

***UNIVERSIDAD DE OVIEDO***

**MASTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA**

**“SUBPRODUCTOS CÁRNICOS PARA  
PREPARAR BIOMATERIALES  
ALIMENTARIOS”**

**TRABAJO FIN DE MASTER**

**POR**

**LUCÍA BARREDA RODRÍGUEZ**

**JULIO, 2014**





Master en Biotecnología Alimentaria  
Universidad de Oviedo  
C/ Julián Clavería s/n. 33071 Oviedo. España  
Tel. 985106226. Fax 985103434. <http://www.unioviedo.es/MBTA>



**PROFESOR TUTOR:**

Dr. D. Manuel Rendueles de la Vega (Universidad de Oviedo)

**CERTIFICA:**

Que D. Lucía Barreda Rodríguez ha realizado bajo mi dirección el Trabajo Fin de Master al que corresponde la presente memoria en el contexto de los estudios del Master Universitario en Biotecnología Alimentaria, 8ª promoción curso 2013-2014.

Oviedo, 08 de Julio 2014

D. (Tutor)

VºBº

Manuel Rendueles de la Vega  
Coordinador del Master en Biotecnología Alimentaria

## **AGRADECIMIENTOS**

A Manuel Rendueles, por confiar en mí y brindarme la oportunidad de participar en la investigación de Biomateriales. Por ayudarme siempre que lo he necesitado, por animarme y apoyarme.

A Amanda, por transmitirme sus conocimientos sobre reología y ayudarme con los ensayos realizados en el Severo Ochoa.

A Carlos, que me prestó su colaboración en mis comienzos, que es cuando más se agradece.

A Cristina, Daniel y Kike, buenos trabajadores y mejores compañeros, que siempre estuvieron dispuestos a prestarme su ayuda.

A mis compañeros de Máster, y en especial a Isabel, Chengxi , Fangzhu y Lei con quienes establecí una sólida amistad.

A mi familia

# ÍNDICE

<b>RESUMEN.....</b>	<b>I</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>II</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>III</b>
<b>LISTA DE TABLAS.....</b>	<b>VI</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
A. ANTECEDENTES DEL TEMA.....	1
B. SITUACIÓN ACTUAL.....	2
C. OBJETIVOS.....	3
<b>1. CAPÍTULO 1. FUNDAMENTOS TEÓRICOS.....</b>	<b>4</b>
1.1. SUBPRODUCTOS DE ORIGEN ANIMAL.....	4
1.1.1. La sangre animal.....	4
a) Composición.....	4
b) Características físicas.....	5
c) Fracciones; plasma/suero y elementos formes.....	5
1.2. PROPIEDADES FUNCIONALES DE LAS PROTEÍNAS SANGUÍNEAS Y SU APLICACIÓN TECNOLÓGICA.....	11
1.3. GELES PROTEICOS SANGUÍNEOS.....	12
1.3.1. Geles.....	12
1.3.2. Aplicaciones de los geles plasmáticos.....	13
1.4. REOLOGÍA.....	15
1.4.1. Clasificación de los fluidos según su comportamiento reológico.....	15
1.4.1.1. Fluidos Newtonianos.....	16
1.4.1.2. Fluidos no Newtonianos.....	16
<b>2. CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>22</b>
2.1. PROCESADO DE SUBPRODUCTOS DE ORIGEN ANIMAL.....	22
2.1.1. Procedencia de la sangre.....	22
2.1.2. Separación de la sangre.....	22

2.1.2.1. Fraccionamiento de la sangre.....	22
2.1.2.2. Fraccionamiento del plasma.....	23
2.2. OBTENCIÓN DE GELES A PARTIR DE PROTEÍNAS SANGUÍNEAS.....	25
2.2.1. La estufa.....	25
2.2.2. El reómetro.....	26
2.2.2.1. Determinaciones reológicas.....	28
a) Barrido de temperatura.....	28
b) Barrido de estrés.....	28
c) Ensayos de fluencia y recuperación.....	29
2.2.3. La transglutaminasa.....	30
2.2.4. Retención de agua.....	31
2.2.5. Liofilización.....	31
2.2.6. Análisis de la microestructura (SEM).....	31
<b>3. CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>33</b>
3.1. OBTENCIÓN DE GELES A PARTIR DE PROTEÍNAS SANGUÍNEAS.....	33
3.1.1. Obtención de geles a partir de Plasma, sin transglutaminasa.....	33
3.1.1.2. Geles de plasma a pH5.....	33
3.1.2. Obtención de geles con transglutaminasa.....	37
3.1.2.1. Plasma.....	38
a) Plasma + 2 U/g de transglutaminasa.....	38
b) Plasma + 5 U/g de transglutaminasa.....	40
c) Plasma + 10U/g de transglutaminasa.....	42
3.1.2.2. Plasma liofilizado.....	44
a) Plasma liofilizado reconstituido diluido 1:10.....	44
b) Plasma liofilizado reconstituido 1:1.....	49
3.1.2.3. Albúmina.....	54
a) Geles de albúmina + 5U/g de transglutaminasa.....	54
b) Geles de albúmina + 7U/g de transglutaminasa.....	57
c) Geles de albúmina + 10U/g de transglutaminasa.....	59

d) Geles de albúmina + 12.5U/g de transglutaminasa.....	61
3.1.3. Estudio de la pérdida de agua en geles.....	65
3.1.4. Análisis de la microestructura (SEM).....	68
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>71</b>
<b>ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....</b>	<b>74</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>76</b>

### RESUMEN

Existen residuos procedentes de la industria alimentaria, que pueden ser recuperados y revalorizados. Tal es el caso de la sangre procedente de los mataderos, que se considera uno de los subproductos más problemáticos de la industria alimentaria, debido a su alto poder contaminante. Al mismo tiempo, la sangre, en este caso de origen bovino, tiene un alto contenido proteico con capacidad gelificante, y es esta propiedad la que se utiliza para sintetizar biomateriales (geles) con aplicaciones alimentarias. En este trabajo se trata de mejorar las propiedades físicas y funcionales de los geles aprovechando la adición de un enzima; la transglutaminasa, que mejora la resistencia, elasticidad y la capacidad de gelificación. De esta manera, podemos elegir los mejores para utilizarlos como películas protectoras en la industria alimentaria.

Se sintetizaron tres tipos de geles (geles de plasma, plasma liofilizado reconstituido y albúmina). Se les añadieron cantidades crecientes de transglutaminasa y a continuación se les caracterizó reológicamente y se hizo un estudio de retención de agua y un análisis de su estructura interna (SEM).

De todos los ensayos realizados, elegimos aquellos que obtuvieron mejores resultados reológicos y al mismo tiempo presentaban una estructura más homogénea; estos fueron los geles de albúmina ensayados con 5 U/g de transglutaminasa que, debido a su abundante retención de agua, podrían aplicarse a alimentos con alto porcentaje de humedad como son los cárnicos. Además, también se podrían utilizar geles de plasma ensayados con 5U/g de transglutaminasa, o geles de plasma liofilizado reconstituido no diluido, con esta misma concentración de transglutaminasa. Estos dos últimos tipos de geles, por presentar abundante pérdida de agua, podrían ser apropiados para alimentos con menos humedad como los productos de pastelería o repostería.

## **ABSTRACT**

Some wastes from the food industry, could be recovered and revalued. Such is the case of blood from slaughterhouses, which is considered one of the byproducts more problematic in the food industry, due to its high-polluting power. At the same time, blood, in this case of bovine origin, has high protein content with gelling capacity, and it is this property which is used to synthesize biomaterials (gels) with food applications. The aim of this work is improving the physical and functional properties of the gels through the addition of an enzyme, transglutaminase, which improves the strength, elasticity and the ability to gel. In this way, we can choose the best to use them as protective films in the food industry.

In this work, three types of gels were synthesized (whole plasma, reconstituted lyophilized plasma and albumin). Increasing amounts of transglutaminase were added to them and then they were submitted to a rheological characterization; a study of water retention and finally an analysis of its internal structure (SEM) were carried out.

Among all the tests, we chose those that presented best rheological results and at the same time had a more homogeneous structure; these were albumin gels tested with 5 u/g of transglutaminase which, because of its important water retention, may be applied to foods with a high percentage of humidity such as meat products. In addition, plasma gels tested with transglutaminase 5U/g may also be used, or undiluted reconstituted freeze-dried plasma gels, with this same concentration of transglutaminase. These last two types of gels, with higher water loss, would be appropriate for foods with less moisture pastry or confectionery products.



## LISTA DE FIGURAS

### **CAPÍTULO 1. FUNDAMENTOS TEÓRICOS**

Fig. 1. Esquema del fraccionamiento de la sangre.....	6
Fig. 2. Proceso de formación de un gel proteico.....	13
Fig. 3. Tipos de fluidos en función de su comportamiento reológico.....	15
Fig. 4. Esfuerzo cortante frente a gradiente de velocidad para fluidos NN independientes del tiempo.....	18

### **CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS**

Fig. 5. Esquema de la obtención de los componentes de la sangre.....	23
Fig. 6. Esquema del flujo de fraccionamiento de las proteínas plasmáticas.....	24
Fig. 7. Estufa P. Selecta.....	25
Fig. 8. Reómetro rotacional HAAKE MARS II.....	26
Fig. 9. Transglutaminasa.....	30

### **CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Fig. 10. Rampa de temperatura para la coagulación del plasma a pH 5.....	33
Fig.11. Barrido de esfuerzo sobre gel de plasma a pH 5.....	34
Fig.12. Barrido de esfuerzo sobre gel de plasma a pH5, duplicado.....	35
Fig.13. Ensayo de fluencia y recuperación sobre gel de plasma a pH 5.....	36
Fig.14. Duplicado de ensayo de fluencia y recuperación sobre gel de plasma a pH5.....	37
Fig.15. Ensayo de barrido de esfuerzo sobre gel de plasma pH 7 + 2U/g de transglutaminasa.....	38
Fig.16. Ensayo de Creep and Recovery sobre plasma a pH 7 + 2U/g de transglutaminasa.....	39

## LISTA DE FIGURAS

---

Fig.17. Ensayo de barrido de esfuerzo sobre plasma a pH 7 + 5 U/g de transglutaminasa.....	40
Fig.18. Ensayo de fluencia y recuperación o Creep and Recovery, sobre gel de plasma a pH 7+ 5 U/g de transglutaminasa.....	41
Fig.19. Ensayo de barrido de esfuerzo sobre plasma a pH 7 + 10U/g de transglutaminasa.....	42
Fig.20. Ensayo de Creep and Recovery sobre plasma a pH 7 + 10U/g de transglutaminasa.....	43
Fig.21. Barrido de esfuerzo sobre gel de plasma liofilizado reconstituido y diluido 1:10 + 7 U/g de transglutaminasa.....	45
Fig.22. Ensayo de Creep and Recovery sobre gel de plasma liofilizado reconstituido y diluido 1:10 + 7U/g de transglutaminasa.....	46
Fig. 23. Ensayo de barrido de esfuerzo sobre gel de plasma liofilizado reconstituido y diluido 1:10 + 10U/g de transglutaminasa.....	47
Fig.24. Ensayo de Creep and Recovery sobre gel de plasma liofilizado reconstituido y diluido 1:10 + 10U/g de transglutaminasa.....	48
Fig.25. Ensayo de barrido de esfuerzo sobre gel de plasma liofilizado y reconstituido 1:1 + 5U/g de transglutaminasa.....	50
Fig.26. Ensayo de Creep and Recovery sobre gel de plasma liofilizado y reconstituido 1:1 + 5U/g de transglutaminasa.....	51
Fig.27. Ensayo de barrido de esfuerzo sobre gel de plasma liofilizado y reconstituido 1:1 + 10U/g de transglutaminasa.....	52
Fig.28. Ensayo de Creep and Recovery sobre gel de plasma liofilizado y reconstituido 1:1 + 10U/g de transglutaminasa.....	53
Fig.29. Ensayo de barrido de esfuerzo sobre gel de albúmina + 5U/g de transglutaminasa.....	55
Fig.30. Ensayo de Creep and Recovery sobre gel de albúmina + 5U/g de transglutaminasa.....	56

## LISTA DE FIGURAS

---

Fig.31. Ensayo de Barrido de esfuerzo sobre gel de albúmina + 7U/g de transglutaminasa.....	57
Fig.32. Ensayo de Creep and Recovery sobre gel de albúmina + 7U/g de transglutaminasa.....	58
Fig.33. Ensayo de barrido de esfuerzo sobre gel de albúmina + 10U/g de transglutaminasa.....	59
Fig.34. Ensayo de Creep and Recovery sobre gel de albúmina + 10U/g de transglutaminasa.....	60
Fig.35. Ensayo de barrido de esfuerzo sobre gel de albúmina + 12.5 U/g de transglutaminasa.....	61
Fig.36. Ensayo de Creep and Recovery sobre gel de albúmina + 12.5 U/g de transglutaminasa.....	62
Fig. 37. Gel de plasma a pH5 sin transglutaminasa, sintetizado en reómetro.....	63
Fig.38. Gel de plasma a pH 7 + 5U/g de transglutaminasa.....	64
Fig.39. Gel de albúmina + 5U/g de transglutaminasa.....	64
Fig. 40. Geles de albúmina más 5U/g, 7U/g, 10U/g y 12,5U/g de transglutaminasa (de izquierda a derecha).....	65
Fig.41. Microestructura de un gel de plasma+5U/g de transglutaminasa.....	69
Fig.42. Microestructura de un gel de plasma liofilizado reconstituido sin diluir.....	69
Fig. 43. Microestructura de un gel de albúmina + 5U/g de transglutaminasa.....	70

## LISTA DE TABLAS

### CAPÍTULO 1. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

Tabla 1. Porcentaje de los componentes de la sangre.....	4
Tabla 2. Cantidad de sangre obtenida de los distintos animales de sacrificio.....	5
Tabla 3. Composición de cationes del plasma sanguíneo.....	7
Tabla 4. Composición de aniones del plasma sanguíneo.....	8
Tabla 5. Composición de derivados proteicos del plasma sanguíneo.....	8
Tabla 6. Composición de glúcidos y derivados metabólicos del plasma sanguíneo.....	9
Tabla 7. Composición de otras sustancias del plasma sanguíneo.....	9
Tabla 8. Composición química del plasma bovino.....	10
Tabla 9. Porcentaje de las distintas fracciones proteicas del plasma bovino.....	10

### CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 10. Retención de agua en plasma con 5U/g y 10U/g de transglutaminasa a lo largo de 60 días.....	66
Tabla 11. Retención de agua en plasma liofilizado diluido 1:10 con 5U/g ,7U/g y 10U/g de transglutaminasa.....	66
Tabla 12. Retención de agua en plasma liofilizado sin diluir con 5U/g y 10U/g de transglutaminasa.....	67
Tabla13. Retención de agua en gel de albúmina con 5U/g, 7U/g, 10U/g y 12,5u/g de transglutaminasa.....	67

## INTRODUCCIÓN

### A. ANTECEDENTES

Numerosos residuos procedentes de la industria alimentaria podrían ser susceptibles de ser recuperados y revalorizados. Un ejemplo de ello lo constituye la sangre, que puede considerarse como uno de los subproductos más problemáticos de la industria alimentaria debido a la gran cantidad que se genera y a su alto poder contaminante (6, 24). La eliminación de estos residuos constituye un importante valor añadido al proceso de producción, por tanto una solución a este problema sería la posibilidad de incorporar la sangre procedente de los mataderos a productos alimenticios o biomédicos.

En este proyecto se aprovecha la capacidad gelificante de las proteínas sanguíneas y plasmáticas (25) para la realización de biomateriales con aplicaciones alimentarias. Esta capacidad gelificante se pone de manifiesto con la temperatura y depende entre otras cosas del pH o la concentración de proteínas. Debido a la importancia de estas variables en los sistemas fisiológicos, biológicos y químicos, existen numerosos trabajos de investigación en los que se analiza la gelificación del plasma bajo cambios en dichos parámetros y sobre todo los usos que esos geles podrían tener. Otro aspecto importante a valorar es el uso de aditivos químicos (tipo dextranos, colágeno, transglutaminasa, etc) mezclados con los componentes proteicos de la sangre de forma que se mejoren las propiedades físicas y funcionales de los biomateriales generados. Existen trabajos como: "Sequential preheating and transglutaminase pretreatments improve stability of whey protein isoclate at pH 7.0 during thermal sterilization" (26) y "Bovine serum albumin-imprinted polymer gels prepared by graft copolymerization of acrylamide on chitosan" (27), que han comenzado a desarrollar los aspectos que se estudiarán en este trabajo.

Se dispone de una experiencia previa en la preparación de biomateriales de sangre, muy en particular a partir de componentes de la sangre porcina (1). Las propiedades de los geles obtenidos son muy dependientes del tipo de proteínas presentes, su concentración, su pH y su modo de fabricación (por ejemplo la temperatura de gelificación). Estos resultados previos del grupo de investigación nos permiten ver el camino que se debe seguir en este proyecto.

## INTRODUCCIÓN

---

En cuanto a la industria alimentaria, existen trabajos del grupo de investigación, como por ejemplo en el trabajo “Caracterización reológica de los geles de fibrinógeno y gamma globulinas de plasma porcino” (25), donde se ha comenzado a vislumbrar que estos geles podrían tener múltiples aplicaciones en la industria alimentaria. En primer lugar podrían ser usados como aditivos, ya que presentan un alto contenido en proteínas y una buena capacidad de retención de agua. También, gracias a su buena capacidad gelificante, podrían emplearse como espesantes. Además existe una aplicación con grandes posibilidades de uso que consiste en emplear estos geles como productos para proteger alimentos. Esto es posible gracias a su excelente resistencia, elasticidad y capacidad de retención de agua.

### **B. SITUACIÓN ACTUAL**

La finalidad principal de este proyecto es el desarrollo de metodologías sencillas en la manipulación y síntesis de los materiales obtenidos en la separación de componentes de la sangre, y la fabricación de biomateriales (en este caso geles de plasma y albúmina) a partir de estos componentes. También en este trabajo se trata de mejorar las propiedades físicas y funcionales de estos biomateriales aprovechando la disponibilidad de aditivos, en nuestro caso el enzima transglutaminasa, que mejora la resistencia, la elasticidad y la capacidad de gelificación. Estos materiales podrán ser utilizados en la industria alimentaria como protectores de alimentos, evitando el uso de otros materiales sintéticos que pueden producir efectos perjudiciales para la salud como alergias o intolerancias a estas sustancias sintéticas. El uso de los geles proteicos permite por otro lado la valorización de las proteínas sanguíneas, que en gran parte son eliminadas como subproductos por las industrias.

Esta aplicación implica un conocimiento profundo de los procesos de gelificación en diferentes condiciones experimentales, por otro lado resulta de interés el conocimiento reológico de los materiales, ya que se debe diseñar de forma que puedan presentar propiedades físicas y funcionales adecuadas a los usos que en este trabajo se proponen.

Desde el punto de vista medioambiental y como punto de partida del proyecto, la finalidad inicial es conseguir el aprovechamiento de un residuo con un elevado contenido en proteína como es la sangre y que produce altos costes de tratamiento en mataderos debido a su alto poder contaminante.

### **C. OBJETIVOS**

1- Se pretende dar una alternativa de valorización de un residuo problemático como es la sangre y convertirlo en productos de más alto valor añadido utilizando para ello tecnologías limpias y medioambientales compatibles. El disponer de materiales naturales para la preservación de alimentos sería susceptible de ser industrializado y comercializado.

2- Desarrollar una tecnología de síntesis de geles de plasma y albúmina que responda a los usos alimentarios que se proponen.

3- Caracterizar física y funcionalmente los biomateriales para que sirvan como biopelículas de protección de alimentos. Para ello se realizarán pruebas reológicas: barrido de temperatura, barrido de esfuerzo y fluencia y recuperación, además se harán un estudio de la capacidad de retención de agua y un estudio de la microestructura.

4- Se pretende, mediante el uso de diferentes compuestos, desarrollar materiales que permitan mejorar la calidad de los geles, por eso en este estudio se pretende ir más allá experimentando con el enzima transglutaminasa, que mejora la resistencia, retención de agua, firmeza, termoestabilidad y la textura de los geles.

5- Desarrollar aplicaciones en alimentos de origen principalmente cárnico, así como también en repostería y panadería, dónde se estudiará en un futuro la capacidad de preservación de los geles y su inocuidad.

## CAPÍTULO 1. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

### 1.1. SUBPRODUCTOS DE ORIGEN ANIMAL

#### 1.1.1. LA SANGRE ANIMAL

##### a) Composición

**Tabla 1. Porcentaje de los componentes de la sangre (6)**

	<b>sangre entera</b>
Sólidos totales (%)	18-20
Proteína (%)	13-15
Grasa (%)	< 1
Carbohidratos (%)	< 1
Sales (%)	2
Agua (%)	80-82

La sangre es un líquido viscoso consistente en una suspensión de elementos formes (leucocitos, hematíes y plaquetas) en un medio coloidal (plasma). La sangre es opaca debido al gran número de células presentes y de color rojo a causa de la hemoglobina que portan los eritrocitos (5). Los leucocitos, los hematíes y las plaquetas reciben el nombre de elementos formes y gracias a que se encuentran suspendidos en el plasma, confieren a la sangre su fluidez característica. La proporción de los principales componentes sanguíneos se expone en la Tabla 1.

La cantidad de sangre en un animal vivo es variable según especie, sexo o edad. En todos los casos, en el proceso de sangrado en el matadero, tan sólo es aprovechable un determinado porcentaje respecto al peso vivo del animal, puesto que la canal retendrá en vasos y capilares un volumen irrecuperable (alrededor del 50%), que también es variable según condiciones de sacrificio, estado fisiológico del animal, etc.



## CAPÍTULO 1. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

---

De forma aproximada, la cantidad de sangre que es posible obtener por especie animal sacrificada se refleja en la Tabla 2.

**Tabla 2. Cantidad de sangre obtenida de los distintos animales de sacrificio (7)**

<b>Especie animal</b>	<b>Total de sangre (% de peso vivo)</b>	<b>Total de sangre (litros)</b>
Vacuno mayor	4.9	15.55
Ternero	5.2	10.65
Cerdo	3.2	3.50
Ovino y caprino	4.1	1.90
Caballar	6.4	27.00

---

### **b) Características físicas**

Densidad: Las sangre tiene aproximadamente una densidad de 1.05 kg/L. Si separamos la misma en sus dos principales componentes, plasma y células, cada uno de éstos tiene a su vez una densidad de 1.03 y 1.09 kg/L, respectivamente. Estos valores son así mismo valores medios. Según la especie también varía la densidad ligeramente, en el caso de sangre de oveja es de 1.06kg/L aproximadamente mientras que en el cerdo es de 1.04kg/L.

pH: El pH de la sangre oscila entre 7.2 y 7.5 a una temperatura de 20°C. Es por tanto neutro o ligeramente básico.

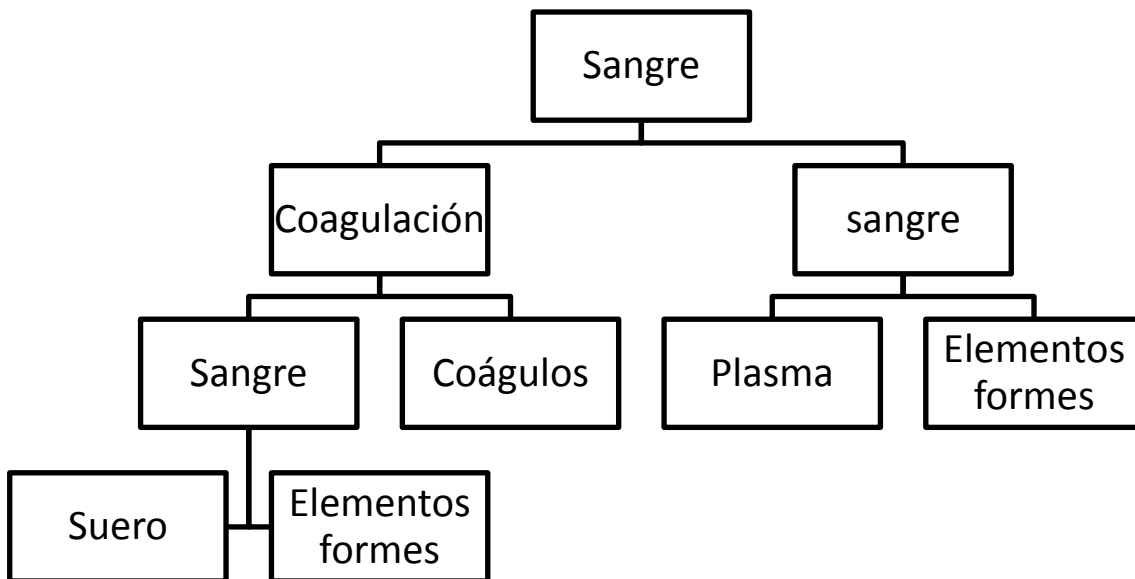
Punto de congelación: Alrededor de -0.55°C.

Viscosidad: Entre 3.6 y 5.3 cp, de 3 a 5 veces superior a la del agua.

### **c) Fracciones; plasma/suero y elementos formes**

- **Plasma/suero**

El plasma sanguíneo es un líquido claro de color amarillento o anaranjado, y ligeramente viscoso. Se debe hacer una distinción entre plasma y suero sanguíneo. El plasma se obtiene por adición de sustancias anticoagulantes a la sangre recién obtenida, que impiden la formación de redes de fibrina y posterior separación de las células, generalmente por procesos de centrifugación. El suero sanguíneo, por el contrario, se obtiene desfibrinando la sangre, esto es, forzando la coagulación de la misma formándose grandes mayas fibrinosas (coágulos) mediante agitación con paletas, que son retenidas posteriormente (8). Tras ello se somete a centrifugación y se separan así las células del suero sanguíneo. La única diferencia en cuanto a composición se refiere a la proteína fibrinógeno en el plasma y su ausencia en el suero. En la Figura 1 se muestra el esquema del fraccionamiento de la sangre para obtener plasma o suero.



**Fig. 1. Esquema del fraccionamiento de la sangre.**

Para la realización de este proyecto se eligió el plasma en lugar del suero debido a las siguientes razones:

## CAPÍTULO 1. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

---

-La composición proteica. El plasma contiene una proteína más que el suero; el fibrinógeno.

-La viabilidad para su obtención. El plasma requiere la adición de un anticoagulante de coste reducido y de fácil manejo. Por el contrario, para la obtención de suero es necesario disponer de un equipo de agitación, con un tipo de paletas determinado y un buen control de la velocidad de agitación ya que de no ser así, la agitación mecánica pueden romper las células produciendo la liberación de la hemoglobina al suero (1).

