

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

**MASTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA
ALIMENTARIA**

**“Síntesis y aplicaciones de nuevos
biomateriales obtenidos a partir de la yema
de huevo y sus fracciones”**

**TRABAJO FIN DE MASTER
POR**

ANDREA RODIL MARTÍNEZ

JULIO, 2015



Agradecimientos

Al Dr. Manuel Rendueles, por darme la oportunidad de trabajar en el grupo de Tecnología de Bioprocesos y Reactores en la unidad de Tecnología Alimentaria. Por su orientación a lo largo de estos meses de trabajo.

A la Dra. Amanda Laca, por el interés puesto y el tiempo invertido. Por sus ideas y consejos. Por hacernos sentir cómodos en laboratorio y estar siempre disponible dentro y fuera de su horario de trabajo. Por su dedicación e infinita paciencia.

Al Dr. Álvaro Meana, por el trabajo realizado en el Centro Comunitario de Sangre y Tejidos de Asturias.

A mis compañeros del máster y de laboratorio, por hacer mucho más llevaderas las horas de trabajo. Por el tiempo dentro y fuera del aula.

A mi familia, por apoyarme y estar siempre ahí.

Indice

Resumen.....	1
Abstract.....	2
Lista de figuras.....	3
Lista de tablas.....	5
1. Introducción.....	6
2. Fundamentos teóricos.....	10
2.1. El huevo de gallina.....	11
2.1.1. Estructura y composición.....	11
2.1.2. Valor nutritivo.....	16
2.1.3. Alergias.....	19
2.1.4. Beneficios del huevo.....	19
2.1.5. Nuevas aplicaciones de las fracciones y componentes del huevo.....	21
2.2. Biomateriales.....	22
2.2.1. Ingeniería tisular.....	22
2.2.2. Bioplásticos y biopelículas.....	24
2.3. La transglutaminasa.....	24
2.4. Reología.....	26
2.5. Texturometría.....	31
2.6. Microscopio electrónico de barrido (SEM).....	32
3. Metodología experimental.....	34
3.1. Fraccionamiento de la yema de huevo.....	35
3.2. Liofilización.....	36
3.3. Extracción de proteínas.....	36
3.4. Cuantificación de proteínas: método Kjeldahl.....	37
3.5. Electroforesis (SDS-PAGE).....	37
3.6. Obtención de biofilms con ácido oleico y glicerol.....	38
3.7. Elaboración de geles con transglutaminasa.....	40
3.7.1. Caracterización de los geles de transglutaminasa.....	40
3.7.1.1. Medidas reológicas.....	40
3.7.1.2. Texturometría.....	42
3.7.1.3. Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	43

3.7.2. Cultivo de fibroblastos.....	43
3.7.3. Visualización de fibroblastos en el SEM.....	44
3.8. Elaboración de cápsulas a partir de fracciones del huevo.....	44
3.8.1. Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	45
3.8.2. Absorción de ácido salicílico.....	46
4. Resultados.....	47
4.1. Cuantificación de proteínas: método Kjeldahl.....	48
4.2. Electroforesis SDS-PAGE.....	49
4.3. Obtención de biofilms con ácido oleico y glicerol.....	50
4.4. Elaboración de geles con transglutaminasa.....	51
4.4.1. Caracterización de los geles de transglutaminasa.....	51
4.4.1.1. Medidas reológicas.....	51
4.4.1.2. Texturometría.....	57
4.4.1.3. Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	59
4.4.2. Cultivo de fibroblastos.....	60
4.5. Elaboración de cápsulas a partir de fracciones del huevo.....	63
5. Conclusiones.....	66
6. Abreviaturas y símbolos.....	69
7. Bibliografía.....	72

Resumen

El objetivo de este trabajo ha sido desarrollar nuevos biomateriales con diversas aplicaciones biotecnológicas a partir de la yema de huevo de gallina y sus fracciones (gránulos y plasma), tanto nativas como delipidadas. Se emplearon varios métodos para la elaboración de biopelículas y geles y los mejores resultados se obtuvieron utilizando transglutaminasa. Las propiedades mecánicas de los geles obtenidos empleando esta enzima fueron caracterizadas mediante reometría, texturometría y microscopía electrónica de barrido. Dichos geles presentaban unas características físicas adecuadas para ser utilizados en el campo de la ingeniería tisular y, por ello, fueron evaluados como soporte para el crecimiento de fibroblastos. Es destacable que en el gel desarrollado a partir de gránulos se observó adhesión y crecimiento de las células formando una capa continua.

Por otra parte, se elaboraron cápsulas que se caracterizaron morfológicamente mediante microscopía y se realizaron pruebas de encapsulación. Las cápsulas de yema presentaron una geometría más esférica y más homogénea que los demás materiales. Sin embargo, todas las cápsulas mostraron una estructura compacta y carente de poros que hace imposible que sean empleadas para la encapsulación de diferentes compuestos. Por tanto, sería necesario optimizar el método de elaboración de las cápsulas a fin de poder emplearlas como soporte para la liberación controlada de sustancias bioactivas.

Abstract

The aim of this work has been the development of new biomaterials with different biotechnological purposes employing, not only native, but also delipidated, hen egg yolk and its fractions (granules and plasma). Several methods were assayed to prepare biofilms and gels, and the best results were obtained using transglutaminase. The gels obtained using this enzyme were mechanically characterized by rheometry, texturometry and scanning electron microscopy. These gels exhibited accurate physical characteristics to be employed in tissue engineering, so they were evaluated as scaffolds for fibroblasts' growth. It is remarkable that in granules gels adhesion and growth of cells was observed, with continuous coatings of cells growing in the surface of the gels.

Additionally, capsules have been developed and they were morphological characterized by means of microscopy techniques. Encapsulation tests were also carried out. Egg yolk capsules showed a more spherical and homogeneous morphology than the other materials. However, all the capsules presented a compact structure without pores, making it impossible to be used for encapsulation of different compounds. Therefore, it would be necessary to optimize the method of capsule preparation in order to use the capsules for the controlled release of bioactive compounds.

Lista de figuras

2. Fundamentos teóricos

Figura 1. Corte transversal de un huevo de gallina.....	12
Figura 2. Composición de las fracciones de la yema de huevo	16
Figura 3. Tipos de fluidos según su comportamiento reológico	27

3. Metodología experimental

Figura 4. Esquema general del fraccionamiento de la yema de huevo. Modificado de Laca et al. (2010).....	31
Figura 5. Representación esquemática del método Kjeldhal.....	37
Figura 6. Placas serradas (PP35/S y MP C35/S) utilizadas en los ensayos realizados (izquierda). Reómetro HAAKE MARS II (derecha).....	41
Figura 7. Texturómetro TA.Txplus (Stable Micro Systems) con soporte HDP/FSR y sonda esférica SMS P/5 X.....	42
Figura 8. A: fotografía del microscopio electrónico de barrido JEOL-6100 SEM. B: cápsulas recubiertas de oro. C: evaporador Sputtering Balzers SCD 004.....	45

4. Resultados

Figura 9. Resultado de la electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS del plasma (P), los gránulos (G), la yema (Y), el plasma delipidado (Pa), los gránulos delipidados (Ga) y la yema delipidada (Ya). S: patrón de proteínas de alto peso molecular.....	49
Figura 10. A. Film elaborado con un 8% de caseína comercial y un 1,6% de ácido oleico tras 5 horas en la estufa. B. Film obtenido a partir de un 8% de gránulos lavados con acetona y un 1,2% de glicerol tras 3 horas en la estufa. C. Film obtenido a partir de un 8% de gránulos lavados con acetona y un 1,2% de glicerol tras 5 horas en la estufa.....	50
Figura 11. Gel de gránulos de yema de huevo con transglutaminasa (9 U/g).....	51
Figura 12. Resultados de los barridos de esfuerzo realizados con una frecuencia de 1 Hz y a 20°C. A. Comparación de geles gránulos de yema de huevo y gránulos delipidados con acetona. B. Comparación de los geles de plasma de yema de huevo y	

plasma delipidado con acetona. C. Comparación de los geles de de yema de huevo y yema delipida con acetona.....	53
Figura 13. Resultados del barrido de esfuerzo en los geles elaborados a partir de gránulos, plasma y yemade huevo con una frecuencia de 1 Hz y a una temperatura de 20°C (A) y a partir de las fracciones lavadas con acetona (B).....	54
Figura 14. Resultados de los barridos de frecuencia realizados en los geles elaborados a partir de: A. gránulos y gránulos delipidados con acetona, B. plasma de yema de huevo y plasma delipidado con acetona, C. yema de huevo y yema delipidada con acetona...	55
Figura 15. Resultados del barrido de frecuencia realizados en los geles elaborados a partir de: A. plasma, gránulos y yema de huevo, B. plasma, gránulos y yema de huevo delipidados con acetona.....	56
Figura 16. Gráfica resultante del ensayo de texturometría en un gel elaborado a partir de gránulos de yema de huevo lavados con acetona.....	58
Figura 17. A. Microfotografía a 35000x y una escala de 0,5µm de la superficie de un gel de plasma de yema de huevo. B. Microfotografía a 10000x y una escala de 1µm de la superficie de un gel yema de huevo.....	59
Figura 18. Microfotografías a 200x y con una escala de 10µm de los geles elaborados a partir de las distintas fracciones de la yema de huevo delipidadas y sin delipidar.....	60
Figura 19. Fibroblastos en geles elaborados a partir de gránulos de yema de huevo. Microfotografías tomadas a 350x y con una escala de 50 µm (A) y 140 aumentos con una escala de 100 µm (B).....	61
Figura 20. Fibroblastos en geles elaborados a partir de yema de huevo. Imágenes tomada a 800 aumentos con una escala de 20 µm (A) y a 1200 aumentos y 10 µm (B). C. Fibroblasto en un gel elaborado a partir de plasma de yema de huevo. Imagen tomada a 4000 aumentos con una escala de 5µm.	62
Figura 21. A y B. Fotografías de cápsulas elaboradas a partir de yema delipidada con acetona. C. Fotografía del estereomiscroscopio de fluorescencia de las cápsulas elaboradas con adición de transglutaminasa. Escala: 1 mm.....	63
Figura 22. Fotografías de las cápsulas elaboradas a partir de yema de huevo: A. en el momento inicial tras secarlas a temperatura ambiente, B. tras llevar una hora hidratándose en agua, C. tras realizar el lavado final con acetona. Escala: 1 mm.....	64
Figura 23. Fotografías tomadas en el SEM a 30x y con una escala de 600 µm de las cápsulas elbaoradas a partir de las distintas fracciones de la yema de huevo.....	65

Lista de tablas

2. Fundamentos teóricos

Tabla 1. Composición de la yema y la clara de huevo.....	14
Tabla 2. Valor nutritivo del huevo comparado con otras fuentes proteicas dietéticas...	16
Tabla 3. Composición del huevo de gallina	18

3. Metodología experimental

Tabla 4. Resumen de las pruebas realizadas con ácido oleico.....	39
---	----

4. Resultados

Tabla 5. Porcentajes de proteína de las distintas fracciones del huevo obtenidos por el método Kjeldhal.....	48
Tabla 6. Parámetros A y z obtenidos a partir de los barridos de frecuencia realizados con los geles elaborados a partir de las distintas fracciones de la yema de huevo.....	57
Tabla 7. Resultados del ensayo de texturometría en geles elaborados a partir de distintas fracciones de huevo.....	59

1. Introducción

El huevo de gallina es desde la antigüedad un alimento muy importante para el hombre y su consumo es casi generalizado en todo el mundo en la actualidad. Esto ha originado una actividad de carácter económico, y sus operadores conforman un sector específico en el conjunto de la producción ganadera y la industria alimentaria. A comienzos del siglo XXI en España el censo de gallinas ponedoras superaba los 40 millones, produciendo más de 1000 millones de docenas de huevos al año. España es uno de los principales productores de huevos de la Unión Europea (UE) y abastece su demanda interior además de comercializar también en el mercado exterior (principalmente intracomunitario) parte de su producción.

Desde un punto de vista nutricional, el huevo contiene prácticamente todos los nutrientes necesarios para el organismo. Los efectos positivos en la salud de algunos de sus componentes permiten considerarlo además un alimento funcional. La proteína del huevo es la de mayor valor biológico y además es la proteína de origen animal con mejor relación entre valor nutricional y precio. La investigación, el desarrollo tecnológico y la innovación en el sector del huevo permiten en la actualidad disponer durante todo el año de un alimento sano, muy nutritivo y asequible. (IEH, 2015).

Los distintos compuestos presentes en el huevo cumplen importantes funciones para la salud. Entre ellas es de destacar la acción antioxidante de algunas vitaminas y oligoelementos del huevo que ayuda a proteger al organismo de procesos degenerativos diversos (cáncer, diabetes, cataratas), así como de las enfermedades cardiovasculares. Los huevos, como fuente de folatos, piridoxina y vitamina B12 y también por su contenido en lecitina, contribuyen a regular los niveles de homocisteína, y por tanto a disminuir el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares (IEH, 2015).

