utilizando calorimetría diferencial de barrido, con contenidos de agua de 30, 50 y 70%, los resultados obtenidos mostraron que la proteína en las mezclas incrementaron su temperatura de fusión y la temperatura de gelatinización del almidón; se observó de igual forma, que el incremento del contenido de agua aumentó los valores de la transición térmica en las mezclas.

Tabla 2. Métodos utilizados para el estudio de las características de geles

Tipo de medición	Instrumento usado	Parámetros de medición
Caracterización estructural	Calorimetría Diferencial de Barrido Difracción de rayos X Colorímetro	Flujo de Calor Análisis del tamaño de partícula Medición del color
Caracterización microscópica	Microscopía de luz Microscopía electrónica de barrido Microscopía electrónica de transmisión Microscopía de fuerza atómica	Disposición estructural de los componentes Distribución estructural de los constituyentes Estructura de las moléculas
Caracterización molecular	Resonancia magnética nuclear Espectroscopia Espectroscopia Raman Resonancia en el Infrarrojo Cercano	Cambios de conformación Estructura molecular Caracterización molecular
Análisis proximal	Horno de vacío Espectroscopia de Absorción Atómica Equipo Kjeldhal Método DNS (Ácido dinitro salisílico)	Humedad Contenido de minerales Proteína Carbohidrato

Tomado de (Banerjee y Bhattacharya, 2012)

1.7 Viscosidad intrínseca

Muchos alimentos contienen biopolímeros de alto peso molecular, tal como las proteínas, pectinas y otros. Regularmente estos contribuyen significativamente a la estructura y viscosidad de alimentos (Rao, 2013). En disoluciones diluidas, las cadenas biopoliméricas son separadas y la viscosidad intrínseca $[\eta]$ de un biopolímero en solución depende únicamente de las dimensiones de las cadenas biopoliméricas. Debido a que la viscosidad intrínseca indica el volumen hidrodinámico de la molécula biopolimérica y está relacionado con el peso molecular y con el radio de giro, refleja características moleculares importantes en un biopolímero (Rao, 2013).

Las concentraciones de los biopolímeros utilizados deben ser tales, que las viscosidades relativas $\eta_r = \frac{\eta}{\eta_s}$ sean aproximadamente 1.2 a 2.0 para asegurar una buena precisión y linealidad de la extrapolación a concentración cero (Wolf, 2007; Rao, 2013). La viscosidad intrínseca se puede determinar a partir de la viscosidad de disoluciones diluidas como el límite de la concentración cero de la viscosidad específica (η_{sp}) dividida por la concentración (C).

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\eta_{sp}}{c} \quad (1)$$

Dónde $\eta_{sp} = \frac{\eta - \eta_s}{\eta_s}$ y η , η_s son las viscosidades de la disolución y el disolvente respectivamente.

Las dos ecuaciones comúnmente usadas para determinar la viscosidad intrínseca son las de Huggins y Kraemer (1987).

$$\frac{\eta_{sp}}{c} = [\eta] + K_1[\eta]^2c \quad (2)$$

$$\ln(\eta_r)/C = [\eta] + K_2[\eta]^2c \quad (3)$$

En la ecuación 3 η_r es la viscosidad relativa. Las ecuaciones 2 y 3 implican que el gráfico de η_{sp}/C contra C y el $\ln(\eta_r)/C$ contra C , daría lugar a líneas rectas; las extrapolaciones se hacen generalmente para los valores de viscosidad relativa entre 1.2 y 2.0 cuando los correspondientes viscosidades específicas están entre 0.2 y 1.0.

La constante de Huggins K_1 es un índice de la interacción biopolímero-biopolímero. Las constantes de Huggins y Kraemer (K_1 y K_2) están teóricamente relacionados por la ecuación 4.

$$K_1 = K_2 + 0.5 \quad (4)$$

La ecuación de Mark–Houwink relaciona la viscosidad intrínseca y el peso molecular promedio (M). Donde K y α son constantes a una temperatura específica para un sistema biopolímero-disolvente determinado.

$$[\eta] = K(M)^\alpha \quad (5)$$

1.8 Calorimetría

El principal objetivo de la calorimetría es la medición del calor, lo cual significa un intercambio de calor. Con el intercambio de calor viene un efecto de cambio de temperatura en un cuerpo, que puede ser utilizado como una medida del intercambio de calor; este proceso crea un flujo de calor, que conduce a diferencias de temperatura a lo largo de su trayectoria (Höhne *et al.*, 2003).

La calorimetría es un método para estudiar las reacciones químicas y muchas transiciones físicas, relacionadas con la generación o consumo de calor (Höhne *et al.*, 2003).

1.8.1 Calorimetría diferencial de barrido

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) por sus siglas en inglés, es una técnica termodinámica, la cual determina la capacidad calorífica de los estados y el exceso de calor asociado con transiciones en materiales que pueden ser inducidos por el cambio de temperatura. La integral del exceso de la capacidad calorífica es la entalpía (Johnson, 2013).

Un calorímetro para análisis térmico diferencial consiste básicamente de dos recipientes calorimétricos de pequeño volumen, en uno de los cuales se sitúa la muestra (líquida o sólida, puede ser compacta, granulosa o polvo) y en el otro la sustancia de referencia (Gill *et al.*, 2010). Se determina constantemente la diferencia de temperatura entre ambos recipientes, para esto se produce una rampa lineal de calentamiento, de esta manera se obtienen termogramas que representan el comportamiento térmico de la muestra en el rango de temperatura de barrido (Zamora Carranza, 1998).

Se puede obtener información de conductividad calorífica y capacidad calorífica que existe entre la muestra y su referencia. Pero sobre todo pone de manifiesto las transiciones de fase que experimenta la muestra (Zamora Carranza, 1998).

La primera Ley de la termodinámica relaciona la energía y el calor

$$dU = dQ - dW \quad (6)$$

Donde U es la energía interna, Q es el calor y W el trabajo. Esta ecuación establece que el cambio en la energía de un sistema es dependiente del calor, que fluye hacia dentro o hacia fuera del sistema y de la cantidad del trabajo que está presente en el sistema o se genera en él. La forma integrada de esta ecuación es.

$$\Delta U = Q - W \quad (7)$$

En condiciones donde no hay trabajo sobre/por el sistema, el cambio en la energía interna es equivalente al flujo de calor en la entrada o salida de éste (Speyer, 1993).

La relación entre el flujo y la temperatura sigue la Ley de Ohm.

$$\frac{dQ}{dt} = k'(T_2 - T_1) \quad (8)$$

Donde el calor fluye en respuesta a un gradiente de temperatura (k') análogo a un flujo de corriente eléctrica (dQ/dt) a través de un resistencia ($1/k'$) como resultado de una diferencia de potencial ($T_2 - T_1$). Se analiza, entonces, a la temperatura como un potencial térmico debido a un flujo de calor y al voltaje como un potencial eléctrico por un flujo de corriente.

A medida que la temperatura aumenta, las diferencias de temperatura entre la muestra y la referencia son medidos de forma continua y calibrados para unidades de potencia (Wen *et al.*, 2012).

1.8.1.1 Funcionamiento

Antes de realizar una determinación, debe calibrarse el calorímetro, utilizando un estándar conocido. El encapsulado de las muestras depende de las condiciones en que se encuentren estas, como se observa en la Tabla 3. Se pesan entre 10 y 12 mg de muestra en una charola, se coloca sobre la celda, se elige una determinada velocidad de calentamiento y un rango de temperaturas (Wen *et al.*, 2012). Se obtiene un termograma, a partir del cual es posible determinar, la desnaturalización de proteínas, capacidad calorífica, transiciones de fase, entalpía, por mencionar algunos.

Tabla 3. Condiciones para seleccionar el método de encapsulado

Tipo de muestra	Medición	Tipo de charola
Sólido (no volátil)	Tg o Tm	No hermética
	Estabilidad oxidativa	Hermética
Sólido (volátil)	Cp	Abierta
	Cp	Hermética
Líquido	Cristalización	Hermética
	Tg , Tm, Cp, Oxidación	Abierta
Solución acuosa	Cp, Tm, Tg	Hermética

Tg = temperaturas de transición vítrea; Tm = temperatura de fusión; Cp = capacidad calorífica

En la Figura 10 se observa un termograma obtenido por calorimetría diferencial de barrido. La integral de la señal de flujo de calor proporciona información cuantitativa de la entalpía de transición, pudiendo analizar también el calor de fusión, porcentaje de cristalinidad, calor de cristalización y calores de reacción. El software del equipo (TA Instruments Universal Analysis 2000) brinda información acerca del orden de reacción, energía de activación y velocidades de reacción.

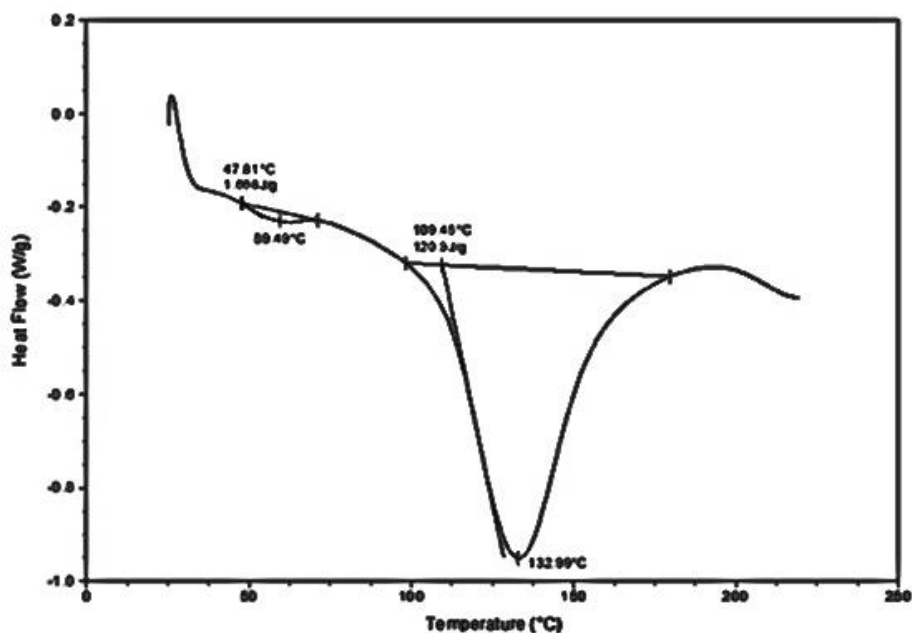


Figura 10. Termograma obtenido por calorimetría diferencial de barrido

Se han realizado diversos estudios mediante calorimetría diferencial de barrido, como el realizado por Colombo *et al.*, (2010) para determinar transiciones térmicas en proteínas del cacahuate, Momoh *et al.*, (2010) analizaron las transiciones térmicas en mucinas de caracol, Iijima *et al.*, (2014) realizaron estudios de mezclas de geles binarios de kapa-carragenina y metilcelulosa.

1.9 Técnicas fototérmicas

Las técnicas fototérmicas implican la generación de ondas acústicas o algún otro efecto termoelástico por algún tipo de energía incidente, como radiación electromagnética, rayos X, electrones, protones, ultrasonido, entre otras (Vargas y Miranda, 1988; Rodríguez y González, 2003).

El efecto fotoacústico fue descubierto en 1880 por Alexander Graham Bell (Tam, 1986). Este efecto se presenta cuando una muestra en una celda cerrada con un gas, es iluminada con luz modulada, cualquier energía absorbida por la muestra es convertida total o parcialmente en energía cinética, aumentando así su temperatura, provocando un flujo de calor hacia el gas contenido en la celda, con la consecuente elevación periódica de la temperatura de este gas, provocando así, fluctuaciones de presión en el gas dentro de la celda, estas fluctuaciones pueden ser detectadas por dispositivos de detección acústica (Tomas *et al.*, 1998).

Se han realizado algunos estudios para la determinación de difusividad térmica en biopolímeros, como el realizado por Rodríguez y González, (2003), donde determinaron la difusividad térmica de la amilosa, amilopectina y almidón, utilizando una celda fotoacústica, obteniéndose los valores de $1.32 \times 10^{-7} \text{ m}^2/\text{s}$, $1.53 \times 10^{-7} \text{ m}^2/\text{s}$

y $2.0 \times 10^{-7} \text{ m}^2/\text{s}$ respectivamente, observando que el compuesto con más cadenas ramificadas es el que presenta la mayor difusividad térmica.

1.9.1 Espectroscopia fotoacústica

En la espectroscopía fotoacústica la amplitud de señal fotoacústica se determina en función de la longitud de onda de excitación óptica, produciendo un espectro fotoacústico (Tam, 1986).

Debido a que las variaciones de temperatura en la muestra dependen de sus propiedades térmicas y ópticas, se pueden realizar estudios de los parámetros que la caracterizan como la difusividad térmica, el calor específico, el coeficiente de absorción óptico, entre otros (Vargas y Miranda, 1988).

De acuerdo al principio de la conservación de la energía aplicado a la normalización de la reflexión (R), absorción (A) y transmisión (T) de luz incidente sobre la superficie de un material ($R + A + T=1$) y considerando que la señal fotoacústica es debido a la absorción de la luz incidente ($1 - R$) en la superficie del material, se puede establecer que la señal fotoacústica es inversa a la reflectancia para materiales ópticamente opacos (Conde-Gallardo *et al.*, 2004).

La determinación de la difusividad térmica ϵ se puede realizar a partir del modelo teórico de Rosencwaig y Gersho, el cual considera a la difusión del calor generado en la muestra hacia el gas en el interior de la celda como principal mecanismo de la señal fotoacústica (Rosencwaig y Gersho, 1976). Ellos formularon un modelo de flujo de calor unidimensional en una celda como resultado de la energía de luz absorbida. La capa de aire en el interior de la celda sufre un calentamiento y un enfriamiento alternado y funciona como un pistón vibratorio, el cual genera la señal fotoacústica detectada.

Considerando una celda cilíndrica como se muestra en la Figura 11, esta tiene un diámetro D , una longitud L , la muestra la consideraron en forma de disco con un espesor l . La parte frontal de la muestra está expuesta al gas de la celda y la superficie trasera se encuentra en contacto con una base de baja conductividad térmica y de espesor l_b , la longitud de la columna de gas l_g en la celda, está dada por $l_g = L - l - l_b$ se consideró que el gas y el material de respaldo no absorben luz.

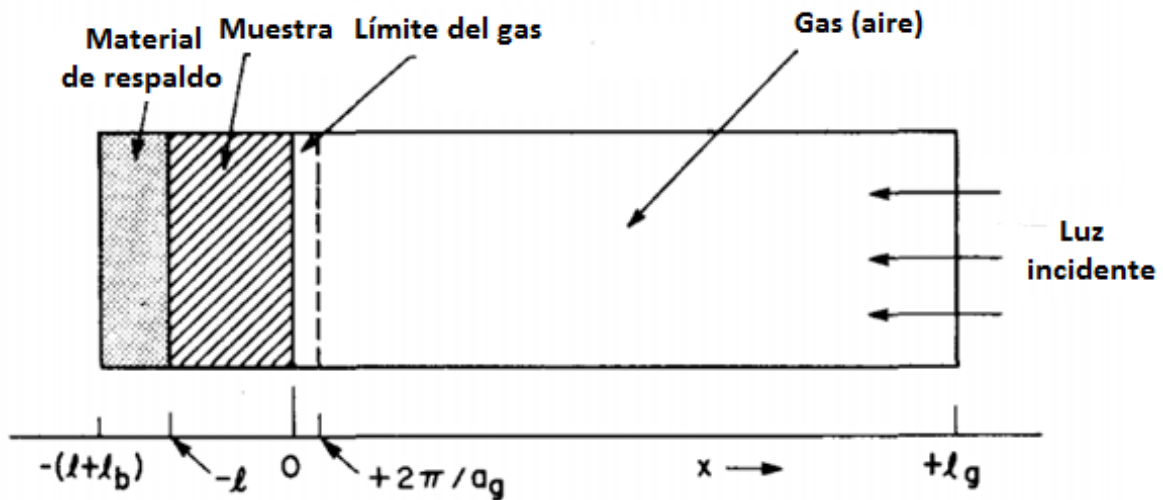


Figura 11. Diseño de Celda fotoacústica

Definiendo los siguientes parámetros:

κ_i , conductividad térmica del material i [$W/(cm \text{ } ^\circ C)$]; ρ_i , densidad del material i (g/cm^3);
 c_i , calor específico del material i [$J/(g \text{ } ^\circ C)$]; $\alpha_i = [\kappa_i/(\rho_i c_i)]$, difusividad térmica del material i (cm^2/s); $a_i = (\omega/2\alpha_i)^{1/2}$, coeficiente de difusión térmica del material i (cm^{-1});
 $\sigma_i = (1 + j)a_i$, coeficiente complejo de difusión térmica del material i (cm^{-1}); $\mu_i = 1/a_i$ longitud de difusión térmica del material i (cm); β_i , coeficiente de absorción óptico (cm^{-1}); $l_{\beta i}$ =longitud de penetración óptica (cm), s=muestra; g, gas; b=material de respaldo; $\omega = 2\pi f$, frecuencia de modulación en rad/s y $j = \sqrt{-1}$.

Una fuente de luz monocromática con una longitud de onda λ sinusoidalmente modulada incide sobre una muestra con una intensidad dada por la Ecuación 9.

$$I = \frac{1}{2} I_0 (1 + \cos \omega t) \quad (9)$$

Donde I_0 es la intensidad de la luz monocromática incidente (W/m^2), β coeficiente de absorción óptico de la muestra en (m^{-1}) y es función de la longitud de onda λ de la luz incidente. La temperatura en la superficie de la muestra en contacto con la capa de gas está dada por la Ecuación 10 (Rosencwaig y Gersho, 1976).

$$\theta = \frac{\beta I_0}{2\kappa_s(\beta^2 - \sigma^2)} \left(\frac{(r-1)(b+1)e^{\sigma_s l} - (r+1)(b-1)e^{-\sigma_s l} + 2(b-r)e^{-\beta l}}{(g+1)(b+1)e^{\sigma_s l} - (g-1)(b-1)e^{-\sigma_s l}} \right) \quad (10)$$

Donde:

$$b = \frac{\kappa_b \alpha_b}{\kappa_s \alpha_s} \quad (11)$$

$$g = \frac{\kappa_g \alpha_g}{\kappa_s \alpha_s} \quad (12)$$

$$r = (1 - j) \frac{\beta}{2a_s} \quad (13)$$

$$\sigma_s = (1 + j)a_s \quad (14)$$

Si se asume el problema de difusión de calor unidimensional con una fuente de radiación modulada periódica y considerando que la muestra se encuentra en un régimen térmicamente delgado, la señal fotoacústica en el modelo de Rosencwaig-Gersho, se puede reducir a la Ecuación 15 (Balderas-López *et al.*, 1999).

$$SF = \frac{Y}{\sqrt{2} a_g a_s} \frac{1}{\sqrt{b^2 + 2bx + 2x^2}} \quad (15)$$

Donde:

Y es un coeficiente independiente de la frecuencia de modulación de la luz; $a_i = [\pi f / (\alpha_i)]^{1/2}$; $i=g, s$, es el coeficiente de difusión térmico del medio i ; α_i = difusividad térmica del medio i ; $b = e_b/e_s$ es la relación de efusividades térmicas entre el material de respaldo (b) y la muestra (s), $x = (f/f_c)^{1/2}$ donde f y f_c es la frecuencia de modulación de la luz y la frecuencia de corte, $f_c = \alpha_i/(\pi l_s^2)$, donde l_s es el espesor de la muestra.

Si se considera que el material de respaldo es aire y despreciando la razón de efusividad térmica correspondiente $b = g = e_g/e_s$ (e_g es la efusividad térmica del aire), la Ecuación 15 se reduce a la Ecuación 16.

$$SF_A = \frac{Y}{2a_g a_s} \frac{1}{x} \quad (16)$$

Considerando que $a_i = [\pi f / (\alpha_i)]^{1/2}$ y $x = (f/f_c)^{1/2}$ la ecuación 16 indica que la señal fotoacústica se comportaría como $f^{-3/2}$ con la frecuencia de modulación de la luz incidente como se observa en la Figura 12.

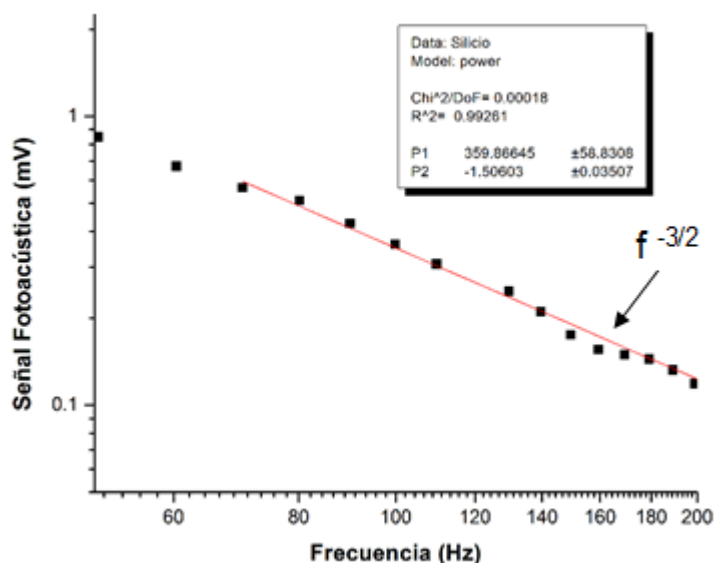


Figura 12. Señal fotoacústica en función de la frecuencia de modulación para el silicio

Si se toma la razón $R = SF / SF_A$ se obtiene la Ecuación 17

$$R = \frac{1}{\sqrt{1 + 2\left(\frac{b}{2x}\right) + 2\left(\frac{b}{2x}\right)^2}} \quad (17)$$

En la Ecuación 17 se puede observar que la relación de efusividades térmicas b , se puede obtener como un parámetro de ajuste a partir de los datos experimentales, como se observa en la Figura 13, donde se grafica la razón de las señales fotoacústicas (R) para el agua destilada y la muestra de referencia, en este caso el silicio.

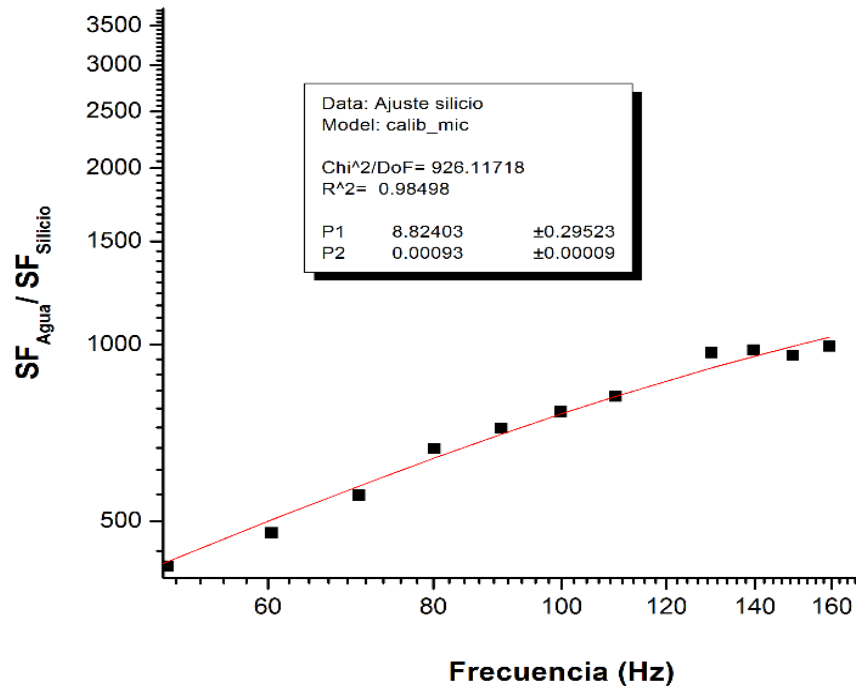


Figura 13. Relación de amplitud R para el agua destilada y la muestra de referencia

Los datos experimentales se representan por ■ y la línea continua representa el mejor ajuste de la ecuación 17 a los datos experimentales.