El plasma está constituido fundamentalmente por un 9% de sólidos y un 90% de agua. Su composición es prácticamente idéntica a la del suero. Contiene numerosas sustancias y elementos en solución, cuya proporción suele mantenerse constante, y en valores medios puede cifrarse de la siguiente forma (1), por cada 100 mL:

### A. Elementos minerales

**Tabla 3. Composición de cationes del plasma sanguíneo**

Cationes	Valor medio (en 100mL)
Calcio	10-12 mg
Potasio	18-20 mg
Magnesio	1.3-3.5 mg
Hierro	0.9-1.2 mg
Cobre	1-1.4 mg
Sodio	300-350 mg

## CAPÍTULO 1. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

---

**Tabla 4. Composición de aniones del plasma sanguíneo**

Aniones	Valor medio (en 100mL)
Cloruros	340-380 mg
Carbonatos	150-170 mg
Fosfatos	12-15 mg
Sulfatos	3-5 mg
Bromuro	0.8-1.8 mg
Yoduro	0.8-1.3 mg
Fluoruro	1-1.2 mg

### B. Derivados de las proteínas

**Tabla 5. Composición de derivados proteicos del plasma sanguíneo**

Derivados proteicos	Valor medio (en 100 mL)
Urea	20-40 mg
Nitrógeno de los aminoácidos	1.5-3 mg
Ácido úrico	3-5 mg
Creatina total	3.8 mg

**C. Glúcidos y derivados metabólicos**

**Tabla 6. Composición de glúcidos y derivados metabólicos del plasma sanguíneo**

<b>Glúcidos y derivados metabólicos</b>	<b>Valor medio (en 100 mL)</b>
Glucosa	80-120 mg
Glucógeno	25-75 mg
Ácido láctico	10-20 mg
Ácido oxálico	1-5 mg
Alcohol etílico	3-4 mg

**D. Otras sustancias**

**Tabla 7. Composición de otras sustancias del plasma sanguíneo**

<b>Otras sustancias</b>	<b>Valor medio (en 100 mL)</b>
Bilirrubina	0.4-1 mg
Amilasa	0.08-0.32 mg
Fosfatasas alcalinas	0.05-0.09 mg
Fosfatasas ácidas	0.01-0.06 mg

**Plasma bovino**

En la Tabla 8 se muestra la composición porcentual de los componentes del plasma bovino íntegro y desecado. Y en la Tabla 9 se muestran los porcentajes de las distintas especies proteicas plasmáticas de la especie bovina.

## CAPÍTULO 1. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

**Tabla 8. Composición química del plasma bovino (6)**

	Plasma sanguíneo	Plasma desecado
Sólidos totales (%)	8-9	96-97.5
Proteína (%)	6-8	70-96
Grasa (%)	0.1-1	0-1.5
Carbohidratos (%)	< 1	-
Sales (%)	1.5	< 2
Agua (%)	90-91	2.5-7

**Tabla 9. Porcentaje de las distintas fracciones proteicas del plasma bovino**

PROTEÍNA	% EN PLASMA BOVINO
<u>Fracción albúmina:</u>	42
Prealbúmina	0.3
Albúmina	41
<u>Fracción globulina:</u>	56
α-Globulina	14
β-Globulina	11
γ-Globulina	31
<u>Fibrinógeno</u>	2

- **Elementos formes**

Se engloban en este grupo los hematíes o glóbulos rojos, las plaquetas y los leucocitos o glóbulos blancos. Los valores normales medios por  $\text{mm}^3$  son de  $4.5 \times 10^6$  -  $5 \times 10^6$  para los hematíes,  $15 \times 10^4$  -  $3 \times 10^5$  para las plaquetas y  $6 \times 10^3$  -  $9 \times 10^3$  para los leucocitos. La mayor parte de estos elementos formes son hematíes que contienen en

su interior la hemoglobina (proteína que representa alrededor de 2/3 de la masa de las proteínas de la sangre, constituyendo el otro tercio las proteínas del plasma). Las proteínas de los leucocitos y plaquetas, representan cantidades insignificantes del total de proteínas de la sangre.

### **1.2. PROPIEDADES FUNCIONALES DE LAS PROTEINAS SANGUÍNEAS Y SU APLICACIÓN TECNOLÓGICA**

El plasma sanguíneo, debido a su contenido en proteínas, puede ser aprovechado para diversos fines debido a las propiedades funcionales de estas.

Las propiedades funcionales de las proteínas, pueden clasificarse en tres grupos principales:

- Propiedades de hidratación. Dependientes de las interacciones proteína-agua.
- Propiedades dependientes de las interacciones proteína-proteína.
- Propiedades superficiales.

El primer grupo incluye propiedades tales como la absorción y la retención de agua, succulencia, hinchado, adhesión, dispersabilidad, solubilidad y viscosidad. El segundo grupo de propiedades interviene en fenómenos como la precipitación, gelificación y formación de otras estructuras diferentes. El tercer grupo se refiere a la tensión superficial de emulsificación y características espumantes de las proteínas. Estos grupos no son totalmente independientes; por ejemplo, la gelificación no solamente implica las interacciones proteína-proteína, sino también las interacciones agua-proteína y la viscosidad y la solubilidad dependen una y otra de las interacciones proteína-agua y proteína-proteína.

La mayor parte de estas propiedades tienen su interés de aplicación en el campo alimentario, de forma que su adición a alimentos puede contribuir a cambios en las propiedades físico-químicas de los mismos, como por ejemplo sus características organolépticas (1). Sin embargo, el interés de este trabajo reside en la capacidad de gelificación de dichas proteínas.

## 1.3. GELES PROTEICOS SANGUÍNEOS

### 1.3.1. GELES

Los geles son sistemas dispersos de al menos dos componentes en los que la fase dispersa forma un entramado cohesivo en el medio de dispersión. Se caracterizan por la falta de fluidez y la deformabilidad elástica. Ocupan una posición intermedia entre las disoluciones, en las que predominan las fuerzas repulsivas entre las moléculas de la fase dispersa, y los precipitados, en los que dominan las interacciones intermoleculares fuertes. Se diferencian dos tipos de geles, entre los que no obstante existen transiciones, las redes poliméricas y las dispersiones agregadas.

- **Las redes poliméricas**

Son redes tridimensionales formadas por la agregación de moléculas fibrilares desorganizadas a estructuras limitadas ordenadas. Para ello, se requiere la adición de un agente reticulante, como por ejemplo el glicerol o la agarosa. Las uniones de este tipo de geles no son completamente estables a ciertos cambios físicos como la temperatura, por lo que pueden formarse por enfriamiento y romperse al calentar. Las interacciones presentes en estos geles son del tipo enlaces de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals (10).

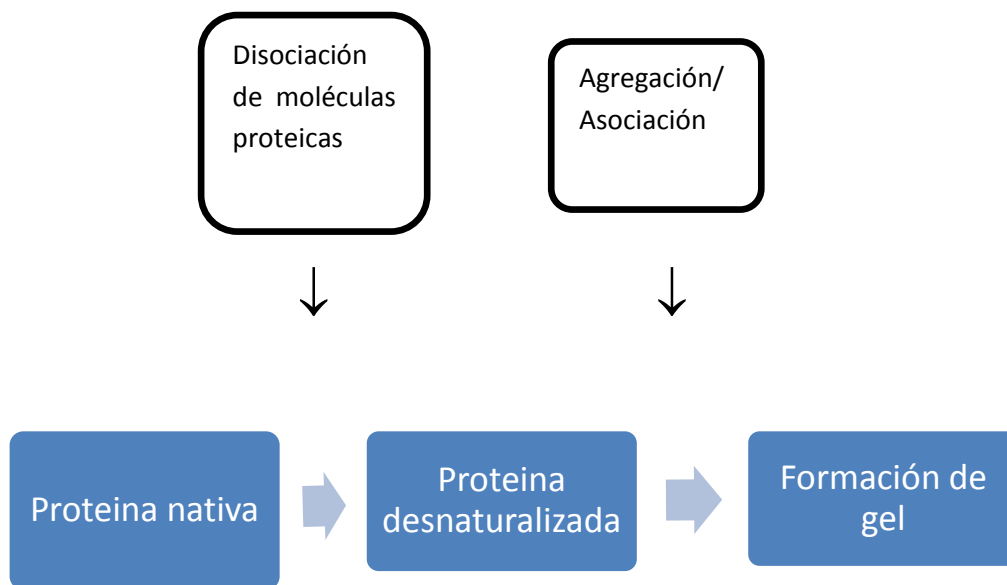
- **Dispersiones agregadas**

Este es el tipo de gel sintetizado en este trabajo. Se forman a partir de un proceso en dos etapas mediado por acción del calor. Figura 2.

Las dispersiones agregadas son geles formados a partir de proteínas globulares tras su calentamiento y desnaturalización. El plegamiento térmico de las proteínas conduce a una liberación de las cadenas laterales aminoacídicas, que podrán participar así en interacciones intermoleculares. La asociación subsiguiente ocurre con formación de pequeños agregados esféricos, que aparecen en cadenas cuyas interacciones dan lugar a la red del gel. Para que este tipo de agregación desordenada conduzca a la formación de un gel, se necesitan concentraciones proteicas relativamente altas (5-10%). También la velocidad de agregación debe ser menor que la de plegamiento, porque en caso contrario, en el entorno del punto isoeléctrico por ejemplo, se formarán



geles poco estructurados. El grado de desnaturalización necesario para que comience la agregación parece depender de la proteína. Puesto que lo que se libera durante la desnaturalización parcial son sobre todo grupos hidrófobos, predominan las interacciones hidrófobas intermoleculares, de ahí el carácter termoplástico (termo-irreversible) de este tipo de geles, en contraposición con los geles termorreversibles estabilizados por puentes de hidrógeno. Los geles termoplásticos no se fluidifican por calentamiento, aunque se pueden ablandar o arrugar. A demás de las interacciones hidrófobas, los puentes disulfuro formados a partir de los grupos tiol liberados contribuyen también a la red, del mismo modo que los enlaces iónicos intermoleculares entre proteínas con puntos isoeléctricos distintos en sistemas heterogéneos.



**Fig. 2. Proceso de formación de un gel proteico (12)**

### 1.3.2. APLICACIONES DE GELES PLASMÁTICOS

La capacidad gelificante de las sustancias es una de las características más estudiadas en biotecnología.

## CAPÍTULO 1. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

---

El gel de plasma sanguíneo puede tener distintas características, en cuanto a grosor, transparencia o comportamiento reológico, en función de la forma en la que se ha llevado a cabo su síntesis. La caracterización de los geles se lleva a cabo a través de medidas reológicas como barridos de temperatura, curvas de flujo o ensayos de fluencia o recuperación. También se utilizan métodos como el DSC (Differential Scanning Calorimetry), SDS-PAGE (Polyacrilamide Gel Electrophoresis), SEM (Scanning Electron Microscopy), o Fractal and Lacunarity Analysis.

Las principales aplicaciones de los geles de plasma se encuentran en la alimentación y en la biomedicina.

- **Alimentación**

En el campo de la alimentación, los geles de plasma, se utilizan aprovechando las propiedades de las proteínas que los forman; así la capacidad de emulsificación, retención de agua y de materia grasa y la gelificación se usa en las salsas, productos cárnicos, lácteos o productos de panadería. La viscosidad, solubilidad a pH diferentes y estabilidad al calor se usa para las bebidas. Y por último, la capacidad de gelificación resulta muy interesante para la creación de biopelículas que protegen los alimentos.

Estas aplicaciones son muy importantes ya que al ser este tipo de gel un producto natural, evita el uso de sustancias sintéticas en los alimentos, que pueden ser perjudiciales para la salud.

- **Biomedicina**

Este tipo de geles se utilizan en oftalmología para los trasplantes de córnea, en cirugía plástica y en cirugía dermatológica. Se han realizado estudios en los que se ha comprobado que si el plasma es rico en plaquetas, estimula la angiogénesis o la proliferación de fibroblastos (11), esta propiedad puede ayudar a la síntesis de piel. Esto último se está investigando en el Centro Comunitario de Sangre y Tejidos del Principado de Asturias con el prototipo de una piel artificial basada en plasma y fibroblastos, como base de la dermis artificial, minimizando el riesgo de enfermedades transmisibles y mejorando la capacidad de integración.

## 1.4. REOLOGÍA

La reología (Eugene Bingham 1929) es la rama de la física de medios continuos que se dedica al estudio de la deformación y el flujo de la materia.

Una definición más moderna expresa que la reología es la parte de la física que estudia la relación entre el esfuerzo y la deformación en los materiales que son capaces de fluir.

Las propiedades mecánicas estudiadas por la reología se pueden medir mediante reómetros, aparatos que permiten someter al material a diferentes tipos de deformaciones controladas y medir los esfuerzos.

### 1.4.1. CLASIFICACIÓN DE LOS FLUIDOS SEGÚN SU COMPORTAMIENTO REOLÓGICO.(Figura3).

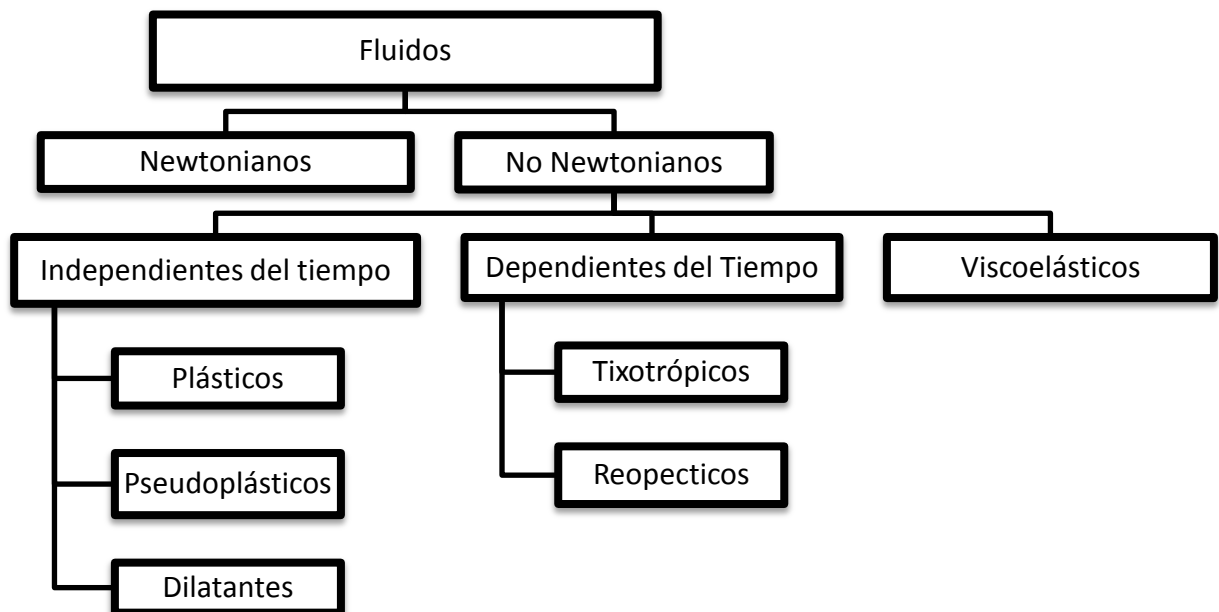


Fig. 3. Tipos de fluidos en función de su comportamiento reológico (3).

### 1.4.1.1. FLUIDOS NEWTONIANOS

Los **fluidos newtonianos** (N) son aquellos en los que, una vez fijada la temperatura y la composición, su viscosidad dinámica no cambia aunque lo haga el gradiente de velocidad (*shear rate*) aplicado, que provoca un esfuerzo cortante (*shear stress*) en los mismos.

Estos fluidos cumplen la **Ley de Newton** de la viscosidad dinámica: El esfuerzo cortante producido es proporcional al gradiente de velocidad aplicado y la constante de proporcionalidad es la **viscosidad dinámica** ( $\mu$ ).

El aire y todos los gases hasta presiones del orden de 10 MPa, el agua, la leche y todos los fluidos formados por moléculas sencillas son newtonianos. También lo son la nata ligera (10 a 30 % MG), la miel (18.2 % de sólidos), el aceite de girasol y el aceite de oliva (2).

### 1.4.1.2. FLUIDOS NO NEWTONIANOS

Los **fluidos no newtonianos (NN)** son aquellos en los cuales la viscosidad dinámica varía al hacerlo el gradiente de velocidad aplicado o el esfuerzo cortante producido. No cumplen la Ley de Newton de la viscosidad.

Las suspensiones densas, lodos, emulsiones, disoluciones de polímeros de cadena larga, líquidos biológicos, alimentos como yogur, mantequilla, zumo de naranja concentrado, puré de melocotón con una concentración de sólidos ( $C_s$ ) > 10.9 % en masa, puré de plátano, de zanahorias, de pera y de tomate, zumo de tomate concentrado, *kétchup*, pescado picado, chocolate fundido, mayonesa, mostaza, compota de manzana con ( $C_s$ ) > 11 %, pinturas, suspensiones de arcilla y de hormigón, etc. son ejemplos de fluidos NN (2).

- **Tipos de fluidos no newtonianos**
- **Fluidos no Newtonianos independientes del tiempo.**

En ellos se cumple que el esfuerzo cortante producido solo es función del gradiente de velocidad aplicado. Los hay de varios tipos, como se puede observar en la Fig. 4

## CAPÍTULO 1. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

---

### Fluidos NN pseudoplásticos.

Son aquellos en los cuales su viscosidad dinámica aparente disminuye al aumentar el gradiente de velocidad aplicado o el esfuerzo cortante producido. Son ejemplos de estos fluidos las disoluciones acuosas de polímeros de masa molar elevada –por ejemplo la carboximetilcelulosa, CMC-, la pulpa de papel, suspensiones de cal, de arcilla (23.3 %), de zumo de naranja concentrado, puré de melocotón (hasta 40.1 %), de plátano, de zanahoria, compota de manzana (11 %), puré de pera (hasta 51.3 %), zumo de tomate (hasta 65.5 %), puré de tomate (hasta 25 %), la mayonesa, la mostaza (2).

### Fluidos NN dilatantes.

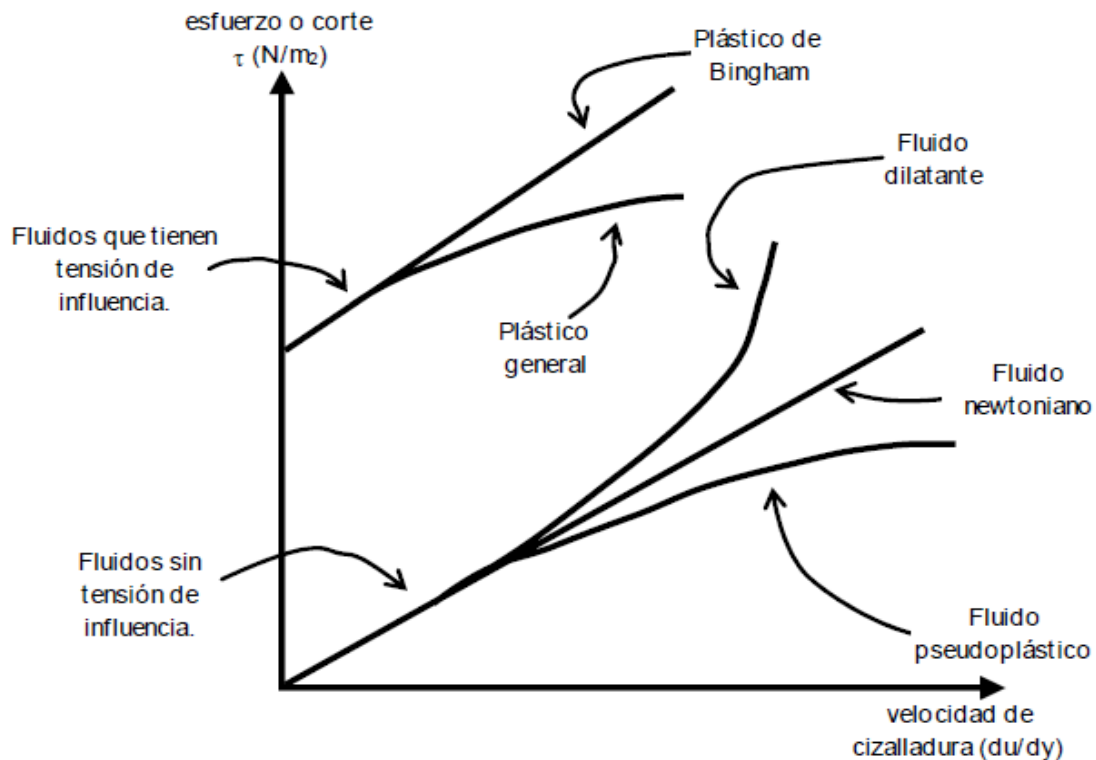
Son aquellos en los cuales la viscosidad aparente aumenta cuando aumenta el gradiente de velocidad aplicado o el esfuerzo cortante producido.

Son ejemplos de este tipo de fluidos las suspensiones de almidón, de silicatos de potasio, de goma arábiga, las arenas movedizas o la arena de la playa mojada (2).

### Fluidos NN plásticos.

Son aquellos que necesitan un esfuerzo cortante umbral para empezar a fluir. Una vez reciben ese esfuerzo constante se comportan, bien como fluidos newtonianos y reciben el nombre de **plásticos de Bingham**, o bien como fluidos pseudoplásticos y reciben el nombre de **plásticos reales**.

Son ejemplos de fluidos plásticos las suspensiones de arcilla o de rocas, la pasta de dientes, el chocolate fundido, el pescado picado, el ketchup o la mantequilla (2).



**Fig. 4. Esfuerzo cortante frente a gradiente de velocidad para fluidos NN independientes del tiempo (2).**

- **Fluidos no Newtonianos dependientes del tiempo.**

Son aquellos en los que la viscosidad aparente depende, además del esfuerzo cortante, del tiempo de actuación de dicho esfuerzo. Los fluidos no newtonianos con propiedades dependientes del tiempo se subdividen en tixotrópicos y reopécticos (1).

#### Fluidos NN tixotrópicos.

Su viscosidad aparente disminuye con el tiempo. Pueden ser fluidos NN pseudoplásticos tixotrópicos o dilatantes tixotrópicos. Son ejemplos de fluidos con tixotropía las gelatinas, la crema de afeitar, las pinturas, la mayonesa y el yogur (2).

#### Fluidos NN reopécticos.

Su viscosidad aparente aumenta con el tiempo. Pueden ser pseudoplásticos reopécticos o dilatantes reopécticos. Son ejemplos de este tipo de fluidos las suspensiones de yeso, de bentonita o de  $V_2O_5$  en agua. La reopéxia es poco frecuente en la alimentación (1,2).

- **Fluidos viscoelásticos**

Algunos materiales únicamente se deforman cuando se les aplica una fuerza sobre ellos (comportamiento elástico), mientras otros fluyen (comportamiento viscoso). Sin embargo, para otros materiales la respuesta es menos clara ya que se deforman y también fluyen al aplicarles una fuerza, su respuesta es parcialmente elástica y parcialmente viscosa. Este comportamiento se denomina **viscoelástico (1)**.

Existen muchos alimentos que presentan propiedades viscoelásticas. Se trata de productos con características como los geles, helados, mantequilla o yogures. El comportamiento viscoelástico se estudia mediante los ensayos dinámicos u oscilatorios. En ellos la muestra es sometida a una deformación ( $\gamma$ ) que se aplica de modo sinusoidal con una determinada frecuencia ( $\omega$ ) cumpliéndose la siguiente ecuación en función del tiempo (t):

$$\gamma(t) = \gamma_0 \sin(\omega t) \quad (1)$$

Donde  $\gamma_0$  es la amplitud de la deformación. La deformación aplicada genera 2 componentes del esfuerzo ( $\tau$ ) en el material viscoelástico, un componente elástico o módulo de almacenamiento ( $G'$ ) en fase con la deformación y otro viscoso o módulo de pérdida ( $G''$ )  $90^\circ$  en desfase con la deformación. De la ecuación (1) puede obtenerse la (2) que muestra que la velocidad de deformación ( $\dot{\gamma}$ ) para evaluar el componente viscoso debe estar  $\pi/2$  rad en desfase con la deformación:

$$\dot{\gamma}(t) = \gamma_0 \omega \cos(\omega t) \quad (2)$$

De esta manera para la deformación en el rango viscoelástico lineal, el esfuerzo generado ( $\tau_0$ ) puede expresarse en función de los módulos elástico y viscoso de la siguiente manera:

$$\tau_0 = G' \gamma_0 \sin(\omega t) + G'' \gamma_0 \cos(\omega t) \quad (3)$$

## CAPÍTULO 1. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

---

Para un material viscoelástico el esfuerzo generado es también sinusoidal, pero muestra un ángulo de desfase de  $\delta$  rad cuando se compara con la deformación. La siguiente ecuación expresa la variación sinusoidal del esfuerzo resultante:

$$\tau(t) = \tau_0 \sin(\omega t + \delta) \quad (4)$$

De las ecuaciones anteriores pueden obtenerse las siguientes expresiones que explican el comportamiento viscoelástico:

$$G' = (\tau_0/\gamma_0) \cos \delta \quad (5)$$

$$G'' = (\tau_0/\gamma_0) \sin \delta \quad (6)$$

$$\tan \delta = G'/G'' \quad (7)$$

donde  $\tan \delta$  es la tangente de las pérdidas. El módulo  $G'$  representa la cantidad de energía que es almacenada en el material o recuperable por ciclo de deformación, mientras que el módulo  $G''$  representa la cantidad de energía que se disipa por ciclo de deformación. Por tanto, para un sólido elástico perfecto toda la energía es almacenada,  $G''$  es cero y el esfuerzo y la deformación estarán en fase ( $\delta=0^\circ$ ). Por el contrario para un líquido sin propiedades elásticas toda la energía se disipa en forma de calor,  $G'$  es cero y el esfuerzo y la deformación estarán  $90^\circ$  en desfase ( $\delta=90^\circ$ ).

Para un determinado material las magnitudes de  $G'$  y  $G''$  están influenciadas por la frecuencia, la temperatura y la deformación. Para valores de deformación en el rango lineal  $G'$  y  $G''$  son independientes de la deformación. La relación entre los módulos  $G'$  y  $G''$  también puede ser expresada en función de un módulo complejo ( $G^*$ ) de acuerdo a la siguiente expresión:

$$G^* = \sqrt{(G')^2 + (G'')^2} \quad (8)$$



## CAPÍTULO 1. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

---

La reología es un instrumento necesario para la caracterización de los geles elaborados a partir de las proteínas sanguíneas, ya que nos aporta información sobre la estructura interna de los geles, el efecto de la temperatura sobre los mismos o como se comportarán al aplicarles el esfuerzo cortante. Del mismo modo se ha comprobado que la estabilidad reológica es considerada un importante parámetro de calidad (4).