La yema de huevo es una compleja emulsión formada por un conjunto de partículas que se encuentran en suspensión en un fluido amarillo claro (Anton, 2013). Esta característica estructura hace que la yema sea fácilmente fraccionable mediante centrifugación una vez que ha sido diluida. Se obtienen así dos fracciones, una correspondiente al sobrenadante, con coloración naranja fuerte y denominada plasma, y un precipitado, de baja coloración, denominado gránulos (Anton, 2007). La yema es considerada como uno de los alimentos más nutritivos que existen. Está constituida por un 34% de lípidos (colesterol (<5%), carotenoides (<5%) fosfolípidos (33%) y

triglicéridos (62%)), un 16% de proteínas (LDL (68%), HDL (16%), fosfoproteínas (4%) y proteína minoritaria (2%)), hidratos de carbono y cenizas (2-3%). Estos componentes son los responsables de que la yema de huevo tenga numerosas propiedades, coagulantes y emulsionantes por ejemplo, que la hacen ser un producto apto para su aplicación culinaria y en la industria alimentaria, química, farmacéutica o cosmética (Anton, 2007).

El sector de la industria alimentaria trata de aprovechar el gran valor nutritivo del huevo y sus componentes, además de las extraordinarias características funcionales convirtiéndolo en un ingrediente clave (IEH, 2015). La industria de los ovoproductos ha sufrido grandes cambios en los últimos cincuenta años y ha experimentado un crecimiento continuo gracias a los avances en la tecnología del procesado de huevos. En la actualidad aproximadamente el 30% del consumo total de huevos se corresponde al consumo de huevos procesados (Froning, 2007). Es evidente que esta industria ha hecho enormes progresos desde la década de 1960, sin embargo, los próximos cincuenta años deben proporcionar avances aún más emocionantes. Existen oportunidades reales para capitalizar los atributos del huevo y la industria tiene una base fuerte para expandirse a nuevas aplicaciones (Froning, 2007).

Desde hace unas décadas, se han ido desarrollando nuevas aplicaciones como resultado de la realización de numerosos estudios. El huevo y en particular la clara, son fuentes importantes de proteínas para la formación de films y recubrimientos (Guérin-Dubiard y Audic, 2007). Los recubrimientos poliméricos se han utilizado en la industria farmacéutica durante muchos años para proporcionar la liberación controlada de ingredientes activos farmacéuticos, para protegerlos y para enmascarar su sabor desagradable (Abu Diak et al., 2007). También se han utilizado partes del huevo como la cáscara o las membranas testáceas para desarrollar soportes en ingeniería tisular (Montañez, 2014; Yi et al., 2004).

El objetivo de este trabajo ha sido la síntesis y caracterización de nuevos biomateriales a partir de la yema de huevo y sus fracciones (gránulos y plasma) tanto delipidadas con distintos disolventes orgánicos (para conseguir aumentar el contenido proteico) como sin delipidar. Para la caracterización se han utilizado técnicas como la

reometría, la texturometría y la microscopía electrónica de barrido. Asimismo, se han ensayado diferentes aplicaciones biotecnológicas para dichos materiales.

2. Fundamentos teóricos

2.1. El huevo de gallina

El huevo de gallina (*Gallus domesticus*) es el huevo de uso más extendido a nivel mundial. Su estructura está diseñada para dar protección y mantener al embrión. Se encuentra protegido de la contaminación exterior por la barrera física que le proporcionan su cáscara y membranas y por la barrera química que le proporcionan sus componentes antibacterianos.

2.1.1. Estructura y composición

Cada huevo pesa entre 50 y 75 gramos y en ellos se diferencian tres partes fundamentales separadas por membranas (Figura 1) que mantienen su integridad: la clara (aproximadamente un 60% del peso del huevo), la cáscara (10%) y la yema (30%) (IEH, 2015).

La cáscara

La cáscara es la cubierta exterior del huevo. Mantiene su integridad física y actúa como barrera bacteriológica. Está constituida principalmente por una matriz cálcica porosa, además de otros minerales como sodio, magnesio, cinc, manganeso, hierro, cobre, aluminio y boro, en menores concentraciones. Dicha matriz permite el intercambio gaseoso entre el interior y el exterior del huevo. El número de poros varía entre 7000 y 15000 y son especialmente numerosos en la zona de la cámara de aire.

El color de la cáscara (blanco o marrón) depende de la concentración de pigmentos (porfirinas) depositados en la matriz cálcica, pero no afecta ni a la calidad ni a las propiedades nutritivas del huevo. Su resistencia depende del metabolismo mineral de la gallina, de una adecuada alimentación, de la genética, del estado sanitario y de la temperatura ambiente.

La cáscara se encuentra recubierta por una cutícula orgánica formada principalmente por proteínas (90%) y pequeñas cantidades de lípidos y carbohidratos. Su función consiste en cerrar los poros para evitar la entrada de microorganismos, evitar

la pérdida de agua y dar un aspecto brillante al huevo. Esta cutícula desaparece tras 2-4 días desde la puesta.

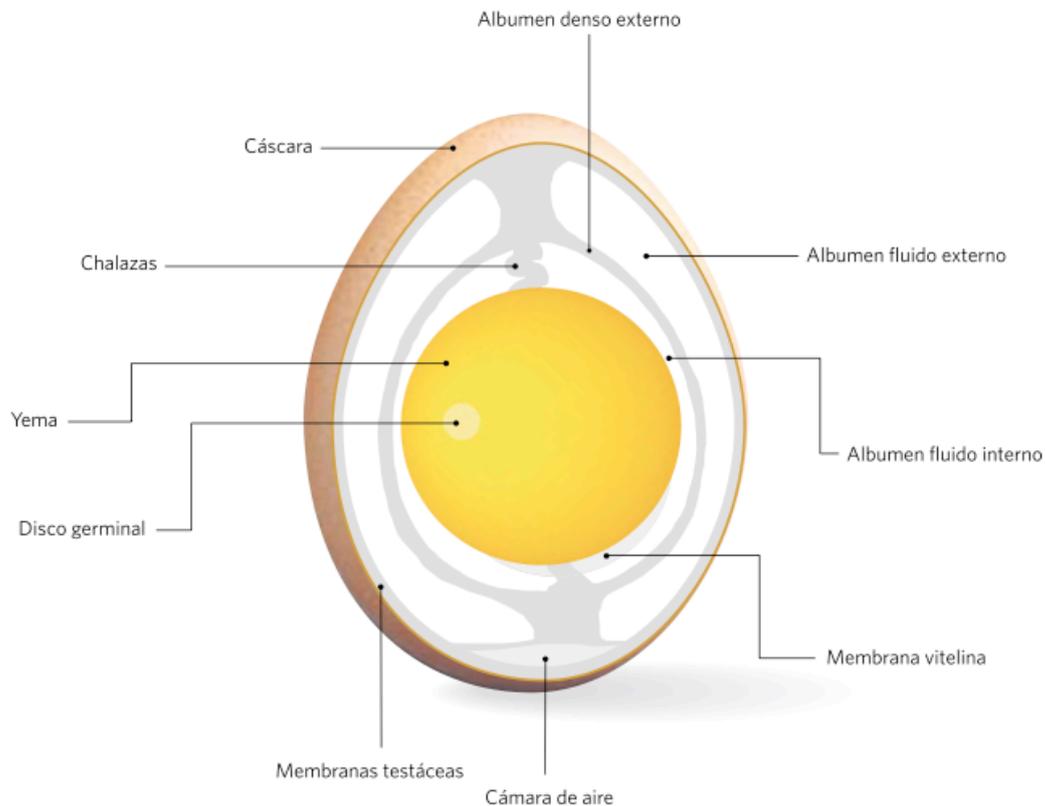


Figura 1. Corte transversal de un huevo de gallina (IEH, 2015).

En su interior, la cáscara está recubierta por la membrana testácea interna, constituida por una fina estructura de fibras de queratina entrelazadas, y la externa, mucho más porosa, que sirve como asentamiento para la formación de la cáscara. Ambas rodean el albumen y proporcionan protección contra la penetración bacteriana. Las membranas se encuentran fuertemente pegadas entre sí cuando el huevo es puesto por la gallina. Poco después, debido a la contracción del volumen del contenido del interior del huevo al enfriarse, penetra aire en el polo grueso por su mayor número de poros y las membranas testáceas se separan para constituir la cámara de aire (IEH, 2015).

Clara o albumen

Se distinguen dos partes: el albumen denso y el albumen fluido. El albumen denso rodea a la yema y es la principal fuente de riboflavina y de proteína del huevo. El albumen fluido es el más próximo a la cáscara. A medida que el huevo pierde frescura el denso es menos consistente y termina por confundirse con el fluido.

La clara está compuesta básicamente por agua (88%) y proteínas (12% aproximadamente). La proteína más abundante (54% del total proteico) es la ovoalbúmina, de especial interés desde el punto de vista nutritivo (IEH, 2015)). En la clara se encuentran algo más de la mitad de las proteínas del huevo y está exenta de lípidos. La composición de la clara y la yema de huevo se muestra en la Tabla 1.

Yema o vitelo

Es la parte central y anaranjada del huevo. Está rodeada de la membrana vitelina que da la forma a la yema y permite que se mantenga separada de la clara. En ella se encuentran las principales vitaminas, lípidos y minerales del huevo y por ello es la parte nutricionalmente más valiosa. Su contenido en agua es de aproximadamente el 50%.

Los sólidos o materia seca se reparten equitativamente entre proteínas y lípidos, quedando una fracción pequeña para vitaminas, minerales y carotenoides. Estos últimos son compuestos de efecto antioxidante y los responsables del color amarillo, que varía en tono e intensidad en función de la alimentación de la gallina.

En su interior se encuentra el disco germinal o blastodisco, que es un pequeño disco claro en la superficie de la yema, lugar en el que se inicia la división de las células embrionarias cuando el huevo está fecundado. Ocasionalmente pueden encontrarse huevos con dos yemas debido a que la gallina produce en una misma ovulación dos óvulos. Este accidente fisiológico es más común en las aves al principio del periodo de puesta. Las manchas de color rojizo o marrón que a veces aparecen en el interior del huevo son simplemente células epiteliales procedentes del oviducto que se han desprendido al formarse el huevo y que no presentan problema alguno para su consumo.

Sujetando la yema para que quede centrada se encuentran las chalazas, unos engrosamientos del albumen con forma de filamentos enrollados, que van desde la yema hasta los dos polos opuestos del huevo (IEH, 2015).

Tabla 1. Composición de la yema y la clara de huevo (IEH, 2015) .

	100 g de yema	100 g de clara
Energía (kcal)	353	49,1
Proteínas (g)	16,1	11,1
Carbohidratos (g)	0,3	0,7
Lípidos (g)	31,9	0,2
Ác. Grasos saturados (g)	9,3	0
Ác. Grasos monoinsaturados (g)	12	0
Ác. Grasos poliinsaturados (g)	5,3	0
Colesterol (mg)	1260	0
Tiamina (mg)	0,29	0,022
Riboflavina (mg)	0,4	0,32
Equivalentes de Niacina (mg)	4,2	3,4
Vitamina B6 (mg)	0,3	0,012
Eq. Folato dietético (µg)	159	9,2
Vitamina B12 (µg)	2	0,1
Vitamina C (mg)	0	0,3
Pantoténico (mg)	3,7	0,14
Vitamina A (Eq. de Retinol) (µg)	886	0
Vitamina D (µg)	5,6	0
Vitamina E (Eq. α- tocoferol) (mg)	5,5	0
Vitamina K (µg)	2	0,01
Biotina (µg)	53	7
Calcio (mg)	140	11
Fósforo (mg)	590	21
Hierro (mg)	7,2	0,2
Iodo (µg)	12	6,8
Cinc (mg)	3,8	0,02
Magnesio (mg)	16	12
Sodio (mg)	51	170
Potasio (mg)	138	154
Selenio (µg)	19	5,4
Colina (mg)	682,3	1,1
Luteína + Zeaxantina (µg)	1094	0

La yema de huevo es una compleja emulsión formada por un conjunto de partículas que se encuentran en suspensión en un fluido amarillo claro (Anton, 2013). Esta característica estructura hace que la yema sea fácilmente fraccionable mediante centrifugación una vez que ha sido diluida. Se obtienen así dos fracciones (Figura 2),

una correspondiente al sobrenadante, con coloración naranja fuerte y denominada plasma, y un precipitado, de baja coloración, denominado gránulos (Anton, 2007).

Los **gránulos** representan entre el 19-23% del extracto seco de la yema de huevo, con un contenido aproximadamente del 50% de las proteínas de la yema y un 7% de los lípidos. El contenido de extracto seco de los gránulos es del 44% y contiene en torno a un 64% de proteínas, 31% de lípidos y 5% de cenizas. Los lípidos de la fracción granular están formados por triglicéridos (60%), fosfolípidos (35%) y colesterol (5%). Los gránulos están constituidos por HDL o lipoproteínas de alta densidad (70%) y fosvitina (16%) unidos por puentes fosfocálcicos entre los grupos fosfato de sus residuos fosforilados; lo que confiere a los gránulos una estructura compacta, poco hidratada, débilmente accesible a enzimas y resistente a la desnaturalización térmica y la gelificación (Anton, 2007).