El valor del parámetro de ajuste (P_2) obtenido en el gráfico de la razón de las señales fotoacústicas, Figura 13, es proporcional a b en la Ecuación 17. A partir del valor conocido de la efusividad del silicio es posible calcular la efusividad de las muestras.

Se han llevado a cabo pocos estudios de espectroscopía fotoacústica en sistemas biológicos, Del Monte y Levy, (1999) estudiaron el comportamiento fotofísico de un colorante orgánico (HITC) incorporado con gel de sílice, para lo cual utilizaron técnicas de espectroscopía infrarroja (FTIR) y espectroscopía ultravioleta-visible-infrarrojo cercano, donde observaron una fuerte absorción en la banda de 660 nm, atribuida a la dimerización o agregación en los sistemas.

Dentro del grupo de trabajo, Delgado Reyes, (2013) llevó a cabo el estudio de las propiedades ópticas de geles de mucinas, utilizando espectroscopía fotoacústica, donde se determinó que la mucina de estómago de cerdo tiene una banda de absorción óptica, en un intervalo de longitud de onda de 400 – 450 nm.

II JUSTIFICACIÓN

2. JUSTIFICACIÓN

Las mucinas son glicoproteínas con alto peso molecular, fuertemente glicosiladas y en conjunto con el agua, sales y lípidos constituyen las secreciones mucosas que cubren ciertas superficies del cuerpo. Las mucosas exhiben una tendencia a formar geles, característica atribuida principalmente a la presencia de las glicoproteínas (mucinas). Por otra parte, se ha observado que las mezclas de mucosas y biopolímeros, entre ellos las proteínas, exhiben una mayor resistencia, teniendo implicaciones físicas importantes como la mejora en la textura y estabilidad. Entre las proteínas usadas para mejorar estas características, se encuentran la grenetina y la soya. La grenetina es un polipéptido derivado de la degradación parcial del colágeno, el principal componente del tejido conectivo animal. Las proteínas de soya son conocidas por su valor nutricional, propiedades funcionales y alta capacidad de retención de agua. Las mezclas binarias de geles son importantes debido a la característica que tienen de mejorar la estabilidad y estructura en ciertos sistemas en los que están contenidos, por lo que es importante llevar a cabo el estudio de mezclas de mucinas-proteínas por técnicas calorimétricas y fototérmicas, que permitan caracterizar las propiedades físicas de estos geles.

III HIPÓTESIS

3. HIPÓTESIS DE TRABAJO

La incorporación de proteínas animales y vegetales a geles conteniendo mucina cruda y purificada permitirá mantener una estabilidad que deberá reflejarse en las propiedades térmicas de los geles.

La composición de los geles de mucina incorporados con proteínas, determinará los cambios en las propiedades térmicas y ópticas de las muestras.

IV OBJETIVOS

4. OBJETIVO GENERAL

Realizar la caracterización de geles binarios de mucina-grenetina y mucina-hidrolizados de proteína de soya a través de calorimetría y espectroscopía fotoacústica.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtención de geles de mucina cruda y purificada.
2. Determinación de transiciones primarias y secundarias en el comportamiento térmico de geles y obtención de parámetros térmicos.
3. Evaluación del efecto de la adición de grenetina e hidrolizados de proteínas de soya en el comportamiento calorimétrico diferencial de barrido de los geles de mucina.
4. Caracterización de los sistemas binarios mediante espectroscopia fotoacústica y determinación de la efusividad térmica de estos sistemas.

V MATERIALES Y MÉTODOS

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Materiales

Para el desarrollo de este proyecto se utilizaron los siguientes materiales:

Se utilizó mucina de estómago de cerdo tipo II (≤ 1.2 % de ácido siálico), mucina de estómago de cerdo tipo III parcialmente purificada (0.5 – 1.5 % de ácido siálico) ambas adquiridas de Sigma Aldrich (México). Proteínas de soya: aislado de soya (90 % proteína en base seca), concentrado de soya (67 % proteína en base seca) y harina de soya (53 % proteína en base seca), el aislado y concentrado de soya fueron donados por Danisco (México) perteneciente a DUPONT (EUA), la harina de soya fue adquirida de Sigma Aldrich (México) y grenetinas de piel de res donadas por la empresa Gelita-México con diferentes grados Bloom, (una medida industrial estándar utilizada para indicar la resistencia mecánica de geles con gelatinas) (Peng et al., 2008), GR1: P120001 (Bloom 200), GR2: P150010 (Bloom 225) y GR3: P1500033 (Bloom 180).

5.2 Estrategia Experimental

El desarrollo de este proyecto se llevó a cabo en cuatro etapas como se muestra en la Figura 14. En la primera etapa se realizó la determinación del peso molecular de mucina cruda y purificada, la determinación de parámetros térmicos como las temperaturas de transición, cambios de entalpía (ΔH) y capacidad calorífica (C_p) de los materiales utilizados (hidrolizados de soya, grenetinas de res y mucinas) en polvo. En la segunda etapa se determinaron los parámetros térmicos (temperaturas de fusión, cambios de entalpía y capacidad calorífica) en mezclas 1:1 de mucinas-proteínas en polvo y se obtuvieron geles de mucina cruda y purificada así como sus respectivos

parámetros térmicos (temperaturas de fusión, cambios de entalpía y capacidad calorífica). En la tercera etapa se adicionaron proteínas de soya y proteínas de res (grenetina de res) a la mucina cruda o purificada y se realizó la determinación de los parámetros térmicos de geles. En la cuarta etapa se realizaron estudios ópticos (determinación del espectro de absorción óptico) de geles de mucinas incorporados con proteínas, y se realizó la determinación de parámetros térmicos como temperaturas de transición, cambios de entalpía (ΔH), capacidad calorífica (C_p) y la determinación de la efusividad térmica de las muestras.

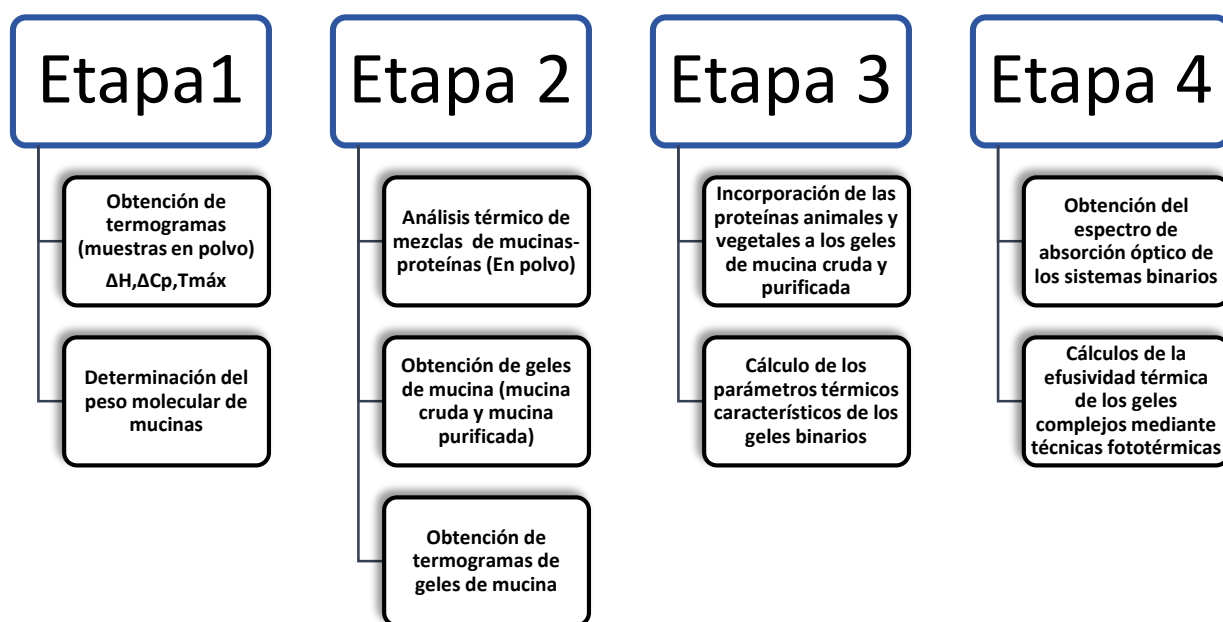


Figura 14. Estrategia experimental

5.3 Métodos

5.3.1 Preparación de las mezclas

Las muestras de mucinas cruda y purificada, así como las grenetinas de piel de res se homogeneizaron con ayuda de un homogenizador IKA A 10 Labortechnik (20 000 rpm) durante 5 min, posteriormente se prepararon mezclas de mucina cruda-proteínas y mucina-purificada proteínas en relación 1:1, para lo cual se utilizó una balanza analítica OHAUS modelo AP-210-0 para el pesado y el homogenizador IKA A 10, durante 5 min. Las muestras obtenidas se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Mezclas de mucinas-proteínas en polvo

<u>Mezclas mucina cruda/proteínas</u>	<u>Mezclas mucina purificada/proteínas</u>
MC-A soya	MP-A soya
MC-C soya	MP-C soya
MC-H soya	MP-H soya
MC-GR1	MP-GR1
MC-GR2	MP-GR2
MC-GR3	MP-GR3

MC=mucina cruda; MP=mucina purificada; GR1=grenetina de res Bloom 200; GR2=grenetina de res Bloom 225; GR3=grenetina de res Bloom 180; A = aislado; C = concentrado; H = harina.

A las mezclas obtenidas se les caracterizó mediante un calorímetro diferencial de barrido y se obtuvieron los termogramas correspondientes a partir de los cuales se procedió a calcular los parámetros térmicos, como son, la Temperatura máxima T_m ($^{\circ}\text{C}$), entalpía ΔH (en J/g) y capacidad calorífica C_p ($\text{J/g}^{\circ}\text{C}$). El software utilizado fue TA Instruments Universal Analysis 2000, la entalpía se calculó a partir de las áreas bajo las curvas. Se realizaron determinaciones por duplicado.

5.3.2 Obtención de geles de mucina cruda y purificada

Para la obtención de geles de mucina cruda y purificada se siguió el siguiente procedimiento realizado por Delgado Reyes (2013).

Se dispersó la mucina (cruda o purificada) en agua destilada, se utilizó una parrilla eléctrica con agitación magnética (IKA RCT basic safety, modelo 3810001) a una temperatura de 50 °C por 5 min. Se dejó enfriar a 25 °C y se ajustó el pH a 2 utilizando ácido clorhídrico 0.1M el pH se determinó con un potenciómetro VWR Scientific modelo 2000. Una vez obtenidas las muestras se realizaron las determinaciones térmicas mediante un calorímetro diferencial de barrido, se utilizó una rampa de 15 °C/min, en un rango de 25 – 260 °C bajo una atmósfera inerte de N₂ (50 mL/min).

5.3.3 Incorporación de las proteínas animales o vegetales a geles de mucina cruda o purificada

Para la incorporación de aislados, concentrados o harinas de soya y grenetinas de piel de res a las mucinas (cruda o purificada), se prepararon disoluciones individuales de cada componente, mucinas y proteínas, a continuación se mezclaron en proporción 1:1, una vez obtenida la mezcla se homogeneizó con ayuda de una parrilla magnética (IKA RCT basic safety, modelo 3810001), una vez homogeneizada se sometió a Baño María durante 60 min, a 85 °C, las muestras obtenidas se dejaron enfriar y se mantuvieron en refrigeración por 24 horas.

La preparación de los componentes individuales de proteínas se detalla a continuación.

5.3.4 Obtención de geles de soya y grenetina de res

5.3.4.1 Aislado de soya

Para la preparación de geles de aislado de soya se siguió el siguiente procedimiento descrito por Kangii et al., (1991) y por Liu y Hsieh, (2007).

Se prepararon disoluciones al 20% de concentración, en agua destilada, se mezclaron con ayuda de un mezclador (Nutribullet ™ Modelo NB-101B, México) con potencia de 600 Watts, durante 3 min, posteriormente se centrifugó a 700 Xg durante 10 min a temperatura ambiente. La formación de geles se indujo mediante calor, para lo cual se pueden utilizar dos métodos, a) calentamiento con una parrilla eléctrica con agitación magnética (IKA RCT basic safety, modelo 3810001), durante 30 min a 85 °C. b) calentamiento en Baño María durante 60 min a 85 °C. Para la preparación de las muestras se utilizó el segundo procedimiento. Las muestras se colocaron en refrigeración por 24 horas para su posterior análisis.

5.3.4.2 Concentrado de soya

Para la preparación de geles de concentrado de soya se siguió el siguiente procedimiento descrito por Kangii et al., (1991); Liu y Hsieh, (2007).

El concentrado se pasó por una malla No. 170 (90 µm o 0.0035 pulgadas) con el objetivo de trabajar con una muestra de tamaño de partícula similar, se prepararon disoluciones al 15% de concentración con agua destilada, se mezclaron con ayuda de un mezclador (Nutribullet ™ Modelo NB-101B, México) con potencia de 600 Watts, durante 3 min. La formación de geles se indujo mediante calor para lo cual se pueden utilizar dos métodos a) calentamiento con una parrilla eléctrica con agitación magnética (IKA RCT basic safety, modelo 3810001), durante 30 min a 85 °C. b) calentamiento en

Baño María durante 60 min a 85 °C. Para la preparación de las muestras se utilizó el segundo procedimiento. Las muestras se colocaron en refrigeración por 24 horas para su posterior estudio.

5.3.4.3 Harina de soya

Para la obtención de geles de harina de soya se siguió el siguiente procedimiento. Se prepararon soluciones al 20% de concentración con agua destilada, se mezclaron con ayuda de un mezclador (Nutribullet ™ Modelo NB-101B, México) con potencia de 600 Watts, durante 3 min. La formación de geles se indujo mediante calor para lo cual se pueden utilizar dos métodos a) calentamiento con una parrilla eléctrica con agitación magnética (IKA RCT basic safety, modelo 3810001), durante 30 min a 85 °C. b) calentamiento en Baño María durante 60 min a 85 °C. Para la preparación de las muestras se utilizó el segundo procedimiento. Las muestras se colocaron en refrigeración por 24 horas para su posterior estudio.

5.3.4.4 Grenetina de piel de res

Para la obtención de geles de grenetina de piel de res se llevó a cabo el procedimiento descrito por Gómez Ocampo., *et al* (2010).

Se prepararon disoluciones al 6.67% de concentración con agua destilada. La formación de geles se indujo mediante calor, para lo cual se utilizó una parrilla eléctrica con agitación magnética (IKA RCT basic safety, modelo 3810001), durante 15 min, entre 60 y 65 °C, las muestras se colocaron en refrigeración por 24 horas para su posterior estudio.

A los geles de mucina cruda o purificada incorporados con aislados, concentrados, harinas de soya o grenetinas de res, se les determinó el espectro de absorción óptico y la efusividad térmica mediante técnicas fotoacústicas.

Para el análisis térmico de las muestras por calorimetría diferencial de barrido se realizó primeramente, una mezcla en relación (1:1) de los componentes en polvo, posteriormente se disolvieron las mezclas en 70% de agua, y finalmente se aplicó calor por calentamiento en Baño María durante 60 min a 85 °C.

5.3.3.5 Determinación de humedad de los geles obtenidos.

Una vez obtenidos los geles de mucinas-proteínas para su análisis en el calorímetro diferencial de barrido, se les determinó la humedad mediante un Analizador de Humedad (KERN MLB 50-3, E.U.A) se pesó aproximadamente 1 g de muestra, la cual se esparció uniformemente a través del contenedor de muestras, la determinación de humedad se realizó en (%), a partir de la pérdida de peso en relación al valor final, para lo cual se utilizó la siguiente ecuación:

$$H (\%) = \frac{\text{perdida de peso}}{\text{peso inicial}} \times 100 \quad (18)$$

5.3.5 Determinación del peso molecular de mucinas

Se realizó la determinación del peso molecular de mucina cruda y mucina purificada de estómago de cerdo utilizando la ecuación de Mark-Houwink $[\eta] = k(M)^\alpha$ que relaciona la viscosidad intrínseca (η) y el peso molecular promedio (M) de biopolímeros en disolución. Las constantes k y α fueron obtenidas de estudios realizados por Jumel *et al*, (1997) en mucinas de estómago de cerdo.

Se prepararon disoluciones de mucinas en agua destilada y azida de sodio (0.001 g/mL-0.019 g/mL) , mediante un viscosímetro tipo Ubbelohde (flujo de 6-30 mm²/s) se obtuvo el tiempo de flujo, determinando el tiempo en que tarda el fluido en pasar de la marca A la marca B, como se muestra en la Figura 15. Las mediciones se realizaron a 25 °C.

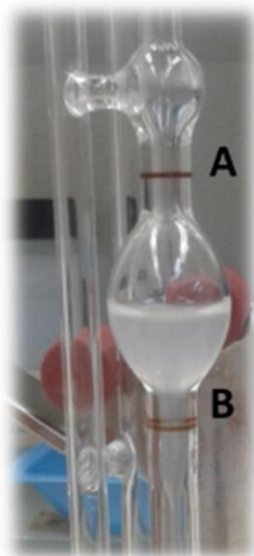


Figura 15. Viscosímetro tipo Ubbelohde

La densidad de las disoluciones fueron determinadas utilizando el equipo Analite surface tension meter (modelo 2141, USA).

La viscosidad relativa se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\eta_r = \frac{\eta}{\eta_s} = \frac{t_1 d_1}{t_2 d_2} \quad (19)$$

Dónde:

η_r , viscosidad relativa; η , viscosidad de la mucina en disolución (Pa s); η_s , viscosidad del disolvente (Pa s); t_1 , tiempo que tarda la muestra en el disolvente, en fluir en el viscosímetro (s); t_2 , tiempo que tarda el disolvente en fluir en el viscosímetro (s); d_1 , densidad de la disolución (g/mL); d_2 , densidad del disolvente [agua destilada conteniendo 0.2 M de NaCl y 0.02 % (p/v) de azida de sodio NaN_3 , g/mL].

Los valores de viscosidad relativa se convirtieron a viscosidad específica η_{sp} utilizando la siguiente ecuación (Kar y Arslan, 1999):

$$\eta_{sp} = \frac{\eta - \eta_s}{\eta_s} = \eta_r - 1 \quad (20)$$

La viscosidad reducida (η_{sp}/C), idealmente debería ser independientes de la concentración, y se convierte así en el límite de concentración cero (Kar y Arslan, 1999).

La viscosidad intrínseca se define como el límite de la viscosidad reducida cuando la concentración se aproxima a cero. El principal método para determinar la magnitud de la viscosidad intrínseca, es extrapolar la viscosidad reducida a su valor en la concentración de soluto cero, como se indicó en la ecuación 1.

$$\eta_i = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\eta_{sp}}{C} \quad (21)$$

Donde:

C, concentración de la mucina en solución (kg/m^3); η_{sp} , viscosidad específica; η_i , viscosidad reducida (m^3/Kg).

En la Figura 16 se muestra la determinación de la viscosidad intrínseca, mediante la extrapolación hacia la concentración cero de la viscosidad específica dividida por la concentración.

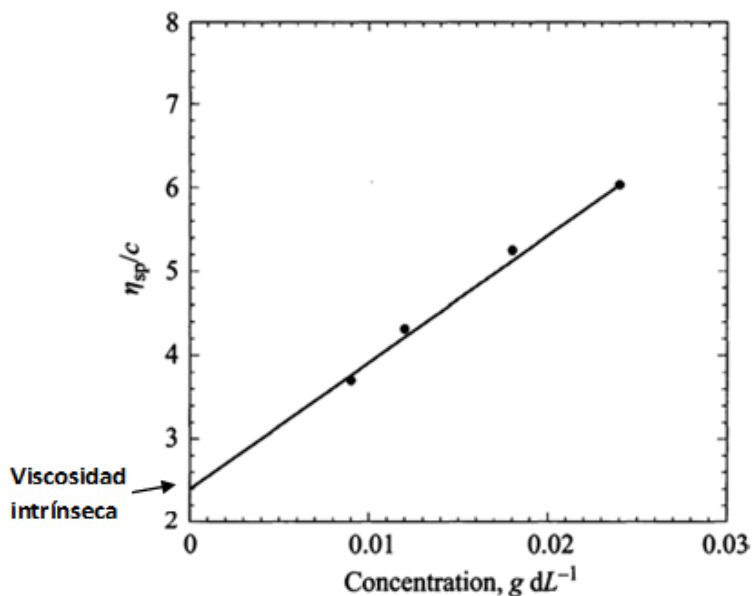


Figura 16. Determinación gráfica de la viscosidad intrínseca

5.3.6 Calorimetría diferencial de barrido

Para la obtención de termogramas se utilizó un calorímetro diferencial de barrido, (marca TA Instruments modelo 2010, EUA), como el que se muestra en la Figura 17.

El método consiste en proporcionar un flujo de calor ($^{\circ}\text{C}/\text{min}$) a la muestra y a un material de referencia. La muestra se coloca en cápsulas de aluminio cerradas herméticamente, para impedir cambios de humedad. El equipo registra el flujo de calor que se suministra a la muestra y a la referencia para mantenerlas a la misma temperatura. De esta manera se obtienen termogramas que representan el comportamiento térmico de la muestra en el rango de temperatura de barrido.

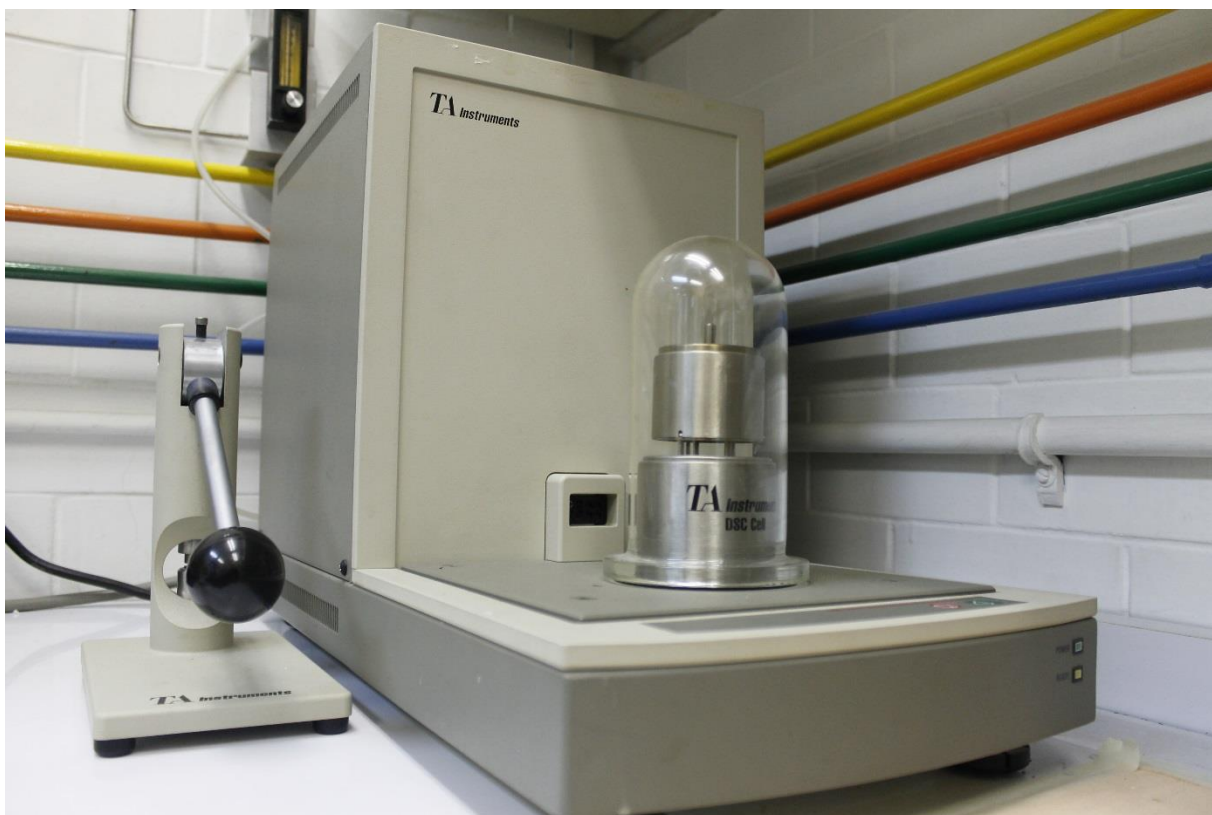


Figura 17. Calorímetro Diferencial de Barrido (TA Instruments 2010)

Las muestras se colocaron en cápsulas de aluminio selladas herméticamente (8-12 mg), se utilizó una rampa de 5 °C/min, para el caso de las muestras en polvo y una rampa de 10 °C/min para las muestras en disolución, se trabajó en un rango de 25 – 250 °C bajo una atmósfera inerte de N₂ (50 mL/min).