## **CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1. PROCESADO DE SUBPRODUCTOS DE ORIGEN ANIMAL.**

El subproducto utilizado es la sangre de los mataderos. De ella se extraen las proteínas que contiene para poder ser utilizadas en la industria alimentaria.

#### **2.1.1. PROCEDENCIA DE LA SANGRE**

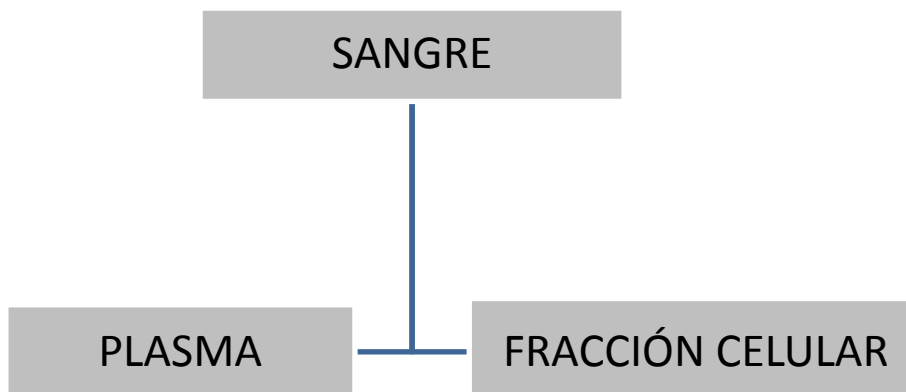
La sangre utilizada procede del sacrificio de ganado bovino del Matadero Central de Asturias Junquera –Bobes (Noreña). Es muy importante la higiene en la recogida para evitar contaminación microbiana que biodegrada la sangre y sus fracciones hidrolizando las proteínas que se pretenden obtener (1). Se recoge en garrafas de plástico de 5L a las cuales se les añade citrato de sodio saturado (Panreac) para evitar su coagulación. Se utiliza citrato sódico al 1%. Las garrafas se llevan al laboratorio y se mantienen en cámara refrigeradora el tiempo suficiente para alcanzar entre 8 °C y 10 °C. El pH va bajando hasta llegar a 6,8.

#### **2.1.2. SEPARACIÓN DE LA SANGRE**

##### **2.1.2.1. FRACCIONAMIENTO DE LA SANGRE**

El fraccionamiento de la sangre, permite obtener las proteínas que contiene. Mediante centrifugación, se separan dos fases; la fracción celular y el plasma (Figura 5). Las condiciones idóneas para separar el plasma y las células son 10000 g durante 10 min. a temperatura entre 4 y 10 °C, utilizándose una centrifuga Kubota 6700 (14).

A continuación el plasma se somete a otra centrifugación a 10000 g en una centrifuga Kubota 6700, durante 10 min. a 4°C, para retirar la fracción de grasa que puede llegar a suponer un 3% del total de los lípidos presentes en la sangre y que tiene efectos negativos para el aprovechamiento de esas proteínas. Posteriormente el plasma y la fracción lipídica se separan por decantación (8).



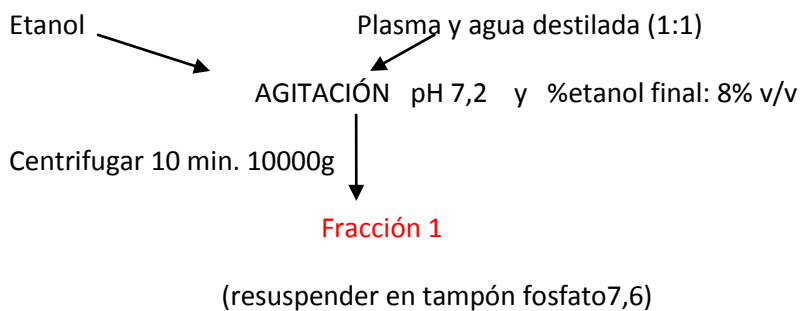
**Fig. 5. Esquema de la obtención de los componentes de la sangre.**

#### 2.1.2.2. FRACCIONAMIENTO DEL PLASMA

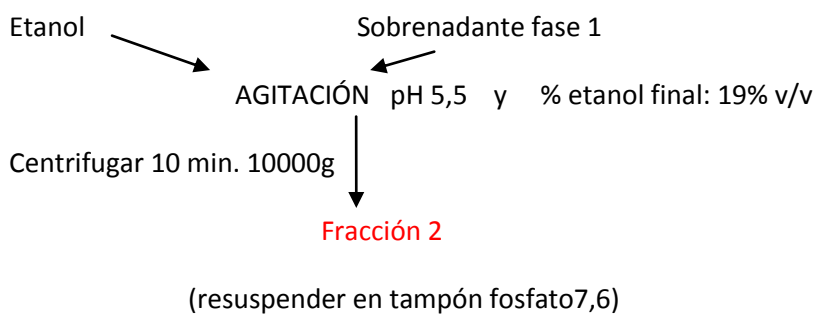
Las proteínas procedentes del plasma sanguíneo se separan mediante una modificación de la técnica de Cohn (13), que consiste en la adición de etanol a diferentes concentraciones. En la Figura 6 se muestra el esquema del flujo del proceso. Se mantiene a una temperatura cercana a los 0°C mediante la colocación de la muestra en un baño de hielo, añadiendo etanol muy lentamente y en constante agitación para evitar la precipitación de las proteínas de fracciones posteriores.

## CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS

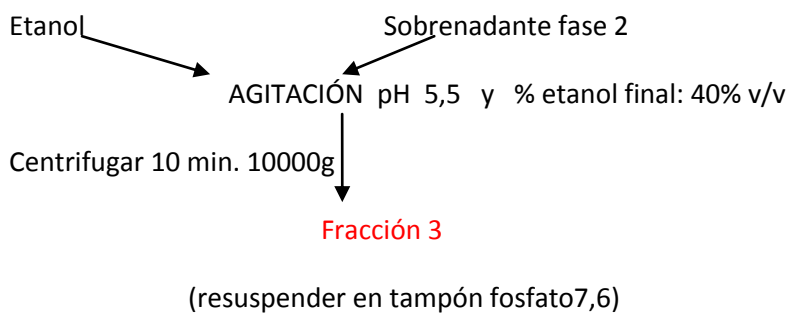
### FASE 1



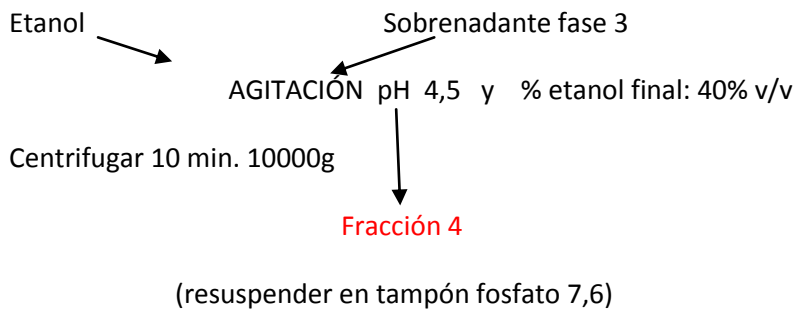
### FASE 2



### FASE 3



### FASE 4



**Fig. 6. Esquema del flujo de fraccionamiento de las proteínas plasmáticas.**

## 2.2. OBTENCIÓN DE GELES A PARTIR DE PROTEÍNAS SANGUÍNEAS

### 2.2.1. LA ESTUFA



**Fig. 7. Estufa P. Selecta**

La estufa utilizada es una P. Selecta (Figura7). Fue usada para la formación de geles con transglutaminasa. Las muestras se colocaron en placas de cristal de 40mm de diámetro (TSD Pierron) añadiendo en cada una de ellas 3 g. de plasma con diferentes cantidades de transglutaminasa según su concentración de la siguiente manera:

- 0,125 g. de transglutaminasa en los ensayos de 2 U/g. de proteína plasmática
- 0,333 g. de transglutaminasa en los ensayos de 5 U/g. de proteína plasmática.
- 0,75 g. de transglutaminasa en los ensayos de 10 U/g. de proteína plasmática.

En los ensayos con plasma liofilizado, el experimento se realiza con:

- 0,5 g. de transglutaminasa en los ensayos de 7 U/g. de proteína plasmática.
- 0,75 g. de transglutaminasa en los ensayos de 10 U/g. de proteína plasmática.

En los ensayos con albúmina, el experimento se realizó con:

- 0,5 g. de transglutaminasa en los ensayos de 5 U/g de proteína plasmática.
- 0,75 g. de transglutaminasa en los ensayos de 10 U/g de proteína plasmática.

## CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS

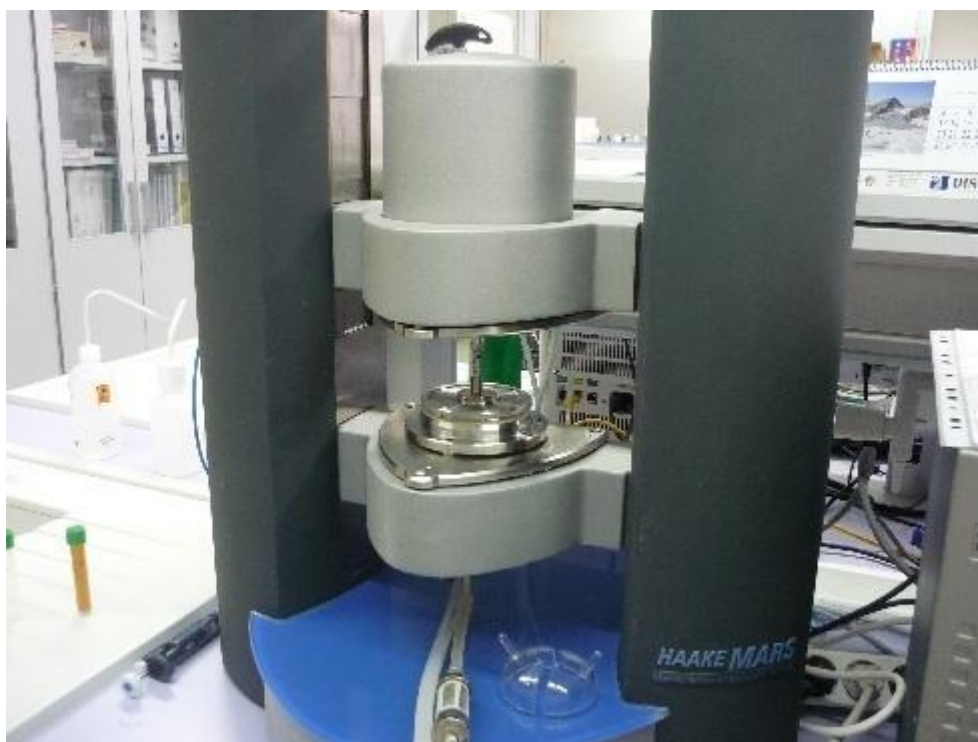
---

-1 g. de transglutaminasa en los ensayos de 12,5 U/g de proteína plasmática.

A continuación se introdujeron en la estufa para calentarse a  $50 \pm 1^\circ\text{C}$ . En los ensayos de plasma el tiempo de incubación es de 4 horas en 2 U/g. de proteína plasmática, mientras que en 5 U/g. de proteína plasmática y en 10 U/g. de proteína plasmática no se necesita incubación, ya que los geles se forman al colocarlos sobre la superficie de la estufa. En los ensayos de albúmina el tiempo de incubación es de 90 minutos. En los ensayos de plasma liofilizado el tiempo de incubación es mayor.

Una vez producida la gelificación, se sacan los geles y se dejan enfriar a temperatura ambiente durante 15 min. Posteriormente se almacenan en el frigorífico hasta su análisis.

### 2.2.2. EL REÓMETRO



**Fig. 8. Reómetro rotacional HAAKE MARS II**

## CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS

---

El reómetro es un aparato destinado a realizar medidas reproducibles a partir de esfuerzos producidos por desplazamientos rotacionales muy limitados y precisos..

El sistema de medición de los reómetros rotacionales es de tipo Searle. La placa superior, también llamada rotor, gira un número de revoluciones constante o variable según convenga, mientras que la placa de abajo, también llamada vaso de medición, permanece en reposo. La placa superior al girar hace que la sustancia que se encuentra entre las dos placas empiece a fluir. La resistencia del líquido al ser cizallado es proporcional al momento de giro dependiente de la viscosidad, es decir, la resistencia de la muestra a ser cizallada permite al rotor solamente girar a una velocidad (velocidad de cizalla) que es inversamente proporcional a la velocidad de la muestra. Entre el motor y el eje de de la placa superior está colocado un elemento de medición que registra ese momento de giro (resorte de acero que se torsiona). La torsión que sufre el resorte es una medida directa de la viscosidad del producto sometido a cizalla (17, 18, 19, 20 y 21).

Desde el punto de vista del sistema de trabajo los reómetros rotacionales pueden hacerlo en:

- Modo CR, o modo de velocidad controlada, donde se asigna una velocidad de cizalla y se mide el esfuerzo (par) originado.
- Modo CS, o modo de esfuerzo controlado, donde se mide la velocidad de cizalla a un esfuerzo de cizalla (par deformador) dado.
- Modo CD, o modo de deformación controlada.

El reómetro utilizado en este proyecto fue un reómetro rotacional (HAAKE MARS II) con un sistema para control de la temperatura (UNIVERSAL TEMPERATURE CONTROLLER) perteneciente a La Unidad de Tecnología Alimentaria de los Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Oviedo (Figura 8). Se utilizó para sintetizar los geles de plasma a pH 5 sin transglutaminasa. Las placas utilizadas para llevar a cabo la síntesis de los geles fueron la placa "Measplate cover MP C35/S" como placa inferior y "Rotor C35/S" Cone with d= 35mm angle 2 DEG" como placa superior. Antes de introducir la muestra hay que ajustar la distancia entre los platos del sensor a 0. A continuación, se sitúa la muestra en el plato inferior de forma que cubra toda la superficie del sensor.

## CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS

---

Finalmente se emplean cubiertas de cristal y aceite de silicona para evitar la desecación de las muestras.

Este reómetro también se utilizó para las determinaciones reológicas que se indican a continuación, en el apartado 2.2.2.1.

### 2.2.2.1. DETERMINACIONES REOLÓGICAS

Antes de comenzar cada medida, las muestras se han dejado estabilizar al menos 15 minutos, contrarrestando así el estrés inducido durante la carga de las mismas (22), y para evitar la desecación durante los análisis se han empleado aceite de silicona y cubiertas de cristal.

#### **a) Barrido de temperatura.**

Los barridos de temperatura indican a qué temperatura la sustancia a analizar experimenta la transición de líquido a gel. Este tipo de experimento se realizó en los geles de plasma a pH 5. Al igual que en el caso de la síntesis de geles, antes de comenzar estas medidas se debe ajustar la distancia de las placas a cero. Las placas utilizadas en este caso fueron placas serradas (placa pequeña “Rotor PP35/S D=35mm” y placa grande “Measplate cover MP35/S”). Las condiciones son las siguientes:

1) CS      0.000 Pa      Temperatura= 20<sup>0</sup>C

Tiempo: 900s

2) CD-1      f= 1.000Hz      Rampa de temperatura: 20-90<sup>0</sup>C

Tiempo: 600s (aumento de temperatura de 7<sup>0</sup>C/min, 0.12<sup>0</sup>C/s)

3) CS      0.000Pa      Rampa de temperatura: 90-20<sup>0</sup>C

Tiempo: 900s (disminución de temperatura de 4.7<sup>0</sup>C/min, 0.08<sup>0</sup>C/s)

#### **b) Barrido de Estrés.**

Los Barridos de Estrés permiten conocer el rango viscoelástico en el que se mueven las muestras. Este tipo de experimento se realizó para todos los geles obtenidos. En



## CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS

---

este caso, al contrario que en el caso anterior, que partíamos de plasma líquido para proceder a su gelificación, partimos de plasma ya gelificado. Las placas utilizadas fueron las placas serradas indicadas anteriormente. Las condiciones son las siguientes:

1) CS 0.000 Pa Temperatura= 20°C

Tiempo 600s

2) CS 0.0100Pa-500Pa Temperatura= 20°C f= 1.000Hz

40 pasos

### **c) Ensayos de fluencia y recuperación.**

Los ensayos de fluencia y recuperación permiten conocer la estructura interna de los geles así como comprobar posibles cambios estructurales al variar su composición. Para este tipo de ensayos, se parte como en el caso anterior de muestras gelificadas y también se realiza para todos los geles obtenidos. Las placas utilizadas fueron también las mismas. Las condiciones son las siguientes:

1) CS 0.000Pa Temperatura=20°C

Tiempo= 300s

2) CS 10.00Pa Temperatura=20°C

Tiempo= 180s

3) CS 0.000Pa Temperatura=20°C

Tiempo= 300s

### 2.2.3. LA TRANSGLUTAMINASA

La transglutaminasa es una transferasa que tiene el nombre sistemático de proteína-glutamina  $\gamma$ glutamilttransferasa. Esta enzima puede actuar sobre las proteínas de los alimentos catalizando la unión entre ellas para formar una estructura de gel mucho más resistente. Es capaz de unir proteínas estableciendo uniones entre un grupo amino de un residuo de lisina y un grupo carboxiamida de un residuo de glutamina, de este modo se crean enlaces inter o intramoleculares altamente resistentes a la proteólisis. El efecto de la transglutaminasa es muy similar al del calentamiento de una proteína. Con el aumento de la temperatura, las proteínas pierden la estructura tridimensional y forman nuevos enlaces que unen las proteínas entre sí dando lugar a la estructura de un gel. Con la transglutaminasa, el efecto que se consigue es muy similar. El gel que se obtiene es muy resistente a las altas temperaturas.

Hay ensayos hechos con transglutaminasa en geles (15). Se observa que la firmeza de éstos, aumenta progresivamente al aumentar la concentración de la transglutaminasa. Esto se debe a que se produce un reforzamiento de la red del gel, como resultado del aumento de enlaces covalentes intermoleculares entre las proteínas del mismo.

La transglutaminasa es una enzima extensamente presente en la naturaleza (hígado y músculos de mamíferos y ciertos tejidos vegetales). La fermentación microbiana en la década de 1980, permitió lograr una producción masiva de transglutaminasa a partir de sustratos de bajo costo (16). La primera caracterización de la transglutaminasa microbiana fue la de la bacteria *Streptomyces mobaraensis*, actualmente la enzima es producida por fermentación con una cepa de *Streptomyces*. La enzima se aplica directamente espolvoreándola o mezclándose con agua. En nuestro caso la aplicamos directamente. Figura 9.



**Fig. 9. Transglutaminasa**

### 2.2.4. RETENCIÓN DE AGUA

La capacidad de retención de agua (CRA) se expresa de acuerdo al porcentaje de la pérdida de agua, según la ecuación descrita por Chantrapornchai y McClements (23):

$$\% \text{ de pérdida} = [(m_i - m_f) / m_i] \times 100 \quad (9)$$

Dónde  $m_i$  es la masa inicial y  $m_f$  es la masa final.

Para medir la retención de agua, pesamos la muestra antes de secarla en la estufa y después de secarla, guardamos la muestra en el frigorífico y hacemos un seguimiento cada 15 días hasta que el peso ya no varíe.

Este seguimiento fue hecho en los geles de plasma con transglutaminasa y en los geles de plasma liofilizado con transglutaminasa, y los resultados obtenidos se especifican en el capítulo 3.

### 2.2.5. LIOFILIZACIÓN

Se liofilizó plasma para ensayar geles con plasma liofilizado. La liofilización se realiza a  $-70^{\circ}\text{C}$  Y 0.1 mb (Liofilizador Telstar modelo Cryodos) durante 24 horas, para lo que es necesario que se congelen previamente a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Una vez liofilizadas las muestra se realizan dos ensayos; uno con plasma diluido 1:10 y otro con plasma reconstituido sin diluir 1:1 y una vez obtenidos los geles, realizamos las pruebas reológicas cuyos resultados se especifican en el capítulo 3.

### 2.2.6. ANÁLISIS DE LA MICROESTRUCTURA (SEM)

Analizamos microscópicamente tres tipos de geles; geles de plasma, geles de plasma liofilizado y geles de albúmina en secciones trasversales. Las muestras se someten a fijación química en tampón fosfato 0,025 M (pH 6,8 Panreac) con el 3% de glutaraldehído (v/v, Panreac). Después de una hora, las muestras se lavan nuevamente dos veces en el mismo tampón fosfato durante 15 min. A continuación se deshidratan sumergiéndolas durante 15 min. en disoluciones acuosas con una concentración creciente de etanol al 96% (Panreac) (20, 40, 60, 80 y 100 (dos veces) % v/v etanol en agua). Cuando están en etanol absoluto, se transfieren al 100% de

## CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS

---

acetona (Panreac) de modo similar, sumergiéndolas durante 10 min. en disoluciones de etanol con una concentración creciente de acetona (30, 50, 70, 90 y 100 (dos veces) % v/v acetona en etanol). Posteriormente las muestras se desecan por punto crítico con CO<sub>2</sub> (Critical Point Dryer Balzers CPD 030, Polaron). Una vez secas, las muestras se montan sobre soportes de aluminio con cinta de carbón adhesiva de doble cara y se bombardean con oro en un evaporador al vacío (Balzers SCD004, BAL-TEC AG). Se usa un microscopio electrónico de barrido JEOL Deba -6100 (JEOL Ltd.,Tokyo Japón).

## CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

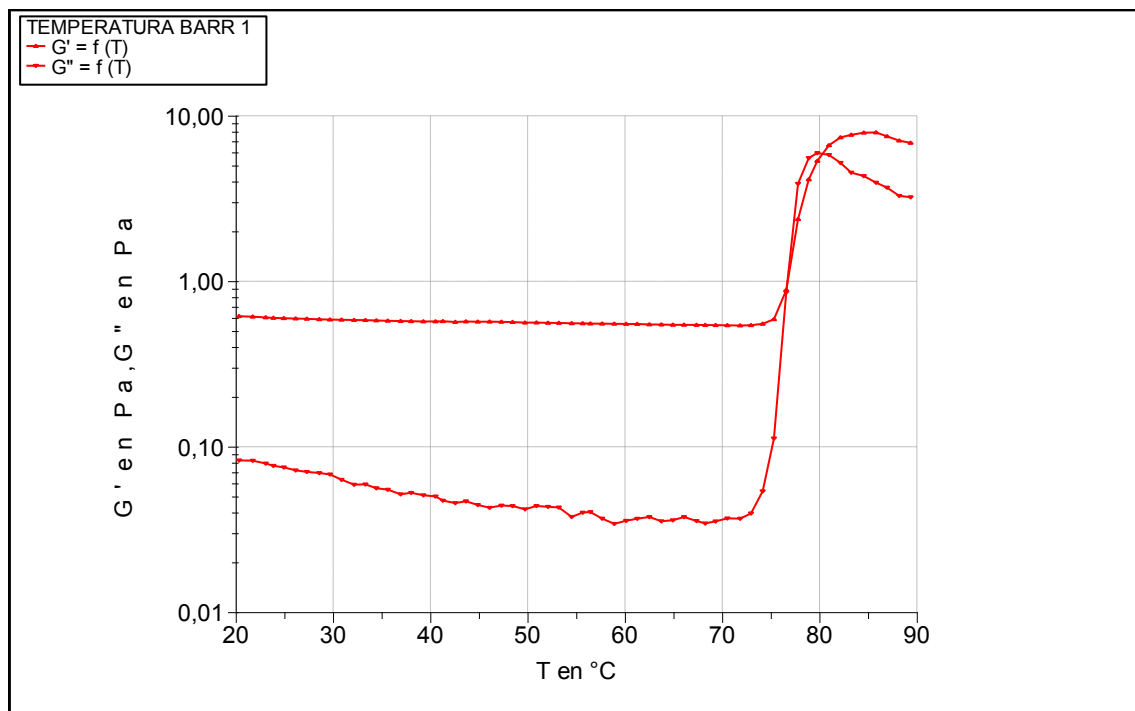
### 3.1. OBTENCIÓN DE GELES A PARTIR DE PROTEÍNAS PLASMÁTICAS

#### 3.1.1. OBTENCIÓN DE GELES A PARTIR DE PLASMA, SIN TRANSGLUTAMINASA

##### 3.1.1.2. GELES DE PLASMA A pH 5

El primer ensayo se realizó con plasma sin transglutaminasa a pH5. Esta prueba se realizó porque en anteriores trabajos (1) no se había probado a hacer geles a pH5, y se quería comprobar si los resultados eran mejores que los realizados a pH 7, el cual normalmente ofrecía los mejores resultados. Se utilizó el reómetro para la gelificación, y para ver en qué momento se producía esta se le aplicó al plasma líquido una Rampa de Temperatura de 20° a 90°C, obteniéndose el resultado de la Figura 10.

#### RAMPA DE TEMPERATURA PARA COAGULAR GEL DE PLASMA A pH 5



**Fig. 10. Rampa de temperatura para la coagulación del plasma a pH 5.**

Como puede observarse, en abscisas se representa la temperatura de coagulación en grados centígrados ( $^{\circ}\text{C}$ ), en ordenadas se representa la evolución del módulo elástico ( $G'$ ) y viscoso ( $G''$ ) con la temperatura, en pascuales (Pa). El punto en que los dos

módulos se cruzan o aumentan considerablemente se denomina punto de gelificación, debido a que en este punto se alcanza la temperatura necesaria para que tenga lugar la coagulación de las proteínas plasmáticas y la formación del gel de plasma. Figura 37.

Resultados de la rampa de temperatura:

$$G' = G'' = 0,9739 \text{ Pa} \quad \text{en} \quad \dot{\omega} = 6,283 \text{ rad/s} \quad f = 1,000 \text{ Hz}$$

$$T = 1,529 \text{ Pa} \quad \lambda = 1,067 - \quad T = 76,65 \text{ }^\circ\text{C} \rightarrow \text{punto de gelificación} \quad t = 1393, \text{ s}$$

$$t_{\text{seg}} = 490,6 \text{ s} \quad \text{PI} = 1,027\text{E}+05$$

Además se realizó un Barrido de Estrés para determinar la resistencia, Figura 11 y Figura 12.