La estructura de los gránulos se debilita cuando se somete a una fuerza iónica por encima de 0,3M de NaCl; ya que el sodio desplaza al calcio de los puentes fosfocálcicos, lo que permite la solubilización de las proteínas (HDL y fosvitinas). Al alcanzar concentraciones de 1,71M de NaCl se pierde la estructura totalmente (Anton, 2007).

El **plasma** comprende entre el 77 y el 81% del extracto seco de la yema y está compuesto por un 85% de LDL (lipoproteínas de baja densidad) y por un 15% de livetinas. Contiene el 90% de los lípidos de la yema, incluidos los carotenoides, y el 50% de las proteínas. Tiene un 75% de lípidos, 25% de proteínas y 2% de cenizas. La distribución de lípidos en el plasma es la siguiente: 70% triglicéridos, 25% fosfolípidos y 5% colesterol (Anton, 2007).

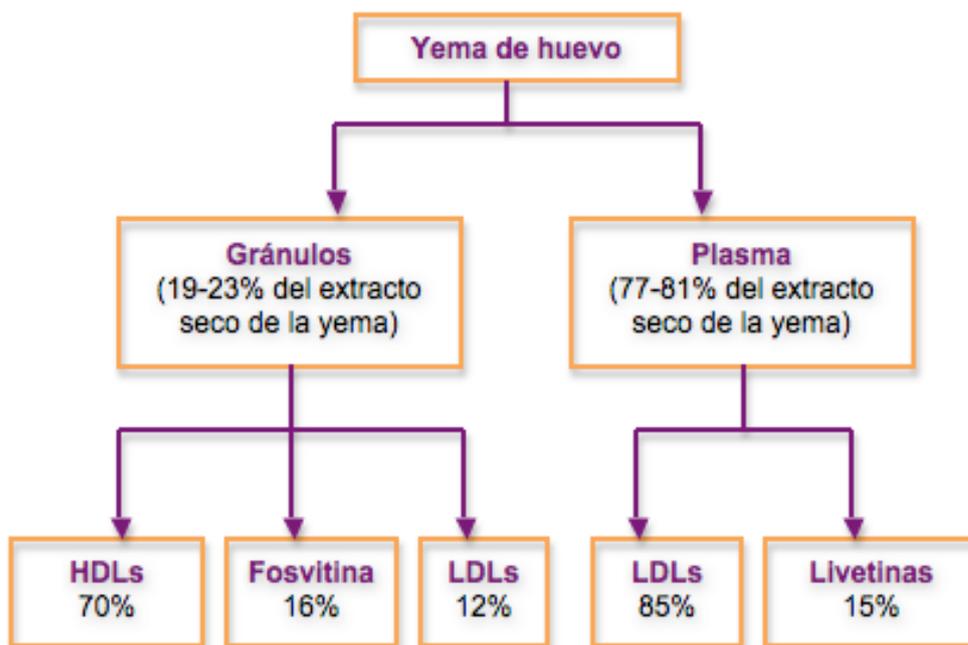


Figura 2. Composición de las fracciones de la yema de huevo (Anton, 2007).

2.1.2. Valor nutritivo

De forma clásica, el huevo ha sido uno de los alimentos más apreciados, puesto que supone una de las fuentes más económicas para obtener proteína de la mejor calidad. Además, también es reconocido por su aporte elevado de micronutrientes (elementos minerales y vitaminas). La Tabla 3 resume la composición nutricional del huevo.

Tabla 2. Valor nutritivo del huevo comparado con otras fuentes proteicas dietéticas.

(*)	Cont. Huevo	Dens.Huevo	Cont. ternera	Dens. ternera	Cont. ternera	Dens. cerdo	Cont. pollo	Dens. pollo
Proteína(g)	12	78,9	21,3	250,0	22	250,0	22,2	278,2
Grasa(g)	10,9	71,7	7	82,2	1,9	21,6	9,6	120,3
AGPI(g)	1,3	8,6	0,8	9,4	0,14	1,6	1,44	18,0
VitE(mg)	1,6	10,5	0,1	1,2	0,41	4,7	0,66	8,3
VitA(UI)	480	3157,9					39	488,7
VitD(mg)	1,7	11,2						
Folato(µg)	23	151,3	11	129,1	2,5	28,4	12	150,4
VitB12(µg)	0,88	5,8	1,3	15,3	2,04	23,2	0,4	5,0
VitB2(µg)	330	2171,1	250	2934,3	230	2613,6	160	2005,0
VitB6(µg)	119	782,9	500	5868,5	565	6420,5	500	6265,7
Fe (mg)	2	13,2	1,5	17,6	1,1	12,5	0,74	9,3
Zn (mg)	1,3	8,6	2,6	30,5	2	22,7	1	12,5
P (mg)	180	1184,2	198	2323,9	204	2318,2	200	2506,3
Kcal	152		85,2		88		79,8	
AGPI/proteína	0,11		0,04		0,01		0,06	

*Datos de contenido expresados por 100g. Densidad nutricional expresada por 1000 kcal.

Como se puede ver en la Tabla 2, es bastante importante la diversidad de nutrientes de los diferentes grupos que pueden destacarse en el huevo. Si hablamos en términos de densidad nutricional (g, μ g o mg de nutriente/1000 kcal alimento), podemos ver como el huevo es realmente un alimento muy aconsejable, si se compara con otros alimentos proteicos a los que puede sustituir en la dieta.

Al hablar de su composición nutricional hay que tener en cuenta que el peso de los huevos se reparte en un rango muy amplio (entre 45 y 80 g) y que las cifras para los distintos nutrientes suelen referirse a 100 g de parte comestible (aproximadamente dos huevos sin cáscara) o, si son por huevo, a un huevo de 60 g considerado como de tamaño medio.

El contenido energético por huevo se acerca a las 75 kilocalorías. Es decir, el aporte calórico de un huevo es relativamente bajo. No es, por tanto, un alimento que favorezca la obesidad. La riqueza del huevo en proteínas es relativamente alta, con la ventaja de que además son fáciles de digerir y de alto valor biológico. Un huevo tiene 7,5 g de lípidos totales, de los cuales 2 g corresponden a ácidos grasos saturados (AGS), 1,1 g a ácidos grasos poliinsaturados (AGP) y 3 g de ácidos grasos monoinsaturados. La relación AGP/AGS es 0,55, considerada más que aceptable y por tanto recomendable en términos de nutrición. Al mismo tiempo es de destacar la riqueza en ácido oleico (monoinsaturado), valorado por sus efectos favorables sobre la salud. El huevo, por otra parte, es la principal fuente de fosfolípidos de la dieta y contribuye a satisfacer de forma significativa las necesidades en ácido linoleico (ácido graso esencial que el organismo no puede sintetizar).

Las vitaminas y los carotenoides (pigmentos) forman parte del 1% de los lípidos de la yema y el 1,5% de la materia seca del huevo. Las vitaminas liposolubles, la colina, el ácido fólico y la vitamina B12 se encuentran exclusivamente en la yema, en la que se concentra la mayor parte de biotina, ácido pantoténico y vitaminas B1 y B6. El contenido en vitaminas puede ser muy variable según la alimentación de la gallina. Por ello se han realizado numerosos estudios sobre la composición vitamínica del huevo y los factores que la condicionan. El interés por el enriquecimiento de este alimento en determinadas vitaminas es reciente, motivado por el creciente volumen de información sobre las cualidades preventivas o terapéuticas de algunos nutrientes.

Entre los minerales destaca la presencia de fósforo, hierro, selenio, yodo y zinc en cantidades de cierta importancia respecto de las necesidades estimadas de estos oligoelementos.

Tabla 3. Composición del huevo de gallina (IEH, 2015).

HUEVOS DE GALLINA	por 100 g de porción comestible	
Agua	75,2	g
Energía	160	Kcal
Energía	669	Kj
Nitrógeno total	2,03	g
Nitrógeno proteico	1,93	g
Hidratos de carbono	0,68	g
Lípidos totales	12,1	g
Ácidos grasos saturados	3,3	g
Ácidos grasos monoinsaturados	4,9	g
Ácidos grasos poliinsaturados	1,8	g
Colesterol	410	mg
Fibra	0	g
Calcio	56,2	mg
Magnesio	12,1	mg
Hierro	2,2	mg
Yodo	12,7	µg
Zinc	2,0	mg
Vitamina B ₁ (tiamina)	0,11	mg
Vitamina B ₂ (riboflavina)	0,37	mg
Niacina (ácido nicotínico)	0,08	mg
Ácido fólico	51,2	µg
Vitamina B ₁₂ (cianocobalamina)	2,1	µg
Vitamina B ₆ (piridoxina)	0,12	mg
Vitamina C (ácido ascórbico)	0	mg
Vitamina A (equivalentes de retinol)	227	µg
Vitamina D ₃	1,8	µg
Vitamina E	2,0	mg

El huevo es la mejor fuente dietética de lecitina o fosfatidilcolina, compuesto de gran interés nutricional por su importancia en diversos procesos metabólicos, en la construcción de membranas celulares y del neurotransmisor acetilcolina. Los organismos responsables de la educación nutricional han considerado oportuno fijar la ingesta recomendada para la colina en unos 500 mg/día, prácticamente la cantidad que aporta un huevo.

La elevada calidad y biodisponibilidad de la proteína del huevo la convierte en una gran fuente de nutrientes en las primeras etapas de la vida (a través de la alimentación de la madre, favorece el desarrollo del feto durante la etapa embrionaria y del bebé lactante, y después en el crecimiento infantil). También es esencial para los deportistas que tratan de ganar músculo y para personas mayores, ya que les ayuda a contrarrestar la pérdida de masa muscular asociada a la edad (IEH, 2015). Por su composición nutricional el huevo es un alimento con una gran capacidad saciante, lo que hace que tenga un interés especial en las dietas de adelgazamiento (IEH, 2015).

2.1.3. Alergias

La alergia al huevo de gallina es una reacción adversa mediada por un mecanismo inmunológico tipo I (IgE). El huevo es una fuente excelente de proteínas, lípidos, sales minerales y vitaminas. La clara aporta cinco componentes proteínicos principales: ovoalbúmina, ovomucoide, ovotransferrina, ovomucina y lisozima. Los primeros se consideran los alérgenos mayores, siendo el ovomucoide la proteína más importante en cuanto a la reacción alérgica ya que es parcialmente termoestable y resistente a la acción digestiva. La yema contiene tres fracciones proteicas de las cuales la apovitelina I y la apovitelina II están consideradas como antígenos mayores. Los componentes del huevo pueden sensibilizar al organismo por ingestión oral, contacto con la piel o por inhalación de sus partículas (aeroalérgenos). En general, la clara es la responsable de la mayoría de las sensibilizaciones (IEH, 2015).

La expresión clínica más frecuente es la cutánea, manifestada por urticaria y angioedema, seguida de molestias digestivas (vómitos, dolor abdominal y diarrea). Puede también haber afección bronquial (broncoespasmo) y nasal (rinoconjuntivitis). En los casos más graves, puede aparecer un cuadro de anafilaxia.

2.1.4. Beneficios del huevo

Los distintos compuestos presentes en el huevo cumplen, además de las funciones nutritivas ya citadas, otras no menos importantes para la salud. Entre ellas es de destacar la acción antioxidante de algunas vitaminas y oligoelementos del huevo que

ayuda a proteger al organismo de procesos degenerativos diversos (cáncer, diabetes, cataratas), así como de las enfermedades cardiovasculares. Los huevos, como fuente de folatos, piridoxina y vitamina B12 y también por su contenido en lecitina, contribuyen a regular los niveles de homocisteína, y por tanto a disminuir el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares (IEH, 2015).

Entre las sustancias “no nutritivas” presentes en el huevo se encuentran diversos anticuerpos cuya acción más significativa es la de favorecer, estimular o mantener la respuesta inmune del organismo frente a determinados procesos infecciosos. Desde hace algunas décadas se sabe de la presencia de inmunoglobulinas en el huevo, pero no fue hasta principios de los años 80 cuando se descubrió que la inmunoglobulina IgY extraída del huevo tenía ventajas indudables sobre la procedente de la sangre de los mamíferos. Esta riqueza del huevo en inmunoglobulinas puede ser una de las razones por las que este alimento contribuya a mejorar la respuesta inmunitaria del organismo.

Otros componentes del huevo de interés para la salud son los AGP ω -3 y ω -6. Estos ácidos grasos parecen jugar un papel importante en la protección frente a la arteriosclerosis y en la mejora de la respuesta inmune. La acción antioxidante de la vitamina E a nivel tisular se potencia con la presencia de selenio en el huevo, ya que éste es un componente esencial del enzima glutatión-peroxidasa (GP) que complementa los efectos de la vitamina E y otros antioxidantes (glutatión, ácido ascórbico, ácido úrico, carotenoides) en un sistema de alta protección. Por otro lado, la riqueza del huevo en selenio y el papel de este oligoelemento en la prevención de ciertos tipos de cáncer incrementa el interés del huevo como alimento saludable (IEH, 2015).

Un último grupo de sustancias “no nutritivas” del huevo, al que se ha prestado especial atención en los últimos años, es el de los pigmentos. Determinados pigmentos presentes en el huevo como el β -caroteno (precursor de la vitamina A) y las xantofilas parecen intervenir activamente en la protección frente a ciertos procesos carcinogénicos.