Generalmente se utilizan cápsulas de aluminio al menos que el material de la muestra reaccione con el aluminio o que la temperatura esperada vaya más allá de lo soportado por las cápsulas. Una vez preparada la muestra se colocó en la celda del calorímetro diferencial de barrido y se colocó una cápsula de referencia (cápsula vacía), como se muestra en la Figura 18. Se realizó la calibración del sistema, mediante un estándar

conocido, se utilizó Indio, cuya temperatura de fusión es 156.60 °C y su entalpía de 28.45 J/g (Speyer, 1993).

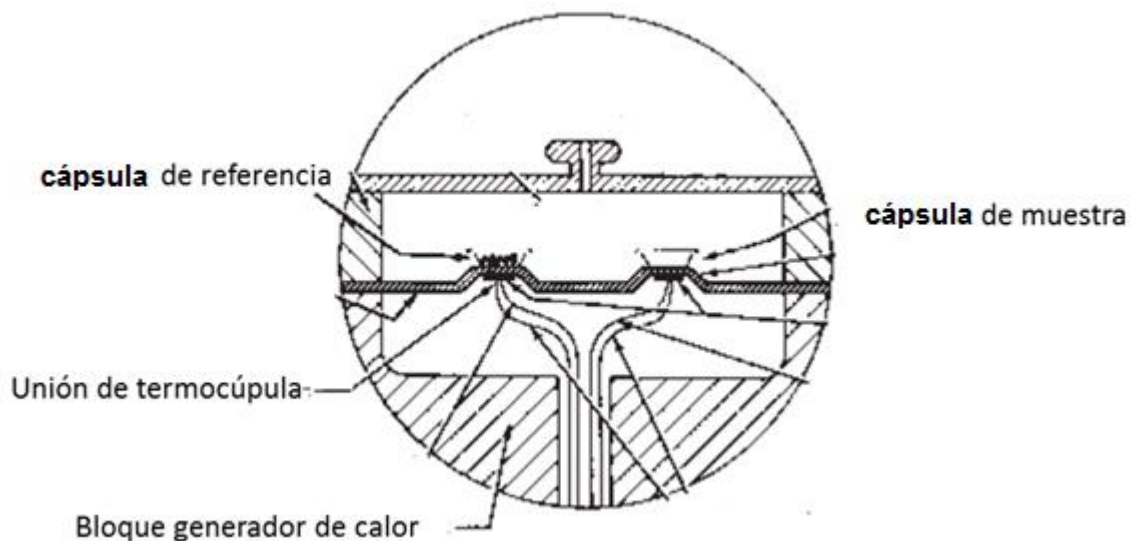


Figura 18. Celda utilizada en el calorímetro diferencial de barrido

Para iniciar el experimento se introdujeron los parámetros de medición, rampa de flujo de calor, peso de la muestra, límite de temperatura, entre otros.

Una vez obtenidos los termogramas se procedió a calcular los parámetros térmicos, Temperatura máxima T_m (°C), entalpía ΔH (en J/g) y capacidad calorífica C_p (J/g°C).

El software utilizado fue TA Instruments Universal Analysis 2000, la entalpía se calculó a partir de las áreas bajo los picos. Se realizaron análisis por duplicado.

5.3.7 Obtención del espectro de absorción óptico de los sistemas binarios mucinas-proteínas

La preparación de las muestras se ha indicado previamente en el apartado 5.3.3. El montaje experimental consiste de una lámpara de xenón Oriel de 1000 Watts, un

monocromador Oriel-77250, un modulador de luz mecánico (chopper), de frecuencia variable, ajustado a 17 Hz y una celda fotoacústica de latón (6 mm de diámetro y 3 mm de altura) equipada con un micrófono, fibra óptica, un amplificador “lock-in” modelo 5210 y una computadora para la adquisición automatizada de datos. La parte inferior y superior de la celda están cerradas herméticamente por ventanas de cuarzo, a través de las cuales la luz modulada entra a la celda fotoacústica.

En la Figura 19, se observa el equipo utilizado para llevar a cabo la obtención del espectro de absorción óptico de los sistemas binarios.

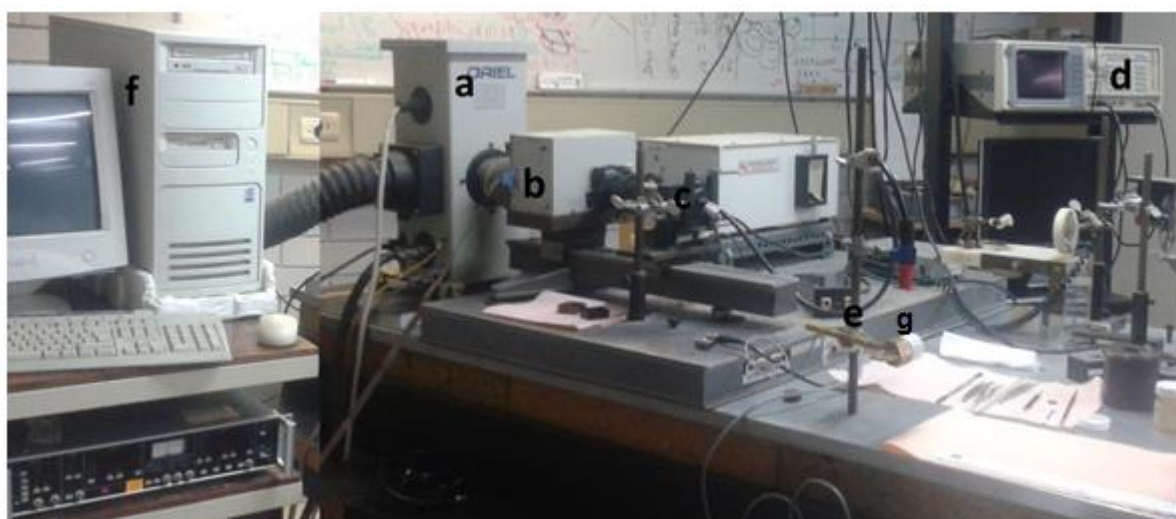


Figura 19. Componentes del espectrómetro fotoacústico

a) Lámpara de Xe, b) Monocromador, c) Modulador óptico (Chopper), d) Amplificador lock-in, e) Fibra óptica, f) PC, g) Celda fotoacústica.

El haz de luz emitido por la lámpara de Xe es enviado a un monocromador, esta luz es modulada por un “Chopper” mecánico a una frecuencia fija de $f=17$ Hz, se utilizaron dos filtros, uno para las mediciones de 300 nm a 540 nm y el otro de 540 a 600 nm, estos filtros forman parte del dispositivo del monocromador. Por medio de la fibra óptica el haz monocromático modulado se hace incidir sobre la muestra colocada en la celda fotoacústica.

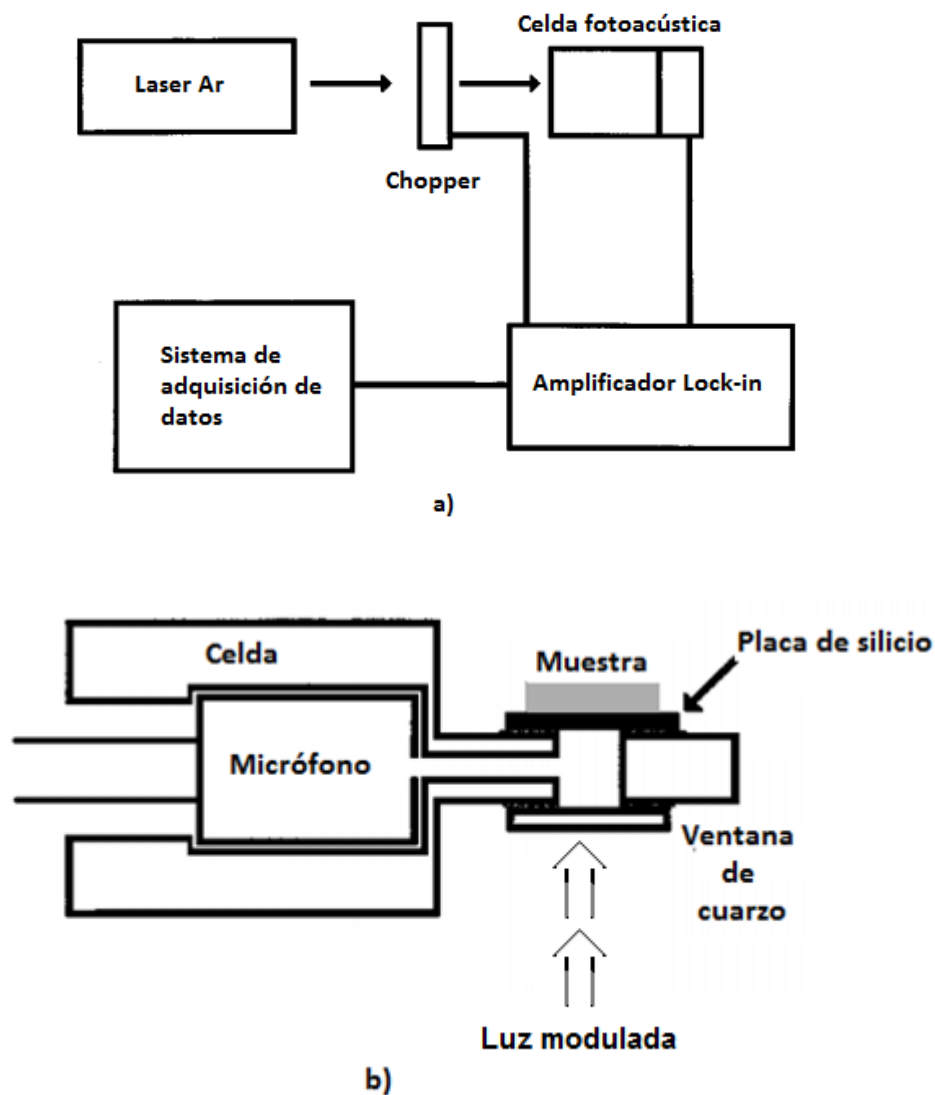
La señal captada por el micrófono es enviada al amplificador “lock-in”, se registra en una computadora la amplitud y la fase de la señal en función de la longitud de onda de la radiación que incide sobre la muestra. Se realizó también una medición de espectroscopía fotoacústica del polvo de grafito como muestra, para normalizar todos los espectros obtenidos, este polvo absorbe por igual todas las longitudes de onda, por lo que la señal fotoacústica (SF) obtenida, solo depende de la intensidad de la lámpara, así al normalizar la SF ya con la muestra, con la obtenida del polvo de grafito, obtenemos la SF que solo depende de las propiedades ópticas de la muestra. Se trabajó en un rango de longitud de onda de 300 a 600 nm.

5.3.8 Determinación de la efusividad térmica de los geles de mucinas, proteínas de soya y grenetinas de res

La preparación de las muestras se ha indicado previamente en la sección 5.3.2, 5.3.3 y 5.3.4. El montaje experimental para la obtención de la efusividad térmica de las muestras (Ver Figura 20a), consiste de un haz de luz que proviene de un láser de Argón marca modu-Laser modelo 4603, cuyo haz monocromático se modula mecánicamente con un “chopper” modelo SR540 con 6 rendijas y un espejo centrado sobre la muestra. Una lámina de silicio de 235 μm de espesor se colocó sobre la celda fotoacústica, sellando una de sus caras, la otra cara de la celda fotoacústica está sellada por una ventana de cuarzo (Ver Figura 20b). El haz incidente de luz actúa como una fuente de calor modulada en la lámina de silicio, este calor modulado es transmitido a la capa de aire contenido en la celda fotoacústica, estas ondas térmicas se utilizan para detectar cambios de presión que tienen lugar en la celda fotoacústica. La detección de la señal se lleva a cabo con un micrófono el cual se conecta a un amplificador “lock-in” modelo SR850 con el cual se registra tanto la amplitud y fase de

la señal fotoacústica, la SF se registró como una función de la frecuencia de modulación, la señal resultante se almacena en una PC. Las mediciones se realizaron a temperatura ambiente.

En la Figura 20 se presenta el arreglo experimental utilizado para la determinación de la efusividad térmica en geles.



Modificado de Balderas-López et al., (1999)

Figura 20.a) Arreglo experimental fotoacústico b) Sección transversal de la celda fotoacústica con la muestra

En la Figura 21 se observa detalladamente como la muestra en estudio, se colocó sobre una placa de silicio, la mencionada placa se colocó sobre una ventana de cuarzo, este sistema se encuentra sobre la celda fotoacústica, dentro de la cual se encuentra un micrófono, con el que es posible detectar la señal fotoacústica, proveniente de la muestra debido al haz de luz que se incide sobre ella.

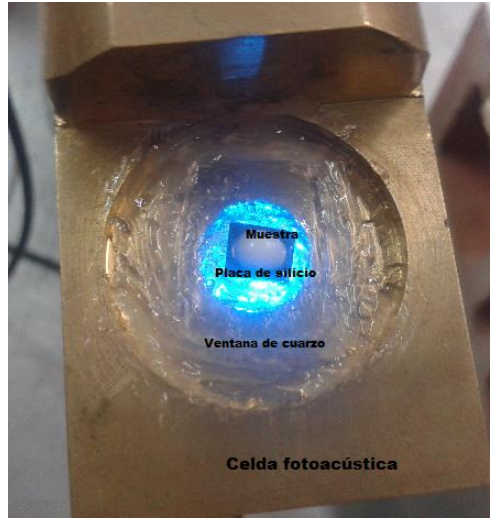


Figura 21. Celda fotoacústica con el sistema aire-silicio-muestra

El sistema aire-silicio-muestra, se representa en la Figura 22. El flujo de calor en este sistema puede ser representado por las ecuaciones de difusión de calor para cada medio, así, se tienen las siguientes ecuaciones.

$$\frac{\partial^2 T_{muestra}}{\partial x^2} - \frac{1}{\alpha_{muestra}} \frac{\partial T_{muestra}}{\partial t} = 0 \quad (22)$$

$$\frac{\partial^2 T_{aire}}{\partial x^2} - \frac{1}{\alpha_{aire}} \frac{\partial T_{aire}}{\partial t} = 0 \quad (23)$$

$$\frac{\partial^2 T_{si}}{\partial x^2} - \frac{1}{\alpha_{si}} \frac{\partial T_{si}}{\partial t} = Fuente\ de\ calor \quad (24)$$

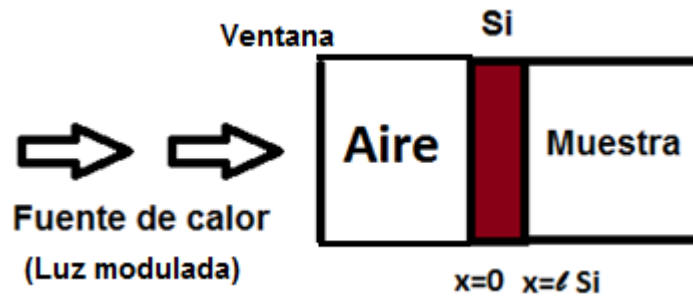


Figura 22. Fuente de calor incidiendo en el sistema aire-silicio-muestra

Si se resuelven las ecuaciones 22, 23 y 24 con las condiciones de frontera de continuidad de temperatura y flujo de calor, en las interfaces aire-silicio y silicio-muestra, así para $x = 0$, $T_{aire} = T_{si}$ y $q_{aire} = q_{si}$; en $x = l_{si}$, $T_{si} = T_{muestra}$ y $q_{silicio} = q_{muestra}$, de esta forma se puede obtener la temperatura modulada del gas (Temperatura promedio en el aire), estas fluctuaciones indican variaciones de presión modulada en el aire de la cámara y el resultado es mostrado en la Ecuación 15. La señal se detecta mediante un micrófono.

Cuando no hay muestra se observa el arreglo mostrado en la Figura 23, una celda fotoacústica con el sistema aire-silicio.

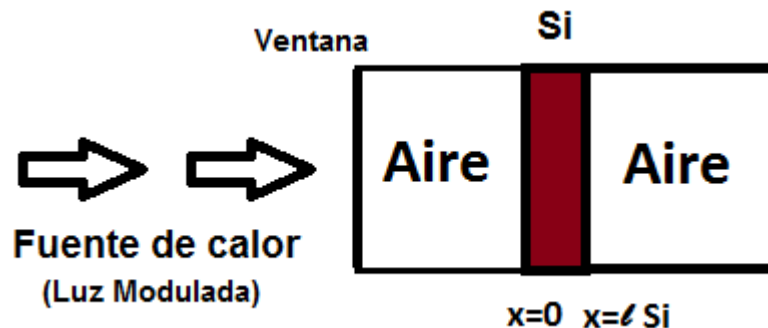


Figura 23. Celda fotoacústica con el sistema aire-silicio

Debido a que la efusividad del gas es mucho menor a la efusividad del silicio $b \ll 1$ de la Ecuación 15 se obtiene en esta aproximación, la Ecuación 16.

Para determinar la efusividad térmica de la muestra se obtiene la razón de las Ecuaciones 15 y 16 dando como resultado la ecuación 17.

A partir del valor conocido de la efusividad del silicio $1.5669 \text{ W s}^{1/2} \text{ cm}^{-2} \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$ fue posible calcular la efusividad de las muestras. Para esto se utilizó la ecuación 17, que expresa la relación de las señales fotoacústicas entre el sistema aire-silicio-muestra y el sistema aire-silicio. El valor de P_2 (parámetro de ajuste de la razón de efusividades) obtenido a partir del mejor ajuste de la ecuación 17 a los datos experimentales de señales fotoacústicas, ver Figura 13, es proporcional a b en dicha ecuación.

VI RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Termogramas de las mucinas, aislados de soya y grenetinas de res

La Figura 24 muestra curvas de DSC (calorimetría diferencial de barrido por sus siglas en inglés) correspondiente a la mucina cruda y purificada, estas muestras se determinaron a 5 °C/min, en un rango de temperatura de 25 - 260 °C. Como primera observación se tiene que el pico en el termograma representa la temperatura a la cual la fusión termina; al finalizar esta transformación, la muestra regresa a la temperatura de los alrededores. La endoterma o pico observado es debido a que la absorción de calor (proceso endotérmico) es detectado por el calorímetro, indicando una diferencia de temperatura con respecto a la referencia y al graficar la temperatura diferencial (ΔT) contra el tiempo se obtiene el termograma correspondiente (Speyer, 1993). El calor liberado en una reacción es simplemente el área bajo la curva expresado en (J/g).

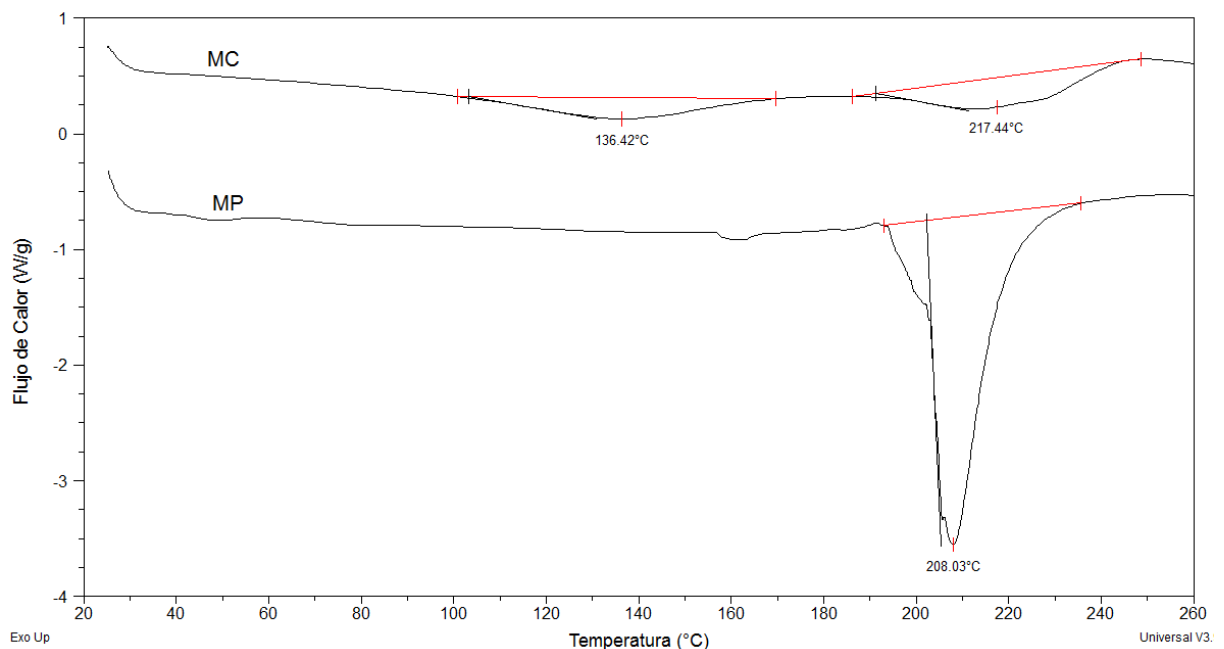


Figura 24. Termograma correspondiente a la mucina cruda y purificada

MC = mucina cruda; MP = mucina purificada

Es posible observar dos picos de desnaturalización correspondientes a la mucina cruda (MC) $T_{p1}=136.53^{\circ}\text{C}$ y $T_{p2}=213.06^{\circ}\text{C}$, en el caso de la mucina purificada (MP), se observan igualmente dos picos de desnaturalización, $T_{p1}=165.82^{\circ}\text{C}$ y $T_{p2}=203.80^{\circ}\text{C}$. El pico principal de desnaturalización, correspondiente al punto de fusión, en la MP (203.80°C) aumentó 49.27 % con respecto al pico de fusión observado en la mucina cruda (136.53°C). Esta variación en la temperatura de fusión observada, está relacionado al mayor contenido de carbohidratos en el caso de la MC en comparación a la MP, la mayor anchura en el pico de la mucina cruda, en comparación al pico de la MP son señales de impurezas en la MC como lo indica Momoh et al., (2010).

Tabla 5. Parámetros térmicos de componentes individuales

Muestra	Parámetros térmicos							
	$TP_1 (^{\circ}\text{C})$		$TP_2 (^{\circ}\text{C})$		$\Delta H (\text{J/g})$		$\Delta C_p (\text{J/g } ^{\circ}\text{C})$	
MC	136.53	± 0.11	213.36	± 0.06	44.14	± 5.69	0.60	± 0.04
MP	165.82	± 3.50	203.80	± 4.23	209.85	± 4.85	5.75	± 0.14
A. soya	54.91	± 0.58	124.87	± 0.84	91.26	± 0.44	1.02	± 0.04
C. soya	58.79	± 1.53	119.68	± 2.64	146.95	± 3.75	1.36	± 0.02
H. soya	53.34	± 0.70	129.44	± 2.45	100.06	± 2.04	1.12	± 0.07
GR1	75.96	± 0.84	122.92	± 1.09	152.80	± 2.50	1.66	± 0.14
GR2	75.99	± 0.95	123.49	± 3.32	158.45	± 19.4	1.59	± 0.31
GR3	76.89	± 0.19	155.09	± 1.32	118.00	± 16.5	1.26	± 0.14

MC = mucina cruda; MP = mucina purificada; A = aislado; C = concentrado; H = harina; GR1=grenetina de res Bloom 200; GR2=grenetina de res Bloom 225; GR3=grenetina de res Bloom 180; TP_1 = temperatura de fusión en el primer pico; TP_2 = temperatura de fusión en el segundo pico; ΔH = entalpía de fusión; ΔC_p = capacidad calorífica.

Se observa también que la entalpía de fusión en el caso de la mucina purificada es 78.96 % mayor con respecto a la observada en la mucina cruda y la capacidad calorífica es 89.56 % mayor en la mucina purificada. Este aumento en la entalpía sugiere una mayor estabilidad debido a puentes de hidrógeno en la mucina purificada, y estos contribuyen endotérmicamente, es decir absorben calor, al momento de

romperse, generando así, un aumento en la entalpía, a estas temperaturas, como sugiere Sousa et al., (1995).