#### BARRIDO DE ESTRÉS EN GEL DE PLASMA A pH 5

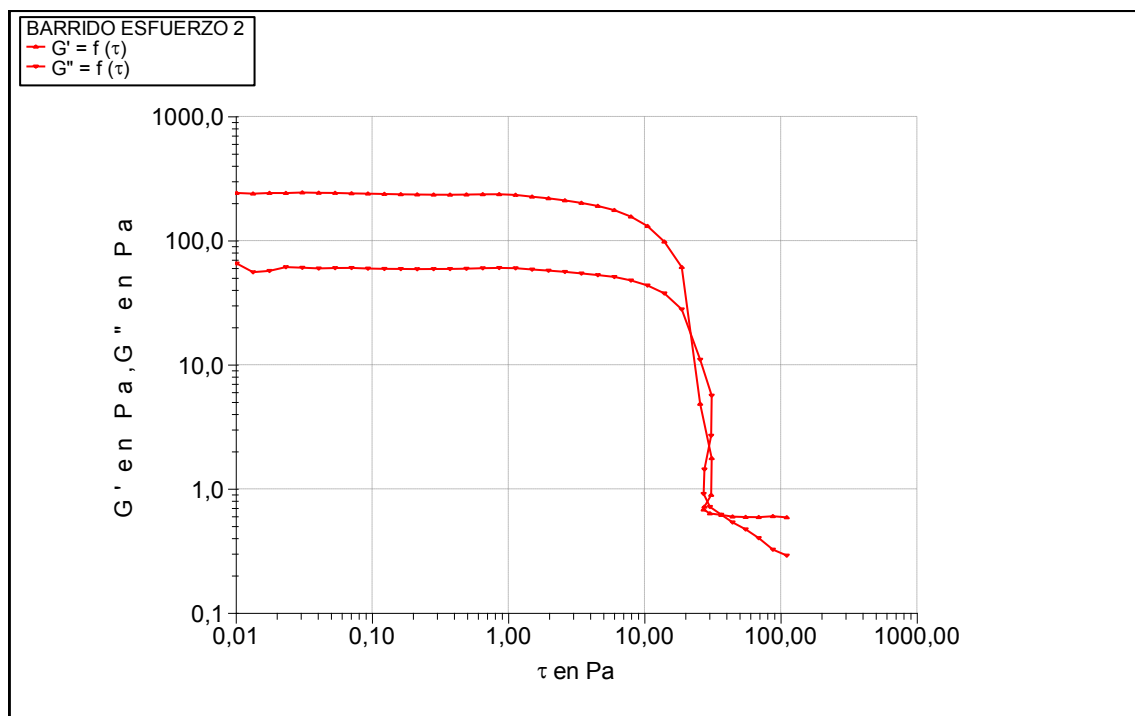
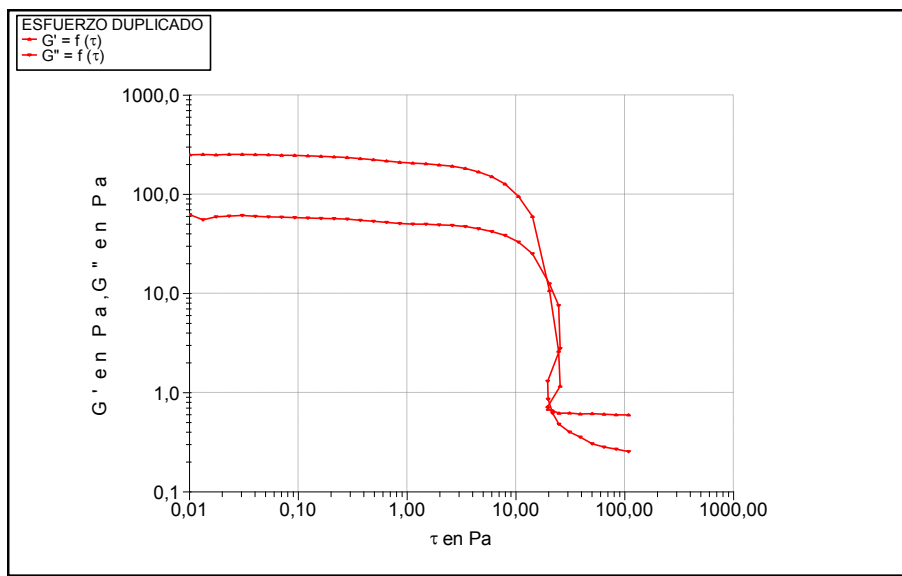


Fig.11. Barrido de esfuerzo sobre gel de plasma a pH 5.

Como puede verse, en abscisas se representa el esfuerzo aplicado en pascales (Pa), en ordenadas el comportamiento de los dos módulos del gel, elástico ( $G'$ ) y viscoso ( $G''$ ), durante la deformación, expresado también en pascales (Pa).

Se puede observar que, al aplicar un esfuerzo creciente de 0 a 500 Pa, se produjo la decaída de los dos módulos del gel cuando se superaron los 10 Pa; esto supuso una más bien baja resistencia de los mismos a pH 5 cuando fueron sometidos a una deformación.

**BARRIDO DE ESTRÉS EN GEL DE PLASMA A pH 5. DUPLICADO**

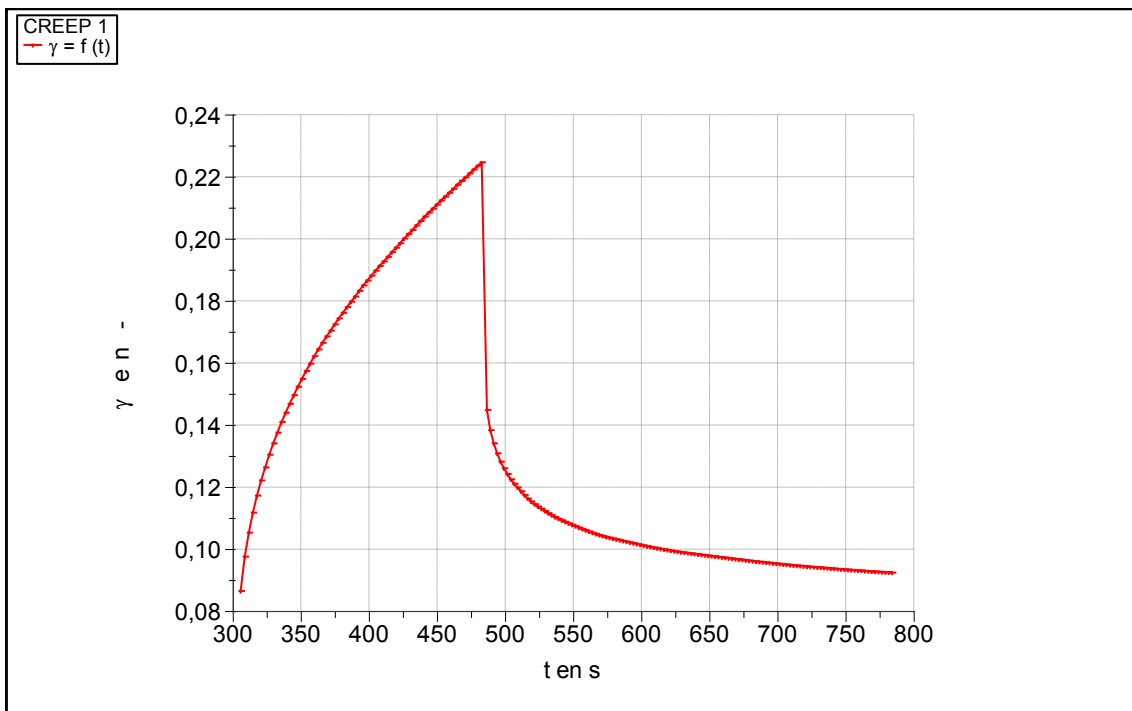


**Fig.12.Barrido de esfuerzo sobre gel de plasma a pH5, duplicado.**

Al realizar el ensayo por duplicado, el resultado obtenido fue similar, y reveló la baja firmeza de estos geles.

Y por último un Ensayo de Fluencia y Recuperación, Figura 13

ENSAYO DE FLUENCIA Y RECUPERACIÓN EN GEL DE PLASMA A pH 5



**Fig.13. Ensayo de fluencia y recuperación sobre gel de plasma a pH 5**

Como se puede observar en la gráfica se representa la deformación alcanzada ( $\gamma$ ) en % frente al tiempo (t) en segundos.

Resultados del duplicado del ensayo Creep and Recovery

$$T = 10,00 \text{ [Pa]}$$

$$\eta = 3,070 \times 10^4 \text{ [Pas]} = 0,0003257 \text{ [1/s]}$$

$$e = 0,1363 \text{ [-]} \quad \dot{\gamma} = 0,01363 \text{ [1/Pa]}$$

$$\gamma_r = 0,1056 \text{ [-]} \quad \gamma_r / \gamma_{\text{max}} = \% \text{ recuperación módulo elástico} = 58,85\%$$

$$J_r = 0,01056 \text{ [-]} \quad J_r / J_{\text{max}} = 58,85\%$$

$$\psi_{1-10} = 2,570 \times 10^7 \text{ [Pas}^2\text{]}$$

$$\lambda = 418,5 \text{ [s]}$$

$$G = 73,36 \text{ [Pa]}$$

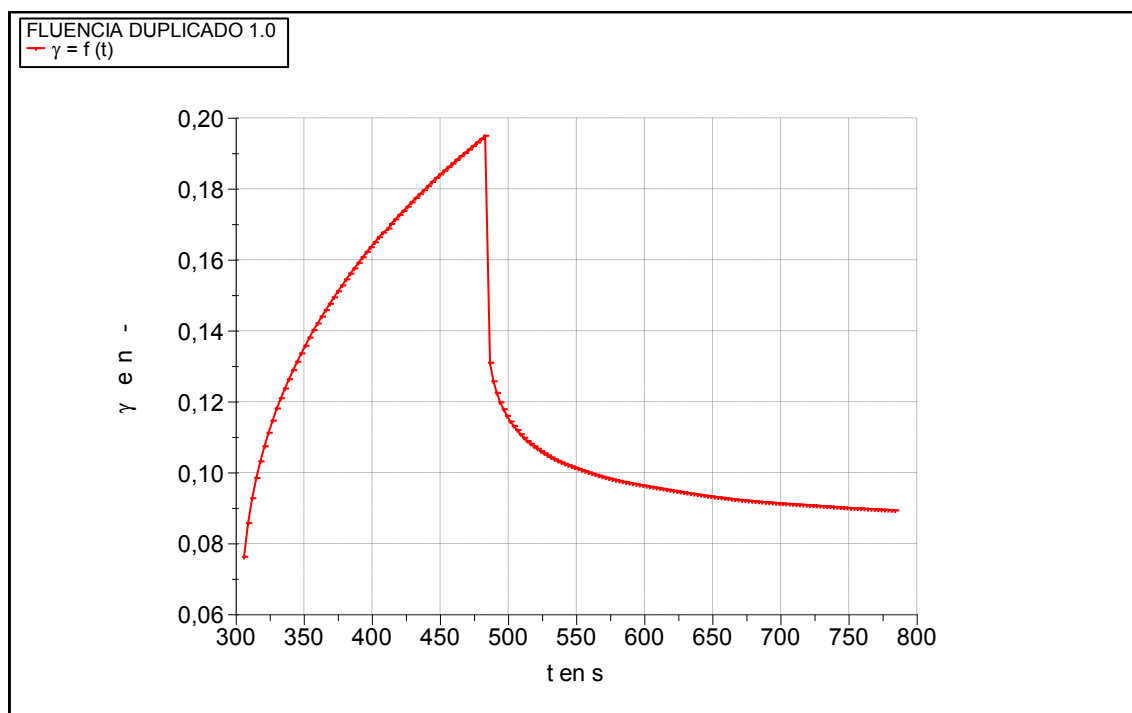
$$d(\lg(\dot{\gamma})) / d(\lg(t)) = 0,2917 \text{ [1/s]}$$

De los resultados se deduce que la recuperación elástica del gel fue del 58,8%, esto quiere decir que tras haberlo sometido a un esfuerzo continuado durante 180 s y



dejarlo recuperar 300 s, su módulo elástico solamente recuperó aproximadamente la mitad. Esto corroboró la baja resistencia antes mencionada.

**ENSAYO DE FLUENCIA Y RECUPERACIÓN EN GEL DE PLASMA A pH 5.  
DUPLICADO**



**Fig.14. Duplicado de ensayo de fluencia y recuperación sobre gel de plasma a pH 5.**

La realización de un duplicado del ensayo confirma los resultados obtenidos; los geles presentan un comportamiento elástico medio. Figura14.

Después de estos resultados, se concluyó que es mejor seguir trabajando a pH 7 para obtener geles más estables, estos ensayos a pH7 los realizó de Pilar del Hoyo (1). Además, es en esta franja donde la transglutaminasa actúa más óptimamente (15).

**3.1.2. OBTENCIÓN DE GELES CON TRANSGLUTAMINASA**

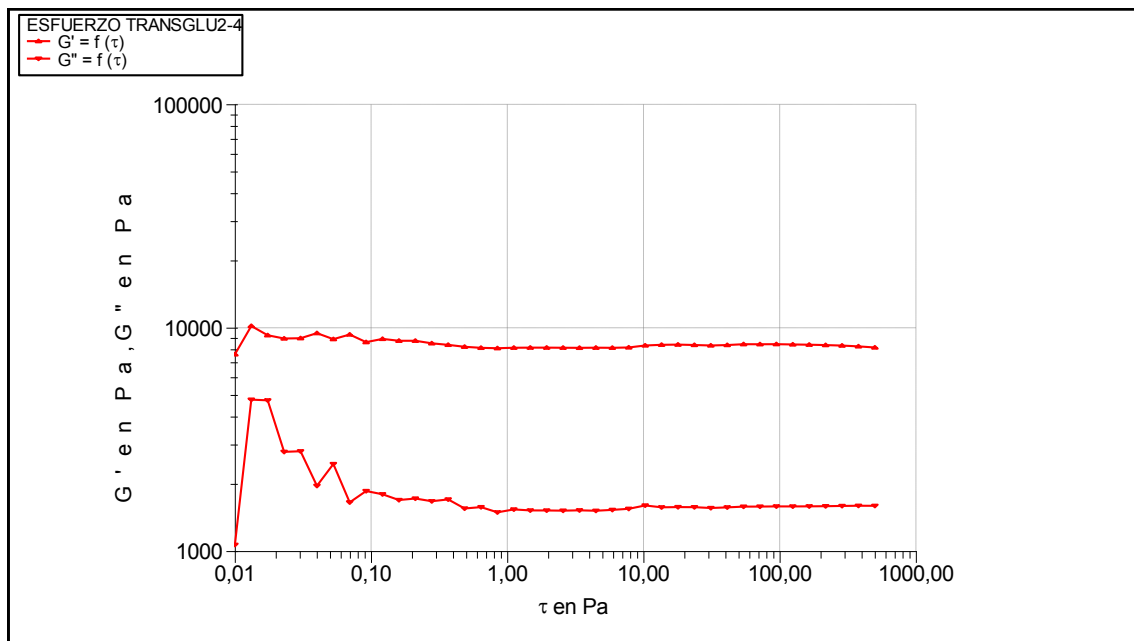
La transglutaminasa actúa sobre las proteínas catalizando la unión entre ellas para formar una estructura de gel mucho más resistente. Se han hecho ensayos con plasma, plasma liofilizado y albúmina añadiendo transglutaminasa y los resultados se detallan en los siguientes apartados.

3.1.2.1. PLASMA

Primeramente se ensayaron geles con plasma a los que se añadieron concentraciones crecientes del enzima transglutaminasa: 2U/g, 5U/g y 10U/g. Así a los 3 g de plasma a pH 7 se espolvoreó la transglutaminasa y posteriormente los geles se incubaron en la estufa a 50°C durante 4 horas en el caso de los que llevaban 2U/g; los otros dos tipos de gel se sintetizaron solamente colocando la placa sobre la superficie de la estufa. Una vez sintetizados, los geles fueron sometidos a dos tipos de ensayo: Barrido de Esfuerzo y Fluencia y Recuperación (Creep and Recovery). Los resultados obtenidos fueron los que se muestran a continuación:

a) Plasma + 2 U/g transglutaminasa

**BARRIDO DE ESFUERZO EN GEL DE PLASMA+2U/g TRANSGLUTAMINASA**



**Fig.15. Ensayo de barrido de esfuerzo sobre gel de plasma pH 7 + 2U/g de transglutaminasa**

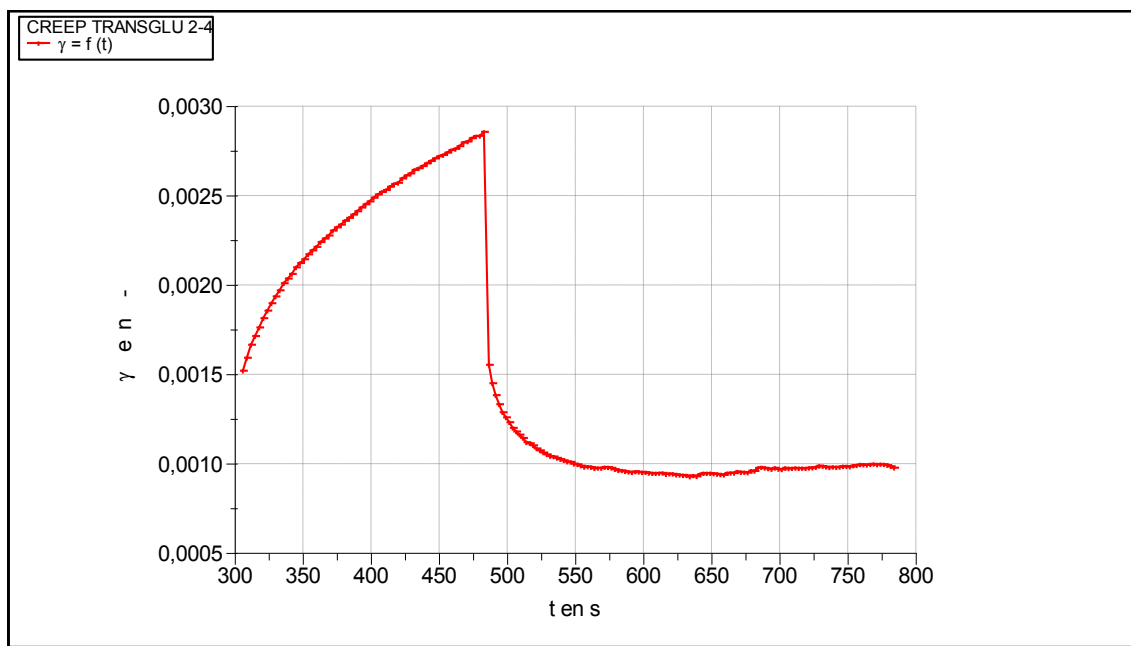
Como se puede observar en esta gráfica se representa la respuesta de los módulos elástico ( $G'$ ) y viscoso ( $G''$ ) del gel ensayado, expresada en pascales (Pa), frente a una deformación creciente, expresada también en pascales (Pa).

Los resultados obtenidos denotaron una gran resistencia de estos geles, ya que al aplicar una deformación en aumento de 0 a 500 Pa, ninguno de los dos módulos del gel decayó, al contrario de lo que ocurría con los geles ensayados sin la adición de

transglutaminasa. Esto demuestra la actividad catalizadora del enzima sobre las proteínas, habiéndose conseguido un gel proteico mucho más firme. Figura 15

En la Figura 16 se representa el resultado del ensayo de Fluencia y Recuperación.

**ENSAYO CREEP AND RECOVERY CON PLASMA+2U/g TRANSGLUTAMINASA**



**Fig.16. Ensayo de Creep and Recovery sobre plasma a pH 7 + 2U/g de transglutaminasa.**

Como se puede ver, la gráfica representa la deformación alcanzada ( $\gamma$ ) en % frente al tiempo ( $t$ ) en segundos.

Resultados del ensayo

$T = 10,00$  [Pa]

$\eta = 2,408e+06$  [Pas]       $\dot{\gamma} = 4,153e-06$  [1/s]

$\gamma_e = 0,002106$  [-]       $J_e = 0,0002106$  [1/Pa]

$\gamma_r = 0,001879$  [-]       $\gamma_r/\gamma_{-max} = 65,80\% = \% \text{ recuperación elástica}$

$J_r = 0,0001879$  [-]       $J_r/J_{-max} = 65,80\% = \% \text{ recuperación elástica}$

$\psi_{1-10} = 2,443e+09$  [Pas<sup>2</sup>]

$\lambda = 507,2$  [s]

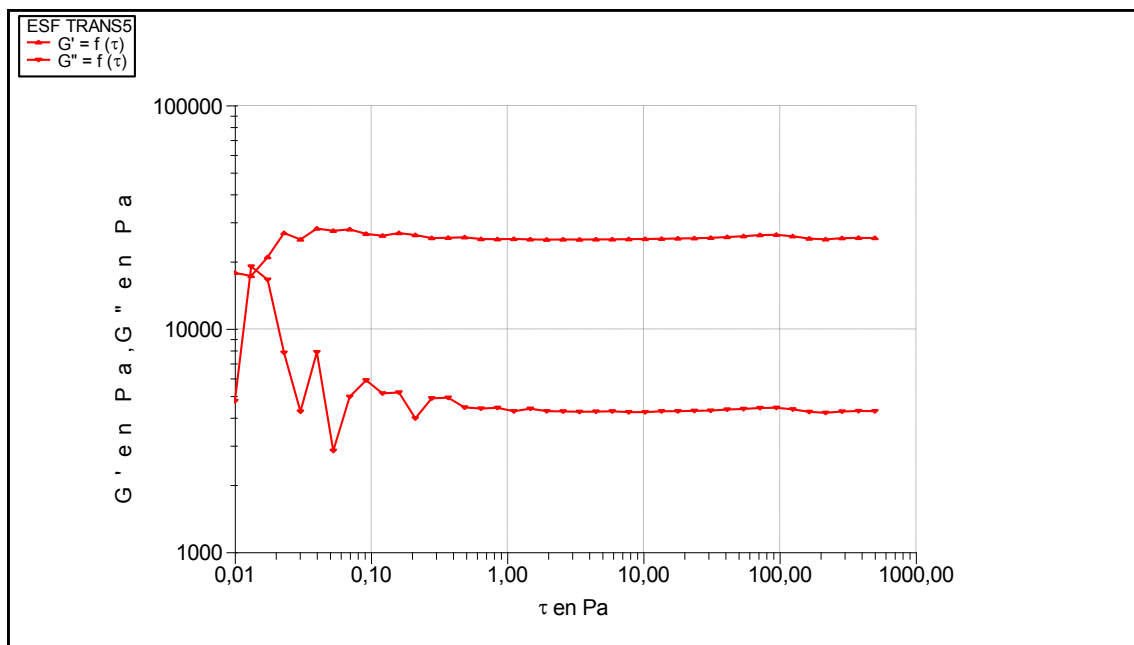
$G = 4748$ , [Pa]

$$d(\lg(\dot{\gamma}))/d(\lg(t)) = 0,2317 [1/s]$$

Los resultados del ensayo reflejaron un comportamiento elástico aceptable para este tipo de geles, superior al que presentaban los geles de plasma sin transglutaminasa, puesto que la recuperación de su módulo elástico representó el 65,80%; se dedujo que el enzima también fue responsable de la mejora de las propiedades estructurales del gel proteico.

b) Plasma + 5 U/g transglutaminasa

**BARRIDO DE ESFUERZO CON PLASMA+5U/g TRANSGLUTAMINASA**

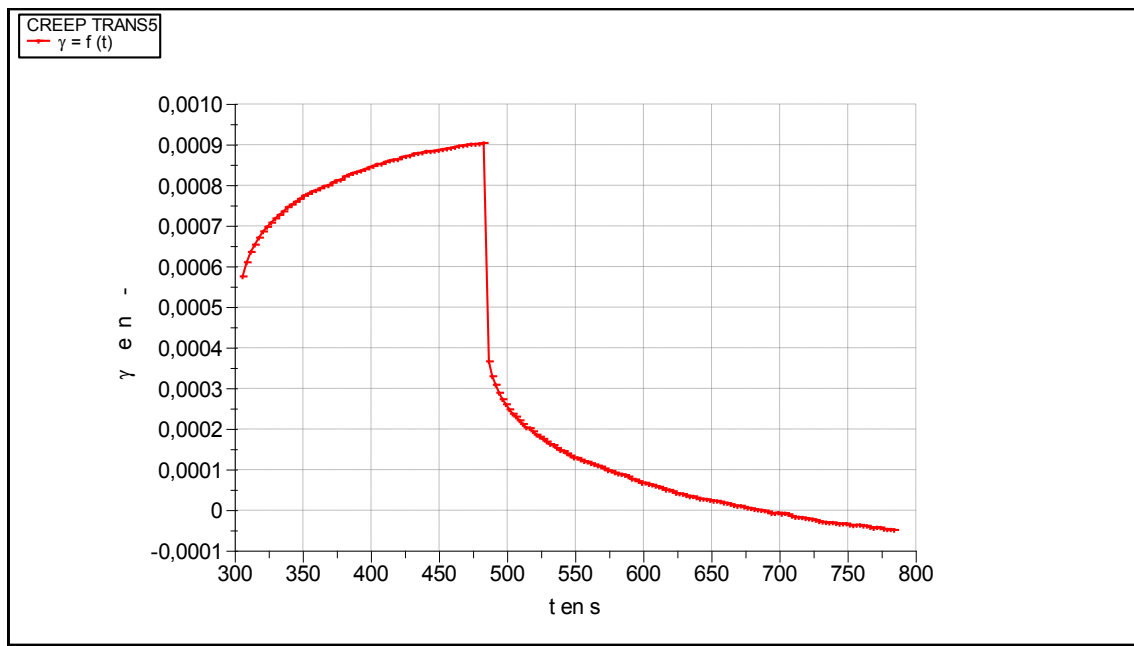


**Fig.17. Ensayo de barrido de esfuerzo sobre plasma a pH 7 + 5 U/g de transglutaminasa.**

Como puede observarse, la gráfica representa la evolución de los dos módulos del gel ensayado, elástico ( $G'$ ) y viscoso ( $G''$ ), expresado en pascales (Pa) frente a una deformación creciente, expresado también en pascales (Pa).

Como muestra la Figura 17, el resultado de este ensayo reveló que la resistencia de los geles fue muy buena debido, de nuevo, a la actividad de la transglutaminasa.

ENSAYO CREEP AND RECOVERY CON PLASMA+5U/g TRANSGLUTAMINASA



**Fig.18. Ensayo de fluencia y recuperación o Creep and Recovery, sobre gel de plasma a pH 7+ 5 U/g de transglutaminasa**

Como se puede ver, la gráfica (Figura 18), representa el grado de deformación alcanzada por el gel ( $\gamma$ ), expresada en %, frente al tiempo, expresado en segundos (s).