2.1.5. Nuevas aplicaciones de las fracciones y componentes del huevo

Se debe resaltar el enorme interés que presentan los diferentes componentes del huevo debido a su potencial aplicación en diversos campos y, sobre todo, en alimentación, farmacia, medicina y cosmética (IEH, 2015).

Las proteínas de la clara

En la actualidad las proteínas de la clara se separan con cierta eficacia utilizando distintas técnicas. Los posibles usos para algunas de ellas serían:

- ovoalbúmina: es la proteína más abundante de la clara, separable por cromatografía, y dado su poder espumante puede ser empleada, por ejemplo, en la elaboración de productos tales como las mousses.

- lisozima: posee un alto poder antibacteriano, en especial contra las bacterias Gram+, lo cual le da aplicación en el campo farmacéutico y médico. Recientes trabajos muestran además otras aplicaciones médicas, como su capacidad antiinflamatoria. Es capaz de romper los polisacáridos complejos que forman las paredes de muchas bacterias (lo que provoca su lisis o muerte).

- ovotransferrina (conalbúmina): se consigue separar de la clara por cromatografía líquida evitando la desnaturalización de la proteína. Tiene actividad antimicrobiana contra numerosos microorganismos Gram + y -, además de propiedades antivirales.

- ovomucina: tiene cualidades gelificantes e importantes propiedades bioactivas. Recientemente se han publicado estudios relativos a su actividad antitumoral en cultivos celulares. También diversas investigaciones han demostrado su acción contra la absorción del colesterol, lo cual hace prever su uso para tal fin en los llamados alimentos funcionales (IEH, 2015).

Entre los estudios más recientes de los componentes de la clara o albumen se encuentra la obtención de péptidos con actividad antihipertensiva. Estos péptidos se obtienen a partir de las proteínas de la clara mediante hidrólisis enzimática, y su

importancia desde un punto de vista biotecnológico radica en su capacidad antihipertensiva, por lo que sería interesante su empleo en la prevención de enfermedades cardiovasculares.

Los componentes de la yema

Mediante diferentes procedimientos, a partir de la yema se han obtenido distintos compuestos con importantes aplicaciones biotecnológicas:

- fosvitina: su capacidad de unirse a iones metálicos le confiere propiedades antibacterianas y antioxidantes y, dada su capacidad de asociarse también al calcio, se prevé su posible empleo como ingrediente en la fabricación de alimentos funcionales destinados a la prevención de la osteoporosis.

- IgY: al igual que la IgG, tiene amplia aplicación en el campo de la inmunología (tratamiento de infecciones intestinales, colitis, enfermedad celíaca, fibrosis quística, caries, etc.).

- lecitina: tiene muchas aplicaciones en el campo de la alimentación como emulsionante, lubricante o surfactante y también en el campo de la cosmética y de la farmacia, fundamentalmente como base en la elaboración de liposomas.

2.2. Biomateriales

2.2.1. Ingeniería tisular

La ingeniería de tejidos es una rama que ha adquirido gran importancia en los últimos años, siendo una de las aplicaciones de mayor interés la referente a la ingeniería de tejido de piel, con importantes avances en el desarrollo de tejidos sustitutos. Se estima que aproximadamente el 1% de la población mundial puede sufrir una quemadura seria en algún momento de su vida. En Europa anualmente un millón de personas sufren heridas en la piel y en Estados Unidos alrededor de 1,5 millones de personas al año padecen quemaduras (Colorado et al., 2013).

Las estrategias en la ingeniería de tejidos pueden ser celulares y acelulares. El tipo celular (*in vitro*) implica previamente la siembra celular sobre soportes que son posteriormente implantados en el tejido lesionado para estimular el crecimiento de nuevo tejido, mientras que el material de soporte en sí es degradado gradualmente y sólo el tejido recién generado permanece funcional. En la estrategia acelular (*in vivo*) se busca el mismo resultado, pero con la diferencia de que el soporte es implantado en la región dañada para estimular la infiltración de células vecinas responsables de la deposición de matriz extracelular (Colorado et al., 2013).

Uno de los objetivos más importantes de la ingeniería de tejidos es el diseño de los biomateriales utilizados como estructuras para soportar las células. Las investigaciones y desarrollos en este área han aumentado en los últimos años, dada la urgente necesidad de alternativas de tratamiento a daños o pérdidas de tejidos, al cáncer y a enfermedades degenerativas (Langer y Vacanti, 1993).

Los biomateriales utilizados para implantes e interacción directa con tejido biológico deben cumplir con propiedades biológicas, físicas, químicas y mecánicas aptas para procesos de locomoción y adhesión celular, con baja toxicidad, alta promoción celular, estabilidad a la degradación y un adecuado comportamiento térmico, entre otras. El enfoque actual de la investigación en aplicaciones dérmicas, epidérmicas y sustitutos de componentes de la piel, se dirige hacia el desarrollo de una ingeniería de tejidos equivalente que combine fuentes celulares activas con materiales naturales o sintéticos (Colorado et al., 2013).

La obtención de biomateriales que faciliten la regeneración ósea es uno de los objetivos claves en el desarrollo de la nueva generación de implantes ortopédicos. Una alternativa para el desarrollo de este tipo de biomateriales son los materiales obtenidos de fuentes naturales animales o vegetales. Dentro de esta categoría se encuentra el colágeno, albúmina, quitosano, la cáscara de huevo, la cascarilla de arroz, el coral bambú y la cáscara de coco (Montañez, 2014). Como se ha mencionado antes, la cáscara de huevo de gallina contiene una fase inorgánica compuesta en un 97% a 98% de carbonato de calcio y el 2% restante es carbonato de magnesio, además tiene pequeñas cantidades de iones sodio, potasio y fosfato, lo que hace una constitución iónica muy parecida a la de la dentina. Uno de los materiales de interés que pueden

provenir de la cáscara de huevo, son los fosfatos de calcio, que se ha demostrado que son biocompatibles con tejido biológico (Montañez, 2014). Las membranas testáceas del huevo también han sido utilizadas para desarrollar soportes en ingeniería tisular (Yi et al., 2004). Se ha probado su biocompatibilidad con células NIH3T3 y se ha observado que las células se multiplican más y se adhieren más rápido a los soportes elaborados a partir de las membranas de huevo que a los soportes elaborados con colágeno.

2.2.2. Bioplásticos y biopelículas

El huevo y en particular la clara, son fuentes importantes de proteínas para la formación de films y recubrimientos (Guérin-Dubiard y Audic, 2007). Los recubrimientos poliméricos se han utilizado en la industria farmacéutica durante muchos años para proporcionar la liberación controlada de ingredientes activos farmacéuticos, para protegerlos y para enmascarar su sabor desagradable (Abu Diak et al., 2007). Existe un creciente interés en la elaboración de estos recubrimientos a partir de polímeros de origen natural, con altos niveles de degradación y con una elevada solubilidad en agua. Aunque las proteínas suponen una alternativa adecuada a los polímeros sintéticos, un inconveniente importante es la limitada resistencia mecánica que poseen. La ovoalbúmina, que constituye más de la mitad de las proteínas de huevo, contiene 4 grupos sulfidrilo (SH). Otras proteínas como la ovotransferrina, ovomucoide y lisozima contienen muchos puentes disulfuro (S-S), que al igual que los grupos SH, están involucrados en los mecanismos de formación de films (Guérin-Dubiard y Audic, 2007). Se puede optimizar la formación de biofilms de proteína de huevo mediante la incorporación de plastificantes, que permiten superar los problemas de debilidad y fragilidad de los films obtenidos y mejorar su flexibilidad y elasticidad. Por otro lado, el uso de plastificantes reduce las interacciones entre las proteínas provocando un aumento del volumen libre de polímeros, causando un descenso en las propiedades de barrera del biofilm. (Guérin-Dubiard y Audic, 2007).

2.3. La transglutaminasa

Las transglutaminasas (TGasas) son una familia de enzimas (EC 2.3.2.13) que catalizan la reacción de formación de un enlace covalente entre un grupo amino (p.e. la

cadena lateral de una lisina -Lys-) y un grupo carboxiamida (p.e. la cadena lateral de un residuo de glutamina -Gln-). Se trata de enzimas que, a diferencia de la mayoría de enzimas industriales (amilasas, lipasas y proteasas) que catalizan reacciones de hidrólisis, inducen a la polimerización de las proteínas (Palafox y García 2006). En consecuencia, son capaces de modificar las propiedades funcionales y de textura de las proteínas creando productos con mayor consistencia y de mejor calidad.

La reacción catalizada por la transglutaminasa es controlada por la relación tiempo/temperatura aunque la unión proteica ocurre independientemente del calentamiento, congelación o adición de sal o fosfatos. Su temperatura óptima es de 50°C y se puede inactivar por elevación de la temperatura (2 horas a 65°C, 15 min a 70°C, 5 min a 75°C, 1 min a 80°C). Es estable en un amplio rango de pH (5-8), lo que permite su aplicación en una gran cantidad de productos.

Las TGasas se distribuyen extensamente en la mayoría de los tejidos animales, vegetales y fluidos corporales y están implicadas en varios fenómenos biológicos, tales como coagulación de la sangre, sanación de heridas, queratinización epidérmica, y rigidez de la membrana de los eritrocitos (Aeschlimann y Paulsson, 1994).

La enzima transglutaminasa tiene aplicación potencial en cualquier material que contenga proteínas, especialmente las que presentan numerosas terminaciones lisina o glutamina, como la proteína de soja o de trigo (Jozami y Sesehousky, 2003). La aplicación de la TGasa más conocida es la reestructuración de carnes rojas, pollos, mariscos; pudiendo transformar materias primas de la carne, o pequeños trozos, en un producto con valor agregado, sin necesidad de utilizar cantidades excesivas de sal o fosfatos. Una vez que se ha formado la carne reconstituida no se dispersa ni siquiera con la congelación o cocción (Jozami y Sesehousky, 2003). La enzima TGasa es empleada también en la industria láctea; al adicionarla al yogur mejora la cremosidad y viscosidad del producto; garantiza una mayor estabilidad reológica durante el almacenaje, y además reduce la sinéresis, es decir, reduce la separación del suero en el yogur, ya que mejora la capacidad de retención de agua del gel.

No sólo se ha usado en el campo de la alimentación. Se está investigando mucho en la obtención de films a partir de polímeros naturales que sirvan como alternativa a los materiales derivados del petróleo. Se han obtenido films a partir de numerosas proteínas como colágeno o proteína de soja, que han mostrado ser totalmente biodegradables. La enzima transglutaminasa ha permitido mejorar las propiedades mecánicas y de barrera de dichos films (Patzsch et al., 2010).

2.4. Reología

La reología es la rama de la física que tiene por objeto el estudio de la deformación y el flujo de la materia bajo la acción de fuerzas mecánicas. La deformación es el cambio de forma o volumen experimentado por un cuerpo bajo la acción de un sistema de fuerzas; y el flujo, una deformación continua en el tiempo.

La aplicación de fuerzas externas de intensidad suficiente puede provocar una deformación de la materia, realizándose un trabajo que se acumula como energía interna de deformación. Cuando estas transformaciones son reversibles y las fuerzas externas dejan de actuar, el sistema recupera instantáneamente la forma y dimensiones originales, mientras que la energía acumulada retorna en forma de trabajo. Se habla entonces de comportamiento elástico. En otras ocasiones, la materia también se deforma bajo la acción de fuerzas aplicadas, pero el trabajo realizado se disipa completamente en forma de calor. Por ello, cuando la acción de dichas fuerzas cesa, el estado de deformación permanece. Se habla entonces de un comportamiento viscoso.

Los cuerpos sólidos son idealmente elásticos cuando son sometidos a esfuerzos. Cuando el esfuerzo cesa, la recuperación es inmediata y total siempre que no se sobrepase el límite de ruptura. Por otro lado, los fluidos se pueden clasificar según su comportamiento reológico en fluidos newtonianos y no newtonianos. Los fluidos newtonianos son aquellos que siguen la Ley de Newton ($\tau = \mu \dot{\gamma}$) con viscosidad (resistencia a fluir) constante para cualquier valor de la deformación y del esfuerzo. La viscosidad dependerá únicamente de la naturaleza de la sustancia, de la presión y de la temperatura (Schramm, 2004).

Los fluidos no newtonianos no siguen la Ley de Newton debido a que su viscosidad depende además del esfuerzo cortante aplicado sobre el fluido y del esfuerzo al que ha sido sometido en el pasado. Así, los fluidos no newtonianos pueden clasificarse en tres grandes grupos: independientes del tiempo (Figura 3), dependientes del tiempo y viscoelásticos (Marín et al., 2014). Dentro de los fluidos no newtonianos independientes del tiempo se encuentran los pseudoplásticos, dilatantes y plásticos. En los primeros la viscosidad disminuye al aumentar el esfuerzo cortante aplicado, al contrario que en los dilatantes, donde la viscosidad aumenta al aumentar el esfuerzo cortante. Los plásticos no fluyen hasta que se les aplica un esfuerzo cortante mínimo denominado esfuerzo umbral. Los fluidos no newtonianos dependientes del tiempo se dividen en tixotrópicos y reopéticos. En los primeros la viscosidad disminuye en función del tiempo que ha sido aplicado el esfuerzo cortante, al contrario que en los reopéticos, donde la viscosidad aumenta según ha pasado más tiempo el fluido sometido al esfuerzo. Los fluidos viscoelásticos son sustancias complejas con un comportamiento elástico y viscoso a la vez. Así, al aplicar un esfuerzo parte de la energía se disipa en forma de calor, pero también parte se almacena.