Se realizó el análisis por DSC en el ácido siálico, el carbohidrato principal presente en las mucinas. Lo que se observa en la Figura 25, es el termograma correspondiente al ácido siálico, este compuesto es un azúcar terminal que se encuentra principalmente en las moléculas glicosidas (Baos *et al.*, 2012). El punto de fusión obtenido es de 194 °C como se reporta por (Sigma-Aldrich, 2015), la entalpía de fusión es de 334 (J/g) y la capacidad calorífica es de 9.23 (J/g°C). La alta temperatura de fusión observada es indicativo de la alta rigidez en la molécula, como lo indica Momoh et al., (2010), es decir, las interacciones son más fuertes por lo que, para que se observe un cambio de transición, este se lleva a cabo a altas temperaturas. Esto se ve reflejado en la cantidad de energía necesaria requerida para observar la transición, por lo que, se observa un valor de 334 (J/g), de entalpía de fusión, el cual es 86% mayor que la entalpía de fusión de la mucina cruda y 7.23 % mayor que la entalpía de fusión de la mucina purificada.

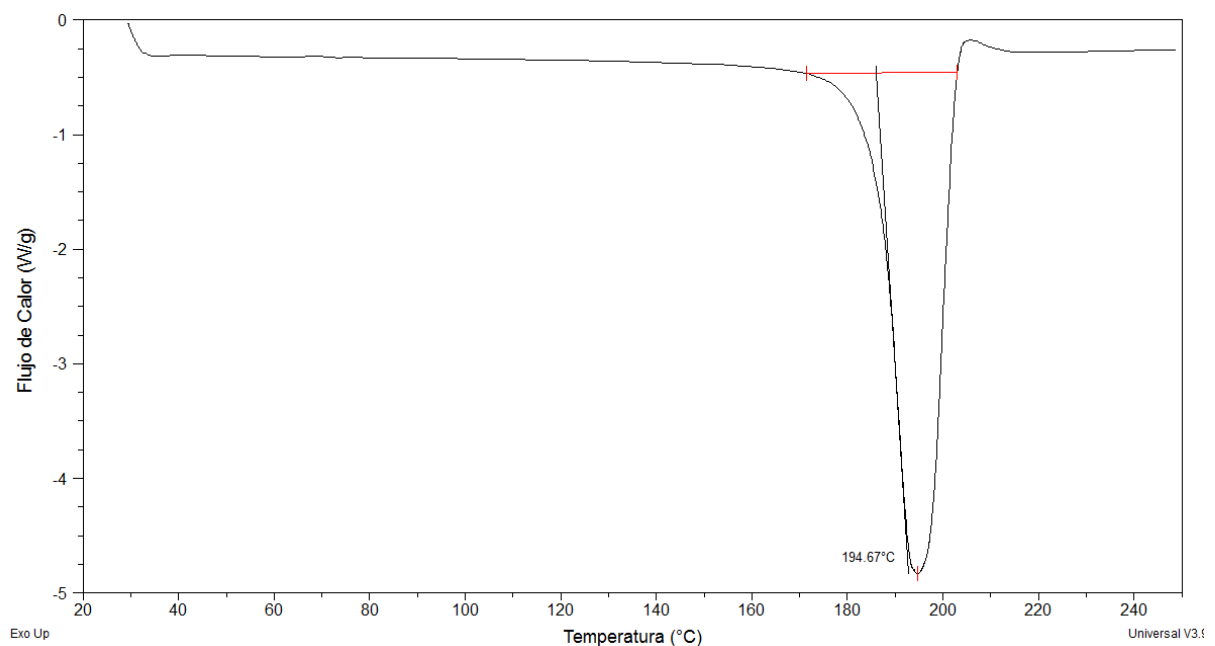


Figura 25. Termograma del ácido siálico

En la Figura 26 se observan los termogramas obtenidos de las proteínas de soya, siendo H: harina de soya, C: concentrado y A: aislado. Los parámetros térmicos obtenidos, se presentan en la Tabla 5.

Se obtuvieron dos picos de desnaturalización, para el aislado, concentrado y harina de soya. Los valores para el primer pico son 54.91, 58.79 y 53.34 °C, para el aislado, concentrado y harina respectivamente. El segundo pico muestra valores de 124.87, 119.68 y 129.44 °C.

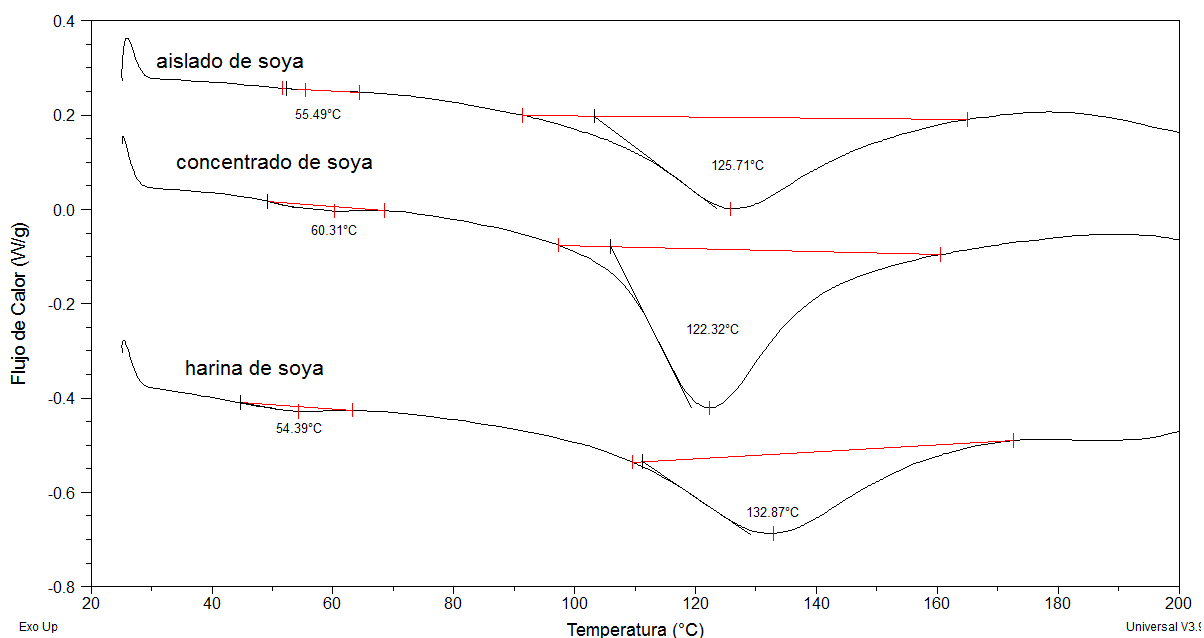


Figura 26. Termograma de las proteínas de soya

Los picos que se observan en los tres termogramas de la Figura 26 corresponden a los dos componentes principales de la soya, el componente 7S y el 11S, como lo reporta Morales y Kokini, (1997) y Li et al., (2014).

El tamaño de los picos varía de acuerdo con la predominancia de alguna de las dos globulinas; 7S y 11S. En los tres termogramas de la Figura 26, el primer pico

corresponde a la desnaturalización de la conglicina 7S y el segundo pico corresponde a la desnaturalización de la glicina 11S como lo reporta Hermansson, (1986) y Sousa et al., (1995).

En la Figura 27 se observan las temperaturas de desnaturalización 7S y 11S, que corresponden al primer y segundo pico respectivamente.

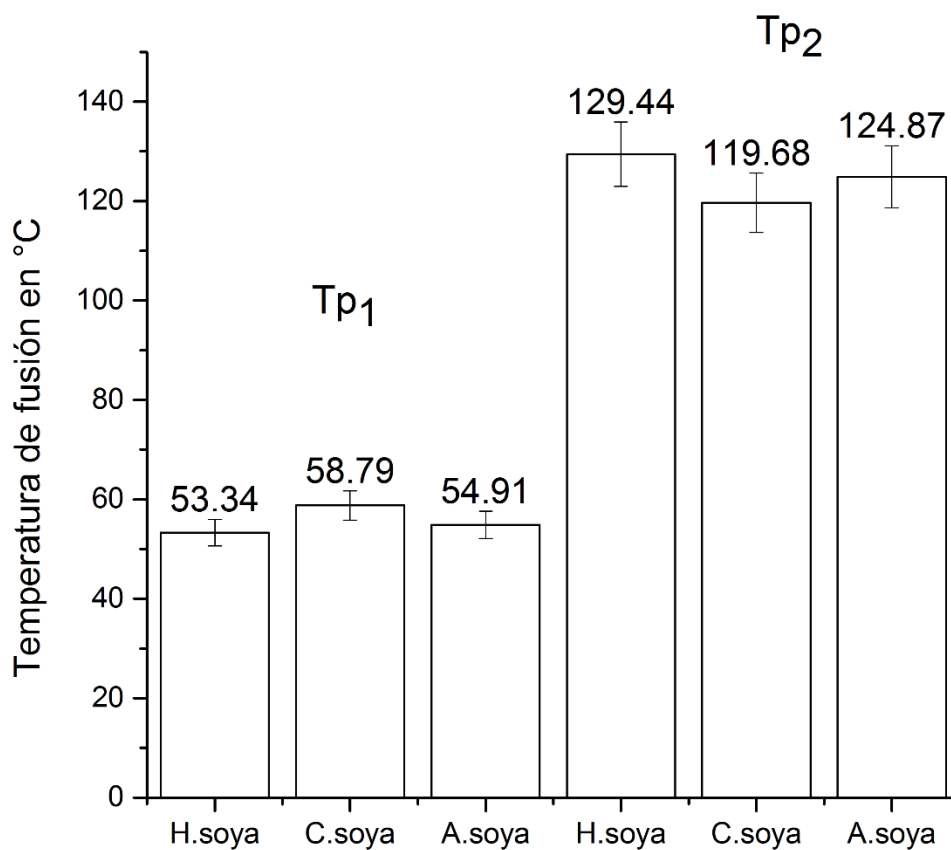


Figura 27. Temperatura de fusión de componentes de la soya

H = harina de soya; C = concentrado de soya; A = aislado de soya; Tp₁ = temperatura de fusión en el primer pico de transición (componente 7S de la soya); Tp₂ = temperatura de fusión en el segundo pico de transición (componente 11S) de la soya.

En la Figura 28 se observan las entalpías de fusión correspondientes a la desnaturalización de los componentes 7S y 11S de la soya.

Se observa una mayor entalpía de fusión en el componente glicina (11S) en las tres muestras, debido a que, esta globulina tiene una mayor temperatura de fusión, relacionado a la mayor cantidad de subunidades presentes (6) en comparación a la conglicina (7S) que tiene menor número de subunidades (3), el mayor número de subunidades contribuye a aumentar la entalpía de fusión, esto representa la energía utilizada tanto en el desdoblamiento de las proteínas, como en la agregación de estas como lo indica Sousa et al., (1995), es decir la desnaturalización térmica de éstas.

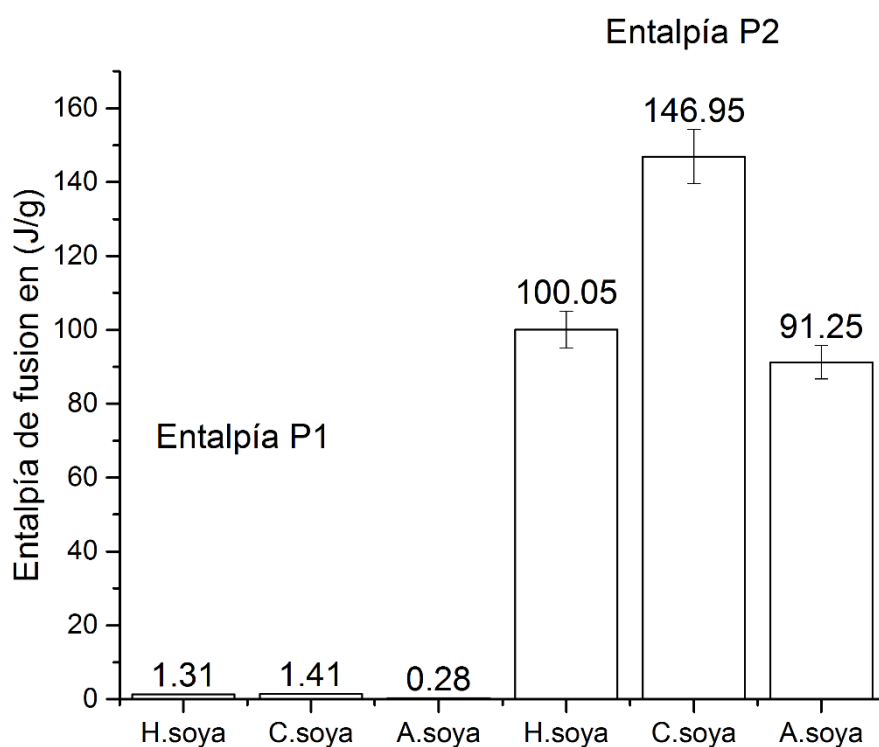


Figura 28. Entalpía de fusión de los componentes de la soya

H = harina de soya; C = concentrado de soya; A = aislado de soya; P₁ = entalpía de fusión en el primer pico de transición (componente 7S de la soya); P₂ = entalpía de fusión en el segundo pico de transición (componente 11S) de la soya.

Estos valores de entalpía son una contribución de la ruptura de uniones hidrofóbicas, así como puentes de hidrógeno (Molina Ortiz y Añón, 2001).

La entalpía (ΔH) es el total de la zona integrada por debajo del pico del termograma, lo que indica la absorción total de energía calorífica por la muestra, a mayor entalpía existe una mayor absorción de energía calorífica como indican Gill et al., (2010) sugiriendo que existe una mayor estabilidad estructural en el componente 11S de la soya. La mayor entalpía se observa en el concentrado de soya, sugiriendo esto, que el producto contiene mayor cantidad de glicina, en comparación a la harina y concentrado de soya.

En la Figura 29 se observan los termogramas obtenidos para la grenetina de res, se observan valores de desnaturalización en el primer pico (T_{p1}) muy similares (75.96 °C, 75.99 °C y 76.89 °C); sin embargo, en el segundo pico de desnaturalización, GR1 y GR2, muestran valores semejantes (122.92 °C y 123.49 °C), GR3 muestra un pico de desnaturalización a los 155.04 °C, además de otro pico, indicando un menor grado de hidrólisis en esta grenetina. La GR2 con el mayor grado de Bloom presenta la mayor entalpía de fusión (158.45 J/g). Estas variaciones en los picos de desnaturalización corresponden a factores como el tipo de grenetina que se trate, la distribución del peso molecular y métodos aplicados para la obtención de estas grenetinas, como ha sido descrito por Sobral y Habitante, (2001).

La variación de capacidad calorífica (ΔC_p) es la cantidad requerida para incrementar o disminuir la temperatura de un material, en la Tabla 5 se observa que la mayor capacidad calorífica la presenta la mucina cruda (5.75 J/g°C), esto asociado a la mayor presencia de carbohidratos en este sistema como lo indican Gill et al., (2010).

La Figura 30 muestra los termogramas obtenidos de las mezclas mucina cruda-proteínas (de soya y grenetinas), se observan dos picos de desnaturalización con

valores (118.36 – 132.41°C) para el primer pico y (194.56 – 210.97 °C), para el segundo; estos valores son similares a la MC sin mezclar, con un valor en el primer pico de transición (T_{p1}) de 136.53 °C y en el segundo (T_{p2}) de 213.36 °C, predominando así el comportamiento de la mucina, indicando que la mucina, funciona como un protector de desnaturalización para las proteínas de soya y grenetinas.

Estos valores se presentan en la Tabla 6. Las entalpías observadas en las mezclas; sin embargo, presentan un aumento con respecto al valor de la entalpía de fusión de la mucina cruda de 114, 79 y 33 % para las mezclas de MC con harina, concentrado y aislado; sin embargo, al analizar estos valores respecto de los valores de las proteínas de soya se observa una disminución de la entalpía de 5.6, 85 y 35% para harina, concentrado y aislado de soya respecto a las mezclas con mucina cruda.

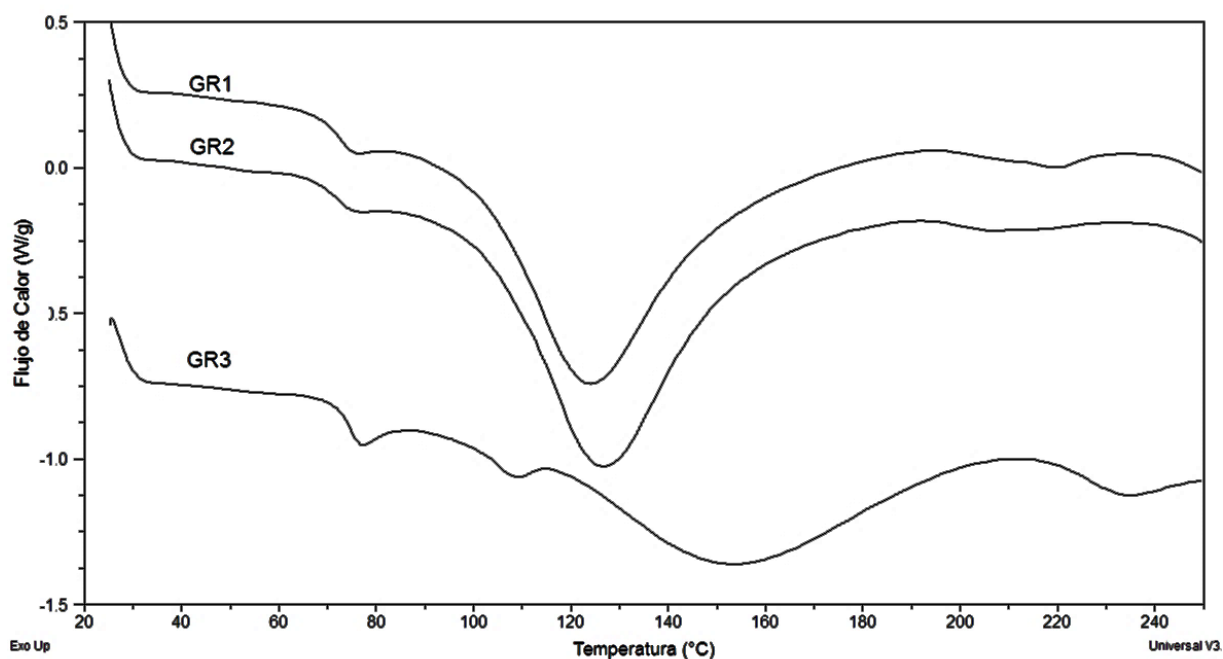


Figura 29. Termogramas de grenetinas de res

GR1=grenetina de res Bloom 200; GR2=grenetina de res Bloom 225; GR3=grenetina de res Bloom 180

Estos cambios de entalpía están relacionados con cambios de energía térmica, necesarios para la ruptura y formación de enlaces, principalmente enlaces de hidrógenos, indicando que existe una interacción debido a que se ve un aumento en el valor de entalpía en las mezclas, en el caso de la disminución de la entalpía respecto de los valores de proteínas es debido a que, los carbohidratos, tienen un efecto de protección en la desnaturalización térmica como indican Li et al. (2014).

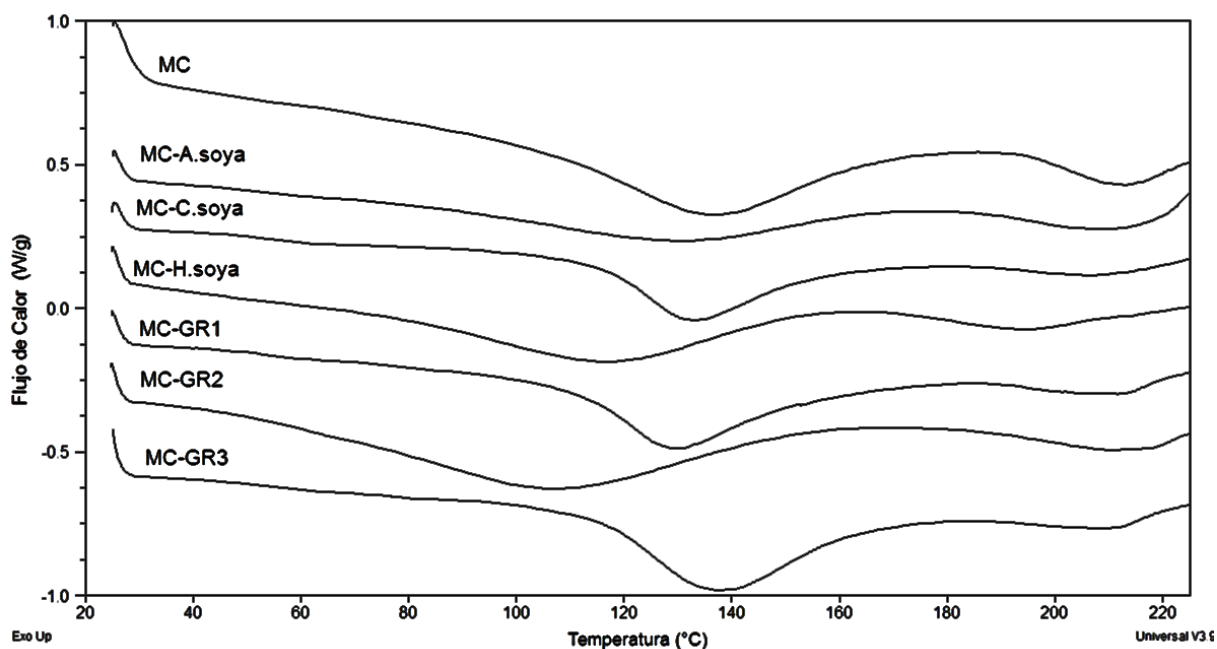


Figura 30. Transiciones térmicas de las mezclas mucina cruda-proteínas de soya y grenetinas de res (1:1).

A = aislado de soya; C = concentrado de soya; H = harina de soya; GR1=grenetina de res Bloom 200; GR2=grenetina de res Bloom 225; GR3=grenetina de res Bloom 180

En cuanto a las mezclas con grenetinas se observa un aumento de entalpía de 246 %, 259 % y 167% para GR1, GR2 y GR3 con respecto a la mucina cruda, debido a que la grenetina es un polipéptido que contiene cadenas de aminoácidos, con múltiples enlaces que contribuyen a aumentar la energía necesaria para romper estos enlaces.

Tabla 6. Parámetros térmicos de mezclas mucina cruda-proteínas

Mezclas mucina cruda/proteínas	Parámetros térmicos							
	TP ₁ (°C)		TP ₂ (°C)		ΔH (J/g)		ΔCp (J/g °C)	
MC-A. soya	130.11	± 0.83	209.49	± 1.43	58.85	± 14.0	0.68	± 0.10
MC-C. soya	129.99	± 2.80	209.39	± 2.46	79.25	± 4.34	0.88	± 0.05
MC-H. soya	118.36	± 1.25	194.27	± 0.29	94.73	± 1.41	0.97	± 0.03
MC-GR1	129.35	± 0.01	210.97	± 0.62	95.90	± 5.61	1.13	± 0.02
MC-GR2	126.16	± 18.9	210.64	± 0.67	138.5	± 21.5	1.40	± 0.07
MC-GR3	132.41	± 4.68	210.81	± 0.11	105.2	± 7.10	1.21	± 0.07

TP₁ = temperatura de fusión en el primer pico de transición TP₂ = temperatura de fusión en el segundo pico de transición; MC = mucina cruda; A = aislado de soya; C = concentrado de soya; H = harina de soya; GR1=grenetina de res Bloom 200; GR2=grenetina de res Bloom 225; GR3=grenetina de res Bloom 180

En la Figura 31 se muestran los termogramas de las mezclas mucina purificada con proteínas de soya y grenetinas de res. Los parámetros térmicos obtenidos se muestran en la Tabla 7. Los termogramas de las mezclas MP-proteínas presentan dos picos de desnaturalización (TP₁ y TP₂), tanto en las mezclas con proteínas de soya como grenetinas de piel de res, mostrando una variación respecto de la mucina purificada, ya que esta presenta valores de 165.82 °C en el primer pico de desnaturalización y 203.80 °C para la el segundo, mientras que en las mezclas con proteínas de soya se obtienen valores de 49.89 – 52.77 °C en el primer pico de transición y 145 – 195 °C en el segundo.