Resultados del ensayo

$$T = 10,00 \text{ [Pa]}$$

$$\eta = 2,545e+07 \text{ [Pas]}$$

$$\dot{\gamma} = 3,930e-07 \text{ [1/s]}$$

$$\gamma_e = 0,0008332 \text{ [-]}$$

$$J_e = 8,332e-05 \text{ [1/Pa]}$$

$$\gamma_r = 0,0009528 \text{ [-]}$$

$$\gamma_r/\gamma_{\text{-max}} = 105,4 \% = \% \text{recuperación elástica}$$

$$J_r = 9,528e-05 \text{ [-]}$$

$$J_r/J_{\text{-max}} = 105,4 \% = \% \text{recuperación elástica}$$

$$\psi_{1-10} = 1,079e+11 \text{ [Pas}^2\text{]}$$

$$\lambda = 2120, \text{ [s]}$$

$$G = 1,200e+04 \text{ [Pa]}$$

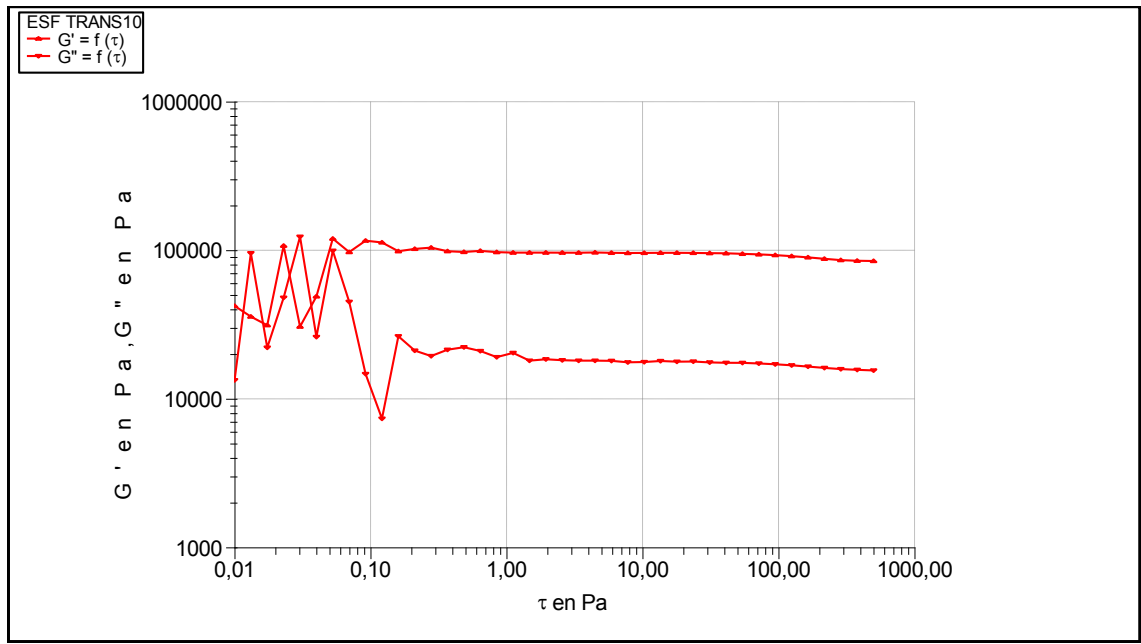
$$d(\lg(\dot{\gamma}))/d(\lg(t)) = 0,07464 \text{ [1/s]}$$

Los resultados revelaron un comportamiento elástico completo de estos geles, pues presentaron un componente elástico que se recuperó al 105,4%; así, se dedujo el papel fundamental de la transglutaminasa, que al añadirse en mayor concentración

fortaleció la red proteica que conforma la estructura de los geles plasmáticos. Figura 38.

c) Plasma + 10U/g transglutaminasa

**BARRIDO DE ESFUERZO CON PLASMA+10U/g TRANSGLUTAMINASA**

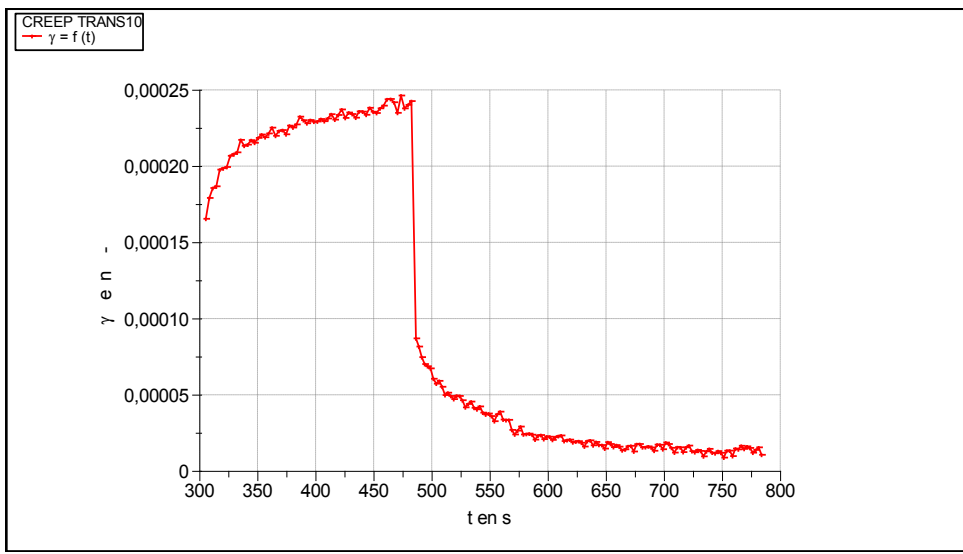


**Fig.19. Ensayo de barrido de esfuerzo sobre plasma a pH 7 + 10U/g de transglutaminasa**

Como se puede ver, en la gráfica (Figura 19) se representa el comportamiento de los módulos elástico ( $G'$ ) y viscoso ( $G''$ ), del gel, expresado en pascales (Pa), cuando son sometidos a una deformación creciente de 0 a 500 Pa.

El resultado fue similar al obtenido en anteriores ensayos de barrido; se observó claramente la firmeza de estos geles con una mayor concentración de transglutaminasa frente al esfuerzo aplicado, puesto que ninguno de sus dos módulos sufrió decaída ante la deformación.

**ENSAYO CREEP AND RECOVERY CON PLASMA+10U/g TRANSGLUTAMINASA**



**Fig.20. Ensayo de Creep and Recovery sobre plasma a pH 7 + 10U/g de transglutaminasa**

Como se observa, la gráfica (Figura 20) representa la deformación alcanzada ( $\gamma$ ) en %, frente al tiempo ( $t$ ) en segundos.

Resultados del ensayo

$$T = 10,00 \text{ [Pa]}$$

$$\eta = 6,815e+07 \text{ [Pas]} \quad \hat{\gamma} = 1,467e-07 \text{ [1/s]}$$

$$\gamma_e = 0,0002158 \text{ [-]} \quad J_e = 2,158e-05 \text{ [1/Pa]}$$

$$\gamma_r = 0,0002320 \text{ [-]} \quad \gamma_r/\gamma_{\text{-max}} = 95,63 \% = \% \text{recuperación elástica}$$

$$J_r = 2,320e-05 \text{ [-]} \quad J_r/J_{\text{-max}} = 95,63 \% = \% \text{recuperación elástica}$$

$$\psi_{1-10} = 2,005e+11 \text{ [Pas}^2\text{]}$$

$$\lambda = 1471, \text{ [s]}$$

$$G = 4,635e+04 \text{ [Pa]}$$

$$d(\lg(\hat{\gamma}))/d(\lg(t)) = 0,07545 \text{ [1/s]}$$

Los geles de plasma sintetizados con 10U/g de transglutaminasa mostraron un excelente comportamiento elástico, puesto que presentaron un 95,63% de recuperación elástica. Esto denotó la capacidad del enzima para mejorar considerablemente la estructura interna de los geles, sin embargo la irregularidad en el comportamiento de los geles a lo largo del ensayo, visible en la gráfica, podría deberse

a una heterogeneidad estructural causada por las interacciones entre la transglutaminasa, en este ensayo presente en mayor concentración, y las proteínas del propio gel.

### 3.1.2.2. PLASMA LIOFILIZADO

Se ensayaron geles a partir de muestras que fueron liofilizadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  y 0,1mb durante 24 horas, en un Liofilizador Telstar, modelo Cryodos. Se hicieron dos tipos de ensayos:

#### a) Plasma liofilizado reconstituido y diluido 1:10

Este tipo de plasma se liofilizó y posteriormente se reconstituyó con agua, pero no en la misma proporción en que se encuentran las proteínas en el plasma, sino que se añadió 10 partes de agua destilada por cada parte de proteína, así, se consiguió un producto diluido; de este producto, para elaborar cada gel, se tomaron 3g, y después se espolvoreó la transglutaminasa en 3 concentraciones diferentes y a continuación se incubaron en estufa a  $50^{\circ}\text{C}$  durante 120 min, de este modo se han obtenidos diversos geles, que se detallan a continuación:

#### 1) Plasma liofilizado reconstituido y diluido 1:10 + 5U/g de transglutaminasa

Cuando se incubaron en la estufa en las mismas condiciones que las mencionadas anteriormente para los geles sintetizados con la transglutaminasa, no se pudo conseguir la coagulación de las proteínas del plasma de una forma apta para obtener un gel que pudiese ser caracterizado después; esto pudo deberse a la dilución de las proteínas, que, tras haber sido sometidas a un proceso de liofilización, ya no se encontraban en las condiciones óptimas para conseguir una gelificación correcta y homogénea.

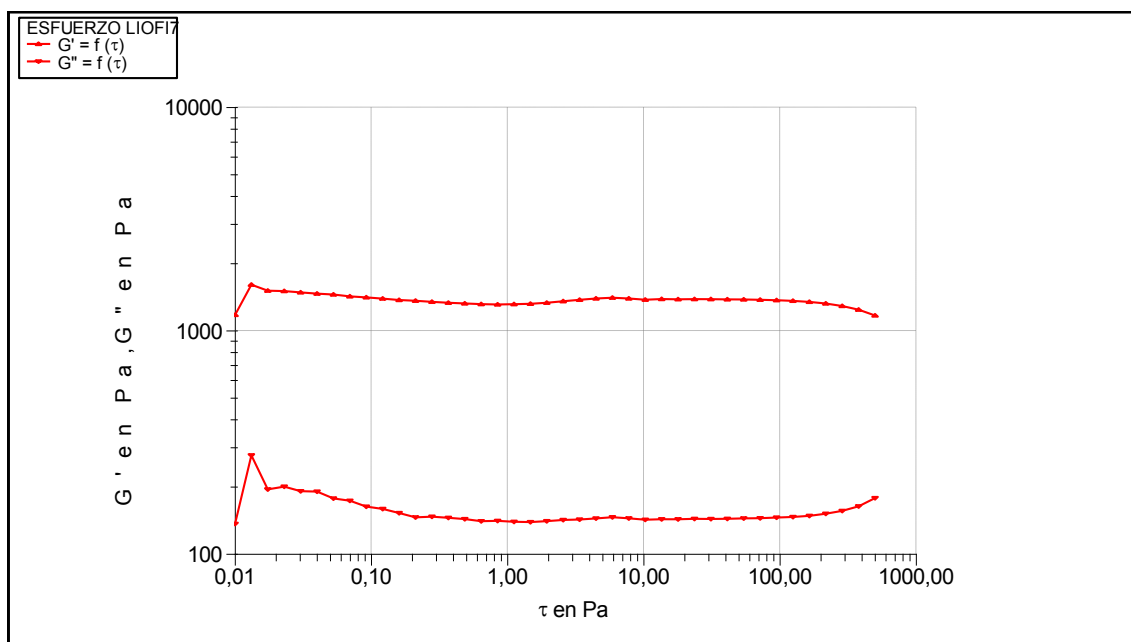
#### 2) Plasma liofilizado reconstituido y diluido 1:10 + 7 U/g de transglutaminasa

Como no se pudieron sintetizar geles con una concentración de 5U/g del enzima, se intentó hacer lo mismo con una concentración de 7U/g; en estas condiciones, sí se consiguió la coagulación correcta de las proteínas plasmáticas y una gelificación apta para ser caracterizada reológicamente. De esta manera, se sometió a los geles



obtenidos a dos tipos de ensayos: Barrido de esfuerzo y Creep and Recovery (Fluencia y Recuperación), cuyos resultados fueron los que aquí se muestran:

**BARRIDO DE ESFUERZO EN GEL DE PLASMA LIOFILIZADO RECONSTITUIDO Y DILUIDO 1:10 + 7U/g DE TRANSGLUTAMINASA**

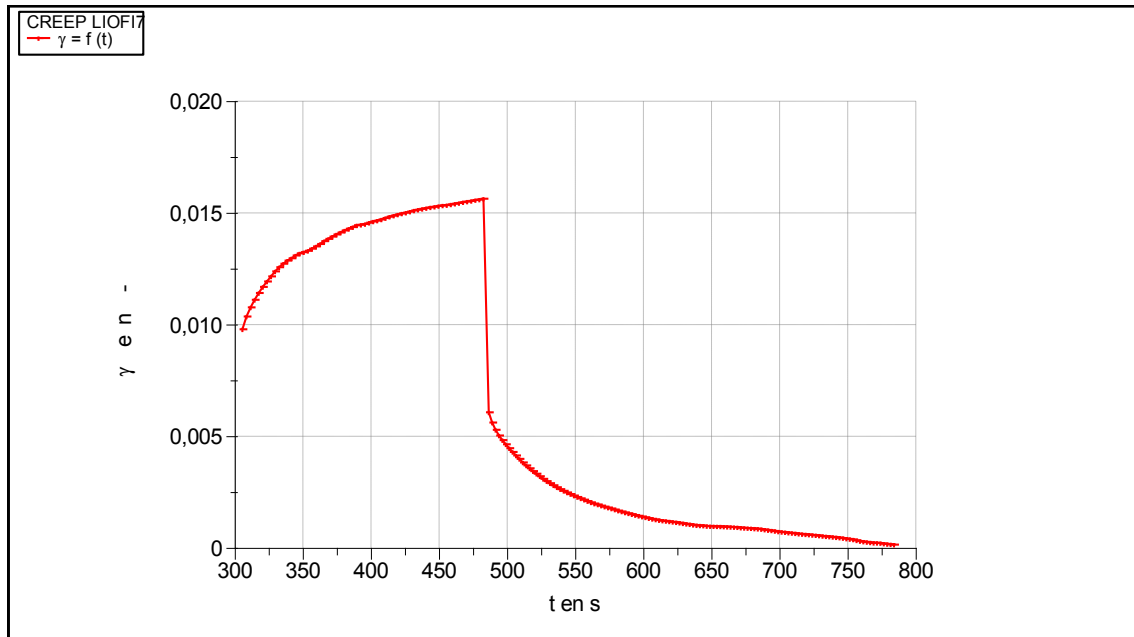


**Fig.21. Barrido de esfuerzo sobre gel de plasma liofilizado reconstituido y diluido 1:10 + 7 U/g de transglutaminasa**

Como se puede ver, la gráfica (Figura 21), representa la evolución de los dos módulos del gel, elástico ( $G'$ ) y viscoso ( $G''$ ) expresada en pascales (Pa), frente a una deformación creciente aplicada y expresada también en pascales (Pa).

A la vista de los resultados obtenidos, se observó una buena resistencia de estos geles frente a la deformación aplicada, puesto que ninguno de los módulos del gel decayó durante el ensayo.

**CREEP AND RECOVERY EN GEL DE PLASMA LIOFILIZADO RECONSTITUIDO Y DILUIDO 1:10 + 7U/g DE TRANSGLUTAMINASA**



**Fig.22. Ensayo de Creep and Recovery sobre gel de plasma liofilizado reconstituido y diluido 1:10 + 7U/g de transglutaminasa**

En la gráfica de la Figura 22 se representa la deformación alcanzada por el gel ( $\gamma$ ) en %, frente al tiempo (t), expresado en segundos.

Resultados del ensayo

$$T = 10,00 \text{ [Pa]}$$

$$\eta = 9,820e+05 \text{ [Pas]} \quad \dot{\gamma} = 1,018e-05 \text{ [1/s]}$$

$$Y = 0,01380 \text{ [-]} \quad J_e = 0,001380 \text{ [1/Pa]}$$

$$Y = 0,01549 \text{ [-]} \quad Y-r/Y\text{-max} = 99,06 \% \rightarrow \% \text{ recuperación}$$

$$J-r = 0,001549 \text{ [-]} \quad J-r/J\text{-max} = 99,06 \% \rightarrow \% \text{ recuperación}$$

$$\Psi_{1-10} = 2,662e+09 \text{ [Pas}^2\text{]}$$

$$\Lambda = 1355, \text{ [s]}$$

$$G = 724,7 \text{ [Pa]}$$

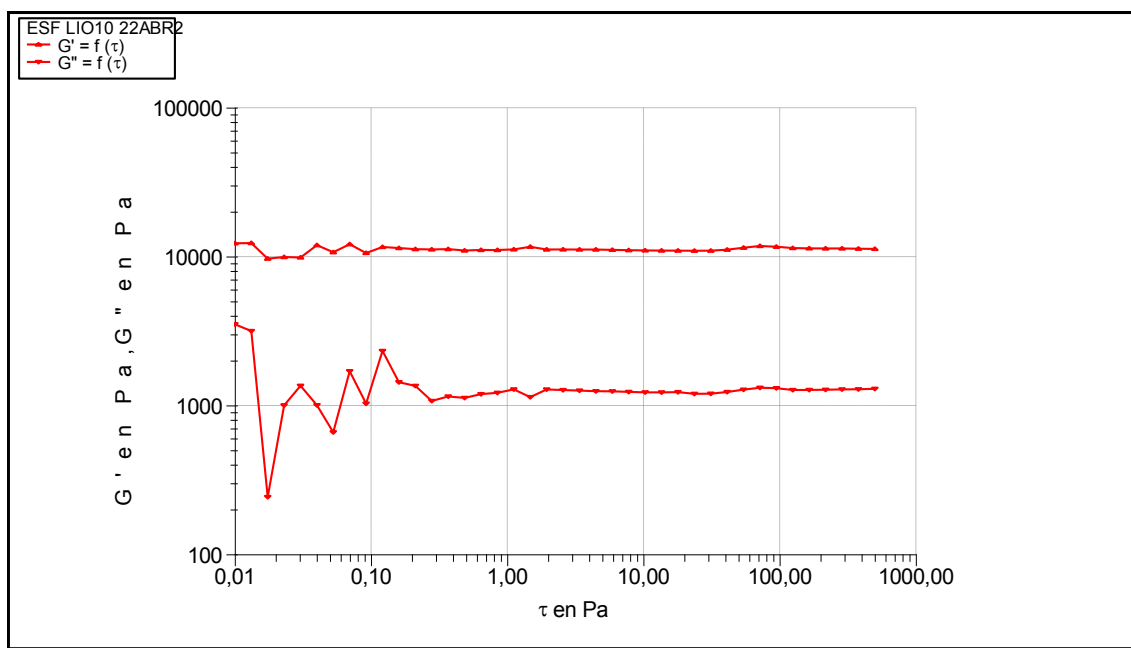
$$d(\lg(\dot{\gamma}))/d(\lg(t)) = 0,1128 \text{ [1/s]}$$

Se observó un excelente comportamiento elástico de los geles liofilizados con esta concentración de transglutaminasa, puesto que la recuperación de su módulo elástico fue prácticamente completa.

3) Plasma liofilizado reconstituido y diluido 1:10 + 10U/g de transglutaminasa

Para concluir los ensayos con plasma liofilizado, reconstituido y diluido 1:10, se incubaron geles añadiendo al plasma liofilizado 10U/g de transglutaminasa y se les aplicó un Barrido de Esfuerzo y un ensayo de Creep and Recovery; los resultados obtenidos fueron claramente diferentes a los anteriores, se presentan a continuación:

**BARRIDO DE ESFUERZO EN GELES DE PLASMA LIOFILIZADO RECONSTITUIDO Y DILUIDO 1:10 + 10U/g TRANSGLUTAMINASA**

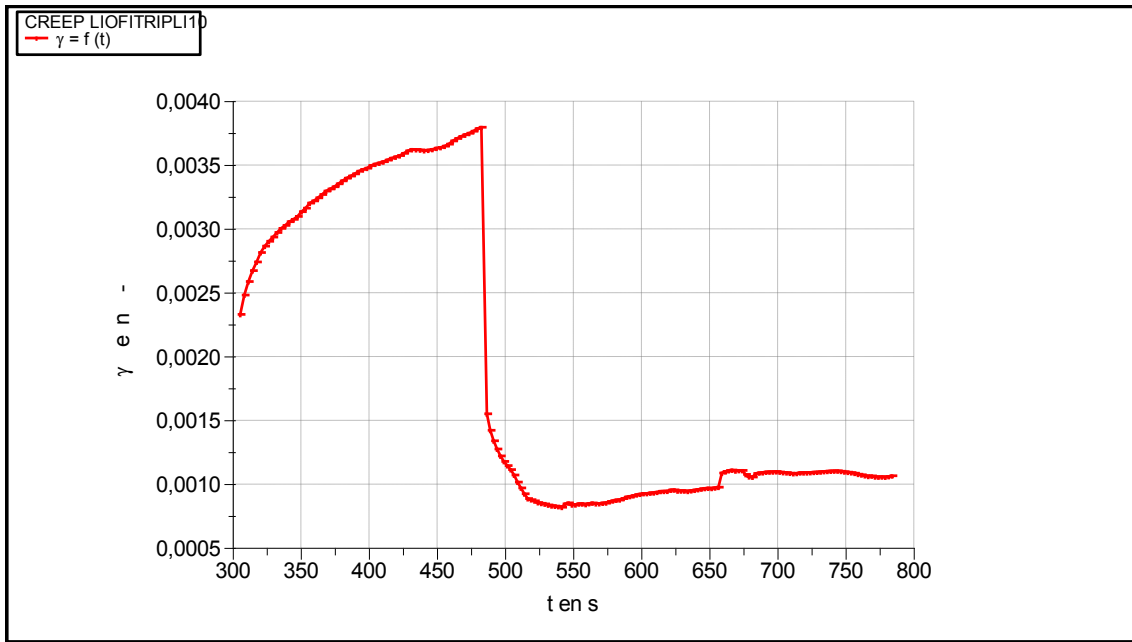


**Fig. 23. Ensayo de barrido de esfuerzo sobre gel de plasma liofilizado reconstituido y diluido 1:10 + 10U/g de transglutaminasa**

En la gráfica (Figura 23) se representa la evolución de los módulos elástico ( $G'$ ) y viscoso ( $G''$ ) del gel, en pascuales (Pa), frente a un esfuerzo creciente aplicado, de 0 a 500 Pa.

Los resultados demostraron una buena firmeza en los geles ensayados, ante una deformación creciente.

**CREEP AND RECOVERY EN GELES DE PLASMA LIOFILIZADO RECONSTITUIDO Y DILUIDO 1:10+ 10U/g DE TRANSGLUTAMINASA**



**Fig.24. Ensayo de Creep and Recovery sobre gel de plasma liofilizado reconstituido y diluido 1:10 + 10U/g de transglutaminasa**

En la gráfica de la Figura 24 se muestra la deformación alcanzada ( $\gamma$ ) en % frente el tiempo ( $t$ ) en segundos.

Resultados del ensayo

$$T = 10,00 \text{ [Pa]}$$

$$\eta = 2,035e+06 \text{ [Pas]} \quad \dot{\gamma} = 4,915e-06 \text{ [1/s]}$$

$$Y_e = 0,002912 \text{ [-]} \quad J_e = 0,0002912 \text{ [1/Pa]}$$

$$Y_r = 0,002730 \text{ [-]} \quad Y_r/Y_{-max} = 71,93 \text{ \%} \rightarrow \text{\% recuperación elástica}$$

$$J_r = 0,0002730 \text{ [-]} \quad J_r/J_{-max} = 71,93 \text{ \%} \rightarrow \text{\% recuperación elástica}$$

$$\psi_{1-10} = 2,411e+09 \text{ [Pas}^2\text{]}$$

$$\lambda = 592,4 \text{ [s]}$$

$$G = 3434, \text{ [Pa]}$$

$$d(\lg(\dot{\gamma}))/d(\lg(t)) = 0,2237 \text{ [1/s]}$$

Los resultados obtenidos denotaron que, en el caso de geles provenientes de plasma liofilizado y posteriormente reconstituido y diluido 1:10, también se consiguió un alto

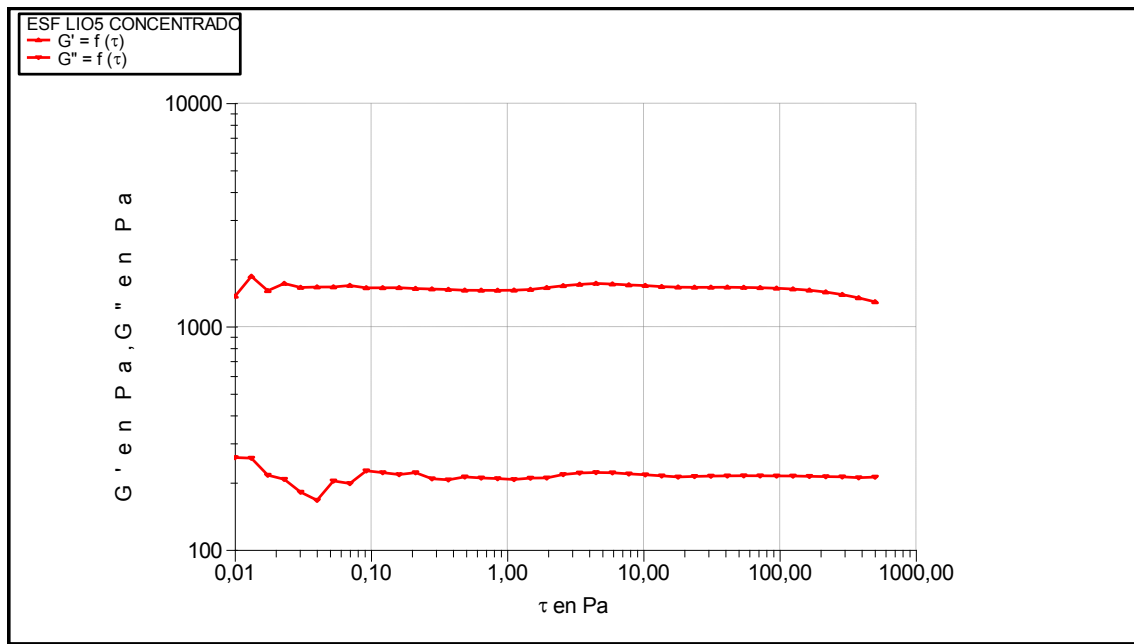
porcentaje de recuperación elástica tras haber sometido al gel a un esfuerzo continuado durante 3 minutos; sin embargo, se puede observar que fue algo inferior al obtenido en los ensayos realizados con 7u/g de transglutaminasa; una explicación de estos resultados podría ser posibles cambios en la estructura interna de los geles de plasma como consecuencia de cambios estructurales producidos en las proteínas plasmáticas y también en los enlaces peptídicos entre ellas durante la liofilización que podrían conducir a cambios en la interacción entre estas y la transglutaminasa, traduciéndose en una ligera disminución en la actividad de esta, que se vería sobre todo reflejado en casos en que esta se añadiera en concentraciones elevadas.