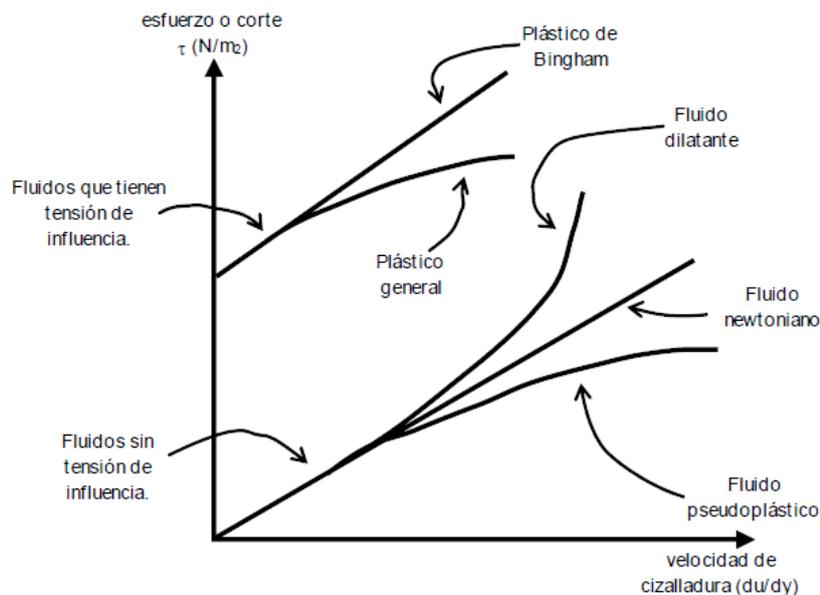


Figura 3. Tipos de fluidos según su comportamiento reológico (Marín et al., 2014).

Los reómetros rotacionales son aparatos destinados a realizar medidas reproducibles a partir de esfuerzos producidos por desplazamientos rotacionales muy limitados y precisos. El sistema de medición de los reómetros es de tipo Searle. La placa superior, también llamada rotor, gira un número de revoluciones variable o constante

según convenga, mientras que la placa de abajo permanece en reposo. Al girar, la placa superior hace que la sustancia que se encuentra entre las dos placas empiece a fluir. La resistencia del líquido a ser cizallado es proporcional al momento de giro dependiente de la viscosidad, es decir, (velocidad de cizalla) que es inversamente proporcional a la velocidad de la muestra. Entre el motor y el eje 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. Desde el punto de vista del sistema de trabajo los reómetros rotacionales pueden hacerlo en (Schramm, 2004):

- Modo CR, o modo de velocidad controlada, donde se asigna una velocidad de cizalla y se mide el esfuerzo originado.

- Modo CS, o modo de esfuerzo controlado, donde se mide la velocidad de cizalla a un esfuerzo de cizalla dado.

- Modo CD, o modo de deformación controlada.

Los elementos sensores de medida que pueden ser utilizados en este tipo de reómetros son:

- Cilindros coaxiales: consta de un cilindro externo y otro interno en el que la sustancia se coloca en el espacio libre que dejan. Son utilizados para medir sustancias de baja viscosidad.

- Cono-Placa: son utilizados para materiales de viscosidad media, fáciles de limpiar y que no tengan partículas en suspensión.

- Placa-placa: esta geometría es adecuada para realizar ensayos oscilatorios y para sustancias poco homogéneas (con partículas en suspensión). Una variación de los sensores placa-placa, son las placas serradas utilizadas para evitar fenómenos de deslizamiento (“slippage”).

Los ensayos reológicos pueden ser estacionarios u oscilatorios (Schramm, 2004). Los ensayos estacionarios más comunes se describen a continuación:

- Rampa de esfuerzo (τ): consiste en aplicar un intervalo de velocidades de deformación y medir el esfuerzo correspondiente, o viceversa. La relación entre el esfuerzo de deformación y la velocidad de deformación determina el modo de fluir de un líquido.

- Rampa de temperatura (T): consiste en incrementar o reducir la temperatura de modo continuo mientras que el resto de condiciones de medida se mantienen constantes. La temperatura se va modificando en función del tiempo a una determinada velocidad.

- Rampa de tiempo (t): consiste en mantener las condiciones de medida constantes durante un periodo de tiempo determinado. Se utiliza para ver como varían las sustancias en función del tiempo, lo que permite identificar fluidos tixotrópicos y reopéticos.

Por otro lado, los ensayos oscilatorios se caracterizan porque en lugar de aplicar un esfuerzo o una velocidad de deformación de manera constante, estos se aplican sobre la muestra de manera oscilatoria a una determinada frecuencia. Se utilizan para caracterizar productos viscoelásticos. Los ensayos oscilatorios aportan información relacionada con la viscosidad y la elasticidad en función de la frecuencia aplicada. Los resultados son sensibles a la composición química y la estructura física del producto, por lo que este tipo de ensayos permite estudiar la estructura interna de las muestras.

En una muestra completamente elástica, el esfuerzo es una oscilación que tiene la misma frecuencia y fase que la oscilación de deformación. En una muestra completamente viscosa, el esfuerzo tiene la misma frecuencia que la oscilación de deformación, aunque se encuentra desfasada 90° . Una sustancia viscoelástica tendrá un ángulo de desfase entre 0 y 90° .

Para obtener un resultado repetible debe trabajarse en la región lineal viscoelástica, en donde el módulo complejo (G^*) que depende de la elasticidad (G') y de la viscosidad (G'') es constante (Marín et al., 2014). El módulo complejo representa

la resistencia de la muestra a la deformación aplicada. El valor de G^* puede expresarse en forma de número complejo con una componente real debida a la aportación elástica y otra imaginaria debida a la aportación viscosa ($G^* = G' + i G''$). Hay varios tipos de ensayos oscilatorios, entre los que se destacan los siguientes:

- Barrido de esfuerzo: para una sustancia cuyo comportamiento reológico es desconocido este sería el primero de los ensayos dinámicos que se debería de realizar, ya que el barrido de esfuerzo aporta la información necesaria para determinar la zona lineal viscoelástica. En este test, con una frecuencia y una temperatura determinadas, se aparte de un esfuerzo inicial que se va incrementando hasta alcanzar un esfuerzo final. Ambos valores son prefijados y se observa como varían las características de la muestra. Hay que tener en cuenta que el rango lineal viscoelástico depende de la frecuencia a la que se realice el ensayo.

- Barrido de frecuencia: aporta información relacionada con las características estructurales de la muestra analizada. Este ensayo se realiza a una temperatura determinada aplicando un esfuerzo constante, que debe de estar dentro de la región lineal viscoelástica. Se parte de una frecuencia inicial que se va incrementando hasta alcanzar un esfuerzo final. Ambos valores son prefijados. En la mayoría de los casos 0.1 Hz es una frecuencia adecuada para iniciar el barrido (valores más pequeños requerirían mucho tiempo de medición) y 14 Hz es una frecuencia adecuada para finalizarlo (valores más elevados podrían originar errores de medida debido a la inercia).

- Barrido de tiempo: ensayo ideal para determinar como cambian los materiales viscoelásticos en función del tiempo para una temperatura dada. Al igual que en el resto de test oscilatorios, se debe de estar dentro del rango lineal viscoelástico.

- Barrido de temperatura: el barrido de temperatura, es muy similar al barrido de tiempo, con la única diferencia de que la temperatura va modificándose de acuerdo a una velocidad predeterminada, siendo la frecuencia y el esfuerzo aplicado constantes.

2.5. Texturometría

La textura es un atributo importante que afecta al proceso y manejo, y determina la vida útil y la aceptación de un producto por parte de los consumidores.

Los sistemas de caracterización de la textura se han dividido normalmente en dos: basados en métodos sensoriales e instrumentales. El análisis sensorial incluye el uso de sentidos como el olfato, la degustación, el sonido y el tacto. La evaluación de textura de productos alimenticios, farmacéuticos y cosméticos a través del tacto incluye el uso de dedos, labios, lengua, paladar y dientes. Como es fácilmente deducible los métodos de análisis sensorial están sujetos a una gran variabilidad, aunque puede reducirse utilizando personal entrenado. Generalmente es preferible el uso de métodos instrumentales para evaluar la textura sobre los métodos sensoriales, puesto que pueden realizarse bajo condiciones mucho más controladas y definidas. Otra de las ventajas del análisis instrumental es que frecuentemente los cambios en niveles de ingredientes producen varios cambios simultáneos en las características del producto. Alguno de esos cambios pueden ser prácticamente imposibles de definir mediante los métodos sensoriales, como la variación de firmeza de un pastel debido al contenido de azúcar (Aname, 2015).

Aunque la reometría puede aportar valiosa información relacionada con la textura, la finalidad del texturómetro es definir uno o más ensayos que permitan la sustitución de la evaluación sensorial humana como herramienta para evaluar texturas. La textura es un atributo multiparamétrico, de modo que para poder entenderla es importante definir las propiedades texturales, así como sus magnitudes, lo que no resulta tarea fácil. Por tanto, es necesaria una nomenclatura internacional estándar para asegurar que todas las investigaciones llevadas a cabo en diferentes países se refieren a las mismas propiedades. Sin embargo, esto no es sencillo, porque algunas palabras al realizar su traducción a otra lengua no siempre son equivalentes (Marín et al., 2014).

Uno de los equipos empleados para la caracterización textural de los alimentos es el analizador de textura. Este equipo somete a la muestra a un esfuerzo entre dos placas, una móvil y otra fija, de manera que mide tres parámetros: tiempo, fuerza y distancia. A partir de estos parámetros se pueden evaluar de forma cualitativa y

cuantitativa las distintas propiedades texturales (firmeza, cohesividad, adhesividad, untabilidad, etc.) de un determinado producto (Marín et al., 2014). El analizador está constituido por una base y un brazo móvil que es el encargado de transmitir la fuerza a la muestra. Las sondas y accesorios empleados se eligen en función de las características del producto a analizar y del parámetro o propiedad que se quiera conocer.

El analizador de textura ofrece datos cuantificables, repetibles y precisos de las propiedades físicas de productos alimenticios, cosméticos, farmacéuticos y químicos. Es un procedimiento muy establecido en la investigación y una herramienta de gran valor en la búsqueda de métodos mejorados para el control de calidad. Se ha utilizado por ejemplo para comparar la textura de la carne con la de alimentos obtenidos a partir de aislados de proteínas de guisante, que han mostrado ser materias primas valiosas para el desarrollo de alimentos alternativos a la carne (Osen et al., 2013).

2.6. Microscopio electrónico de barrido (SEM)

El microscopio electrónico de barrido (SEM, Scanning Electron Microscope) proporciona imágenes y datos físico-químicos de la superficie de cuerpos generalmente opacos a los electrones, por medio de un delgadísimo haz de electrones que recorre dicha superficie y de detectores que transducen las señales que de ella emanan, transformándolas en corrientes eléctricas que se emplean en formar una imagen (Vázquez y Echevarría, 2000).

El SEM es uno de los instrumentos más versátiles para el examen y análisis de características microestructurales de objetos sólidos. Una de las razones para ello es su alta resolución (de 20 a 50 Å) y la apariencia tridimensional de las imágenes, producto de su gran profundidad de foco (aproximadamente entre 100 y 1000 veces mayor que la de un microscopio óptico a la misma magnificación).

En general los SEM cuentan con capacidad analítica mediante el agregado de un detector de rayos X dispersivo en energías (EDS, Energy Dispersive Spectrometer), que permite obtener información composicional de manera rápida y eficiente. Los

microscopios electrónicos de barrido trabajan a un vacío aproximado de 10^{-6} torr. En estos microscopios las muestras no conductoras (orgánicas, biológicas, vidrios, polímeros, etc.) necesitan una cubierta conductora metálica, para evitar carga eléctrica y daño por radiación y lograr su observación. En estos casos se utiliza generalmente una cubierta de oro por ser buen conductor del calor y la electricidad, o se recubren con carbono cuando se quiere realizar análisis químico por EDS. Por otro lado, las muestras conductoras pueden ser examinadas sin ningún tipo de cubierta (Echarri et al., 2013).

En el caso de las muestras biológicas, estas deben recibir un tratamiento de secado por punto crítico (CPD, Critical Point Drying) previo al metalizado. El CPD es un método de secado posterior a la deshidratación con alcohol o acetona, que permite conservar la forma y estructura celular de la muestra. El proceso se basa en el reemplazo de los líquidos (utilizados en la extracción, fijación y conservación iniciales) por CO_2 , que es finalmente evacuado sin dañar los tejidos de la muestra (Echarri et al., 2013).

Los nuevos microscopios electrónicos de barrido (ESEM, Environmental Scanning Electron Microscope) tienen la capacidad de trabajar con bajo vacío (hasta 20 torr), aumentando notablemente el campo de aplicación, llegando a extremos de poder estudiar en esas condiciones muestras con un 100% de humedad relativa.