En las mezclas de MP-grenetinas se obtienen valores de 45.96-51.15 °C y 117.98 – 164.16 °C en el primer pico de transición y en el segundo respectivamente, esto es una indicación de una posible interacción entre las mucina purificada y las proteínas de soya y proteínas de res como se ha reportado (Momoh et al., 2010) debido a que se observa la reducción del primer pico de transición, y el segundo pico de transición una inflexión más pronunciada; se observan además, valores de entalpía similares en las mezclas de mucinas-grenetinas, siendo estos 202.25, 209.85 y 136.40 (J/g), en

comparación a la entalpía de la mucina purificada 209.85 (J/g), actuando la mucina purificada, como protector contra la desnaturalización.

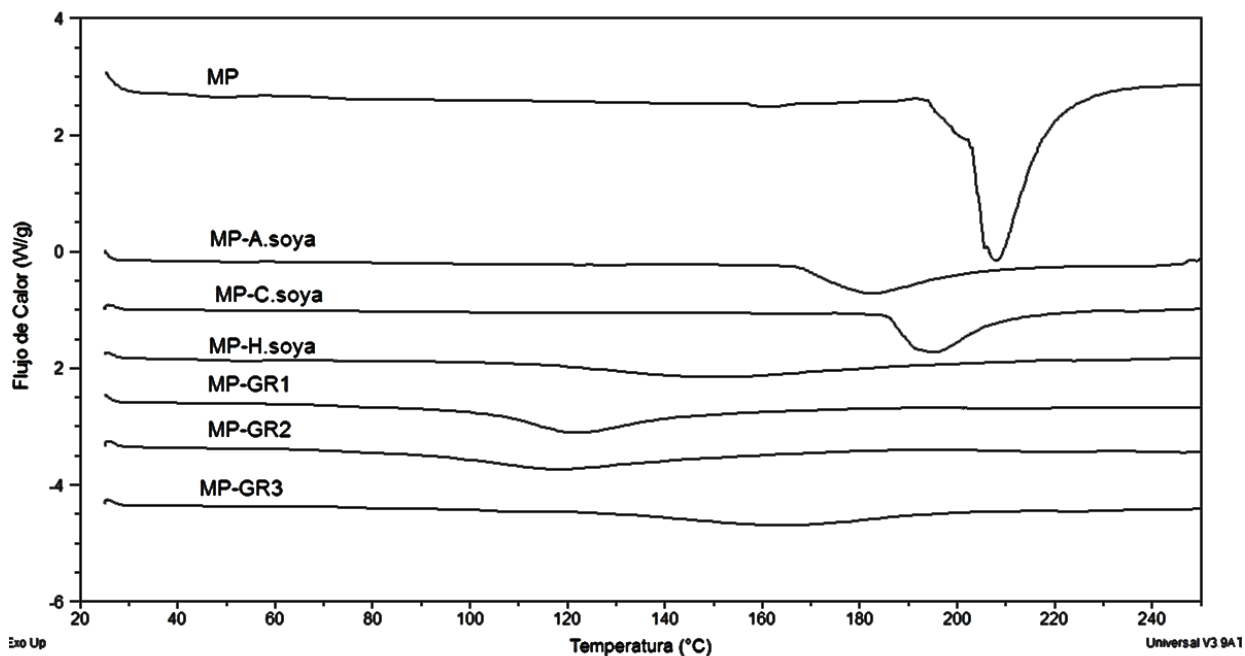


Figura 31. Termogramas de las mezclas mucina purificada-proteínas de soya y grenetinas de res (1:1)

MP = mucina purificada; A = aislado de soya; C = concentrado de soya; H = harina de soya; GR1=grenetina de res Bloom 200; GR2=grenetina de res Bloom 225; GR3=grenetina de res Bloom 180

Tabla 7. Parámetros térmicos de mezclas mucina purificada-proteínas

Mezclas mucina purificada/proteínas	Parámetros térmicos						
	TP ₁ (°C)	TP ₂ (°C)	ΔH (J/g)	ΔC _p (J/g °C)			
MP-A. soya	52.52 ± 0.16	181.43 ± 0.76	137.00 ± 0.70	2.31 ± 0.21			
MP-C. soya	49.89 ± 0.40	195.18 ± 0.17	159.15 ± 16.25	2.94 ± 0.36			
MP-H. soya	52.77 ± 0.25	145.39 ± 5.86	156.50 ± 37.70	1.50 ± 0.00			
MP-GR1	45.96 ± 0.52	120.69 ± 1.28	202.25 ± 23.25	1.66 ± 0.08			
MP-GR2	48.00 ± 2.54	117.98 ± 0.49	209.85 ± 13.75	1.61 ± 0.07			
MP-GR3	51.15 ± 0.00	164.16 ± 0.00	136.40 ± 0.00	1.30 ± 0.07			

TP₁ = temperatura de fusión en el primer pico de transición TP₂ = temperatura de fusión en el segundo pico de transición; MP = mucina purificada; A = aislado de soya; C = concentrado de soya; H = harina de soya; GR1=grenetina de res Bloom 200; GR2=grenetina de res Bloom 225; GR3=grenetina de res Bloom 180

6.2 Peso molecular de mucinas

En las Tablas 8 y 9 se muestran los valores del tiempo de flujo y densidad para la determinación de viscosidad relativa, viscosidad específica y viscosidad reducida, para mucina cruda y purificada. A partir del gráfico de viscosidad reducida contra concentración, es posible determinar la viscosidad intrínseca, mediante la interpolación hacia el valor cero de la concentración. Una vez obtenida la viscosidad intrínseca es posible obtener el peso molecular mediante la ecuación de Mark-Houwink (ecuación 5) ya que esta ecuación relaciona la viscosidad intrínseca y el peso molecular promedio (M) de un sistema biopolímero-disolvente determinado; donde K y α son constantes a una temperatura específica.

Tabla 8. Determinación de la viscosidad reducida en la mucina cruda

Concentración de mucina cruda (g/mL)	Tiempo (s)	ρ (g/mL)	Viscosidad Relativa	Viscosidad Específica	Viscosidad Reducida (mL/g)
0.004	38.72	1.0195	1.2552	0.2552	63.7963
0.007	45.71	1.0237	1.4878	0.4878	69.6880
0.010	54.56	1.0240	1.7762	0.7762	77.6215
0.013	63.98	1.0280	2.0910	1.0910	83.9262
0.016	75.77	1.0320	2.4862	1.4862	92.8903
0.019	85.90	1.0330	2.8212	1.8212	95.8552

La viscosidad relativa y la viscosidad específica son adimensionales, la viscosidad reducida es el cociente de la viscosidad específica y la concentración (η_{sp}/C).

En la Figura 32 se observa el gráfico obtenido de la viscosidad específica reducida, graficada contra la concentración, obteniendo mediante extrapolación la viscosidad intrínseca, en la mucina cruda. En la Figura 33 se observa similar gráfica de viscosidad y la extrapolación para la mucina purificada.

Tabla 9. Determinación de la viscosidad reducida en la mucina purificada

Concentración de mucina purificada (g/mL)	Tiempo (s)	ρ (g/mL)	Viscosidad Relativa	Viscosidad Específica	Viscosidad Reducida (mL/g)
0.004	38.08	1.0210	1.2361	0.2361	59.0370
0.006	42.42	1.0255	1.3830	0.3830	63.8322
0.008	47.52	1.0243	1.5476	0.5476	68.4530
0.010	52.26	1.0240	1.7013	0.7013	70.1334
0.014	62.57	1.0277	2.0443	1.0443	74.5923
0.016	68.50	1.0287	2.2402	1.2402	77.5142
0.018	75.40	1.0317	2.4732	1.4732	81.8447

La viscosidad relativa y la viscosidad específica son adimensionales, la viscosidad reducida es el cociente de la viscosidad específica y la concentración (η_{sp}/C).

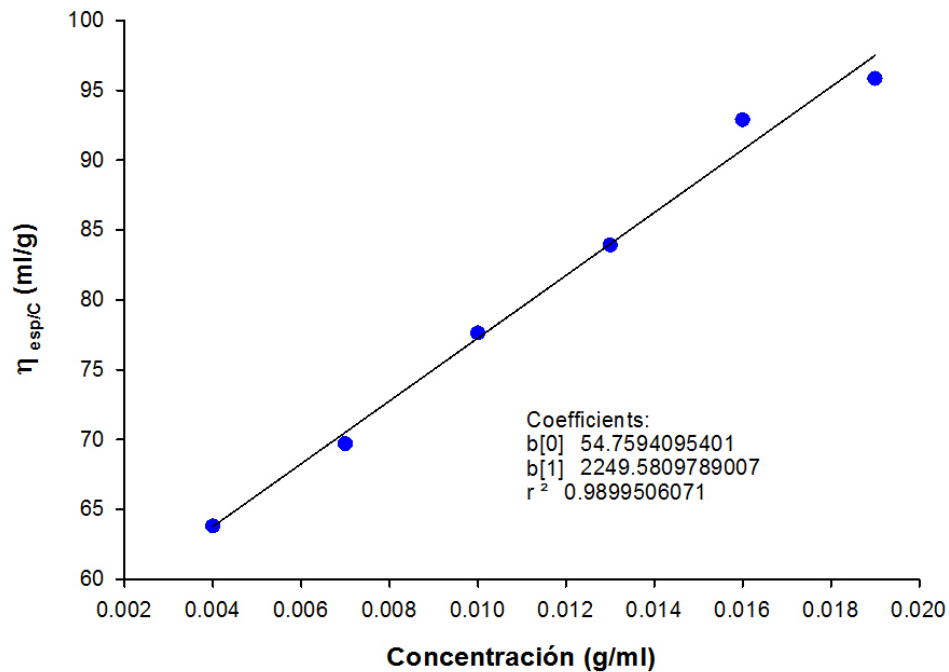


Figura 32. Viscosidad reducida (específica/concentración) de la mucina cruda

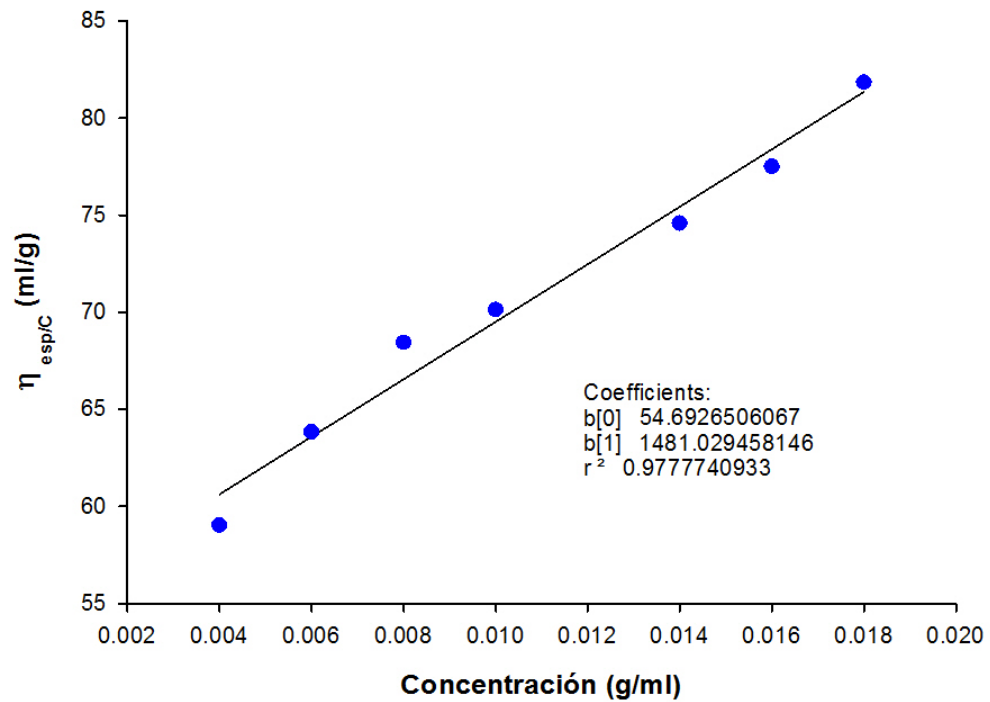


Figura 33. Viscosidad reducida (específica/concentración) de la mucina purificada

La viscosidad intrínseca (η) para la mucina cruda fue de 54.76 y para la mucina purificada fue de 54.69, presentando R^2 de 0.9899 y 0.9777. A partir de la ecuación 5 es posible calcular los pesos moleculares correspondientes.

$$[\eta] = K(M)^\alpha \quad (5)$$

Los valores de las constantes K y α se muestran en la Tabla 10

Tabla 10, Constantes K y α para mucina de cerdo

Mucina	Parámetros	Autor
Mucina de cerdo (colon)	$K=6.3 \times 10^{-6}$ $\alpha=1.1$	Jumel et al., 1997

Los pesos moleculares obtenidos se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11. Peso molecular obtenido en mucinas

Muestra	η (mL/g)	PM
Mucina cruda	54.7594	2.033×10^6
Mucina purificada	54.6926	2.031×10^6

Se observa una disminución de aproximadamente 0.1 % en el peso molecular de la mucina purificada respecto a la cruda, esto es indicativo de pérdida de componentes, como los carbohidratos, presentes en la mucina cruda, durante el proceso de purificación al que se somete la mucina.

Los pesos moleculares obtenidos son similares a los reportados por Fogg et al., (1996) para mucinas de colon de cerdo, cuyo valor reportado fue de 2.1×10^6 .

6.3 Termogramas de geles de mucinas

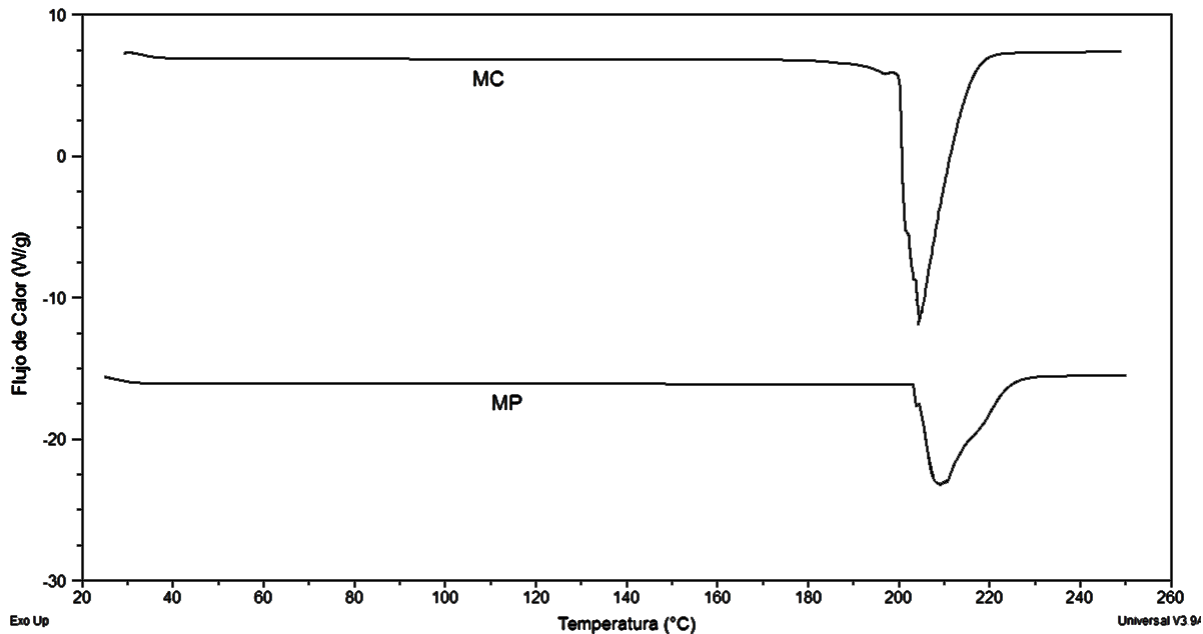


Figura 34. Termogramas de geles de mucinas cruda y purificada

MC = mucina cruda; MP = mucina purificada

En la Figura 34 se observan los termogramas de los geles de mucina cruda y mucina purificada, en la Tabla 12 se observan los valores de los parámetros térmicos obtenidos para los geles de mucinas.

Tabla 12. Parámetros térmicos obtenidos de los geles de mucinas

Muestra	Parámetros térmicos							
	TP ₁ (°C)		TP ₂ (°C)		ΔH (J/g)		ΔCp (J/g °C)	
Mucina cruda	-	-	203.28	± 0.92	1061.65	± 69.45	44.15	± 2.40
Mucina purificada	-	-	204.63	± 1.85	560.45	± 44.05	19.68	± 1.28

TP₁ = temperatura de fusión en el primer pico de transición TP₂ = temperatura de fusión en el segundo pico de transición ΔH = entalpía de fusión ΔCp = capacidad calorífica.

Lo que es posible observar en estos termogramas es la desaparición de uno de los picos de transición presentes en las mucinas en polvo; en la MC este pico se encuentra en 136 °C, en la MP en 165 °C, la presencia de un solo pico de transición es indicativo de la formación de enlaces, principalmente enlaces entre hidrógenos, característicos en presencia del disolvente agua y fuerzas de van der Waals, como lo indican Momoh et al., (2010), la presencia de estos enlaces requiere altas temperaturas para que se lleve a cabo la transición térmica y de la misma forma, el valor de entalpía aumenta considerablemente, ésta aumentó 24 veces en el gel de MC respecto de su valor en polvo y aumentó 2.67 veces en la MP, debido al calor requerido para llevar a cabo este tipo de reacciones.

Otra característica que se observa en el termograma de la Figura 34 es, la aparente falta de definición del pico, esto está relacionado a posibles variaciones de presión a lo largo del experimento, lo cual, es más notable en muestras con presencia de agua como lo indica Hatakeyama y Quinn, (1999); sin embargo, esto también puede estar relacionado con la naturaleza de las muestras, que no presentan una estabilidad

térmica como los metales, o muestras en polvo que carecen de agua, reflejándose su inestabilidad en la falta de definición en el pico de transición.

6.4 Análisis por DSC de los geles de soya y grenetina de res

A continuación se muestran los resultados obtenidos del análisis por calorimetría diferencial de barrido a componentes individuales de geles de proteínas de soya y grenetinas de res.

Tabla 13. Transiciones térmicas obtenidas en geles de soya

Muestra	Parámetros térmicos							
	TP ₁ (°C)	TP ₂ (°C)	ΔH (J/g)		ΔCp (J/g °C)			
A. soya	-	-	104.98	± 0.11	1455.00	± 190.0	30.34	± 3.49
C. soya			118.10	± 0.65	1206.00	± 29.00	20.78	± 0.42
H. soya	-	-	170.87	± 27.6	919.65	± 18.85	9.67	± 0.31

TP₁ = temperatura de fusión en el primer pico de transición TP₂ = temperatura de fusión en el segundo pico de transición A = aislado C = concentrado H = harina; ΔH = entalpía de fusión; ΔCp = capacidad calorífica.

En la Figura 35 se presentan los termogramas obtenidos de los geles de soya y en la Tabla 13 se observan los parámetros obtenidos donde la ausencia de uno de los picos de transición presentes en muestras en polvo es evidente, indicando con esto, la desnaturalización de uno de los componentes principales de la soya, durante el proceso de formación de gel, esto debido al tratamiento térmico al cual se somete para inducción de la gelificación; se infiere por lo tanto que el componente conglicina (7S), el cual tiene una temperatura de desnaturalización de 60 °C, es el que se ha desnaturalizado, ya que, la glicina (11S) tiene una temperatura de desnaturalización de aproximadamente 130 °C. Se puede establecer, entonces, que la desnaturalización de las proteínas es necesario para la formación del gel Renkema *et al.*, (2002).

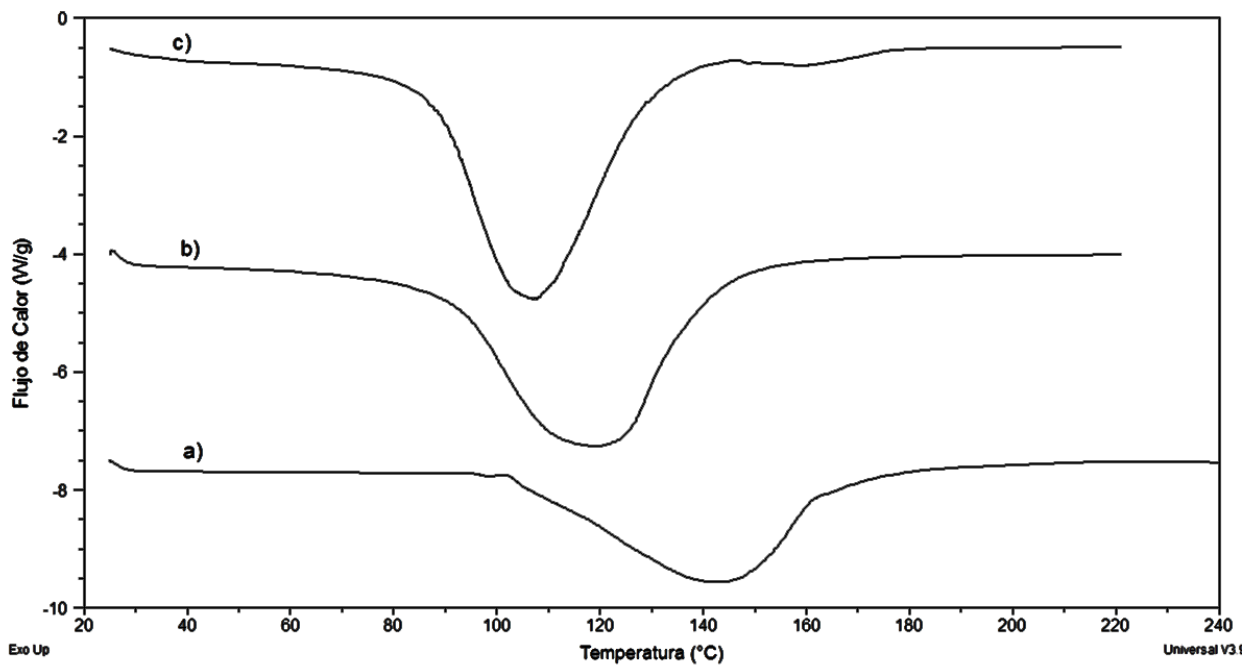


Figura 35. Termogramas de geles de proteínas de soja a) harina; b) concentrado; c) aislado

La entalpía de fusión es 16 veces mayor en los geles de aislado de soja respecto a las muestras en polvo, en el gel conteniendo concentrado de soja la entalpía es 8.2 veces mayor que la muestra en polvo y en el gel de harina de soja es 6 veces mayor que en la muestra en polvo, debido a la presencia de agua, indicando que existe una mayor formación de enlaces, de tipo hidrogeno. Como se observa, mientras mayor sea el contenido de proteína es mayor la entalpía de fusión observada en los geles de soja, debido a que el contenido de proteínas permite contribuir al número de enlaces formados.

El termograma de la Figura 36 corresponde al gel obtenido a partir de gretina de piel de res GR1.