### b) Plasma liofilizado reconstituido 1:1

Esta vez, el plasma que se liofilizó también se reconstituyó con agua, pero esta fue añadida en la misma proporción en que se encuentran las proteínas en el plasma, es decir, 1 parte de agua por cada parte de proteína (1:1); de este modo se consiguió hidratar el plasma sin diluirlo, con el fin de recuperar el producto original. Para elaborar los geles se siguió el mismo procedimiento que para los de plasma liofilizado diluido. Al plasma se espolvoreó transglutaminasa en diferentes concentraciones y se incubó en estufa a 50°C durante 120 min, los resultados se explican a continuación:

#### 1) Plasma liofilizado y reconstituido 1:1 + 5U/g de transglutaminasa

Al contrario de lo que sucedió con el plasma liofilizado diluido 1:10 tratado con 5 U/g de transglutaminasa, en el cual no se consiguió coagulación de las proteínas, en este caso en el que no hay dilución, si se consiguieron geles proteicos; se les sometió a 2 tipos de ensayo, Barrido de Esfuerzo y Creep and Recovery, cuyos resultados se reflejan aquí:

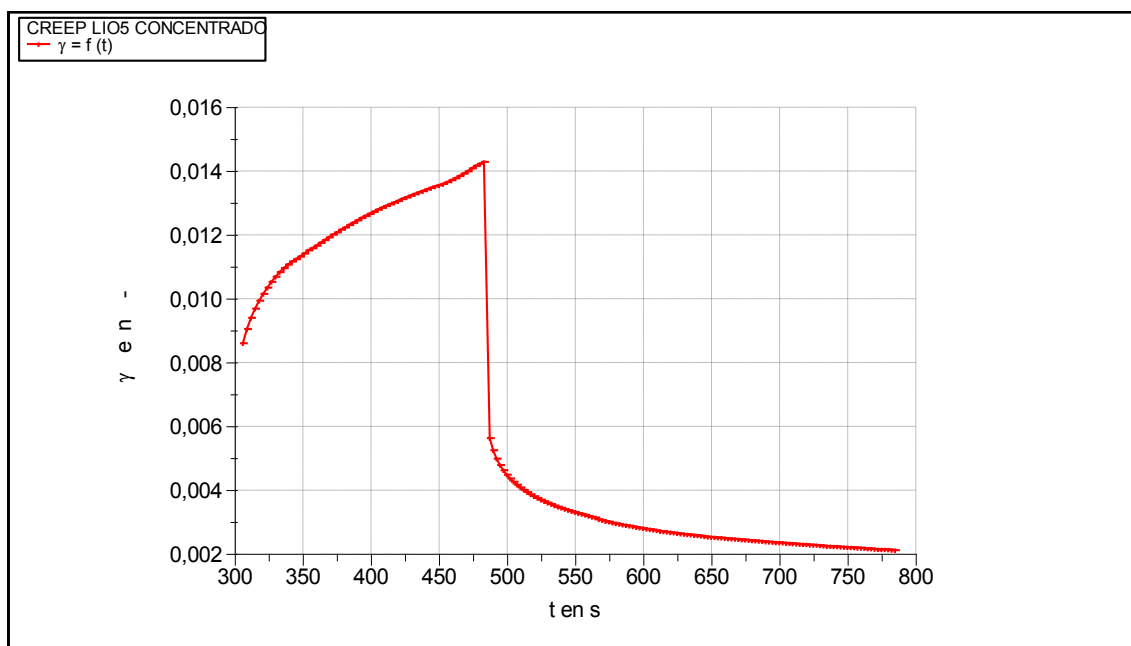
**BARRIDO DE ESFUERZO EN GELES DE PLASMA LIOFILIZADO Y RECONSTITUIDO 1:1 + 5U/g DE TRANSGLUTAMINASA**


**Fig.25. Ensayo de barrido de esfuerzo sobre gel de plasma liofilizado y reconstituido 1:1 + 5U/g de transglutaminasa**

Como puede verse, la gráfica de la Figura 25 representa la evolución de los dos módulos, elástico ( $G'$ ) y viscoso ( $G''$ ), expresada en pascales (Pa), frente a la deformación aplicada, expresada también en pascales (Pa).

Los resultados revelaron una buena resistencia de los geles ensayados ante el esfuerzo creciente (de 0 a 500 Pa), la prueba la tenemos en que ninguno de sus dos módulos decayó durante el ensayo.

**CREEP AND RECOVERY EN GELES DE PLASMA LIOFILIZADO Y RECONSTITUIDO 1:1 + 5U/g DE TRANSGLUTAMINASA**



**Fig.26. Ensayo de Creep and Recovery sobre gel de plasma liofilizado y reconstituido 1:1 + 5U/g de transglutaminasa**

Como se puede observar en la Figura 26, la gráfica representa la deformación alcanzada por el gel ( $\gamma$ ) expresada en %, frente al tiempo ( $t$ ) en segundos.

Resultados del ensayo

$$T = 10,00 \text{ [Pa]}$$

$$\eta = 3,973e+05 \text{ [Pas]} \quad \hat{Y} = 2,517e-05 \text{ [1/s]}$$

$$Ye = 0,009768 \text{ [-]} \quad Je = 0,0009768 \text{ [1/Pa]}$$

$$Y-r = 0,01217 \text{ [-]} \quad Y-r/Y-max = 85,18 \% \rightarrow \% \text{ recuperación elástica}$$

$$J-r = 0,001217 \text{ [-]} \quad J-r/J-max = 85,18 \% \rightarrow \% \text{ recuperación elástica}$$

$$\Psi_{1-10} = 3,083e+08 \text{ [Pas}^2\text{]}$$

$$\lambda = 388,1 \text{ [s]}$$

$$G = 1024, \text{ [Pa]}$$

$$d(\lg(\hat{Y}))/d(\lg(t)) = 0,3038 \text{ [1/s]}$$

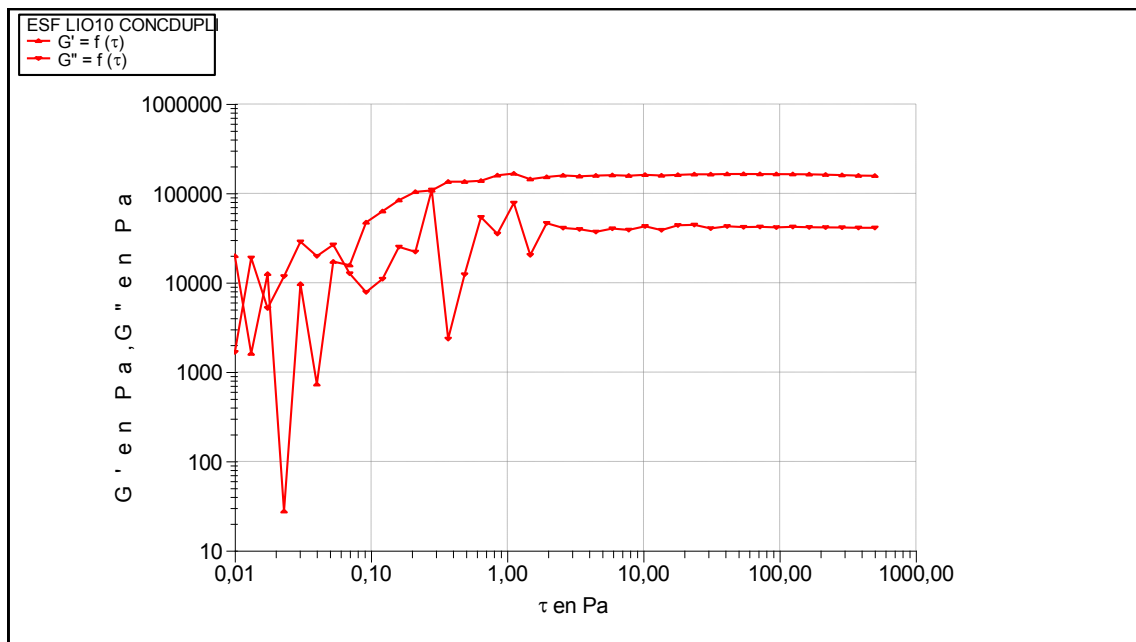
Los resultados del ensayo mostraron un importante comportamiento elástico de estos geles frente al Creep aplicado durante 3 minutos, ya que en los 6 minutos siguientes,

fueron capaces de recuperar el 85% de su estructura; en este caso la respuesta fue similar a la de un gel con las mismas características, procedente de plasma sin liofilizar.

2) Plasma liofilizado y reconstituido 1:1 + 10U/g de transglutaminasa

Se pudieron realizar también geles añadiendo al plasma liofilizado y reconstituido 10U/g de transglutaminasa. A estos geles se les aplicaron Barrido de Esfuerzo y Creep and Recovery, cuyos resultados se detallan aquí.

**BARRIDO DE ESFUERZO EN GELES DE PLASMA LIOFILIZADO Y RECONSTITUIDO 1:1 + 10U/g DE TRANSGLUTAMINASA**



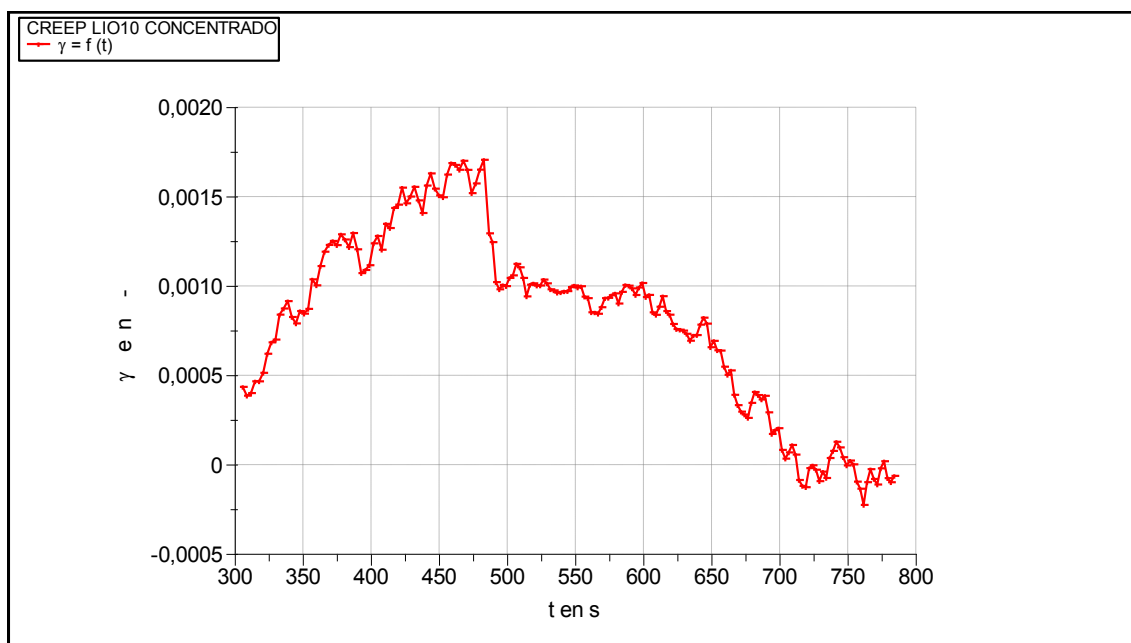
**Fig.27. Ensayo de barrido de esfuerzo sobre gel de plasma liofilizado y reconstituido 1:1 + 10U/g de transglutaminasa**

En la gráfica (Figura 27) se puede observar el comportamiento de los módulos elástico ( $G'$ ) y viscoso ( $G''$ ) del gel, expresado en Pa, cuando se les aplica una deformación de 0 a 500 Pa.

Los resultados mostraron una buena resistencia de los geles frente a la deformación creciente que sufrieron en el ensayo, ya que los dos módulos soportaron hasta 500 Pa sin decaer.



**CREEP AND RECOVERY EN GELES DE PLASMA LIOFILIZADO Y RECONSTITUIDO 1:1 + 10U/g DE TRANSGLUTAMINASA**



**Fig.28. Ensayo de Creep and Recovery sobre gel de plasma liofilizado y reconstituido 1:1 + 10U/g de transglutaminasa**

Se observa en la gráfica de la Figura 28 la deformación alcanzada ( $\gamma$ ) expresada en %, frente al tiempo ( $t$ ), expresado en segundos.

Resultados del ensayo

$$T = 10,00 \text{ [Pa]}$$

$$\eta = -1,034e+07 \text{ [Pas]}$$

$$\dot{\gamma} = -9,670e-07 \text{ [1/s]}$$

$$Y_e = 0,001805 \text{ [-]}$$

$$J_e = 0,0001805 \text{ [1/Pa]}$$

$$Y-r = 0,001769 \text{ [-]}$$

$$Y-r/Y\text{-max} = 103,7 \% \rightarrow \% \text{ recuperación elástica}$$

$$J-r = 0,0001769 \text{ [-]}$$

$$J-r/J\text{-max} = 103,7 \% \rightarrow \% \text{ recuperación elástica}$$

$$\Psi_{1-10} = 3,860e+10 \text{ [Pas}^2\text{]}$$

$$\lambda = -1866, \text{ [s]}$$

$$G = 5542, \text{ [Pa]}$$

$$d(\lg(Y))/d(\lg(t)) = -0,1063 \text{ [1/s]}$$

Como podemos observar en el análisis, el gel fue capaz de recuperar totalmente su módulo elástico tras haber sido sometido a un esfuerzo constante; sin embargo el

ensayo siguió un curso muy irregular, como si el reómetro hubiese encontrado imperfecciones en la muestra estudiada que se tradujeron en los altibajos mostrados en la representación gráfica. Como en los anteriores ensayos, es probable que el origen de las irregularidades en el ensayo sea la heterogeneidad estructural de los geles sometidos a ensayo, debida sobre todo a cambios en las proteínas del plasma liofilizado que podrían dificultar las interacciones entre estas y la transglutaminasa, estos problemas se acrecentarían por tratarse de muestras más concentradas, y, por tanto, con un mayor porcentaje proteico en su estructura.

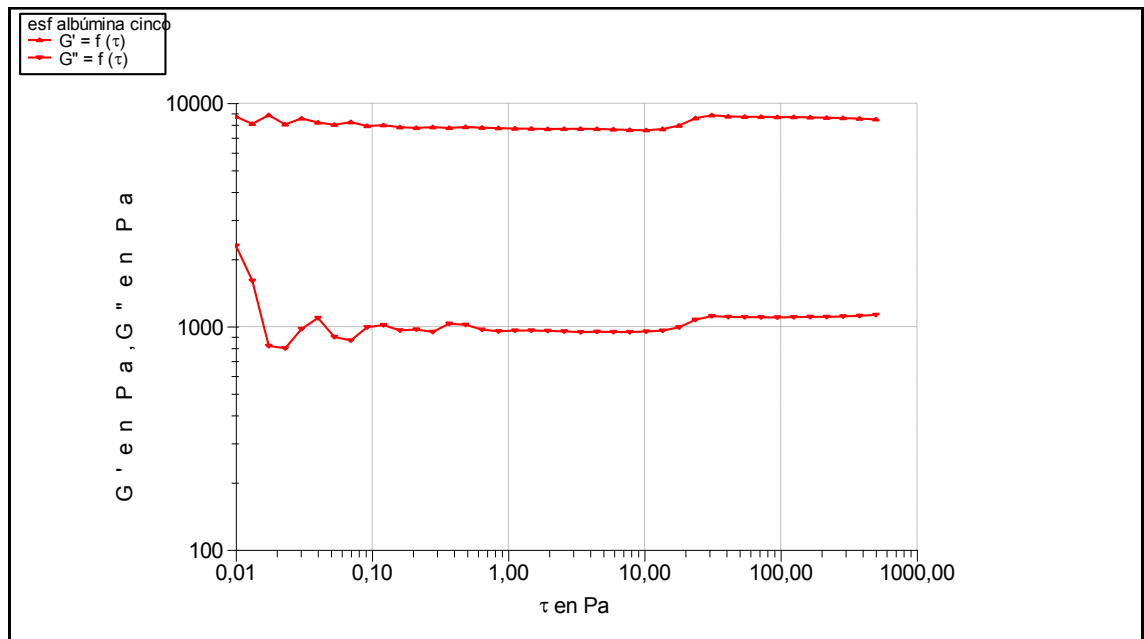
### 3.1.2.3. ALBÚMINA

El plasma se fraccionó y se obtuvieron cuatro fracciones: de la primera se obtuvo fibrinógeno, de la segunda gamma-globulina, de la tercera alfa y beta-globulina y de la cuarta albúmina, con esta última fracción, resuspendida en tampón fosfato a pH 7.6, fue con la que se ensayaron geles añadiendo a 3g de la albúmina resuspendida concentraciones crecientes de transglutaminasa: 5U/g, 7U/g, 10U/g y 12.5U/g y a continuación fueron incubados en estufa a 50°C durante 90 min. De este modo se obtuvieron los resultados que se muestran a continuación.

- a) Geles de albúmina + 5U/g de transglutaminasa.

Este tipo de geles se sometieron a dos tipos de ensayo; Barrido de esfuerzo y Creep and Recovery. Los resultados se detallan a continuación:

**BARRIDO DE ESFUERZO EN GELES DE SEROALBÚMINA BOVINA (BSA) + 5U/G TRANSGLUTAMINASA**

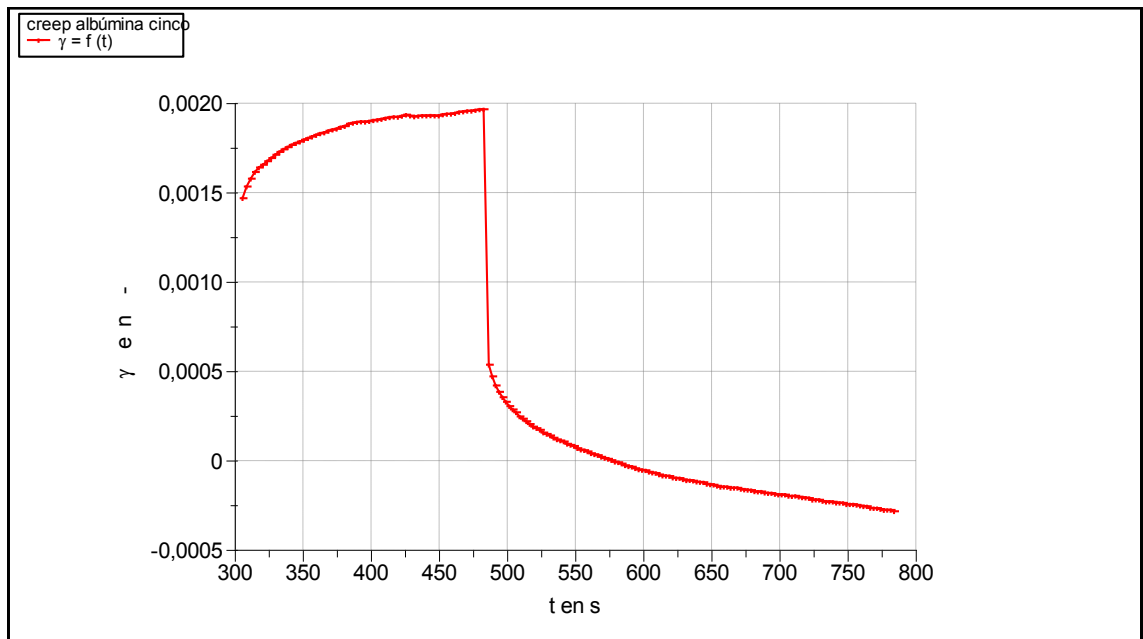


**Fig.29. Ensayo de barrido de esfuerzo sobre gel de albúmina + 5U/g de transglutaminasa**

En la gráfica (Figura 29) se muestra el comportamiento de los dos módulos del gel. Elástico ( $G'$ ) y viscoso ( $G''$ ), expresado en pascales (Pa), frente al esfuerzo aplicado, también en pascales (Pa).

En este barrido, el gel de albúmina ensayado con 5U/g de transglutaminasa fue capaz de resistir esfuerzos crecientes de 0 hasta 500 Pa, sin que ninguno de sus dos módulos, ni elástico ( $G'$ ) ni viscoso ( $G''$ ) decayera en el transcurso de la prueba, lo que demostró una gran firmeza de los mismos.

**CREEP AND RECOVERY EN GELES DE SEROALBÚMINA BOVINA (BSA) + 5U/G TRANSGLUTAMINASA**



**Fig.30. Ensayo de Creep and Recovery sobre gel de albúmina + 5U/g de transglutaminasa**

Como se puede ver, en la Figura 30 se representa la deformación alcanzada por el gel ( $\gamma$ ), expresada en %, frente al tiempo ( $t$ ) expresado en segundos.

Resultados del ensayo

$$T = 10,00 \text{ [Pa]}$$

$$\eta = 1,162e+07 \text{ [Pas]}$$

$$\hat{Y} = 8,602e-07 \text{ [1/s]}$$

$$Y = 0,001812 \text{ [-]}$$

$$J_e = 0,0001812 \text{ [1/Pa]}$$

$$Y-r = 0,002250 \text{ [-]}$$

$$Y-r/Y\text{-max} = 114,4 \% \rightarrow \% \text{ recuperación elástica}$$

$$J-r = 0,0002250 \text{ [-]}$$

$$J-r/J\text{-max} = 114,4 \% \rightarrow \% \text{ recuperación elástica}$$

$$\Psi_{1-10} = 4,897e+10 \text{ [Pas}^2\text{]}$$

$$\lambda = 2106, \text{ [s]}$$

$$G = 5520, \text{ [Pa]}$$

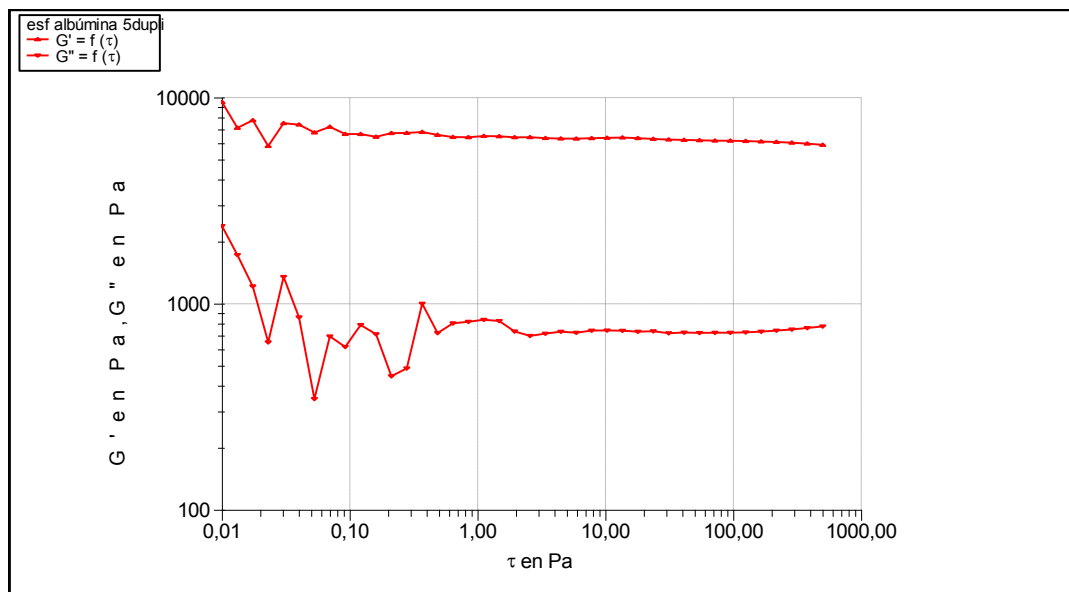
$$d(\lg(\hat{Y}))/d(\lg(t)) = 0,07501 \text{ [1/s]}$$

Los resultados obtenidos mostraron que los geles ensayados respondieron perfectamente al ensayo de Creep and Recoveryal que se sometieron, ya que tras cesar el esfuerzo aplicado, su módulo elástico se recuperó totalmente.

b) Geles de albúmina + 7U/g de transglutaminasa

Estos geles, se fabricaron añadiendo una concentración algo mayor de transglutaminasa pero manteniendo constante la concentración de BSA. Fueron sometidos a las mismas pruebas reológicas que los anteriores, Barrido de esfuerzo y Creep and Recovery, cuyos resultados se detallan a continuación:

**BARRIDO DE ESFUERZO EN GELES DE SEROALBÚMINA BOVINA (BSA) +7U/G TRANSGLUTAMINASA**

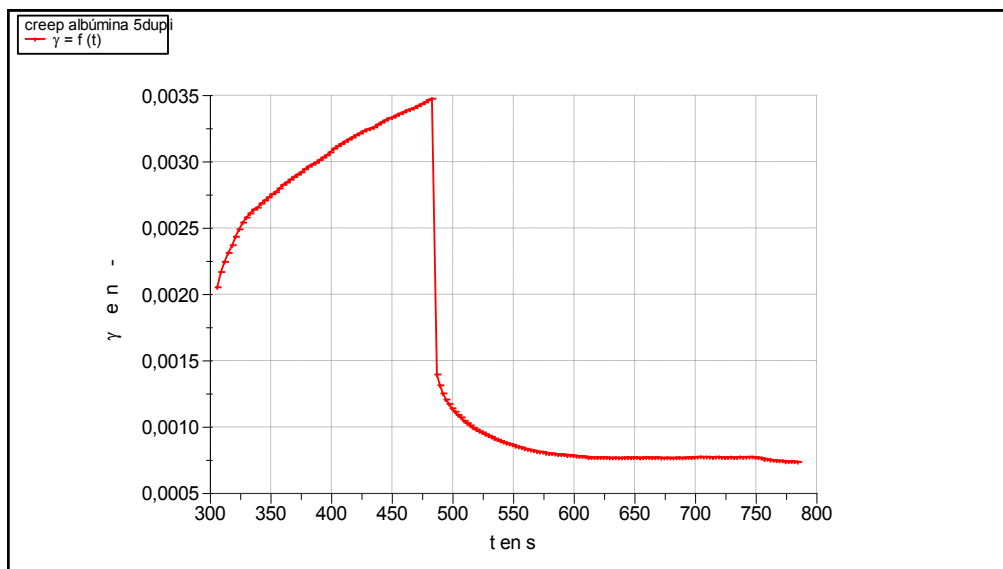


**Fig.31. Ensayo de Barrido de esfuerzo sobre gel de albúmina + 7U/g de transglutaminasa**

En la gráfica (Figura 31) se representa la evolución de los dos módulos del gel, elástico ( $G'$ ) y viscoso ( $G''$ ) expresada en pascales (Pa), frente a una deformación creciente aplicada de 0 a 500 Pa.