3. Metodología experimental

3.1. Fraccionamiento de la yema de huevo

Para el fraccionamiento de la yema de huevo se siguió el procedimiento descrito por Laca et al. (2010). Se utilizaron huevos de gallina medianos de la marca Alimerka. La cáscara se rompió manualmente y tras separar la yema del huevo con ayuda de un papel de filtro para quitar los restos de albumen, se eliminó la membrana vitelina con ayuda de unas pinzas. Las yemas se diluyeron con agua destilada en proporción 1:1,5 (v/v) y se utilizó NaOH (Sigma-Aldrich) 1N para ajustar el pH de la mezcla a 7. Se dejó en reposo a 4°C durante una noche.

Se centrifugó la mezcla (Centrífuga Kubota 6500) a 4°C y 10000xg durante 45 minutos. Se separaron por decantación los gránulos (sedimento) del plasma (sobrenadante) y se congelaron a -80°C para posteriormente ser liofilizados. Se congelaron también yemas sin diluir ni centrifugar. La Figura 4 muestra un esquema del proceso.

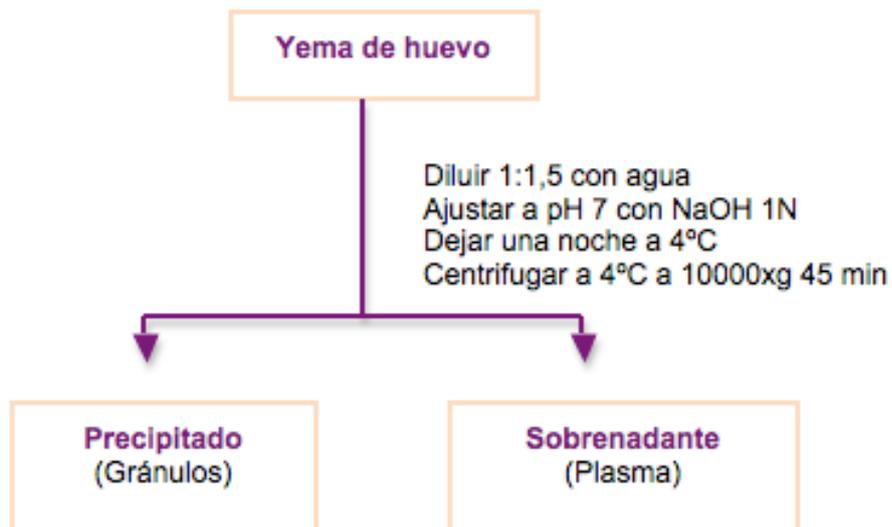


Figura 4. Esquema general del fraccionamiento de la yema de huevo. Modificado de Laca et al. (2010).

3.2. Liofilización

Las muestras de yema, gránulos y plasma previamente congeladas a -80°C se liofilizaron (Liofilizador TELSTAR modelo Cryodos) a -70°C y 0.1 mBa durante 24 horas. Posteriormente, las distintas fracciones fueron tamizadas en un tamiz de 2 mm de luz y se almacenaron a 4°C .

3.3. Extracción de proteínas

Se utilizaron diferentes disolventes orgánicos para intentar eliminar la grasa de las muestras. A partir de la yema y las fracciones liofilizadas se prepararon diluciones 1:5 (p/v) con tres disolventes diferentes: hexano (Sigma-Aldrich), etanol (Panreac) y acetona (Panreac).

Las disoluciones se agitaron a temperatura ambiente durante 30 min a 700 rpm y posteriormente se centrifugaron a $10000\times g$ y 20°C durante 10 min. Se retiró el sobrenadante y el precipitado se congeló a -80°C para posteriormente ser liofilizado en las condiciones mencionadas en el apartado anterior.

Para comprobar si se conseguía alcanzar una concentración más alta de proteína en las muestras se llevaron a cabo dos pruebas adicionales. Una de ellas consistió en realizar 4 lavados de los gránulos (20 min cada uno) con acetona, agitando a 700 rpm y con las mismas condiciones de centrifugación que en los casos anteriores. En la última prueba, los gránulos se lavaron durante 30 min, pero esta vez utilizando cloroformo (Sigma-Aldrich), un disolvente orgánico muy utilizado como desengrasante en muchos procesos industriales, pero también altamente tóxico. Los gránulos así tratados también fueron congelados y liofilizados.

A partir de este momento todos los ensayos serán llevados a cabo con las fracciones del huevo liofilizadas.

3.4. Cuantificación de proteínas: método Kjeldahl

El contenido proteico de las muestras fue determinado por el método Kjeldahl (Roca et al., 2003), representado esquemáticamente en la Figura 5. Se transformó el nitrógeno en ion amonio (NH_4^+) mediante digestión (Digestor FOSS modelo Tecator) a 420°C con ácido sulfúrico 96% (Panreac) en presencia de un catalizador. El NH_4^+ se evaporó en forma de amoníaco añadiendo NaOH (Sigma-Aldrich). El vapor fue recogido por destilación (Destilador FOSS modelo Kjeltec 2200) en un matraz receptor que contenía ácido bórico (Panreac) (pasando nuevamente a NH_4^+). Los iones amonio fueron valorados con ácido clorhídrico (Panreac) utilizando como indicador rojo de metilo (Sigma-Aldrich) y verde de bromocresol (Sigma-Aldrich).

Digestión



Neutralización y destilación



Titulación



Figura 5. Representación esquemática del método Kjeldahl.

A partir del número de equivalentes de HCl utilizados se pudo conocer la cantidad de nitrógeno presente. El contenido de proteína de las muestras se calculó utilizando el factor de corrección correspondiente al huevo y sus derivados: 6,25 (Merrill y Watt, 1973). Todos los análisis se realizaron al menos por triplicado.

3.5. Electroforesis (SDS-PAGE)

Para caracterizar los extractos proteicos obtenidos a partir de yema y sus fracciones, se llevó a cabo una electroforesis en gel de poliacrilamida. Se analizaron las fracciones sin delipidar y las muestras lavadas con acetona, por ser las que se utilizarán

en todos los ensayos de aquí en adelante (a no ser que se especifique lo contrario) al presentar un mayor contenido proteico que las obtenidas con hexano y etanol.

Se prepararon disoluciones de 4 mg/mL a partir de las muestras liofilizadas. Por otro lado, se preparó el tampón de muestra, constituido por glicerol 35% (p/v), SDS 8% (p/v), azul de bromofenol 0,05% (p/v), Tris-HCl pH 6,8 0,5M, y β -mercaptoetanol 5% (v/v). Se mezcló con las muestras en proporción 3:1 y se calentaron a 100°C durante 5 minutos.

La electroforesis se llevó a cabo en un gel de concentración al 3,5% de poliacrilamida y un gel de separación al 12%, aplicando un voltaje de 200V. El equipo utilizado fue un Power Pac 300 (Bio-Rad). Se cargaron 15 μ L para tener una cantidad de proteína de entre 15 y 30 μ g aproximadamente en cada calle del gel. El tampón de electroforesis estaba compuesto por Tris(hidroxiometil)aminometano 0,02M, glicina 5M y SDS 0,1%.

La disolución de tñido utilizada estaba formada por azul de Coomassie 0,1% (p/v), metanol 50% (v/v), ácido acético 10% (v/v) y agua destilada 40% (v/v). La disolución de desteñido se componía de ácido acético 10% (v/v), metanol 40% (v/v) y agua destilada 50% (v/v).

Como patrones se utilizaron proteínas de alto peso molecular (SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Broad Range) suministradas por Bio-Rad, al igual que el azul de Coomassie y el TEMED. El resto de reactivos utilizados fueron adquiridos de Sigma Aldrich.

3.6. Obtención de biofilms con ácido oleico y glicerol

Se siguió el método modificado descrito por Abu Diak et al. (2007) para la obtención de films de caseína utilizando ácido oleico. En lugar de caseína se usaron los gránulos de huevo delipidados con distintos disolventes orgánicos, por ser la fracción con mayor contenido proteico de todas las obtenidas.

Se diluyeron los gránulos con amonio (Panreac) 3M en agitación según las concentraciones mostradas en la Tabla 4. Se añadió ácido oleico (Riedel-de Hæn) en cantidades necesarias para obtener concentraciones de 0,8 1,2 y 1,6%. La disolución se llevó al volumen final con agua destilada. Se realizaron también pruebas con caseína comercial (Sigma Aldrich) de una pureza del 90% para comprobar la validez del método. Las mezclas se dejaron 5 horas en la estufa (Memmert, modelo 100-800) a 50°C.

Por otro lado, se llevaron a cabo pruebas usando como plastificador glicerol (Panreac) en lugar de ácido oleico. En esta ocasión las proporciones utilizadas fueron 1,6% de glicerol y 8% de muestra. Las mezclas se dejaron secar a temperatura ambiente.

Tabla 4. Resumen de las pruebas realizadas con ácido oleico.

Muestra	% de muestra (p/p)	% de ác. oleico (p/p)
Gránulos acetona	8	0,8
		1,2
		1,6
	16	0,8
		1,2
		1,6
Gránulos acetona 4x	8	1,6
	16	1,6
Gránulos hexano	8	1,6
	16	1,6
Gránulos etanol	8	1,6
	16	1,6
Caseína	8	0,8
		1,2
		1,6
	16	0,8
		1,2
		1,6

3.7. Elaboración de geles con transglutaminasa

Se utilizó transglutaminasa (Cuisine Innovation) con una actividad de 50U/g para preparar geles a partir de la yema de huevo, los gránulos y el plasma liofilizados y a partir de las fracciones delipidadas con acetona (por ser las que poseían mayor contenido proteico). Para ello se prepararon disoluciones 1:10 de cada una de ellas en agua destilada y se transfirieron 1,5 mL a placas Petri de 35 mm de diámetro. Finalmente se añadieron 0,33 g de transglutaminasa a cada placa para conseguir una actividad enzimática de 9U/g. Los geles se metieron tapados en la estufa (Memmert, modelo 100-800) a 50°C durante 90 minutos y se almacenaron a 4°C. Se introdujeron también disoluciones sin transglutaminasa para comprobar que no se producía gelificación únicamente por efecto de la temperatura.

3.7.1. Caracterización de los geles de transglutaminasa

3.7.1.1. Medidas reológicas

Se utilizó el reómetro rotacional HAAKE MARS II (Figura 6) de Thermo Scientific con sistema Peltier de control de temperatura. Se empleó un sensor placa-placa serrado (PP35/S) para evitar errores de medida originados por fenómenos de deslizamiento (“slippage”).

Los ensayos llevados a cabo fueron de tipo oscilatorio, ensayos empleados habitualmente en la caracterización de materiales viscoelásticos. Dichos ensayos se caracterizan por aplicar sobre la muestra un esfuerzo o una velocidad de deformación de manera oscilatoria a una determinada frecuencia (Schramm, 2004).

Los ensayos fueron realizados 24 h después de elaborar los geles con transglutaminasa. Se realizaron dos tipos de análisis y en todos los casos la temperatura se mantuvo en 20°C, la ranura entre placas en 1,100 mm y se dejó la muestra, una vez colocada sobre el equipo, durante al menos 20 min previamente a la realización de los ensayos a fin de que se recuperara de las tensiones originadas durante su colocación en el equipo. Todos los ensayos fueron realizados al menos por duplicado.

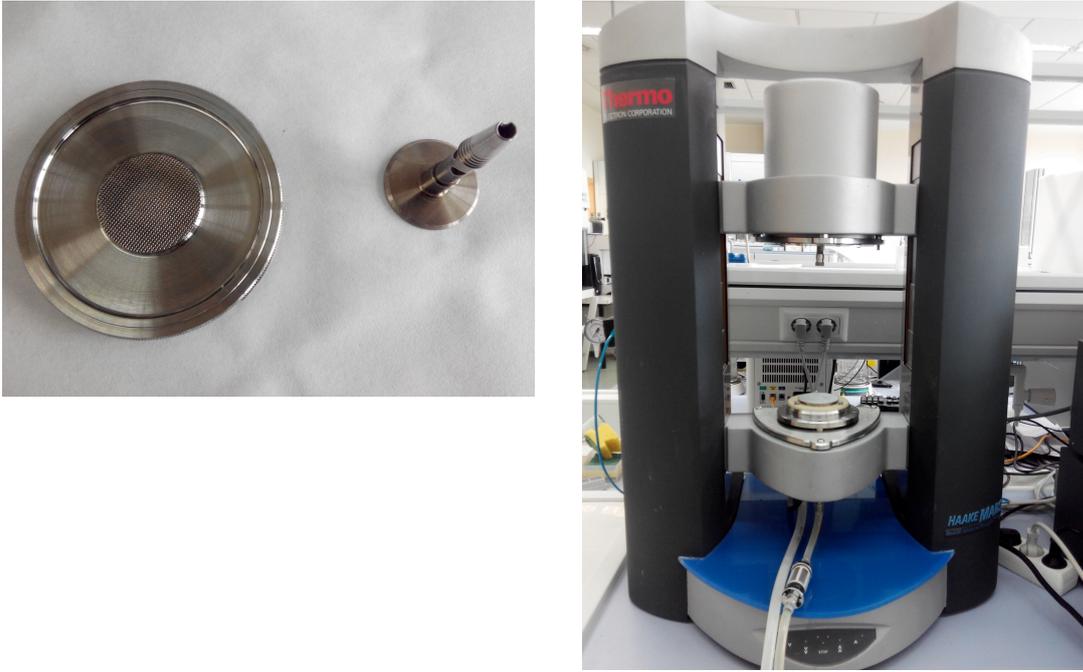


Figura 6. Placas serradas (PP35/S y MP C35/S) utilizadas en los ensayos realizados (izquierda). Reómetro HAAKE MARS II (derecha).