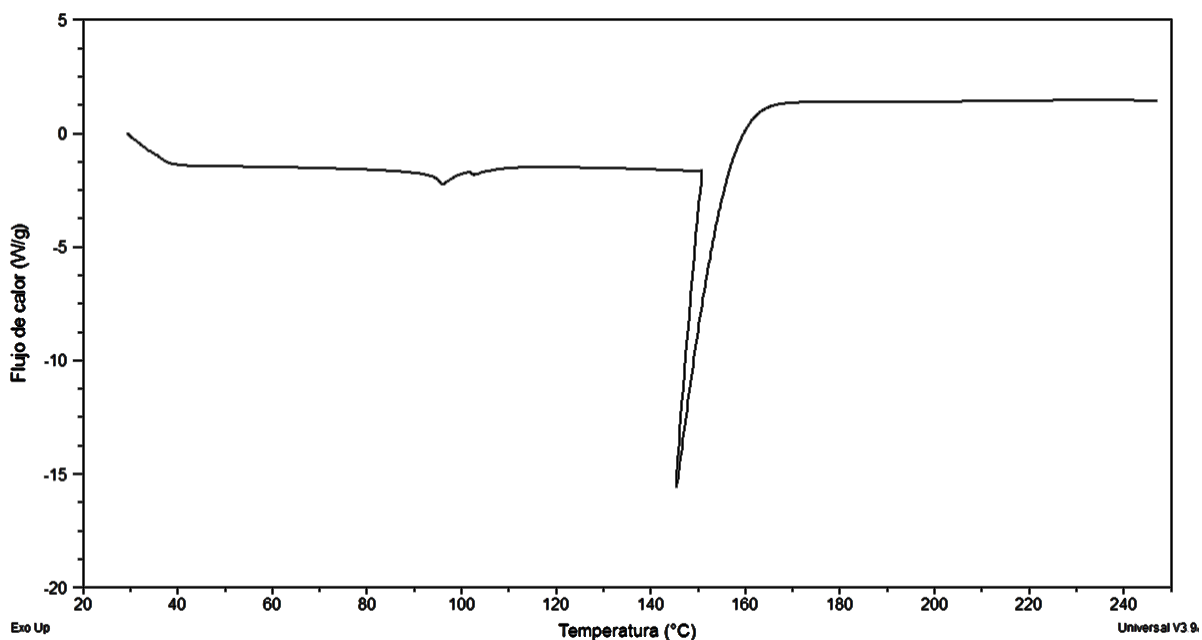


Figura 36. Comportamiento térmico del gel de grenetina

En la Tabla 14 se presentan los parámetros térmicos obtenidos para el gel conteniendo grenetina de piel de res. Se observan dos picos de transición en el termograma, el primer pico corresponde a la temperatura de transición vítrea característica de este tipo de gel (Sobral y Habitante, 2001), esta transición es un cambio en la movilidad molecular (en la fase amorfa de la muestra), el material es rígido por debajo de la temperatura de transición vítrea y “gomoso” arriba de ella; el segundo pico corresponde a la temperatura de fusión en el gel (Tseretely y Smirnova, 1992) este valor es 20 % mayor a lo reportado por Mendieta-Taboada et al., (2008), cuyo valor es de 116.2 °C para una concentración del 10% de una grenetina de piel de cerdo.

Tabla 14. Parámetros térmicos de grenetina de piel de res

Muestra	Parámetros térmicos							
	TP ₁ (°C)		TP ₂ (°C)		ΔH (J/g)		ΔCp (J/g °C)	
GR1	95.93	± 1.85	145.45	± 0.11	159.70	± 0.65	7.88	± 0.00

GR1=grenetina de res Bloom 200; Tp₁ = temperatura de fusión en el primer pico; Tp₂ = temperatura de fusión en el segundo pico; ΔH = entalpía de fusión; ΔCp = capacidad calorífica.

6.5 Efecto de la incorporación de las proteínas animales y vegetales a los geles de mucina cruda y purificada

Para la incorporación de aislados de soya y grenetinas de piel de res a las mucinas, se prepararon disoluciones individuales de cada componente, mucinas y proteínas, a continuación se mezclaron en proporción 1:1, se sometió a Baño María durante 60 min, a 85 °C, las muestras obtenidas se dejaron enfriar y se mantuvieron en refrigeración por 24 horas.

En las Figuras 37, 38, 39 y 40 se muestran los termogramas de las mucinas incorporadas con proteínas. En las Tablas 15 y 16 se observan los parámetros térmicos obtenidos para estas mezclas.

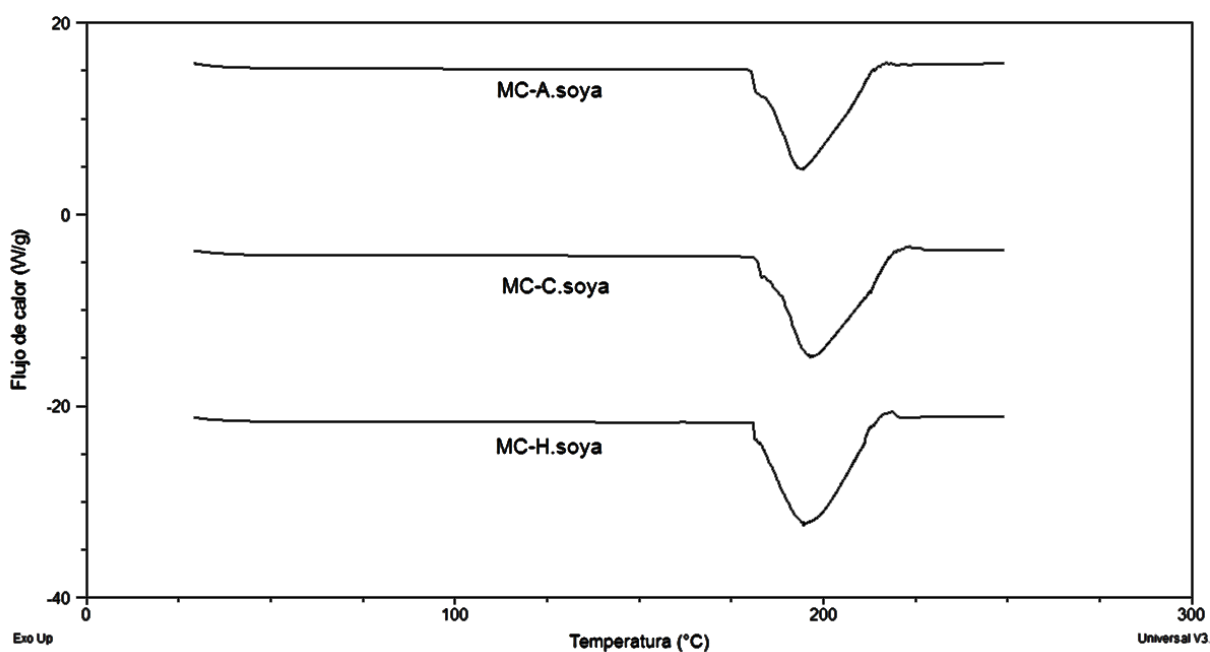


Figura 37. Termograma de los geles mucina cruda-proteínas de soya

MP = mucina purificada; MC = mucina cruda; A = aislado de soya; C = concentrado de soya; H = harina de soya.

Tabla 15. Transiciones térmicas de geles de mucinas incorporados con proteínas de soya

Muestra	Parámetros térmicos				
	TP ₁ (°C)	TP ₂ (°C)	ΔH (J/g)	ΔC _p (J/g °C)	
MC-A. soya	-	-	191.07 ± 4.55	1067.50 ± 20.50	49.10 ± 4.18
MC-C. soya	-	-	197.01 ± 0.65	1173.50 ± 23.50	48.57 ± 2.31
MC-H. soya	-	-	196.28 ± 0.09	1166.50 ± 50.50	56.27 ± 3.57
MP-A. soya	-	-	199.64 ± 3.25	986.95 ± 56.05	42.34 ± 7.11
MP-C. soya	-	-	195.44 ± 0.00	1056.50 ± 51.50	46.22 ± 2.70
MP-H. soya	-	-	195.00 ± 1.38	943.70 ± 22.20	50.23 ± 12.86

TP₁ = temperatura de fusión en el primer pico de transición TP₂ = temperatura de fusión en el segundo pico de transición; MC = mucina cruda; MP = mucina purificada; A = aislado de soya; C = concentrado de soya; H = harina de soya;

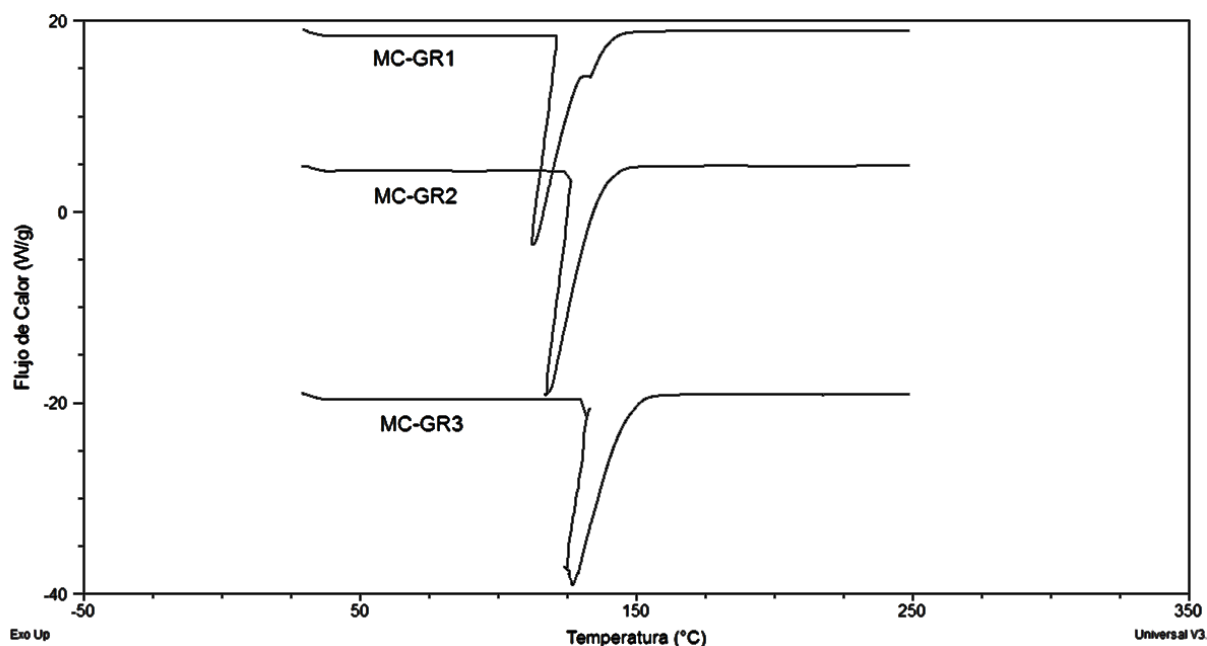


Figura 38. Comportamiento térmico de los geles mucina cruda-grenetinas

MP = mucina purificada; MC = mucina cruda; GR1=grenetina de res Bloom 200; GR2=grenetina de res Bloom 225; GR3=grenetina de res Bloom 180.

Primero cabe destacar que, los geles de mucina cruda-proteínas de soya, mucina purificada-proteínas de soya y mucina purificada-grenetinas, presentan valores muy similares de punto de fusión siendo estos, de 191 – 207 °C aproximadamente. Sin embargo, las mezclas de mucina cruda-grenetinas, presenta un punto de fusión inferior siendo estos de 114 – 118 °C.

En diferentes estudios realizados con grenetinas, como el llevado a cabo por Mendieta-Taboada et al., (2008) se ha observado que al mezclar las grenetinas con biopolímeros, la grenetina contribuye a aumentar el efecto plastificante; es decir, contribuye a aumentar la movilidad molecular y por lo tanto el biopolímero se vuelve menos estable, esto tiene un efecto en la disminución de la temperatura de fusión, como se observa en las mezclas mucina cruda-grenetinas.

Para las mezclas mucinas-proteínas en general, la presencia de un solo pico de transición es indicativo de la formación interacciones entre las estructuras de los componentes, es decir formación de enlaces hidrógeno y de fuerzas de Van der Waals (Patel et al., 2003).

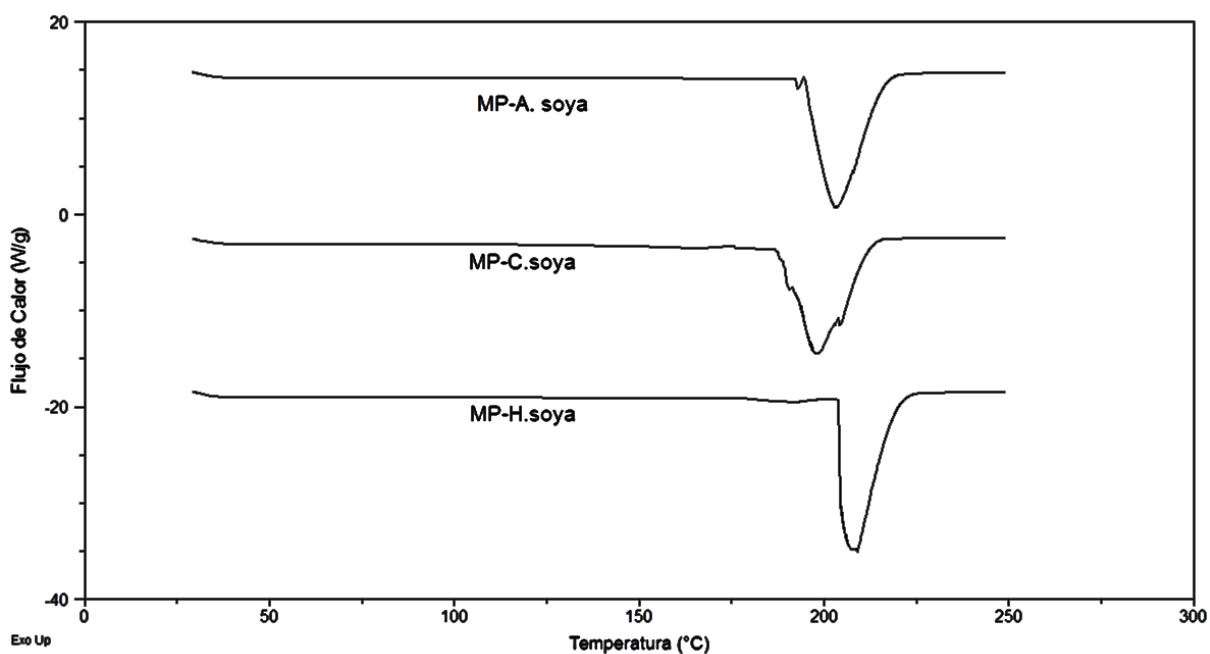


Figura 39. Transiciones térmicas de los geles mucina purificada- proteínas de soya
MP = mucina purificada; A = aislado de soya; C = concentrado de soya; H = harina de soya.

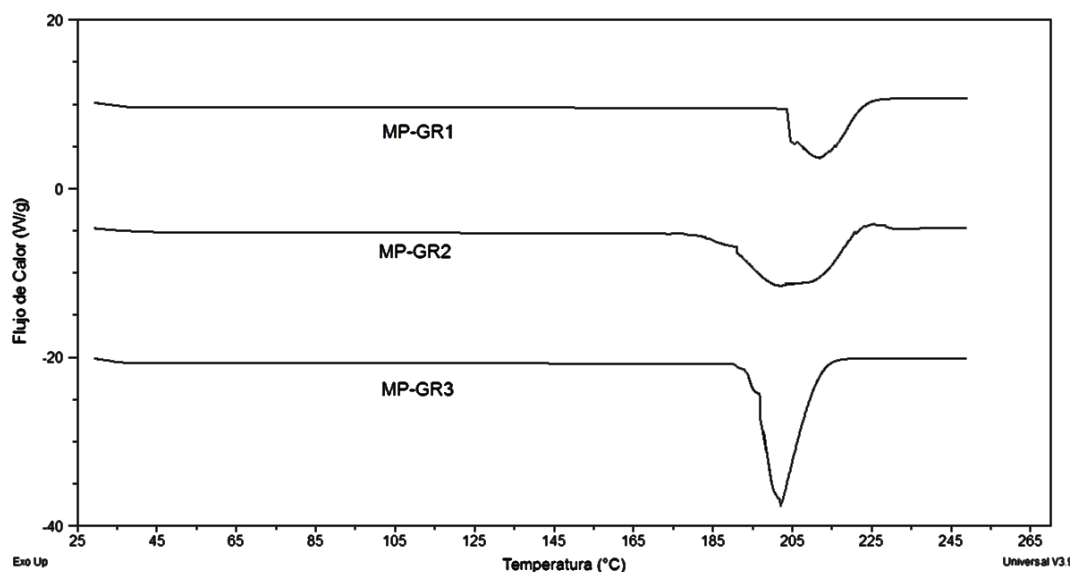


Figura 40. Termogramas de los geles mucina purificada-grenetinas

MP = mucina purificada; GR1=grenetina de res Bloom 200; GR2=grenetina de res Bloom 225; GR3=grenetina de res Bloom 180

Estas interacciones, son debido a transiciones de orden-desorden que se llevan a cabo en las moléculas a partir del calentamiento al que son sometidas. El pico principal de transición se atribuya al ordenamiento de las cadenas presentes en las mucinas, permitiendo una asociación o interacción con las proteínas con las que se mezclan (Fitzpatrick *et al.*, 2013), esto indica además que los componentes poliméricos son miscibles, reflejando la contribución de interacciones de cada uno de los componentes individuales (Mendieta-Taboada *et al.*, 2008).

Tabla 16. Parámetros térmicos de geles de mucinas incorporados con grenetinas

Muestra	Parámetros térmicos							
	TP ₁ (°C)	TP ₂ (°C)	ΔH (J/g)		ΔCp (J/g °C)			
MC-GR1	-	-	118.42	± 6.00	1126.5	± 57.50	28.60	± 2.42
MC-GR2	-	-	114.66	± 3.17	1231.5	± 80.50	41.31	± 10.98
MC-GR3	-	-	117.55	± 9.00	1265.5	± 21.50	34.87	± 0.26
MP-GR1	-	-	207.11	± 1.22	608.3	± 188.45	36.87	± 15.17
MP-GR2	-	-	199.11	± 5.77	716.4	± 14.85	33.94	± 4.13
MP-GR3	-	-	197.38	± 2.91	891.7	± 148.25	40.07	± 0.67

MC = mucina cruda; MP = mucina purificada; GR1=grenetina de res Bloom 200; GR2=grenetina de res Bloom 225; GR3=grenetina de res Bloom 180

6.6 Espectro de absorción óptico de los sistemas binarios mucinas-proteínas

En las Figuras 41, 42, 43, 44, 45 y 46 se observa el espectro de absorción de los geles de mucinas, proteínas de soya y proteínas de res, tanto individualmente como los geles de mucinas incorporados con proteínas. En la sección 5.3.2, 5.3.3 y 5.3.4 se describe detalladamente el proceso de obtención de éstas muestras.

En la Figura 41 se muestra el comportamiento del espectro de absorción óptico para los geles de mucina cruda y purificada a lo largo de la región ultravioleta (300 nm-400 nm) y visible (400-600 nm) es muy similar para ambas muestras; sin embargo, en el rango de 375 nm– 425 nm se observa una mayor absorción óptica en la mucina cruda, este comportamiento puede indicar la presencia de algún componente que no se observa en la mucina purificada, como podría ser el ácido siálico, que en la mucina purificada se encuentra en menor porcentaje. La mayor absorción óptica produce un calentamiento mayor en la muestra en esas longitudes de onda, teniendo como consecuencia, una mayor señal fotoacústica.

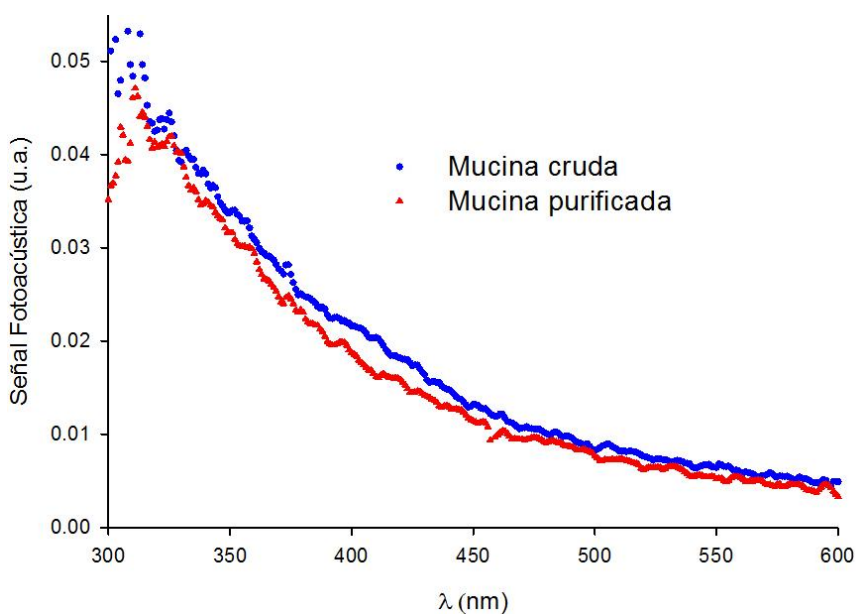


Figura 41. Espectro de absorción óptico de geles de mucinas cruda y purificada

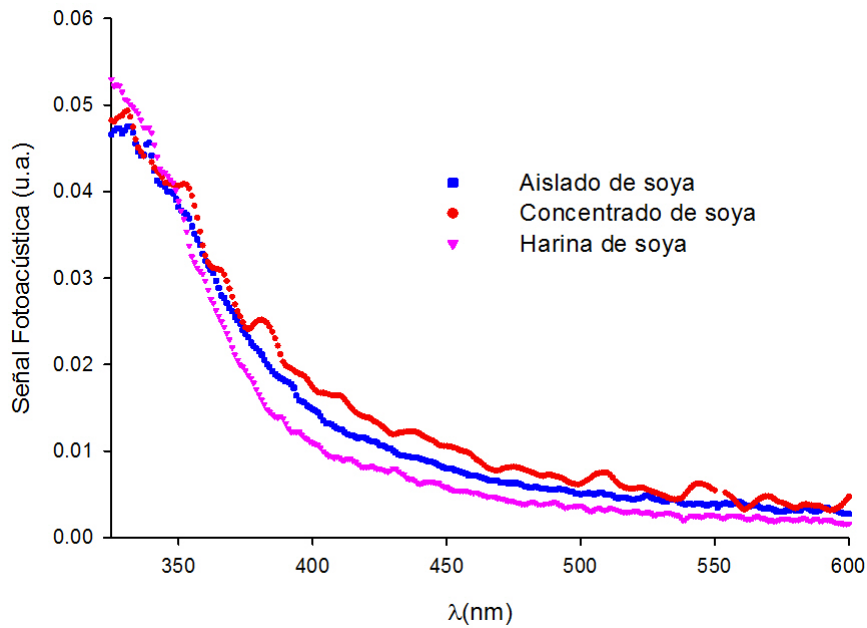


Figura 42. Espectro de absorción óptica de geles de proteínas de soja, aislado, concentrado y harina

Para los geles de aislados de soja, se puede observar que la mayor absorción óptica está en el rango de 312-375 nm (Ver Figura 42), presentando un comportamiento similar para las tres muestras. Es en este rango de longitudes de onda, donde se da un calentamiento mayor en estas muestras, se atribuye a la agregación o dimerización que tiene lugar en estos sistemas como lo reporta Del Monte y Levy, (1999), debido a la desnaturalización que sufren, por el proceso térmico al que son sometidos, para inducir la formación de geles.

En la Figura 43 se muestran los espectros de absorción para los geles de grenetinas de piel de res, se observa una mayor absorción en el rango de 305 nm-320 nm para las tres grenetinas, lo cual se ha atribuido a la agregación en el sistema, según reporta Del Monte y Levy, (1999). De la misma forma es posible observar que entre grenetinas las que presentan el mayor espectro de absorción son las GR1 y GR3 en el rango de

305 nm-320 nm correspondiente a la región ultravioleta, mientras que la GR2, en este mismo rango, presenta aproximadamente 3.9% menor absorción; sin embargo, en la región de 350 nm-450 nm los valores para las tres grenetinas se observan muy similares. La menor absorción en la GR2 está posiblemente asociado a la menor cantidad de agua liberada en el sistema, debido a que esta grenetina presenta el mayor grado de Bloom (una medida industrial estándar utilizada para indicar la resistencia mecánica de geles en grenetinas) permitiendo un mayor número de interacciones, principalmente de puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals

La Figura 44 se observan los espectros de absorción ópticos de los geles de mucina cruda adicionados con proteínas de soya y grenetinas de res.