Como se puede observar, tras aplicar un esfuerzo creciente a estos geles desde 0 a 500 Pa, no se observó la caída de ninguno de los dos módulos, lo que demostró una resistencia considerablemente elevada también con esta concentración de transglutaminasa.

**CREEP AND RECOVERY EN GELES DE SEROALBÚMINA BOVINA (BSA) +7U/G  
TRANSGLUTAMINASA**



**Fig.32. Ensayo de Creep and Recovery sobre gel de albúmina + 7U/g de transglutaminasa**

Como se puede observar, en la gráfica (Figura 32), se representa la deformación alcanzada por el gel ( $\gamma$ ) expresada en %, frente al tiempo ( $t$ ), expresado en segundos.

Resultados del ensayo

$$T = 10,00 \text{ [Pa]}$$

$$\eta = 2,091e+06 \text{ [Pas]} \quad \dot{\gamma} = 4,783e-06 \text{ [1/s]}$$

$$Y = 0,002614 \text{ [-]} \quad J_e = 0,0002614 \text{ [1/Pa]}$$

$$Y-r = 0,002739 \text{ [-]} \quad Y-r/Y\text{-max} = 78,85 \% \rightarrow \% \text{ recuperación elástica}$$

$$J-r = 0,0002739 \text{ [-]} \quad J-r/J\text{-max} = 78,85 \% \rightarrow \% \text{ recuperación elástica}$$

$$\Psi_{1-10} = 2,286e+09 \text{ [Pas}^2\text{]}$$

$$\lambda = 546,6 \text{ [s]}$$

$$G = 3825, \text{ [Pa]}$$

$$d(\lg(\dot{\gamma}))/d(\lg(t)) = 0,2398 \text{ [1/s]}$$

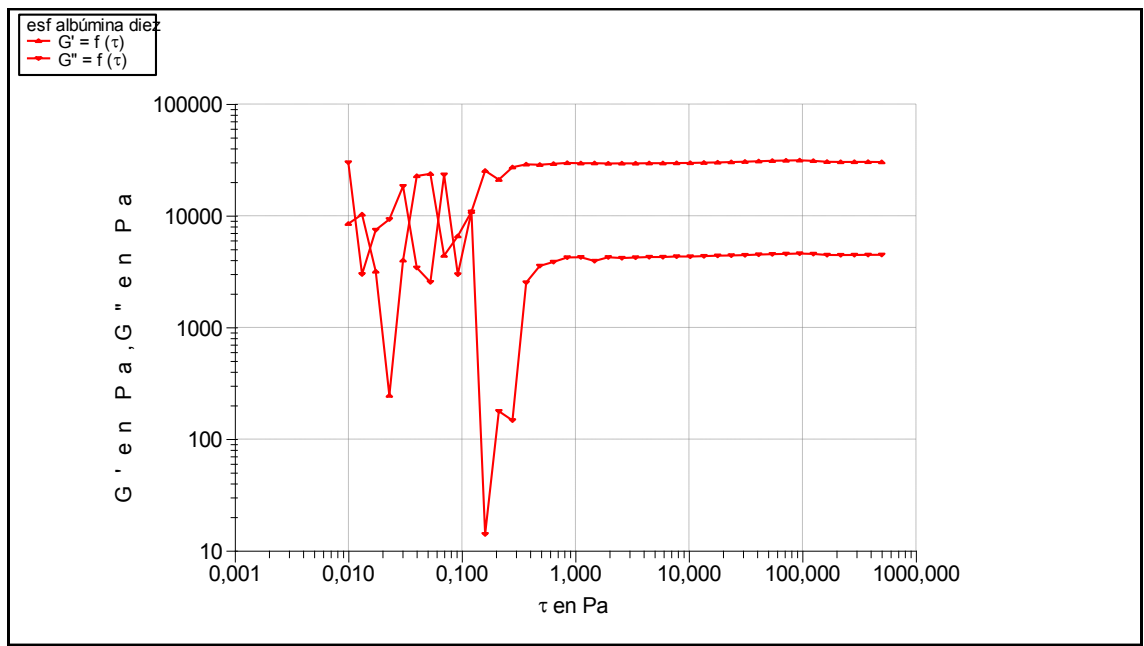
Los geles ensayados en estas condiciones presentaron también un muy buen comportamiento elástico (78.85% de recuperación) cuando fueron sometidos a un esfuerzo constante durante 3 minutos y se les dejó recuperar durante 6. Sin embargo

ésta no fue completa, como en los ensayados con 5U/g de transglutaminasa; como no varió la concentración de albúmina, en este caso todo parece indicar una relación inversamente proporcional entre la concentración del enzima añadido y la capacidad de recuperación elástica del gel tras haber sido sometido a un esfuerzo continuado.

c) Geles de albúmina + 10U/g de transglutaminasa

En el tercer ensayo, se añadió a la albúmina 10U/g de transglutaminasa y también se ensayaron los geles sintetizados. Estos fueron los resultados obtenidos:

**BARRIDO DE ESFUERZO SOBRE GELES DE SEROALBÚMINA BOVINA (BSA) +10 U/g DE TRANSGLUTAMINASA**

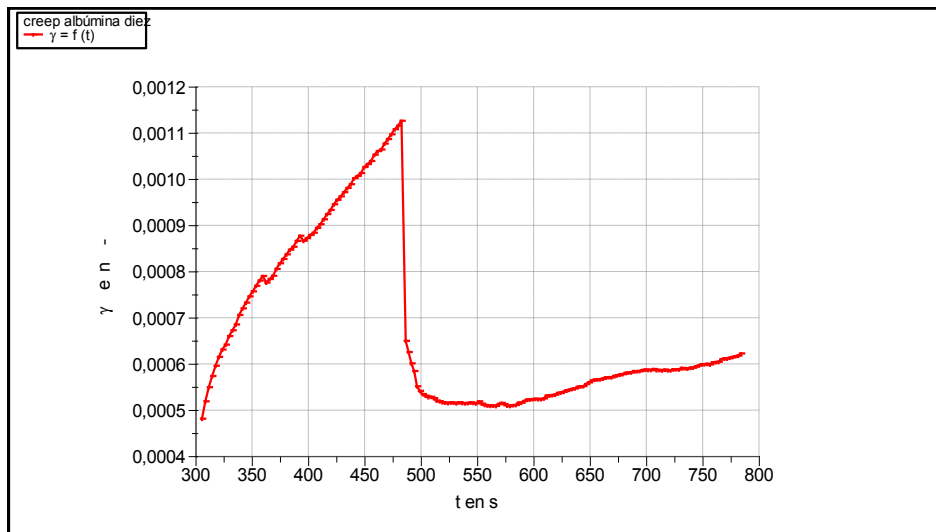


**Fig.33. Ensayo de barrido de esfuerzo sobre gel de albúmina + 10U/g de transglutaminasa**

En la gráfica (Figura 33) se muestra la evolución de los módulos elástico ( $G'$ ) y viscoso ( $G''$ ) del gel, expresada en pascales (Pa), cuando sufren una deformación creciente, expresada también en pascales (Pa).

Los geles mostraron buenas propiedades reológicas, al ser capaces de soportar un esfuerzo creciente de 0 a 500 Pa cuando fueron sometidos a él durante 300 segundos, no observándose decaídas en ninguno de los módulos.

**CREEP AND RECOVERY EN GELES DE SEROALBÚMINA BOVINA (BSA) +10 U/g DE TRANSGLUTAMINASA**



**Fig.34. Ensayo de Creep and Recovery sobre gel de albúmina + 10U/g de transglutaminasa**

Como se puede observar, en la Figura 34 se representa la deformación que puede alcanzar el gel ( $\gamma$ ), expresada en %, frente al tiempo (t), expresado en segundos.

Resultados del ensayo

$$T = 10,00 \text{ [Pa]}$$

$$\eta = 3,049e+06 \text{ [Pas]} \quad \hat{Y} = 3,280e-06 \text{ [1/s]}$$

$$Y_e = 0,0005359 \text{ [-]} \quad J_e = 5,359e-05 \text{ [1/Pa]}$$

$$Y-r = 0,0005036 \text{ [-]} \quad Y-r/Y\text{-max} = 44,72 \% \rightarrow \% \text{ recuperación elástica}$$

$$J-r = 5,036e-05 \text{ [-]} \quad J-r/J\text{-max} = 44,72 \% \rightarrow \% \text{ recuperación elástica}$$

$$\psi_{1-10} = 9,964e+08 \text{ [Pas}^2\text{]}$$

$$\lambda = 163,4 \text{ [s]}$$

$$G = 1,866e+04 \text{ [Pa]}$$

$$d(\lg(\hat{Y}))/d(\lg(t)) = 0,5136 \text{ [1/s]}$$

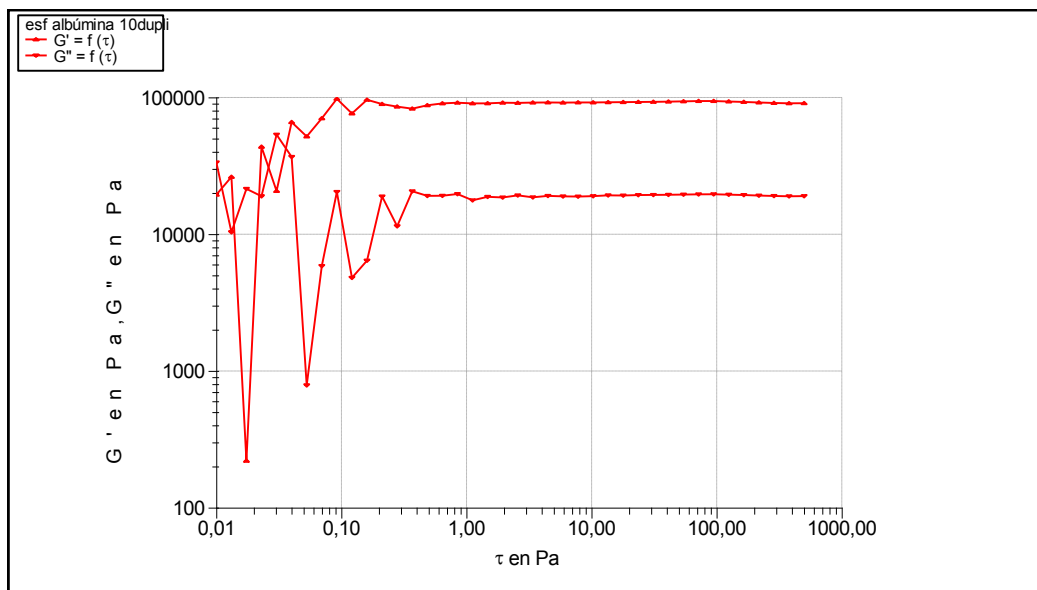


En el ensayo de fluencia y recuperación el comportamiento elástico de los geles fue el esperado según los resultados anteriores en los ensayos con 5 y 7U/g de transglutaminasa; así, tras haber aplicado un esfuerzo constante durante 180 segundos, y dejarlos que recuperasen durante 300, se observó que sólo el 44% de la recuperación correspondía al módulo elástico (recuperación elástica); estos geles fueron, por tanto, menos aptos en la conservación de su estructura original tras haber sido sometidos a una deformación.

d) Geles de albúmina + 12.5U/g de transglutaminasa

Por último, y para completar estos ensayos, se realizaron geles partiendo de la misma concentración de albúmina que los anteriores, pero añadiendo una concentración de transglutaminasa de 12.5 U/g; se les aplicaron los mismos ensayos: Barrido de Esfuerzo y Creep and Recovery, cuyos resultados se detallan a continuación:

**BARRIDO DE ESFUERZO EN GELES DE SEROALBÚMINA BOVINA (BSA)+12,5U/g DE TRANSGLUTAMINASA**



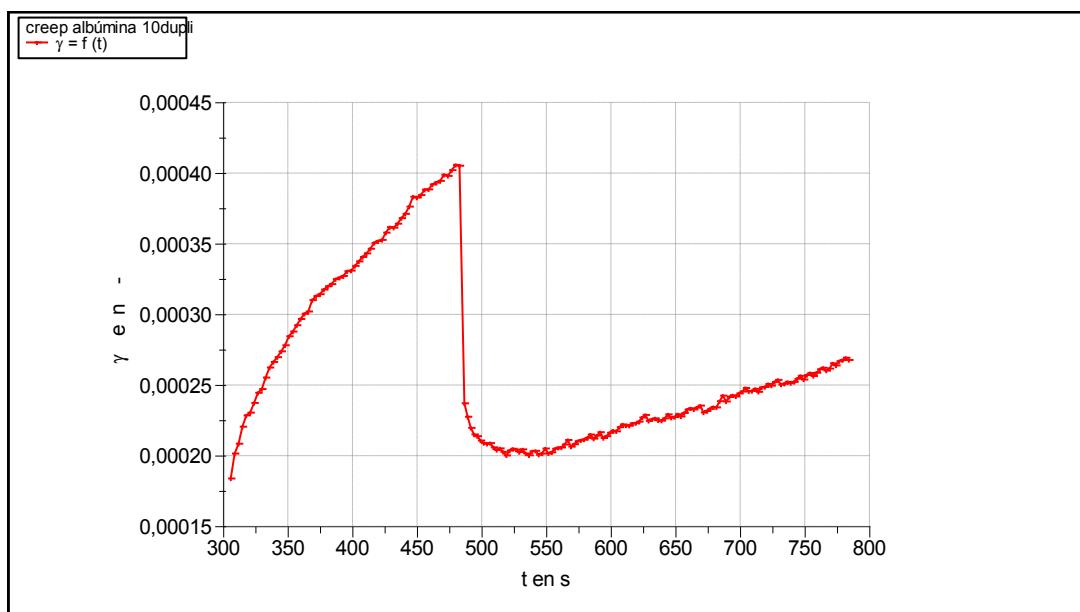
**Fig.35. Ensayo de barrido de esfuerzo sobre gel de albúmina + 12.5 U/g de transglutaminasa**

Se puede ver en la gráfica de la Figura 35 la representación del comportamiento de los dos módulos del gel, elástico ( $G'$ ) y viscoso ( $G''$ ), expresada en pascales (Pa), frente a un esfuerzo creciente, de 0 a 500 Pa.

Como en los anteriores barridos, estos geles también resistieron, sin que decayesen sus módulos, el esfuerzo creciente aplicado.

Así, queda claro que la transglutaminasa aportó una cualidad principal a los geles de albúmina: los dotó de una gran resistencia y firmeza, a juzgar por los resultados similares obtenidos al ensayar los cuatro tipos de geles a concentraciones crecientes del enzima.

**CREEP AND RECOVERY EN GELES DE SEROALBÚMINA BOVINA (BSA) +12.5U/g DE TRANSGLUTAMINASA**



**Fig.36. Ensayo de Creep and Recovery sobre gel de albúmina + 12.5 U/g de transglutaminasa**

En la Figura 36 se puede observar la deformación que alcanzó el gel ( $\gamma$ ) expresada en %, frente al tiempo ( $t$ ) expresado en segundos.

Resultados del ensayo

$T = 10,00$  [Pa]

$\eta = 1,415e+07$  [Pas]       $\dot{\gamma} = 7,067e-07$  [1/s]

$Y_e = 0,0002789$  [-]       $J_e = 2,789e-05$  [1/Pa]

$Y_r = 0,0001375$  [-]       $Y_r/Y_{-max} = 33,93$  %  $\rightarrow$  % recuperación elástica

$J_r = 1,375e-05$  [-]       $J_r/J_{-max} = 33,93$  %  $\rightarrow$  % recuperación elástica

### CAPITULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

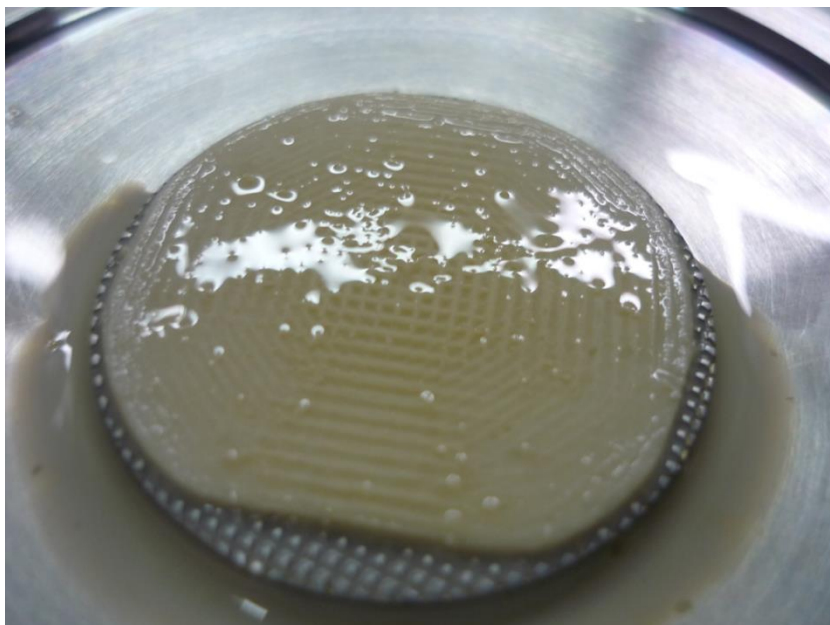
$$\psi_{1-10} = 1,117e+10 \text{ [Pas}^2\text{]}$$

$$\lambda = 394,6 \text{ [s]}$$

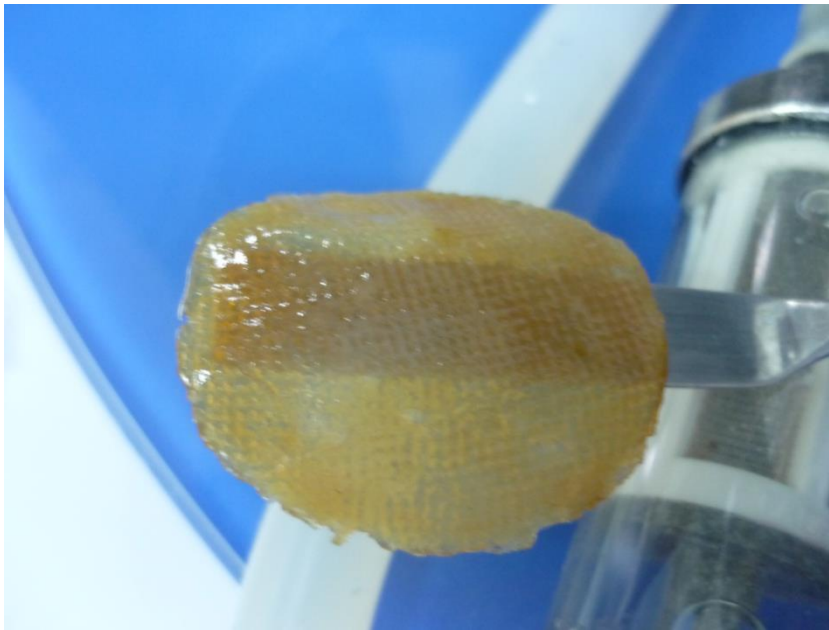
$$G = 3,586e+04 \text{ [Pa]}$$

$$d(\lg(\dot{\gamma}))/d(\lg(t)) = 0,2921 \text{ [1/s]}$$

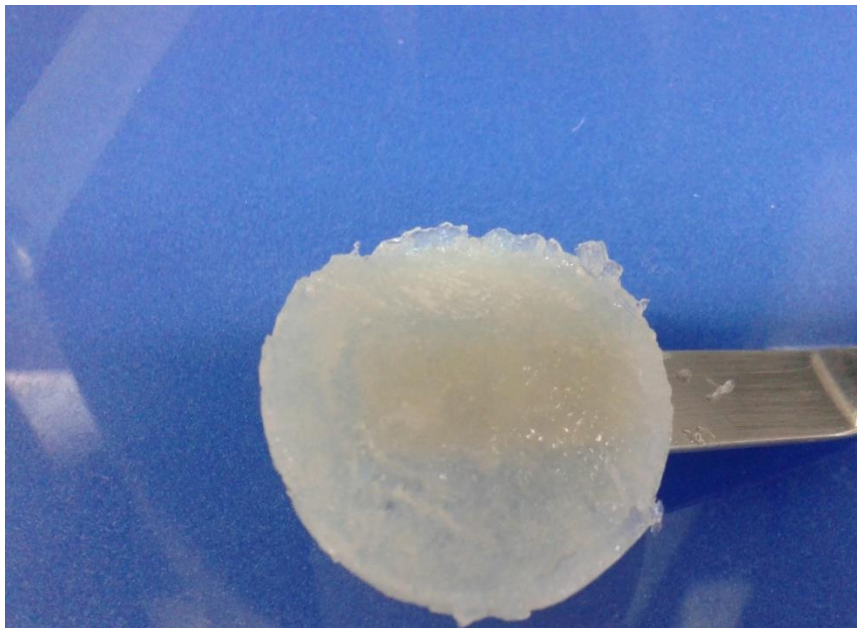
El resultado del ensayo de fluencia y recuperación confirmó la aparente relación inversamente proporcional entre la concentración de transglutaminasa añadida a la albúmina y la capacidad de recuperación elástica de los geles ensayados tras haber sido sometidos durante 180 segundos a un esfuerzo constante. Parece indudable la gran resistencia que proporcionó a los geles de albúmina este enzima, tanto como la influencia que ejerció sobre la estructura interna de los mismos debido, sobre todo, a las interacciones entre la proteína mayoritaria del gel (albúmina) y la transglutaminasa; al ensayar concentraciones crecientes de la misma, la estructura de cada muestra, se volvió, lógicamente, más heterogénea que la anterior, esta podría ser una buena explicación a las dificultades para recuperar la estructura original tras haber sufrido un esfuerzo continuado. Figuras 39 y 40.



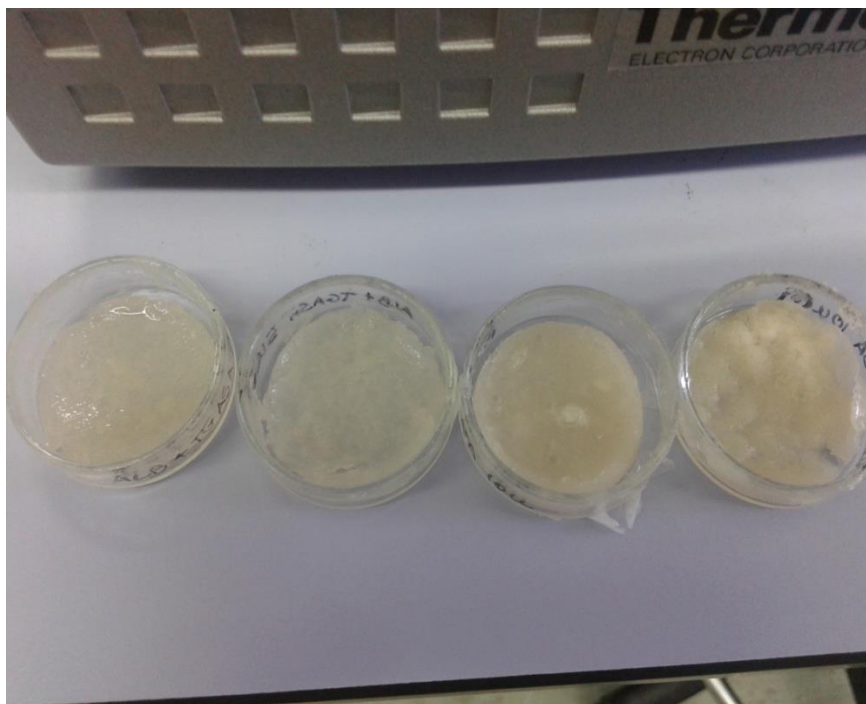
**Fig. 37. Gel de plasma a pH5 sin transglutaminasa, sintetizado en reómetro.**



**Fig.38. Gel de plasma a pH 7 + 5U/g de transglutaminasa**



**Fig.39. Gel de albúmina + 5U/g de transglutaminasa**



**Fig. 40. Geles de albúmina más 5U/g, 7U/g, 10U/g y 12,5U/g de transglutaminasa (de izquierda a derecha).**

### **3.1.3. ESTUDIO DE LA PÉRDIDA DE AGUA EN GELES**

Partiendo del principal objetivo de este trabajo que consiste en el hallazgo de los geles que presenten las condiciones más idóneas para proteger alimentos, resulta interesante estudiar la retención de agua en los mismos, expresado como la pérdida de agua (a mayor pérdida de agua menor retención de esta en el gel). De este modo, podemos deducir que aquellos geles con baja retención de agua, serán más adecuados para proteger productos con bajo contenido en humedad, como pueden ser los productos de panadería y repostería, mientras que los geles con alta capacidad de retención de agua, serán apropiados para productos alimenticios con más contenido en humedad como son los productos cárnicos.

Los ensayos de pérdida de agua se hicieron para geles de plasma con transglutaminasa, geles de plasma liofilizado con transglutaminasa y geles de albúmina con transglutaminasa, obteniéndose los siguientes resultados:

### CAPITULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### A. GELES DE PLASMA BOVINO SIN LIOFILIZAR CON 5U/g Y 10U/g DE TRANSGLUTAMINASA

**Tabla 10. Retención de agua en plasma con 5U/g y 10U/g de transglutaminasa a lo largo de 60 días.**

TIEMPO EN DÍAS	PESO 5U/g	%WL 5U/g	PESO 10U/g	%WL 10U/g
0	3,3342	0	3,75	0
3	2,43	27,12	3	20
15	1,1853	64,45	2,1081	43,68
30	0,8015	75,96	2,0152	46,26
45	0,6235	81,3	1,8395	50,95
60	0,6228	81,32	1,6777	55,26

De la Tabla 10 se pudo deducir que los geles de plasma ensayados con 10U/g de transglutaminasa presentaron una mayor capacidad de retención de agua (WHC) que aquellos que fueron ensayados con una concentración de 5U/g de la misma, puesto que el% de pérdida de agua (WL) a lo largo de 60 días fue del 55,26% frente al 81,32% en los geles ensayados añadiendo al plasma 5U/g de transglutaminasa.