Barrido de esfuerzo

El barrido de esfuerzo aporta la información necesaria para determinar la zona lineal viscoelástica. Con una frecuencia de 1 Hz y una temperatura de 20°C, se parte de un esfuerzo inicial (0,01 Pa) que se va incrementando hasta alcanzar un esfuerzo final (10^4 Pa) y se observa como varían las características de las muestras.

Barrido de frecuencia

Este ensayo aporta información relacionada con las características estructurales de los geles. Se realiza a 20°C aplicando un esfuerzo constante. Dicho esfuerzo debe estar dentro de la región lineal viscoelástica. Se realizó una rampa inversa de frecuencia de 10 Hz a 1 Hz en modo CS con un esfuerzo de 10 Pa.

A partir de los resultados experimentales de los barridos de frecuencia se calculó el número de coordinación z , una medida de las unidades reológicas (relacionadas con la estructura tridimensional de los geles), y el coeficiente de proporcionalidad A , relacionado con la fuerza de interacción de estas unidades reológicas

(Mancini et al., 2002). Ambos parámetros están relacionados según la ecuación $G^* = A \cdot \nu^{1/2}$ (Gabriele et al., 2001), donde G^* es el módulo complejo en Pa y ν la frecuencia en Hz.

3.7.1.2. Texturometría

Todos los geles fueron evaluados empleando un texturómetro TA.TXplus (Stable Micro Systems) con un soporte (HDP/FSR) y una sonda esférica de 5 mm de diámetro SMS P/5 S (Figura 7). Este ensayo permite medir y comparar la resistencia y elasticidad de los geles obtenidos a partir de las distintas fracciones de la yema de huevo. Los parámetros obtenidos mediante este ensayo son el punto de ruptura y la distancia de ruptura del gel. Este último parámetro da una idea aproximada de la elasticidad del producto. Las muestras fueron preparadas 24 h antes del análisis y estos fueron realizados al menos por triplicado.

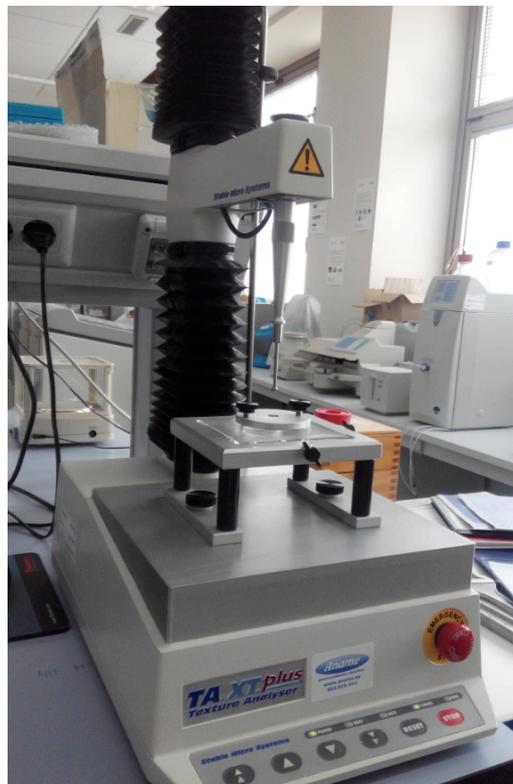


Figura 7. Texturómetro TA.Txplus (Stable Micro Systems) con soporte HDP/FSR y sonda esférica SMS P/5 X.

3.7.1.3. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

El método de preparación de las muestras para ser observadas al microscopio fue adaptado de Egelanddal et al. (2001). Se cortaron pequeños trozos de los geles que se fijaron químicamente con glutaraldehído (Panreac) al 3% (v/v) en tampón fosfato 25 mM durante 5 horas. Trascurrido ese tiempo se realizaron 3 lavados de 15 minutos cada uno con el mismo tampón fosfato.

Los geles fueron deshidratados sumergiéndolos 15 minutos en disoluciones acuosas con una concentración creciente (20, 40, 60, 80 y (x2) 100% (v/v)) de etanol al 96% (v/v) (Panreac). A continuación las muestras se sumergieron en disoluciones de etanol con una concentración creciente de acetona (Panreac) (30, 50, 70, 90 y (x2) 100% (v/v)) durante 10 minutos.

Las muestras se secaron por punto crítico con CO₂ (Critical Point Dryer Balzers CPD 030, Polaron). Una vez secas se montaron sobre soportes de aluminio con cinta de carbón adhesiva de doble cara y se bombardearon con oro en un evaporador al vacío (Sputtering Balzers SCD 004). Finalmente los geles fueron visualizados en el microscopio electrónico de barrido JEOL-6100 SEM. Se tomaron fotografías a 200x, 600x, 10000x y 35000x.

3.7.2. Cultivo de fibroblastos

El cultivo de fibroblastos en los geles de transglutaminasa se realizó en el Centro Comunitario de Sangre y Tejidos de Asturias. Los geles elaborados a partir de la yema, los gránulos y el plasma de huevo se esterilizaron con varios lavados de etanol (Panreac) al 100, 90, 80 y 70% (v/v). Es importante que el etanol utilizado sea absoluto. No se utilizaron las fracciones delipidadas por poder contener restos de acetona que resultaría tóxica para las células. A partir de este momento se realizó todo el proceso en condiciones de esterilidad. Se cortaron varios explantes de los geles, se colocaron en placas multipocillos P6 de 35 mm de diámetro y 10 cm² de superficie y se realizaron 4 lavados de 5 minutos con suero salino para eliminar el etanol, que resulta tóxico para las células. Se añadieron fibroblastos de ratón de la línea celular “Swiss 3T3” (European Collection of Animal Cell Cultures, 85022108) sobre los geles y se cultivaron a 37°C en

una atmósfera con un 5 % de CO₂ (Incubador SANYO MCO-20AIC) durante 7 días. El medio de cultivo utilizado fue “Dulbecco’s Modified Eagle Medium” (DMEM, Gibco) suplementado con 10% de PBS y con dos antibióticos: vancomicina y amikacina. El medio se cambió a los 4 días. Pasados 3 y 7 días se comprobó el crecimiento de los fibroblastos en el gel utilizando un microscopio invertido (Olympus CKX41). Se realizó también un control positivo de crecimiento de fibroblastos y un control microbiológico para asegurar que no existía contaminación.

3.7.3. Visualización de fibroblastos en el SEM

Los geles se fijaron químicamente con glutaraldehído (Panreac) al 2% (v/v) en tampón fosfato 0,1 M durante 24 horas. Transcurrido ese tiempo los geles fueron deshidratados sumergiéndolos en disoluciones acuosas con concentración creciente de acetona (Panreac) (30, 50, 70, 90 y 100% (v/v)) durante 10 minutos en cada una de ellas.

Las muestras se introdujeron en isoamiloacetato puro (Merck) y se secaron por punto crítico con CO₂ (Critical Point Dryer Balzers CPD 030, Polaron). Una vez secas se montaron sobre soportes de aluminio con cinta de carbón adhesiva de doble cara y se bombardearon con oro en un evaporador al vacío (Sputtering Balzers SCD 004). Finalmente los geles fueron visualizados en el microscopio electrónico de barrido JEOL-6100 SEM (Figura XA) para comprobar si existía crecimiento de fibroblastos.

3.8. Elaboración de cápsulas a partir de fracciones de huevo

En la elaboración de las cápsulas a partir de las fracciones de huevo se siguió el método modificado para la obtención de cápsulas de caseína descrito por Bulgarelli et al. (2000). Se prepararon disoluciones al 30% (p/v) en agua destilada (10 mL) que contenían mezclas muestra-gelatina (Royal) (1:2). Se utilizaron las tres fracciones delipidadas y sin delipidar. Para todas ellas se siguió el mismo proceso. Cada mezcla se calentó durante 5-10 min en un baño a 60°C mientras se calentaban también 30 mL de aceite de vaselina (Panreac) a la misma temperatura.

La mezcla de muestra-gelatina se añadió gota a gota sobre la vaselina caliente y se agitó a 500 rpm. Pasados 10 min se bajó la temperatura rápidamente metiendo la disolución en hielo durante 5 min. Para solidificar las gotas se añadieron 50 mL de acetona previamente enfriada a 5°C y se agitó de nuevo a 500 rpm durante 15 minutos.

Las bolas obtenidas permanecieron 30 min a 4 °C, se realizaron tres lavados con acetona y se dejaron secar a temperatura ambiente. Finalmente se visualizaron en un estereomicroscopio de fluorescencia (Leica M205FA) tomando fotografías de las cápsulas secas, 1 hora después de hidratarlas para observar los cambios morfológicos producidos, y tras un lavado con acetona para comprobar si recuperaban su morfología original.

3.8.1. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Una vez secas las cápsulas se montaron sobre soportes de aluminio con cinta de carbón adhesiva de doble cara y se bombardearon con oro en un evaporador al vacío (Sputtering Balzers SCD 004) (Figura 8.C.). Finalmente las muestras fueron visualizadas en el microscopio electrónico de barrido JEOL-6100 SEM (Figura 8.A.). Se tomaron fotografías a 30 y 100x.

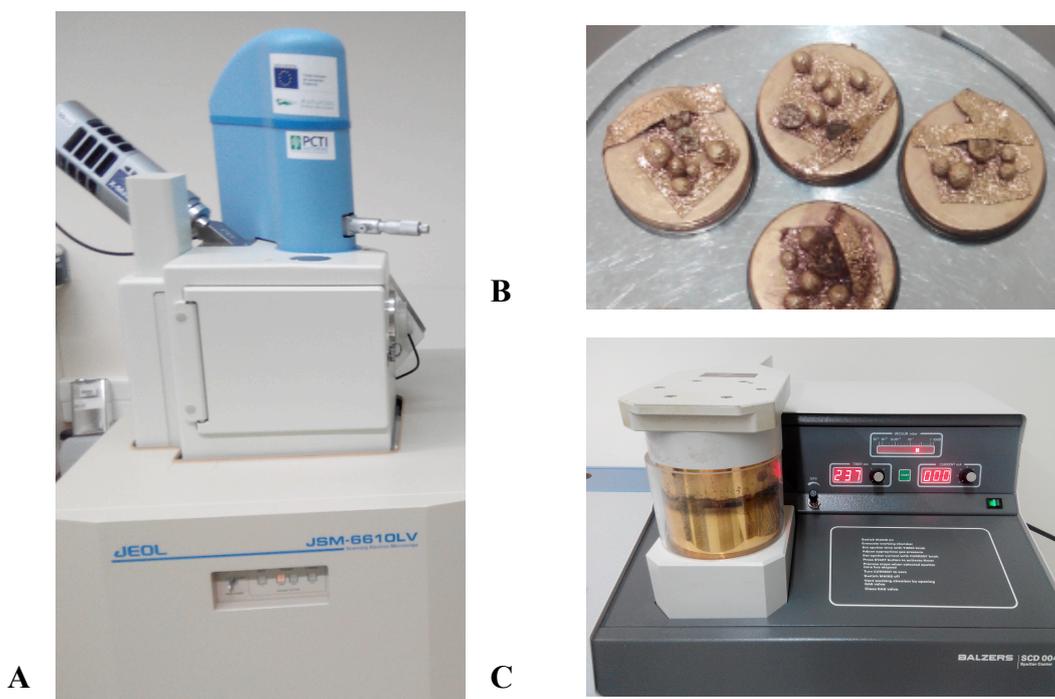


Figura 8. A: fotografía del microscopio electrónico de barrido JEOL-6100 SEM. B: cápsulas recubiertas de oro. C: evaporador Sputtering Balzers SCD 004.

3.8.2. Absorción de ácido salicílico

Se siguió el método modificado de Bulgarelli et al. (2000) para el estudio de la capacidad de las bolas de caseína de encapsular FluNa. En este caso se intentó encapsular ácido salicílico, un compuesto con acción analgésica, antiinflamatoria y antipirética entre otras (Braña et al., 2005), que se puede analizar fácilmente por métodos espectrofotométricos (Combarros et al., 2014).

A partir de las cápsulas obtenidas de la yema liofilizada y sus fracciones se prepararon disoluciones al 1% (p/v) con 28 mL de ácido salicílico (Sigma-Aldrich) 0,05% (p/v). Se agitaron las disoluciones 30 min a 25°C y 150 rpm y otros 5 min después de añadir 30 mL de acetona (Panreac).