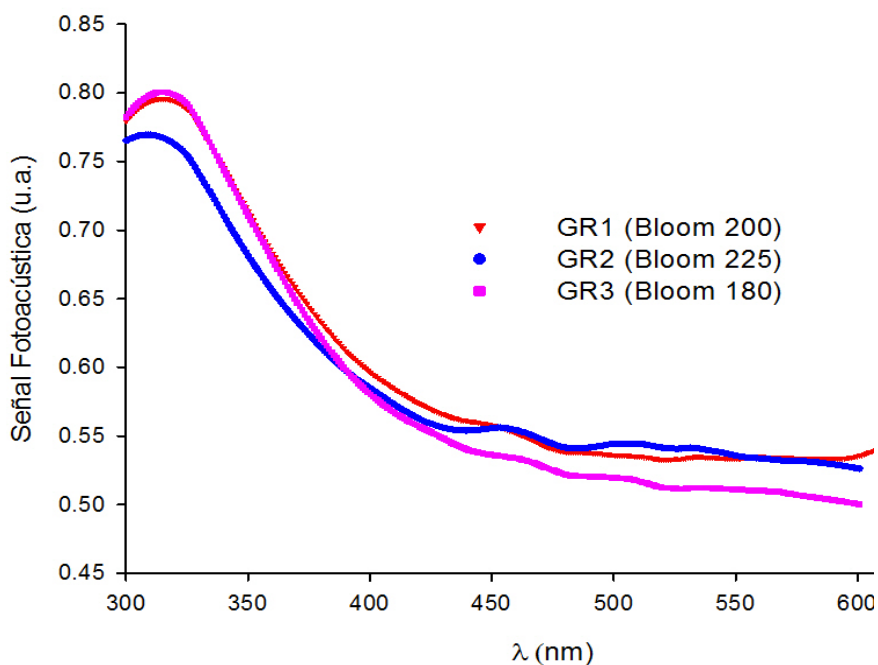


Figura 43. Señal fotoacústica vs longitud de onda en los geles de grenetina

GR1=grenetina de res Bloom 200; GR2=grenetina de res Bloom 225; GR3=grenetina de res Bloom 180

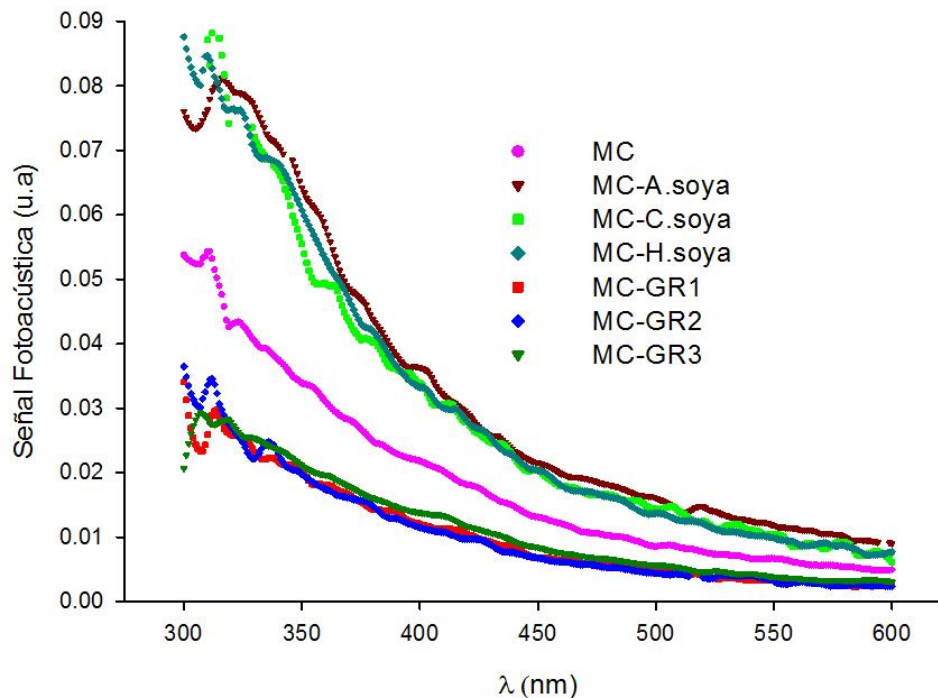


Figura 44. Señal fotoacústica vs la absorción para geles de mucina cruda-proteínas de soya y grenetinas de res

En los geles de mucina cruda-grenetinas se observa una mayor absorción óptica en el rango de 312 nm a 375 nm, mientras que en los geles de mucina cruda – proteínas de soya se observa una mayor absorción óptica, aproximadamente 35 %, respecto de los componentes individuales, indicando que los geles de mucina cruda con proteínas de soya favorecen la absorción óptica, debido, probablemente, a la mayor presencia de carbohidratos en la mucina cruda, que puedan contribuir a la formación de enlaces, principalmente hidrógeno, permitiendo un mayor flujo de calor.

En la Figura 45 se observa el espectro de absorción óptico de los geles de mucina purificada con proteínas de soya observándose un aumento de absorción (15.38%), respecto de sus componentes individuales, indicando una posible interacción entre estos componentes, lo que contribuye a forma enlaces, principalmente hidrógeno.

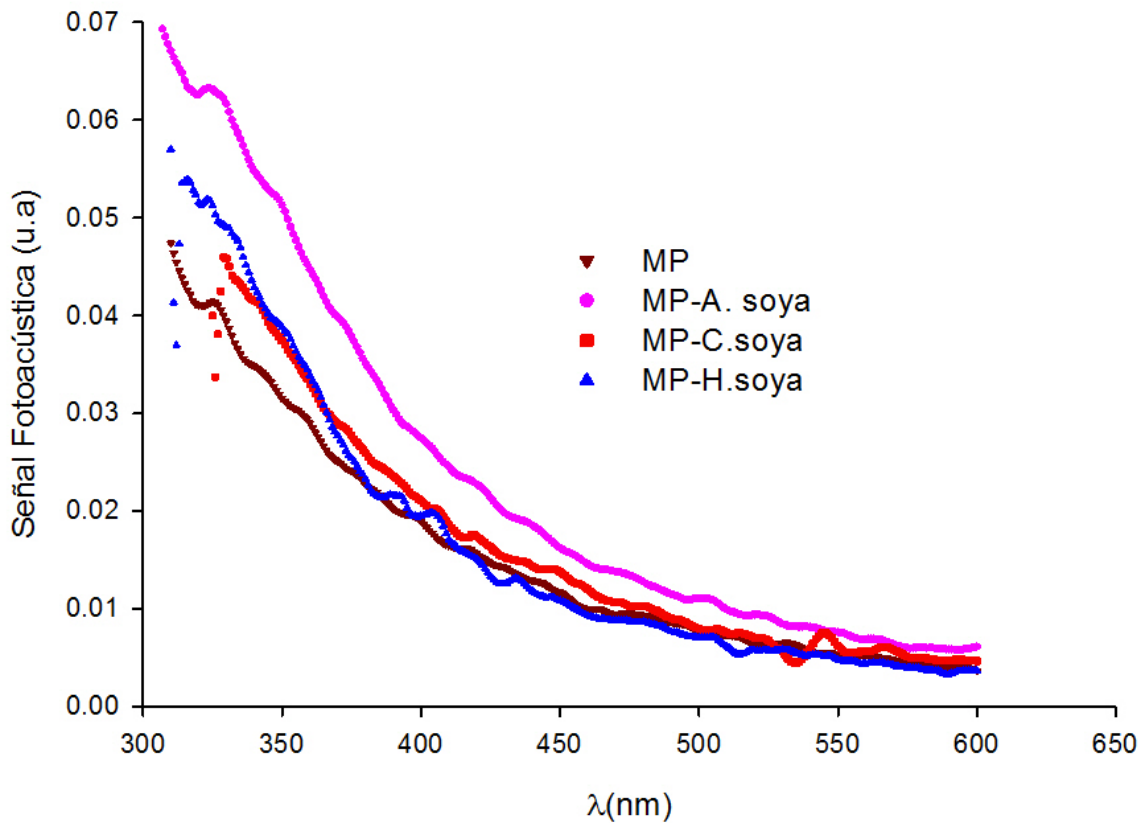


Figura 45. Espectro de absorción óptica de geles de mucina purificada-proteínas de soya
 MP = mucina purificada; A = aislado de soya; C = concentrado de soya; H = harina de soya

En la Figura 46 se observa el espectro de absorción óptica de los geles de mucina purificada incorporados con grenetinas. Se observa una mayor absorción óptica en el rango ultravioleta (310 nm – 400 nm), indicando, posiblemente, una interacción con enlaces (hidrógeno y fuerzas de Van der Waals) más débiles, en estos sistemas binarios.

En la Figura 47 se observa el espectro de absorción del ácido siálico y las mucinas (cruda y purificada), se observa un pico de absorción a los 400 nm en el ácido siálico; sin embargo no es posible determinar la naturaleza explícita del enlace.

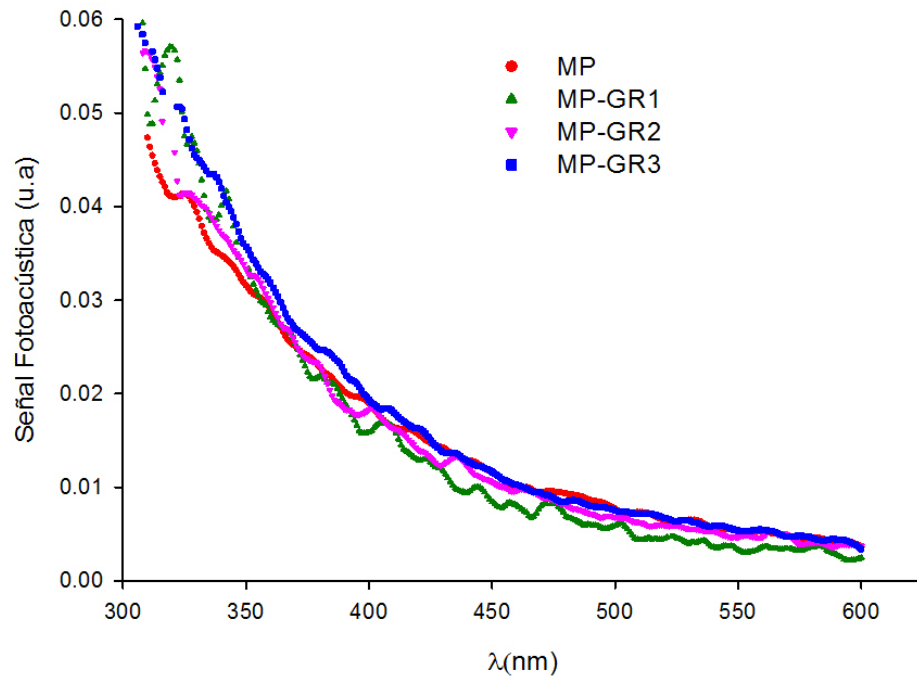


Figura 46. Espectro de absorción óptico de geles de mucina purificada-grenetinas

GR1=grenetina de res Bloom 200; GR2=grenetina de res Bloom 225; GR3=grenetina de res Bloom 180

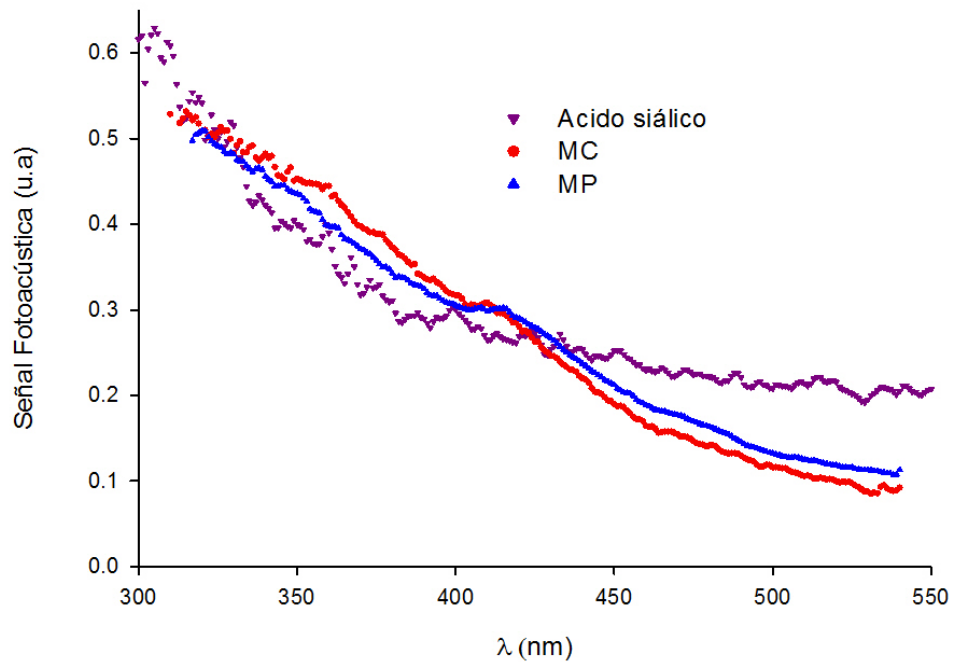


Figura 47. Señal fotoacústica vs longitud de onda del ácido siálico, mucina cruda y mucina purifica en polvo

6.7 Cálculo de la efusividad térmica de los geles complejos mediante técnicas fototérmicas

La metodología para la elaboración de los geles de mucinas incorporados con proteínas se describe en las secciones 5.3.2, 5.3.3 y 5.3.4. Para cada medición de efusividad térmica, se utilizó una señal fotoacústica de referencia, utilizando para esto la del aire. En la Figura 12 se observa el comportamiento típico de la señal fotoacústica en función de la frecuencia de modulación de la luz incidente, bajo estas condiciones se muestra la dependencia de $f^{-3/2}$ según la Ecuación 16. El cociente de la señal fotoacústica, expresado en la Ecuación 17 para el caso de agua destilada se observa en la Figura 13.

El valor del parámetro ajustado P_2 es proporcional a b en la Ecuación 17 y debido a que se utilizó una placa de silicio en la celda fotoacústica, entonces la relación de efusividades entre el silicio y la muestra con el parámetro P_2 está dada por la ecuación 25. En la figura 48 y 49, se observa la relación $SF_{\text{muestra}} / SF_{\text{silicio}}$, obtenida para el gel de harina de soya y el gel de mucina purificada incorporado con aislado de soya, en función de la frecuencia de modulación de la luz incidente. La línea continua representa el mejor ajuste de la Ecuación 17 a los datos experimentales.

$$e_s = 2P_2 e_{si} \rho_{si} \sqrt{\frac{\pi}{\alpha_{si}}} \quad (25)$$

Donde

e_s = efusividad de la muestra $\frac{W S^{1/2}}{cm^2 \circ C}$; P_2 = parámetro obtenido del ajuste; e_{si} = efusividad reportada del silicio $(1.5669 \frac{W S^{1/2}}{cm^2 \circ C})$; l_{si} = espesor del silicio en (cm) $(235 \times 10^{-4} \text{ cm})$; α_{si} = difusividad térmica del silicio $(0.8 \text{ cm}^2/\text{s})$.

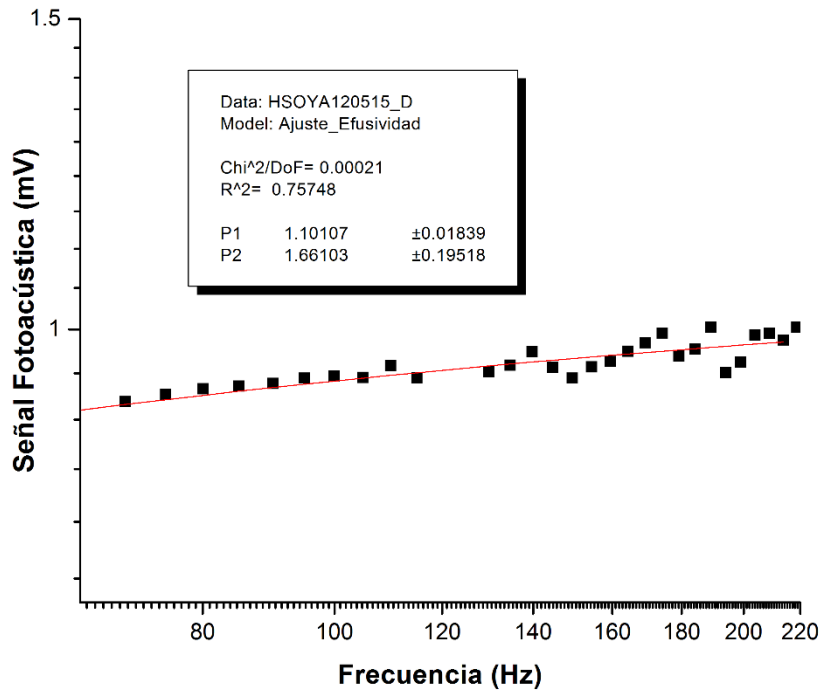


Figura 48. Ajuste para la obtención de efusividad en geles de harina de soya

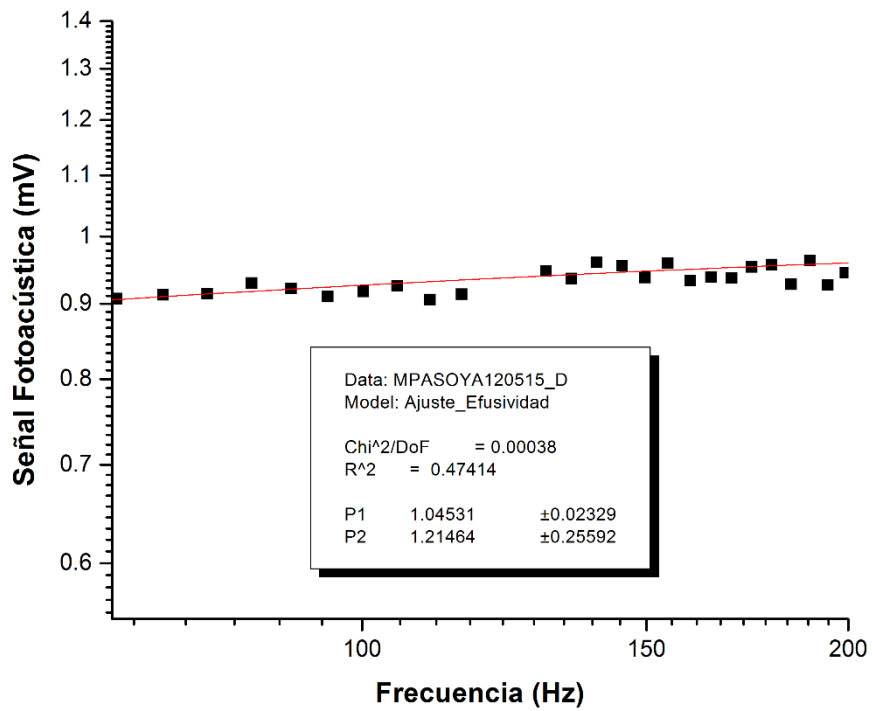


Figura 49. Ajuste para la obtención de efusividad en geles de mucina purificada-aislado de soya

Tabla 17. Valores obtenidos de efusividad en geles de mucinas (cruda y purificada), proteínas de soya, grenetinas de res y mezclas de mucinas-proteínas de soya y grenetinas de res

Muestra	Efusividad ($W s^{1/2} cm^{-2} °C^{-1}$)
Mucina Cruda	0.1421
Mucina Purificada	0.1750
Aislado de soya	0.1899
Concentrado de soya	0.2290
Harina de soya	0.2296
Grenetina de res (GR1)	0.1573
Grenetina de res (GR2)	0.1614
Grenetina de res (GR3)	0.1435
MC-A. soya	0.2627
MC-C. soya	0.2670
MC-H. soya	0.1598
MP-A. soya	0.1679
MP-C. soya	0.1418
MP-H. soya	0.1533
MC-GR1	0.1935
MC-GR2	0.1782
MC-GR3	0.1703
MP-GR1	0.1417
MP-GR2	0.1580
MP-GR3	0.1507

MC = mucina cruda; MP = mucina purificada; A = aislado de soya; C = concentrado de soya; H = harina de soya; GR1=grenetina de res Bloom 200; GR2=grenetina de res Bloom 225; GR3=grenetina de res Bloom 180

En la Tabla 17 se observan los valores de la efusividad térmica obtenida para los geles de mucinas (cruda y purificada), proteínas de soya y grenetinas de res; así como los geles de mucinas, incorporados con proteínas de soya y grenetinas de res.

La efusividad térmica de la mucina purificada obtenida es de $0.1750 \frac{Ws^{1/2}}{cm^2°C}$, por otro

lado, la de la mucina cruda se obtuvo un valor menor, de $0.1421 \frac{Ws^{1/2}}{cm^2°C}$ mostrando así

que la mucina purificada tiene una mayor capacidad para intercambiar calor con los alrededores y se esperaría una mayor conductividad térmica para este sistema, debido a que la efusividad térmica está directamente relacionada a la conductividad térmica, mediante la relación $e = \sqrt{k\rho c}$, donde e es la efusividad térmica, k la conductividad térmica y c el calor específico.

Los valores de efusividad obtenidos para las grenetinas de piel de res estuvieron en el rango de $0.1435 - 0.1614 \frac{Ws^{1/2}}{cm^2\text{°C}}$, este rango se encuentra muy cercano al valor de la efusividad térmica del agua, el cual está reportada entre $0.1560 - 0.1580 \frac{Ws^{1/2}}{cm^2\text{°C}}$, esto asociado a la gran cantidad de agua presente en estos sistemas, aproximadamente 94% de agua. Los mayores valores de efusividad se presentan en las proteínas de soya, siendo $0.1899 \frac{Ws^{1/2}}{cm^2\text{°C}}$ para el aislado, $0.2290 \frac{Ws^{1/2}}{cm^2\text{°C}}$ para el concentrado y $0.2296 \frac{Ws^{1/2}}{cm^2\text{°C}}$ para la harina, como es posible observar, mientras menor sea el contenido de proteína, se observa una mayor efusividad en estos sistemas, esto asociado a mayores interacciones (puentes de hidrógeno, Fuerzas de Van der Waals) que se forman con el mayor contenido de proteína, como sugiere (Yañez-Limón *et al.*, 1995).

En los geles de mucina cruda- proteínas de soya se observan valores de efusividad térmica de $0.2670 \frac{Ws^{1/2}}{cm^2\text{°C}}$ con la adición de concentrado, $0.2627 \frac{Ws^{1/2}}{cm^2\text{°C}}$ con la adición de aislado de soya y de $1597 \frac{Ws^{1/2}}{cm^2\text{°C}}$ para la harina, los geles de proteínas de soya con mucina purificada muestra valores de $1418-1679 \frac{Ws^{1/2}}{cm^2\text{°C}}$, indicando con esto que las mezclas con mucina purificada intercambian menor cantidad de calor con sus alrededores, que la mezcla con mucina cruda; es decir, que la mucina cruda puede

estar contribuyendo a que exista una mayor conducción de calor a través de ella, en comparación con la mucina purificada, debido a la mayor presencia de carbohidratos en la mucina purificada.

En los geles de mucina purificada-proteínas de soya y grenetinas de res se observan valores muy cercanos al valor de la efusividad térmica del agua $0.1417-0.1678 \frac{W s^{1/2}}{cm^2 \text{ } ^\circ C}$ en los geles de mucina purificada-proteínas de soya al igual que los geles de mucina purificada con grenetinas se observa un comportamiento muy similar al de la mucina purificada, indicando que no existe una fuerte interacción entre estos componentes ya que no está afectada de manera significativa la efusividad térmica de la mucina purificada al incorporar proteínas de soya y grenetinas de res.

A medida que las reacciones de entrecruzamiento entre componentes progresan, como en el caso de los geles de mucina cruda incorporados con grenetinas y proteínas de soya, la estructura de las muestras cambian, como resultado se espera que exista un aumento de la difusividad térmica y por consiguiente de la efusividad térmica como lo indica Yañez-Limón et al., (1995).