#### B. GEL DE PLASMA LIOFILIZADO, RECONSTITUIDO Y DILUIDO 1:10 CON 5U/g, 7U/g Y 10U/g DE TRANSGLUTAMINASA

**Tabla 11. Retención de agua en plasma liofilizado diluido 1:10 con 5U/g ,7U/g y 10U/g de transglutaminasa.**

TIEMPO EN DÍAS	PESO 5U/g	%WL 5U/g	PESO 7U/g	%WL 7U/g	PESO 10U/g	%WL 10U/g
0	1,042	0	3,5	0	3,75	0
1	0,82	21,3	2,8	20	3	20

En la Tabla 11 se observó que, a corto plazo, una mayor concentración de transglutaminasa (7 ó 10U/g) se tradujo en una superior capacidad de retención de agua; sin embargo no se pudo estudiar la pérdida de agua a largo plazo debido a que los geles comenzaron a sufrir contaminación microbiana de forma muy temprana.

CAPITULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**C. GEL DE PLASMA LIOFILIZADO Y RECONSTITUIDO 1:1 CON 5U/g Y 10U/g DE TRANSGLUTAMINASA**

**Tabla 12. Retención de agua en plasma liofilizado sin diluir con 5U/g y 10U/g de transglutaminasa.**

TIEMPO EN DÍAS	PESO 5U/g	%WL 5U/g	PESO 10U/g (1)	%WL 10U/g (1)	PESO 10U/g (2)	%WL 10U/g(2)
0	3,3342	0	3,75	0	3,75	0
1	1,57	52,91	2,096	44,11	2,2516	39,96
15	0,84	74,8	0,87	76,8	ESTROPEÓ	ESTROPEÓ
30	0,8313	75,07	0,8233	78,04	ESTROPEÓ	ESTROPEÓ

Los datos que se observan en la Tabla 12 revelaron una importante pérdida de agua en los dos tipos de geles ensayados en este caso: en ambos casos superó el 75%; sin embargo, en esta ocasión la pérdida fue ligeramente superior en la muestra tratada con 10U/g de transglutaminasa; se intentó hacer un seguimiento en un duplicado de 10U/g, pero, como puede observarse en la tabla, este se contaminó a los 15 días y no se pudo continuar con su estudio.

**D. GEL DE ALBÚMINA CON 5U/g, 7U/g, 10U/g y 12,5U/g DE TRANSGLUTAMINASA**

**Tabla13. Retención de agua en gel de albúmina con 5U/g, 7U/g, 10U/g y 12,5u/g de transglutaminasa.**

TIEMPO EN DÍAS	PESO 5U/g	%WL 5U/g	PESO 7U/g	%WL 7U/g	PESO 10U/g	%WL 10U/g	PESO 12,5U/g	%WL 12,5U/g
0	3,330	0	3,5	0	3,75	0	4	0
15	2,60	21,92	2,95	15,71	1,65	56	2,70	32,5

Como se puede observar en la tabla 13, en este caso se ha estudiado la capacidad de retención de agua 15 días después de haber sintetizado los geles de albúmina. Aquí la mayor retención de agua tuvo lugar en los geles obtenidos añadiendo valores menores de transglutaminasa (5U/g y 7U/g) y la menor se pudo ver en aquellos que se sintetizaron añadiendo 10U/g del enzima.

En general los geles de plasma y plasma liofilizado son los que más pérdida de agua experimentan y por lo tanto serían más apropiados como películas para proteger

productos de panadería y repostería mientras que los geles de albúmina que retienen más agua podrían ser más apropiados para los productos cárnicos.

Para completar esta información, se realizó un estudio de la microestructura de estos geles (plasma, plasma liofilizado reconstituido sin diluir y albúmina), que sirvió de apoyo para explicar los resultados obtenidos.

### **3.1.4. ANÁLISIS DE LA MICROESTRUCTURA (SEM)**

Por último, se analizó la microestructura de los geles con el fin de encontrar aquellos con mejores propiedades estructurales; con este fin, se eligieron los geles que demostraron mejores propiedades reológicas en los ensayos anteriormente realizados: geles de plasma, plasma liofilizado reconstituido sin diluir y albúmina + 5U/g de transglutaminasa.

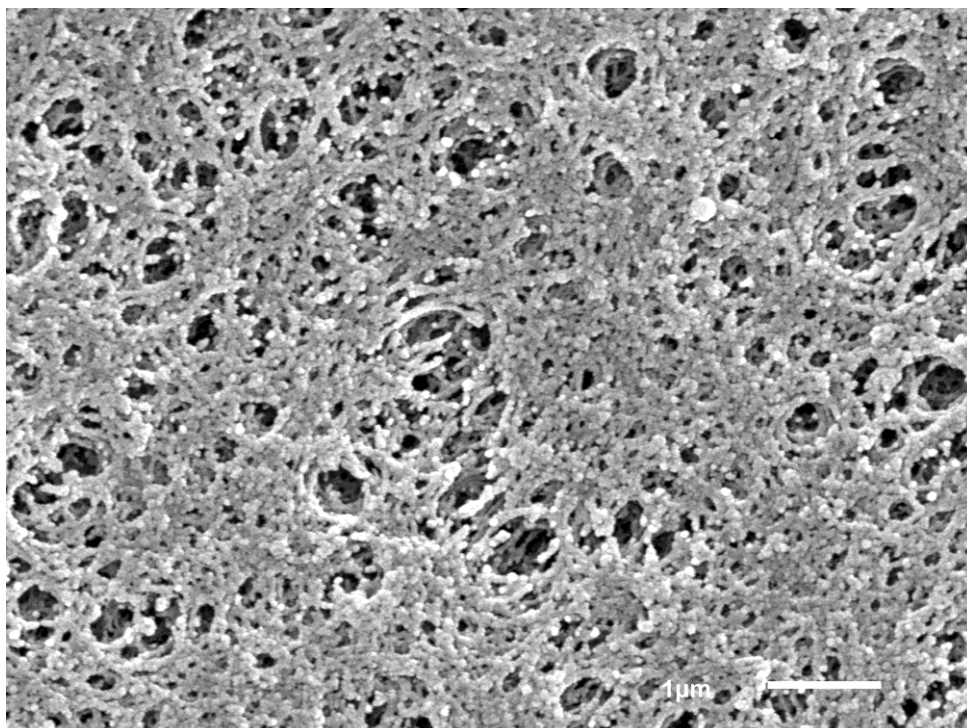
Para realizar este ensayo, los tres tipos de geles fueron tratados como se indica en el apartado 2.2.6. del Capítulo 2. Y después fueron observados en el SEM. Los resultados se observan en las figuras 41, 42 y 43.

En la Figura 41, se observa la microestructura de un gel de plasma+5U/g de transglutaminasa. Se pueden observar los agregados de proteínas (áreas grises) y los poros de la red del gel (espacios negros). Es una estructura bastante homogénea pero también porosa lo cual podría facilitar la pérdida de agua

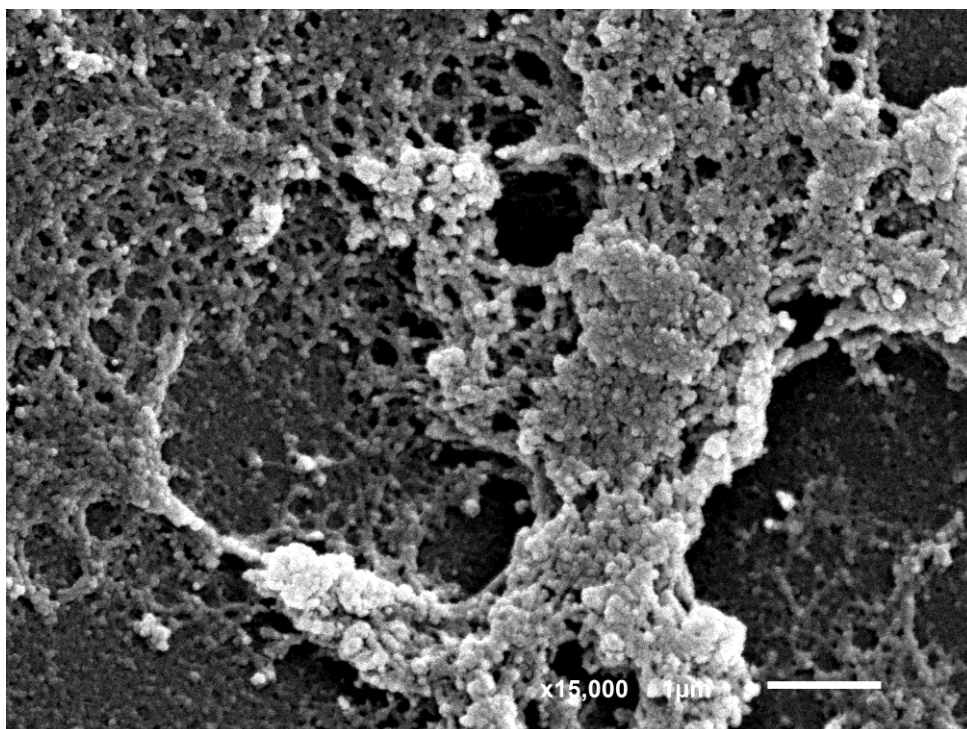
En la Figura 42 se observa la microestructura de un gel de plasma liofilizado reconstituido sin diluir. Igual que en la Figura 41, se observan agregados de proteínas (áreas grises) y poros de la red del gel (espacios negros). En este caso la estructura resultó ser más heterogénea observándose zonas con más presencia de poros, y otras más compactas.

En la Figura 43 se observa la microestructura de un gel de albúmina + 5U/g de transglutaminasa. Este gel es el menos poroso de los tres y el más homogéneo. Se observa una zona gris compacta que representa los agregados de proteínas. Esta estructura concuerda con los resultados reológicos que se obtuvieron en estos geles, que mostraban una muy buena resistencia y excelente comportamiento elástico en los mismos; además también coincide con la mayor retención de agua que mostraron, debido a su escasa porosidad.

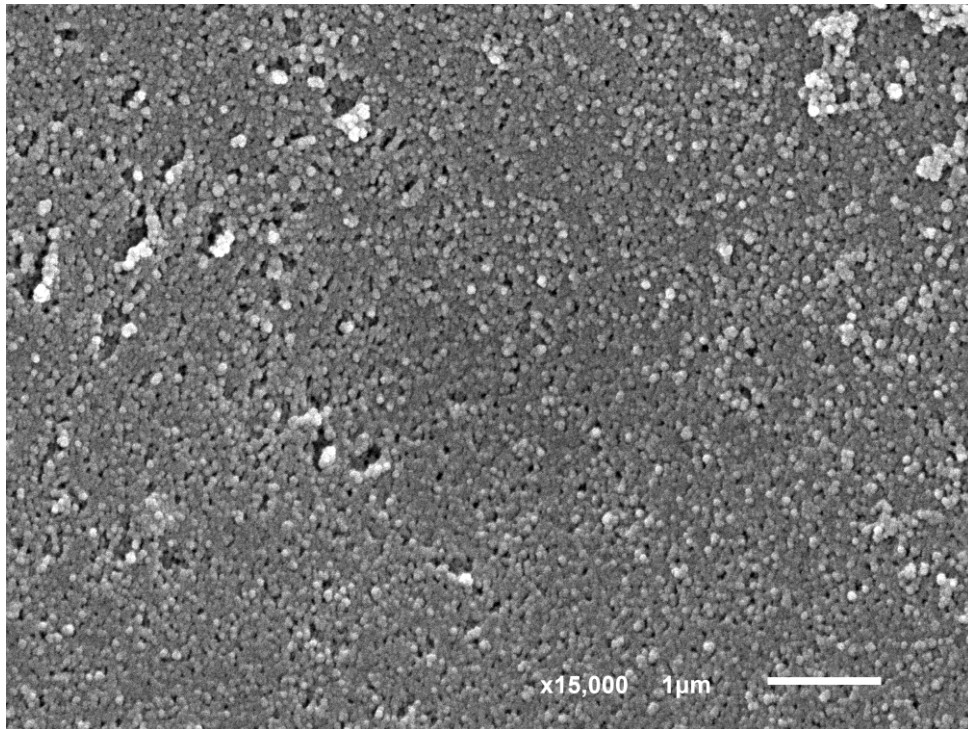




**Fig.41. Microestructura de un gel de plasma+5U/g de transglutaminasa.**



**Fig.42. Microestructura de un gel de plasma liofilizado reconstituido sin diluir.**



**Fig. 43. Microestructura de un gel de albúmina + 5U/g de transglutaminasa**

## CONCLUSIONES

---

### CONCLUSIONES

1. Se consiguen mejorar las propiedades físicas y funcionales de biomateriales (en este caso geles de plasma y albúmina) obtenidos a partir de un residuo altamente contaminante como es la sangre bovina procedente de los mataderos. Para ello se utiliza el enzima transglutaminasa con el que se consigue mejorar la resistencia, elasticidad, manipulación, capacidad de gelificación y estructura interna de los mismos. El uso de este enzima, permite, por tanto, conseguir biomateriales con propiedades óptimas para el uso al que se desea destinarlos en el campo de la alimentación. Se decide además trabajar a pH7 ya que se ha comprobado que este es el más idóneo para la síntesis de geles y además es el pH en el cual la transglutaminasa actúa más óptimamente.

2. Se demuestra que la adición de la transglutaminasa acelera el proceso de gelificación, observándose que a altas concentraciones se produce la gelificación a temperatura ambiente, así ocurre con los geles de plasma + 5 U/g y + 10 U/g de transglutaminasa, los cuales gelificaron al colocar la placa sobre la superficie de la estufa. También se observa que mejora muchísimo la resistencia del gel, porque los módulos elástico ( $G'$ ) y viscoso ( $G''$ ) del mismo, observados en los resultados de los ensayos de barrido de esfuerzo aplicados, no decaen, en comparación con los geles ensayados sin transglutaminasa, en los cuales los módulos elástico y viscoso acaban decayendo. Además otro resultado de la adición de la transglutaminasa es un aumento de la retención de agua en los geles, pero esto sólo puede apreciarse en los geles de albúmina.

3. Se sintetizaron tres tipos de geles con transglutaminasa: de plasma, de plasma liofilizado y reconstituido y de seroalbúmina. Se les añade concentraciones crecientes del enzima y se les caracteriza reológicamente además de hacer un estudio de la retención de agua y un análisis de su estructura interna, y al compararlos con geles sintetizados sin transglutaminasa (ensayo de gel de plasma a pH 5), se observa que sus propiedades reológicas mejoran significativamente.

4. De los geles de plasma sintetizados con transglutaminasa, el mejor resultado se obtuvo en geles sintetizados con 5U/g del enzima, los cuales demostraron tener una gran resistencia y un muy buen comportamiento elástico. Al hacer un estudio con el SEM se observa una estructura homogénea y muy porosa, lo que explica la alta pérdida de agua detectada en el estudio de retención de agua. Por lo tanto este tipo de

## CONCLUSIONES

---

geles podrían ser usados para proteger productos alimentarios que necesiten películas con una menor humedad y una gran pérdida de agua como son los productos de panadería o repostería.

5. Se ensayaron dos tipos de geles de plasma liofilizado: plasma liofilizado reconstituido y diluido 1:10 y, plasma reconstituido y no diluido 1:1. Los primeros se ensayaron con 5U/g de transglutaminasa pero resultaron ser geles muy poco estables y además se contaminaron rápidamente. Son los geles resultantes del plasma reconstituido no diluido ensayados con 5U/g de transglutaminasa los que experimentan en conjunto buenos resultados: alta resistencia y 85% de comportamiento elástico. El estudio SEM muestra una estructura heterogénea, con zonas compactas y otras con más presencia de poros. Esta presencia de poros explica la pérdida de agua, por tanto estos geles también se podrían aplicar a productos de repostería y panadería como los geles de plasma citados en el punto 4.

6. Con la albúmina obtenida en el fraccionamiento del plasma, se sintetizaron geles añadiendo 5U/g, 7U/g, 10U/g y 12.5U/g de transglutaminasa. Los ensayos reométricos determinaron que todos los geles presentaban una alta resistencia ante los barridos de esfuerzo aplicados, pero presentaron notables diferencias en cuanto a su comportamiento elástico, siendo este completo en los geles con 5U/g de transglutaminasa convirtiéndose estos geles en los que mejores propiedades reológicas presentaban. Al realizar el estudio SEM en los geles de albúmina + 5U/g de transglutaminasa se observó una estructura muy homogénea, compacta y muy poco porosa, que coincide con el estudio de retención de agua, en el cual se observa que son geles con muy buena retención de la misma. Estos geles serían ideales para evitar la deshidratación de los alimentos y se pueden aplicar por ejemplo en las pastas cárnicas finas o los patés.

7. De todos los ensayos realizados con geles de plasma, plasma liofilizado reconstituido y albúmina, tratados con diferentes concentraciones de transglutaminasa, elegimos aquellos que presentan mejores resultados reológicos y al mismo tiempo una estructura más homogénea; estos geles son los de albúmina, ensayados con 5U/g de transglutaminasa y que podrían aplicarse a alimentos con un porcentaje alto de humedad, como los cárnicos. Además, también se pueden utilizar geles de plasma ensayados con 5U/g de transglutaminasa o geles de plasma liofilizado reconstituido con esta misma concentración del enzima. Estos dos tipos de biomateriales, por presentar abundante pérdida de agua, serían más apropiados para conservar los

## CONCLUSIONES

---

alimentos que contienen menos porcentaje de humedad, como pueden ser los de pastelería o repostería.

## ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

A	Área
Bar	Bares (medida de presión)
°C	Grado centígrado
CMC	Carboximetilcelulosa
cm	Centímetro
cm <sup>2</sup>	Centímetro cuadrado
cos	Coseno
cs	Concentración de sólidos
cP	Centipoise (Medida de viscosidad)
CS	Modo de esfuerzo controlado
CD	Modo de deformación controlada
DSC	Differential Scanning Calorimetry
dl	Decilitro
DQO	Demanda química de oxígeno
Fig.	Figura
G	Módulo instantáneo elástico de la unidad de Maxwell
G'	Módulo elástico
G''	Módulo viscoso
G*	Modulo complejo
g	Gramo
g	Fuerza de centrifugación
Hz	Herzio
Kg	Kilogramo
L	Litro
MG	Materia grasa
M	Molaridad
mL	Mililitro
min	Minuto
m	Metro
m <sup>2</sup>	Metro cuadrado
mg	Miligramo
MPa	Megapascal
mPa	Milipascal
m <sub>i</sub>	Masa inicial
m <sub>f</sub>	Masa final
N	Newton
rad	Radianes
Pa	Pascales
rpm	Revoluciones por minuto
SEM	Scanning Electron Microscopy
SDS-PAGE	Polyacrilamide Gel Electrophoresis

s	Segundo
sin	Seno
t	Tiempo
tan	Tangente
T	Temperatura
%v/v	Porcentaje en volumen
%w/w	Porcentaje en peso

## LETRAS GRIEGAS

$\alpha$	$\alpha$
$\beta$	$\beta$
$\gamma$	Deformación
$\gamma_0$	Amplitud de la deformación
$\dot{\gamma}$	Velocidad de deformación
$\mu$	Viscosidad
$\sigma$	Esfuerzo aplicado
$\tau$	Esfuerzo cortante aplicado
$\tau_0$	Valor de fluencia
$\omega$	Frecuencia

## BIBIOGRAFÍA

1. Pilar del Hoyo. "Valorización de sangre de mataderos mediante el desarrollo de nuevos materiales y productos". Tesis doctoral. Universidad de Oviedo 2012.
2. Francisco A. Riera. Master en Biotecnología Alimentaria. "Diseño de Sistemas de Proceso en Biotecnología Alimentaria. Universidad de Oviedo 2013.
3. Steffe, J. F. (1996). "Rheological methods in food process engineering". USA: Freeman Press.
4. Tabilo-Munizaga, G., & Barbosa- Cánovas, G.V., (2005). "Rheology for the food industry". J. Food Eng., 67(1-2), 147-156.
5. Farreras, P. (1992). "Medicina Interna", Ed. Doyma S.A. Madrid, 2, 1571-1581.
6. Ockerman, H. W., & Hansen, C.L. (1994). "Industrialización de Subproductos de Origen Animal", Ed. Acribia S.A., Zaragoza. 239-252.
7. Ockerman, H. W., & Hansen, C.L. (1998). "Animal By- product processing and utilization". Florida, USA: CRC Press.
8. Galiano, Y. (1993). "Los Subproductos Procedentes de los Animales de Abasto", Eurocarne, 17,61-68.
9. Prandl, O., Fisher, A., Schmiidhofer, T. (1994). "Tecnología e Higiene de la Carne", Ed. Acribia S.A. , Zaragoza, 517-526.
10. Stauton, E. (1969). "Bioquímica Médica", Ed. Interamericana, Madrid, 431-445.
11. N. Pallua, T. Wolter, M. Markowicz. "Platelet rich plasma in burns". Burns Vol. 36, P. 4-8 (2010).
12. A. Totosans. "Funcionalidad de Proteínas Musculares". México (2006).
13. Cohn E.J. (1948). "The history of plasma fractionation". In Advances in Military Medicine, Andrus et al. Eds. Little, Brown & Co.
14. Moure, F. (2000). "Isolation of blood proteins. Analysis of possibilities. (In Spanish).
15. Chuan-he Tang, Miao Yang, Fu Liu, Zhong Chen. "A novel process to efficiently form transglutaminase-set soy protein isolate-stabilized emulsion gels". March 2013 LWT-Food Science and Technology. ELSEVIER.
16. Ando H. y cols. "Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganisms".(1989).



## BIBIOGRAFÍA

---

17. Rao, M.A. (1999). "Rheology of fluids and semisolid foods". Aspen Publishers, Inc., Maryland (USA).
18. Roudot, A.C. (2004). "Reología y análisis de la textura de los alimentos". Editorial Acribia S.A. Zaragoza.
19. Schramm, G. (2004). "A practical approach to rheology and rheometry". Germany: Haake GmbH.
20. Szczesniak, A.S. (2002). "Texture is a sensory property". *Food Quality and Preference*, 13(4): 215-225.
21. Laca, A., Sáenz, M., Paredes, B., & Díaz, M. (2009). "Rheological properties, stability and sensory evaluation of low cholesterol mayonnaises prepared using egg yolk granules as emulsifying agent". *J. Food Eng.*, 97, 243-252.
22. Lamsal, B.P., Jung, S., & Johnson, L.A. (2007). "Rheological properties of soy protein hydrolysates obtained from limited enzymatic hydrolysis". *LWT-Food science and technology*, 40 (7), 1215-1223.
23. Chantrapornchai, W. & McClements, D.J. (2002). "Influence of NaCl on optical properties, large-strain rheology and water holding capacity of heat-induced whey protein isolate gels". *Food Hydrocolloids*, 16(5), 467-476.
24. Rendueles, M., Moure, F., Fernández, A., Díaz, M. (1996). "Preliminary studies on the processing of Slaughterhouses Blood for Protein Recovery". *Resource and Environmental Biotechnology*, 1, 193-206.
25. P. del Hoyo, M. Rendueles, M. Diaz (2012). "Caracterización reológica de los geles de fibrinógeno y gamma globulinas de plasma porcino".
26. Qixin Zhong, Wan Wang, Zhixiong Hu, Shinya Ikeda. "Sequential preheating and transglutaminase pretreatments improve stability of wey protein isolate at pH 7.0 during thermal sterilization". Noviembre 2012. *Food Hydrocolloids*. ELSEVIER.
27. Guoqi Fu, Jichao Zhao, Hao Yu, Li Liu, Binglin He. "Bovine serum albumin-imprinted polymer gels prepared by graft copolymerization of acrylamide on chitosan". Marzo 2007. *Science Direct*. ELSEVIER.
28. Chong-hao Bi, Dong Li, Li-jun Wang, Fei Gao, Benu Adhikari. "Effect of high shear homogenization on rheology, microstructure and fractal dimension of acid-induced SPI gels." Noviembre 2013. *Journal of Food Engineering*. ELSEVIER.
29. Chee-Yuen Gan, Abbas F.M. Alkharhi, and Azhar Mat Easa. "Using response surface methodology to optimize process parameters and cross-linking agents for production of combined-cross-linked bovine serum albumin gels." Diciembre 2008 *Journal of Bioscience and Bioengineering*. ELSEVIER.
30. Elena Saguer, Anna Illanes, Eva Espigulé, Dolors Parés, Sonia Hurtado, Mónica toldrà, Carmen Carretero." Effect of transglutaminase on heat-induced gel properties at

## BIBIOGRAFÍA

---

acid pH of mixtures of plasma and haemoglobin hydrolysate from porcine blood.” 11<sup>th</sup> International Congress on Engineering and Food (ICEF11). (2011) Sciverse ScienceDirect. ELSEVIER.

31. A. Vallés-Lluch, M. Arnal-Pstor, C. Martinez-Ramos, G. Vilariño-Feltrer, L. Vikingsson, C.Castells-Sala, C.E. Semino, M. Monleón Pradas.” Combining self-assembling peptide gels wiht three-dimensional elastomer scaffolds”. Agosto 2013 Acta Biomaterialia. ELSEVIER.

32. Masalova O., Kulikouskaya V., Shutava T. ,Agabekov V. “Alginate and chitosan gel nanoparticles for efficient protein entrappment”. 2<sup>nd</sup> European Conference on Nano Films: ECNF-2012. Sciverse ScienceDirect. ELSEVIER.

33. Timothy E.L. Douglas, Agata Skwarczynska, Zofia Modrzejewska, Lieve Balcaen, David Schaubroeck, Sylvia Lycke, Frank Vanhaecke, Peter Vandenabeele, Peter Dubruel, John A. jansen, Sander C.G. Leeuwenburgh. “Acceleration of gelation and promotion of mineralization of chitosan hydrogels by alkaline phosphatase.” Febrero 2013. International Journal of Biological Macromolecules. ELSEVIER.

34. Enrique Marquez, Erika Arévalo, yasmina Barboza, Betty Benitez, Lisbeth Benitez y Anangelina Archile. “ Effect of concentration of transglutaminase and reaction time on the stability of restructured product”. Revista científica, FCV-LUZ/Vol. XVI, Nº 6, 662-667, 2006.

35. Yasuda, K. ,Nakamura, R.,& Hayakawa, S. (1986). “Factors effecting heat-induced gel formation of bovine serum albumin”. J. Food Sci., 51(5), 1289-1292.

36. J.W. Kane, M.M. Sternheim. Física. 2<sup>a</sup> Edición (2007) Editorial Reverté, S.A.

37. Albert Ibarz, Gustavo V. Barbosa-Cánovas. Operaciones Unitarias en la Ingeniería de Alimentos. Ediciones Mundi-Prensa (2011).

38. R. Paul Sing, Dennis R. Heldman. Introducción a la Ingeniería de los Alimentos. Segunda edición. 2009 Editorial Acribia S.A.

39. Thomas M. Devlin. Bioquímica. Libro de texto con aplicaciones clínicas.Cuarta Edición. Editorial Reverté, S.A., 2004.

40. David L. Nelson, Michael M. Cox. Lehninger. Principios de Bioquímica. Cuarta edición.(2008).Ediciones Omega S.A.