VII CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

Por los resultados obtenidos en el presente estudio se concluye:

1. Se determinaron las temperaturas de transición térmica de los siguientes componentes, mucina cruda, mucina purificada, aislado de soya, concentrado de soya, harina de soya y grenetinas de piel de res, en polvo y en forma de gel, así como las mezclas de mucinas-proteínas en polvo y geles de mucinas (cruda y purificada) incorporados con proteínas de soya y grenetinas de res.
2. Se observaron dos picos de desnaturalización correspondientes a la mucina cruda $T_{p1}=136.53^{\circ}\text{C}$ y $T_{p2}=213.06^{\circ}\text{C}$, en el caso de la mucina purificada, se observaron igualmente dos picos de desnaturalización, $T_{p1}=165.82^{\circ}\text{C}$ y $T_{p2}=203.80^{\circ}\text{C}$.
3. La entalpía de fusión en el caso de la mucina purificada fue 78.96% mayor con respecto a la mucina cruda y la capacidad calorífica fue de 89.56 % mayor en la mucina purificada.
4. Se obtuvieron dos picos de desnaturalización, para el aislado, concentrado y harina de soya; los valores para el primer pico fueron 54.91, 58.79 y 53.34 °C, respectivamente. El segundo pico mostró valores de 124.87, 119.68 y 129.44 °C. Estos picos corresponden a los componentes principales de la soya (7S y 11S).
5. En las grenetinas de res se observaron valores de T_{p1} muy similares (75.96 °C, 75.99 °C y 76.89 °C); sin embargo, en el segundo pico de desnaturalización, GR1 y GR2, mostraron valores similares (122.92 °C y 123.49 °C), GR3 mostró un pico de desnaturalización a los 155.04 °C. La GR2 con el mayor grado de Bloom presentó la mayor entalpía de fusión.

6. En los geles de mucina cruda-proteínas predominó el comportamiento de la mucina (cruda y purificada) indicando que estas glicoproteínas pueden actuar como protectores contra la desnaturalización de las proteínas.

7. Los termogramas de las mezclas mucina purificada-proteínas en polvo, presentaron dos picos de desnaturalización, tanto en las mezclas con proteínas de soya como grenetinas de piel de res, mostrando una variación respecto de la mucina purificada individual, ya que ésta presentó valores de 165.82 °C en el primer pico de transición T_{p1} y 203.80 °C para el segundo T_{p2} , mientras que en las mezclas con soya se obtuvieron valores de 49.89 – 52.77 °C en el primer pico de transición T_{p1} y 145 – 195 °C en el segundo T_{p2} .

8. En las mezclas de mucina purificada-grenetinas en polvo se obtuvieron valores de 45.96-51.15 °C en la T_{p1} y 117.98 – 164.16 °C para la T_{p2} .

9. La viscosidad intrínseca (η) para la mucina cruda fue de 54.76 y para la mucina purificada fue de 54.69. El peso molecular obtenido fue de 2.033×10^6 para la mucina cruda y 2.031×10^6 para la mucina purificada.

10. El comportamiento térmico de los geles se realizó mediante calorimetría diferencial de barrido. En los geles de mucina se observó la presencia de un solo pico de transición, indicando la formación de enlaces en presencia del disolvente.

11. Los geles de soya mostraron la presencia de un solo pico de desnaturalización indicando la desnaturalización de uno de los componentes principales de la soya (7S), durante el proceso de gelificación.

12. Los geles de grenetina presentaron dos picos de transición en el termograma, el primer pico corresponde a la temperatura de transición vítrea característica de este tipo de geles y el segundo pico a la temperatura de fusión.

13. La incorporación de proteínas a los geles de mucinas, mostró lo siguiente, los geles mucina cruda -proteínas de soya, mucina purificada-proteínas de soya y mucina purificada-grenetinas, presentaron valores muy similares de punto de fusión siendo estos, de 191 – 207 °C aproximadamente.

14. Los geles de mucina cruda-grenetinas, presentaron un punto de fusión inferior siendo estos de 114 – 118 °C. Para los geles de mucinas–proteínas en general, la presencia de un solo pico de transición es indicativo de la formación de interacciones entre las estructuras de los componentes (mucinas-proteínas), es decir formación de enlaces hidrógeno y de fuerzas de van der Waals.

15. Se obtuvieron los espectros de absorción ópticos de los geles de mucinas y de éstas mucinas incorporadas con proteínas, en general los espectros indicaron mayor absorción óptica en la región ultravioleta del espectro.

16. Los valores obtenidos de efusividad térmica fueron $0.1750 \frac{W_S^{1/2}}{cm^2 \cdot ^\circ C}$ para la mucina purificada y de $0.1421 \frac{W_S^{1/2}}{cm^2 \cdot ^\circ C}$ para la mucina cruda.

17. Los valores de efusividad obtenidos para las grenetinas fueron 0.1435 – 0.1614 $\frac{W_S^{1/2}}{cm^2 \cdot ^\circ C}$. Los mayores valores de efusividad se presentaron en las proteínas de soya, siendo $0.1899 \frac{W_S^{1/2}}{cm^2 \cdot ^\circ C}$ para el aislado, $0.2290 \frac{W_S^{1/2}}{cm^2 \cdot ^\circ C}$ para el concentrado y $0.2296 \frac{W_S^{1/2}}{cm^2 \cdot ^\circ C}$ para la harina.

18. En los geles mucina cruda- proteínas de soya se observaron valores de efusividad térmica de $0.2670 \frac{Ws^{1/2}}{cm^2 \circ C}$ para la mucina incorporada con el concentrado de soya, $0.2627 \frac{Ws^{1/2}}{cm^2 \circ C}$ para el aislado de soya y de $0.1598 \frac{Ws^{1/2}}{cm^2 \circ C}$ para la harina, las mezclas de proteínas de soya con mucina purificada mostró valores de $0.1533-0.1679 \frac{Ws^{1/2}}{cm^2 \circ C}$.

19. Se obtuvieron valores de peso molecular de 54.7594 g/gmol para la mucina cruda y de 54.6926 g/gmol para la mucina purificada. Se observa una disminución de aproximadamente 0.1% en el peso molecular de la mucina purificada respecto a la cruda, esto es indicativo de pérdida de componentes, como los carbohidratos, presentes en la mucina cruda, durante el proceso de purificación al que se somete la mucina.

VIII. RECOMENDACIONES

8. RECOMENDACIONES

1. Realizar la mezcla de mucinas-proteínas variando la concentración 25:75, 75:25 y determinar los parámetros térmicos, para determinar la influencia de la concentración en el comportamiento térmico de estos sistemas.
2. Estudiar el efecto de sales y pH en mucinas incorporadas con proteínas.
3. Realizar la determinación del espectro de absorción óptico de las proteínas de soya y grenetinas en polvo.
4. Realizar un análisis mediante microscopía, de los geles incorporados con proteínas.
5. Realizar un análisis de los geles mediante espectroscopía infrarroja y rayos X.
6. Analizar el efecto de las pectinas de alto y bajo metoxilo en el comportamiento térmico de las mucinas.
7. Estudiar las propiedades reológicas de los geles de mucina incorporados con proteínas de soya y grenetinas de res.

IX BIBLIOGRAFÍA

9. BIBLIOGRAFÍA

- Allen, A., Pain, R. H., Robson, T. R. (1976). Model for the structure of the gastric mucous gel. *Nature*, 264, 88-89.
- Badui Dergal, S. (2006). Química de los alimentos. Pearson Educación. Capítulo 3, 119-256.
- Bainy, E., Tosh, S., Corredig, M., Woodrow, L., Poysa, V. (2008). Protein Subunit Composition Effects on the Thermal Denaturation at Different Stages During the Soy Protein Isolate Processing and Gelation Profiles of Soy Protein Isolates. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 85, 581-590.
- Balderas-López, J. A., Gutiérrez-Juárez, G., Jaime-Fonseca, M. R., Sánchez-Sinencio, F. (1999). Measurements of thermal effusivity of liquids using a conventional photoacoustic cell. *Review of Scientific Instruments*, 70, 2069-2071.
- Banerjee, S., Bhattacharya, S. (2012). Food gels: gelling process and new applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52, 334-346.
- Bansil, R., Turner, B. S. (2006). Mucin structure, aggregation, physiological functions and biomedical applications. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 11, 164-170.
- Baos, S. C., Phillips, D. B., Wildling, L., McMaster, T. J., Berry, M. (2012). Distribution of Sialic Acids on Mucins and Gels: A Defense Mechanism. *Biophysical Journal*, 102, 176-184.
- Bhattacharya, S., Jena, R. (2007). Gelling behavior of defatted soybean flour dispersions due to microwave treatment: Textural, oscillatory, microstructural and sensory properties. *Journal of Food Engineering*, 78, 1305-1314.
- Cesàro, A., Cuppo, F., Fabri, D., Sussich, F. (1999). Thermodynamic behavior of mixed biopolymers in solution and in gel phase. *Thermochimica Acta*, 328, 143-153.
- Clark, A., Ross-Murphy, S. (1987). Networks from Disordered Biopolymers. *Biopolymers*. Springer Berlin Heidelberg. Capítulo 4, 107-142.
- Colombo, A., Ribotta, P. D., Leon, A. E. (2010). Differential scanning calorimetry (DSC) studies on the thermal properties of peanut proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 4434-4439.
- Conde-Gallardo, A., Cruz-Orea, A., Tomas, S. A. (2004). Interference Effects in Photoacoustic and Reflectance Spectroscopies on TiO₂/Si Structures and TiO₂ Band Gap. *Applied Spectroscopy*, 58, 917-921.
- Cone, R. A. (2009). Barrier properties of mucus. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61, 75-85.
- Cowin, S. C., Doty, S. B. (2007). Tissue Mechanics. In: COWIN, S., DOTY, S. (eds.) *Tissue Mechanics*. Springer New York. Capítulo 10, 289-339.
- Dahan, E., Sundararajan, P. R. (2013). Thermoreversible physical gels of poly(dimethylsiloxane) without cross-links or functionalization. *Langmuir*, 29, 8452-8458.

- Del Monte, F., Levy, D. (1999). Spectroscopy and optical properties of HITC-doped silica sol-gel glasses. *Optical Materials*, 13, 17-25.
- Delgado Reyes, V. A. (2013). *Efecto de la concentración, pH, temperatura y cationes en las propiedades viscoelásticas, térmicas y ópticas de geles de mucina*. Tesis de Doctorado en Ciencias, especialidad Biotecnología, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politecnico Nacional.
- Desseyne, J.-L., Tetaert, D., Gouyer, V. (2008). Architecture of the large membrane-bound mucins. *Gene*, 410, 215-222.
- FAO. (2007). *Future expansion of soybean 2005-2014* [Online]. Available: http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/tcas/publications/policy_assistance_series_3.pdf.
- FAO. (2015). *Technology of production of edible flours and protein products from soybeans* [Online]. Available: <http://www.fao.org/docrep/t0532e/t0532e03.htm> [Accessed Julio 21, 2015 2015].
- Fitzpatrick, P., Meadows, J., Ratcliffe, I., Williams, P. A. (2013). Control of the properties of xanthan/glucomannan mixed gels by varying xanthan fine structure. *Carbohydrate Polymers*, 92, 1018-1025.
- Fogg, F. J., A Hutton, D. A., A Jumel, K., A Pearson, J. P., A Harding, S. E., A Allen, A. (1996). Characterization of pig colonic mucins. *Biochemical Journal*, 316, 937-942.
- Galuska, C. E., Maass, K., Galuska, S. P. (2015). Mass Spectrometric Analysis of Oligo- and Polysialic Acids. In: CASTILHO, A. (ed.) *Glyco-Engineering*. Springer New York.
- Gill, P., Moghadam, T. T., Ranjbar, B. (2010). Differential scanning calorimetry techniques: applications in biology and nanoscience. *Journal of Biomolecular Techniques*, 21, 167-193.
- Goldberg, B., Stacey, G. (2008). *Genetics and genomics of soybean*, Springer Science & Business Media. Capítulo 2, 3-17.
- Gómez-Guillén, M. C., Giménez, B., López-Caballero, M. E., Montero, M. P. (2011). Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *Food Hydrocolloids*, 25, 1813-1827.
- Gómez Ocampo, J. P. (2010). *Estudio de las propiedades fisicoquímicas y estructurales de geles de grenetinas nativas y adicionadas con hidrocoloides*. Tesis de Maestría en Ciencias, especialidad Biotecnología, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politecnico Nacional.
- Hatakeyama, T., Quinn, F. X. (1999). Thermal Analysis Fundamentals and Applications to Polymer Science. In: SONS, J. W. A. (ed.). Capítulo 1,2; 1-25.
- Hattrup, C. L., Gendler, S. J. (2008). Structure and function of the cell surface (tethered) mucins. *Annual Review of Physiology*, 70, 431-57.
- Hermansson, A. M. (1986). Soy protein gelation. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 63, 658-666.

- Höhne, G. W. H., Hemminger, W. F., Flammersheim, H.-J. (2003). *Differential Scanning Calorimetry*. Springer US. Capítulo 2, 1-298.
- Hulmes, D. J. S. (2008). Collagen Diversity, Synthesis and Assembly. In: FRATZL, P. (ed.) *Collagen*. Springer US. Capítulo 2, 15-41.
- Iijima, M., Hatakeyama, T., Hatakeyama, H. (2014). Gel–sol–gel transition of kappa-carrageenan and methylcellulose binary systems studied by differential scanning calorimetry. *Thermochimica Acta*, 596, 63-69.
- Jian, H., Xiong, Y. L., Guo, F., Huang, X., Adhikari, B., Chen, J. (2014). Gelation enhancement of soy protein isolate by sequential low- and ultrahigh-temperature two-stage preheating treatments. *International Journal of Food Science & Technology*, 49, 2529-2537.
- Johnson, C. M. (2013). Differential scanning calorimetry as a tool for protein folding and stability. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 531, 100-109.
- Kangii, J., Matsumura, Y., Mori, T. (1991). Characterization of texture and mechanical properties of heat-induced soy protein gels. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 68, 339-345.
- Kar, F., Arslan, N. (1999). Effect of temperature and concentration on viscosity of orange peel pectin solutions and intrinsic viscosity–molecular weight relationship. *Carbohydrate Polymers*, 40, 277-284.
- Kasapis, S. (2007). The effect of pressure on the glass transition of biopolymer/co-solute. Part I: The example of gelatin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 40, 491-497.
- Kočevár-Nared, J., Kristl, J., Šmid-Korbar, J. (1997). Comparative rheological investigation of crude gastric mucin and natural gastric mucus. *Biomaterials*, 18, 677-681.
- Kumar, R., Choudhary, V., Mishra, S., Varma, I. K. (2004). Enzymatically modified Soy Protein. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 75, 727-738.
- Kwon, H. J., Osada, Y., Gong, J. P. (2006). Polyelectrolyte Gels-Fundamentals and Applications. *Polymer Journal*, 38, 1211-1219.
- Lang, T., Hansson, G. C., Samuelsson, T. (2007). Gel-forming mucins appeared early in metazoan evolution. *The National Academy of Sciences of the USA*, 104, 16209-16214.
- Latinovic, O., Hough, L. A., Daniel Ou-Yang, H. (2010). Structural and micromechanical characterization of type I collagen gels. *Journal of Biomechanics*, 43, 500-505.
- Li, S., Wei, Y., Fang, Y., Zhang, W., Zhang, B. (2014). DSC study on the thermal properties of soybean protein isolates/corn starch mixture. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 115, 1633-1638.
- Libao-Mercado, A. J., De Lange, C. F. M. (2007). Refined methodology to purify mucins from pig colonic mucosa. *Livestock Science*, 109, 141-144.
- Liu, K., Hsieh, F.-H. (2007). Protein–Protein Interactions in High Moisture–Extruded Meat Analogs and Heat-Induced Soy Protein Gels. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 84, 741-748.

- Lopes Da Silva, J. A., Rao, A., M. (1999). Rheological Behavior of Food Gel Systems. *Rheology of Fluid and Semisolid Foods Principles and Applications*. Aspen Publishers, Inc. Capítulo 6, 319 – 356.
- Mbaherekire, B. J., Oryem–Origa, H., Kashambuzi, J., Mutumba, G. M., Nyangababo, J. T. (2003). Elemental Composition of Bean (*Phaseolus vulgaris*) and Soy Bean (*Glycine max L.*) Grown on Wood Ash Amended Soil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 70, 0817-0823.
- Mcdonald, M. B. (2013). *A Deeper Look At Seed Germination* [Online]. Available: <https://cropview.wordpress.com/2013/02/27/a-deeper-look-at-seed-germination/>.
- Mcguckin, M. A., Thornton, D. J. (2012). *Mucins Methods and Protocols*, Springer Protocols. Capítulo 2, 27-49.
- Mendieta-Taboada, O., Sobral, P. J. D. A., Carvalho, R. A., Habitante, A. M. B. Q. (2008). Thermomechanical properties of biodegradable films based on blends of gelatin and poly(vinyl alcohol). *Food Hydrocolloids*, 22, 1485-1492.
- Molina Ortiz, S. E., Añón, M. C. (2001). Enzymatic Hydrolysis of Soy Protein Isolates. DSC study. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 66, 489-499.
- Momoh, M. A., Adikwu, M. U., Ibezim, C. E., Ofokansi, K. C., Attama, A. A. (2010). Thermal characterisation of PEGylated mucin. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 3, 458-460.
- Morales, A., Kokini, J., L. (1997). Glass Transition of Soy Globulins Using Differential Scanning Calorimetry and Mechanical Spectrometry. *Biotechnology Progress*, 13, 624-629.
- Mori, H., Shimizu, K., Hara, M. (2013). Dynamic viscoelastic properties of collagen gels with high mechanical strength. *Materials Science and Engineering C*, 33, 3230-3236.
- Nishinari, K. (1997). Rheological and DSC study of sol-gel transition in aqueous dispersions of industrially important polymers and colloids. *Colloid and Polymer Science*, 275, 1093-1107.
- Normand, V., Muller, S., Ravey, J.-C., Parker, A. (2000). Gelation Kinetics of Gelatin: A Master Curve and Network Modeling. *Macromolecules*, 33, 1063-1071.
- Patel, M. M., Smart, J. D., Nevell, T. G., Ewen, R. J., Eaton, P. J., Tsibouklis, J. (2003). Mucin/Poly(acrylic acid) Interactions: A Spectroscopic Investigation of Mucoadhesion. *Biomacromolecules*, 4, 1184-1190.
- Peng, H., Martineau, L., Shek, P. (2008). Hydrogel-elastomer composite biomaterials: 3. Effects of gelatin molecular weight and type on the preparation and physical properties of interpenetrating polymer networks. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 19, 997-1007.
- Perez-Vilar, J., Eckhardt, A. E., Hill, R. L. (1996). Porcine submaxillary mucin forms disulfide-bonded dimers between its carboxyl-terminal domains. *The Journal Of Biological Chemistry*, 271, 9845-9850.

- Perez-Vilar, J., Mabolo, R. (2007). Gel-forming mucins. Notions from in vitro studies. *Histology and Histopathology, Cellular and molecular biology*, 22, 455-464.
- Qiu, L.-J., Chang, R.-Z. (2010). The Origin and History of Soybean. In: SINGH, G. (ed.) *The Soybean: botany, production and uses*, 1-23
- Rao, M. A. (2013). *Rheology of fluid, semisolid, and solid foods Principles and applications*, Springer. Capítulo 1, 1-26.
- Ravanagh, G., M., Ross-Murphy, S., B. (1998). Rheological characterisation of polymer gels *Progress in Polymer Science* 23, 533-562.
- Renard, D., Van De Velde, F., Visschers, R. W. (2006). The gap between food gel structure, texture and perception. *Food Hydrocolloids*, 20, 423-431.
- Renkema, J. M. S., Gruppen, H., Van Vliet, T. (2002). Influence of pH and Ionic Strength on Heat-Induced Formation and Rheological Properties of Soy Protein Gels in Relation to Denaturation and Their Protein Compositions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6064-6071.
- Renkema, J. M. S., Van Vliet, T. (2002). Heat-Induced Gel Formation by Soy Proteins at Neutral pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 1569-1573.
- Robert, K. M., David, A. B., Kathleen, M. B., Kennelly, P. J., Victor, W. R., P. Anthony, W. (2010). *Harper Bioquímica Ilustrada*. Mc Graw Hill, Capítulo 47, 506-527.
- Rodríguez, P., González De La Cruz, G. (2003). Photoacoustic measurements of thermal diffusivity of amylose, amylopectin and starch. *Journal of Food Engineering*, 58, 205-209.
- Roldan-Vargas, S., Smallenburg, F., Kob, W., Sciortino, F. (2013). Gelling by heating. *Scientific Reports*, 3, 2451.
- Rosas-Flores, W., Ramos-Ramírez, E. G., Salazar-Montoya, J. A. (2012). Geles, Avance y Perspectiva 2012. *Nueva Época*, 4, 1-10.
- Rosencwaig, A., Gersho, A. (1976). Theory of the photoacoustic effect with solids. *Journal of Applied Physics*, 47, 64-69.
- Schrieber, R., Gareis H. (2007). From collagen to gelatine. In: Gareis H. *Gelatine Handbook, Theory and Industrial Practice*. Wiley-VCH, 45-117.
- Sigma-Aldrich. (2015). *MSDS N-Acetylneuraminic acid* [Online]. Available: <https://www.sigmaaldrich.com/MSDS>.
- Sobral, P. J. A., Habitante, A. M. B. Q. (2001). Phase transitions of pigskin gelatin. *Food Hydrocolloids*, 15, 377-382.
- Sousa, I. N., Mitchell, J., Ledward, D., Hill, S., Beirão Da Costa, M. L. (1995). Differential scanning calorimetry of lupin and soy proteins. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 201, 566-569.
- Speyer, R. F. (1993). *Thermal Analysis of Materials*. Marcel Dekker, Inc. 1, 1-265.

- Szafner, G., Németh, C., Bicanic, D., Lantos, Z., Dóka, O. (2015). Photopyroelectric assessment of the thermal effusivity of fresh hen egg and of rehydrated egg powders. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 120, 363-368.
- Tam, A. (1986). Applications of photoacoustic sensing techniques. *Reviews of Modern Physics*, 58, 381-431.
- Tomas, S. A., Sammiguel, R. E., Cruz-Orea, A., Gomes Da Silvez, M., Sthel, M. S., Vargas, H., Miranda, L. C. M. (1998). Photoacoustic detection of water vapour permeability in ZrO₂-TiO₂ ceramic. *Measurement Science and Technology*, 9, 803-808.
- Tseretely, G. I., Smirnova, O. I. (1992). DSC study of melting and glass transition in gelatins. *Journal of thermal analysis*, 38, 1189-1201.
- Vargas, H., Miranda, L. C. M. (1988). Photoacoustic and related photothermal techniques. *Physics Reports (Review Section of Physics Letters)* 161, 43-101.
- Voynow, J. A., Rubin, B. K. (2009). Mucins, mucus, and sputum. *Chest*, 135, 505-512.
- Walkenström, P., Hermansson, A.-M. (1996). Fine-stranded mixed gels of whey proteins and gelatin. *Food Hydrocolloids*, 10, 51-62.
- Wang, H., Jiang, L., Fu, L. (2007). Properties of molded soy protein isolate plastics. *Journal of Applied Polymer Science*, 106, 3716-3720.
- Wang, Y., Wang, R., Chang, Y., Gao, Y., Li, Z., Xue, C. (2015). Preparation and thermo-reversible gelling properties of protein isolate from defatted Antarctic krill (*Euphausia superba*) byproducts. *Food Chemistry*, 188, 170-176.
- Wen, J., Arthur, K., Chemmalil, L., Muzammil, S., Gabrielson, J., Jiang, Y. (2012). Applications of differential scanning calorimetry for thermal stability analysis of proteins: qualification of DSC. *Journal of Pharmaceutical sciences*, 101, 955-64.
- Wolf, B. A. (2007). Polyelectrolytes Revisited: Reliable Determination of Intrinsic Viscosities. *Macromolecular Rapid Communications*, 28, 164-170.
- Yanez-Limon, M., Rodriguez, M. E., Alvarado-Gil, J. J., Zelaya-Angel, O., Sanchez-Sinencio, F., Cruz-Orea, A., Vargas, H., Figueroa, J. D. C., Martinez-Bustos, F., Martinez, J. L., Gonzalez-Hernandez, J., Arguello, C., Miranda, L. C. M. (1995). Photoacoustic measurements of thermal diffusivity and correlation with viscosity of instant corn dry masa flour. *Analyst*, 120, 1953-1958.
- Yang, Y., Campanella, O. H., Hamaker, B. R., Zhang, G., Gu, Z. (2013). Rheological investigation of alginate chain interactions induced by concentrating calcium cations. *Food Hydrocolloids*, 30, 26-32.
- Zamora Carranza, M. (1998). TERMO I In: SEVILLA, U. D. (ed.) *Un estudio de los sistemas termodinámicos*. Universidad de Sevilla, 38, 1-265.