Tras realizar varios lavados con acetona las cápsulas se liofilizaron durante 2-3 horas. Una vez secas se sumergieron en 50 mL de NaOH (Panreac) 1N. Pasadas 24 horas las muestras se filtraron para eliminar los restos de cápsulas y se ajustaron a pH inferior a 7 con HNO₃ (Panreac) al 60%.

Se mezclaron 4,5 mL de las disoluciones con 5 mL de nitrato de hierro (10 g/L) para medir la absorbancia del complejo formado a 530 nm en un espectrofotómetro HELIOS γ (Thermo Scientific). Se preparó también un blanco y un control de ácido salicílico.

Con el fin de reforzar la estructura de las cápsulas se realizaron pruebas sumergiendo 0,15 gramos de las mismas en 30 mL de una disolución con un 1% (p/v) de transglutaminasa (9 U/g). Se agitaron 30 minutos a 25°C y 150 rpm y se visualizaron las bolas en un estereomicroscopio de fluorescencia (Leica M205FA) para comprobar si existían diferencias morfológicas con las bolas sin transglutaminasa.

4.Resultados

4.1. Cuantificación de proteínas: método Kjeldahl

La Tabla 5 muestra una comparación de la cantidad de proteína de la yema, los gránulos y el plasma con dichas fracciones delipidadas con tres disolventes orgánicos: hexano, etanol y acetona. Como era de esperar, todas las fracciones lavadas con los distintos disolventes tienen un mayor contenido proteico que las muestras sin delipidar, siendo la acetona el disolvente que consigue un mayor rendimiento de extracción de proteína.

El lavado de los gránulos con cloroformo no proporciona un aumento del contenido proteico respecto al alcanzado con el resto de disolventes, al contrario que los cuatro lavados con acetona, en los que si se aprecia un aumento de aproximadamente un 20% de la proteína de las muestras. Esto resulta interesante en el protocolo de obtención de biofilms con ácido oleico y glicerol, en el que es preferible partir de proteína lo más pura posible.

Tabla 5. Porcentajes de proteína de las distintas fracciones del huevo obtenidos por el método Kjeldahl.

Muestra	Proteína (%)	Incremento (%)
Gránulos- hexano	66,4±0,9	18
Gránulos-etanol	67,8±1,0	20
Gránulos-acetona	69,1±0,2	23
Gránulos-acetona (4 lavados)	78,1±4,4	39
Gránulos cloroformo	68,0±1,6	21
Gránulos	56,3±1,7	
Plasma-hexano	37,3±1,0	63
Plasma-etanol	32,5±0,6	42
Plasma-acetona	39,1±0,1	71
Plasma	22,9±0,4	
Yema-hexano	49,9±0,9	66
Yema-etanol	37,2±2,4	24
Yema-acetona	49,0±1,2	63
Yema	30,1±0,9	

4.2. Electroforesis SDS-PAGE

El gel de poliacrilamida de la electroforesis de la yema, los gránulos y el plasma y de las fracciones delipidadas se muestra en la Figura 9. Se puede observar que en los gránulos hay una concentración de proteína mayor que en el resto de las muestras y que por el contrario, el plasma es la fracción con menor contenido proteico (como ya se había puesto de manifiesto con el método Kjeldahl). Se puede ver que el perfil de las muestras delipidadas es el mismo que el de las muestras que no han sido lavadas con acetona, con bandas más intensas debido a la extracción proteica llevada a cabo. Por tanto, en el tratamiento de concentración realizado no se ha perdido ninguna proteína.

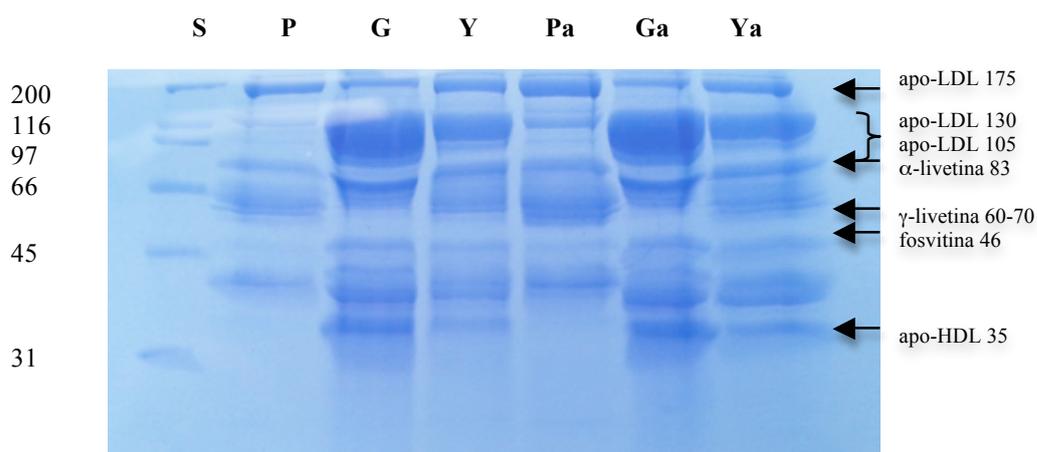


Figura 9. Resultado de la electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS del plasma (P), los gránulos (G), la yema (Y), el plasma delipidado (Pa), los gránulos delipidados (Ga) y la yema delipidada (Ya). S: patrón de proteínas de alto peso molecular.

La banda correspondiente a la proteína apo-LDL de 175 kDa se observa con más intensidad en la yema y el plasma de huevo delipidados y sin delipidar. En los gránulos y la yema aparece una banda ancha que podría corresponder a las proteínas apo-LDL de 105 y 130 kDa, peso medio del 70% de las LDL de la yema (Anton, 2007). En las calles G, Y, Ga y Ya se puede ver una banda de aproximadamente 46 kDa, la proteína fosvitina (Le Denmat et al., 2000), característica de los gránulos, que representa el 11% de las proteínas de la yema (Anton, 2007). Por el contrario, la banda correspondiente a las γ -livetinas de 60-70 kDa y a las α -livetinas de 83 kDa (características del plasma) se aprecian en las calles P, Y, Pa y Ya. En los gránulos y la yema también se observa una banda que se correspondería con la apo-HDL de 35 kDa, que no aparece en el plasma y que corresponde con el 28% de las HDL de la yema (Anton, 2007).

4.3. Obtención de biofilms con ácido oleico y glicerol

Se obtuvieron biofilms transparentes y resistentes a partir del control de caseína comercial con un 1,6% de ácido oleico (Figura 10.A.), que podrían servir para la encapsulación de diferentes medicamentos como ya describieron Abu Diak et al. (2007). A pesar de utilizar la fracción de la yema de huevo con un mayor contenido proteico (gránulos lavados con acetona, etanol y hexano) no se consiguieron obtener biofilms similares a los de caseína. Esto se debe probablemente a la diferencia estructural de la caseína y las proteínas del huevo, ya que la presencia de lípidos en las muestras es todavía muy elevada (la caseína poseía una pureza del 90%) y estos se encuentran en forma de lipoproteínas constituyendo estructuras muy compactas (Chang et al.,1997).

Los gránulos lavados con los tres disolventes formaron películas muy frágiles, quebradizas e imposibles de separar de los recipientes sin romperse. Las mezclas con la mayor concentración de ácido oleico fueron las que más se parecieron a los films de caseína, mientras que las muestras con mayor concentración de muestra liofilizada dieron peores resultados. No se observaron diferencias entre las muestras lavadas con acetona, etanol y hexano. En la Figura 10 se muestran los mejores resultados obtenidos a partir de tres de las múltiples combinaciones mencionadas en el apartado 3.6. de la metodología experimental.

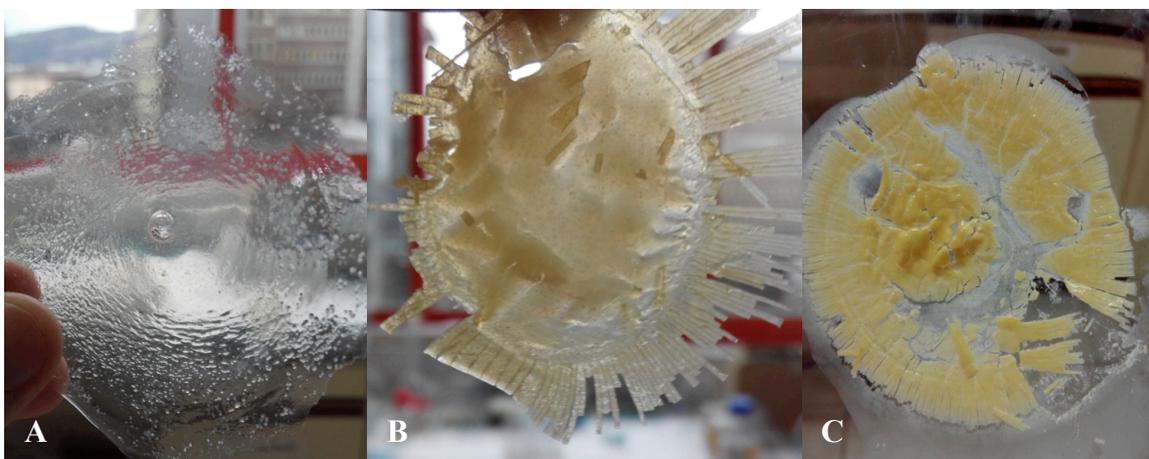


Figura 10. A. Film elaborado con un 8% de caseína comercial y un 1,6% de ácido oleico tras 5 horas en la estufa. B. Film obtenido a partir de un 8% de gránulos lavados con acetona y un 1,2% de glicerol tras 3 horas en la estufa. C. Film obtenido a partir de de un 8% de gránulos lavados con acetona y un 1,2% de glicerol tras 5 horas en la estufa.

4.4. Elaboración de geles con transglutaminasa

Se consiguió obtener geles uniformes a partir de todas las muestras en las que se añadió transglutaminasa (9U/g): yema, plasma, gránulos y las tres fracciones delipidadas con acetona. Noventa minutos en la estufa a 50°C fueron suficientes para conseguir geles resistentes y elásticos que se pudieron separar fácilmente de las placas para los ensayos posteriores (Figura 11). No se observaron diferencias entre ellos, salvo el color más tenue de los geles obtenidos a partir de las fracciones lavadas con disolvente orgánico, debido al menor contenido de pigmentos solubles en lípidos que presentaban estas muestras.

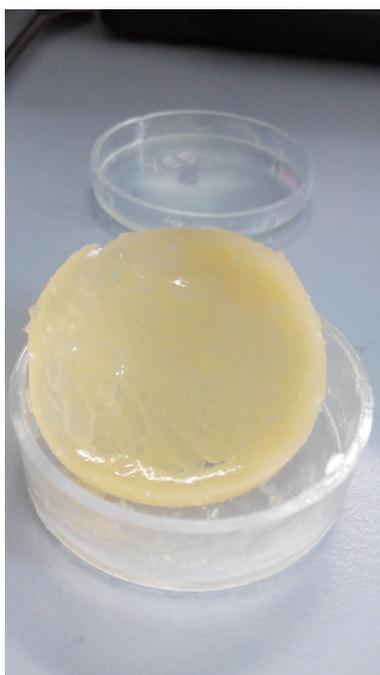


Figura 11. Gel de gránulos de yema de huevo con transglutaminasa (9 U/g).

4.4.1. Caracterización de los geles de transglutaminasa

4.4.1.1. Medidas reológicas

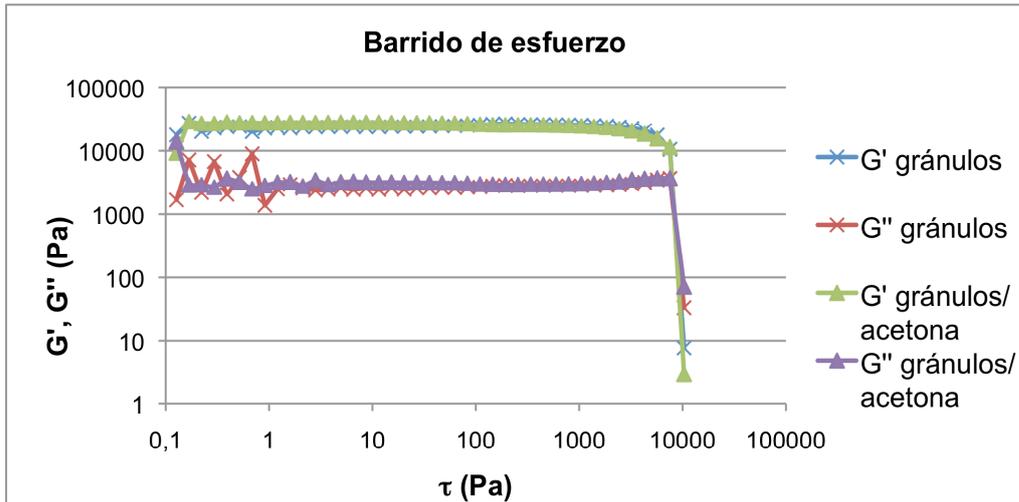
Barrido de esfuerzo

Los resultados de los barridos de esfuerzo de los geles elaborados a partir de la yema liofilizada y de dicha fracción delipidada se muestran en la Figura 12.A. Se puede observar que el intervalo lineal viscoelástico va desde los 0,1 Pa hasta casi los 10000

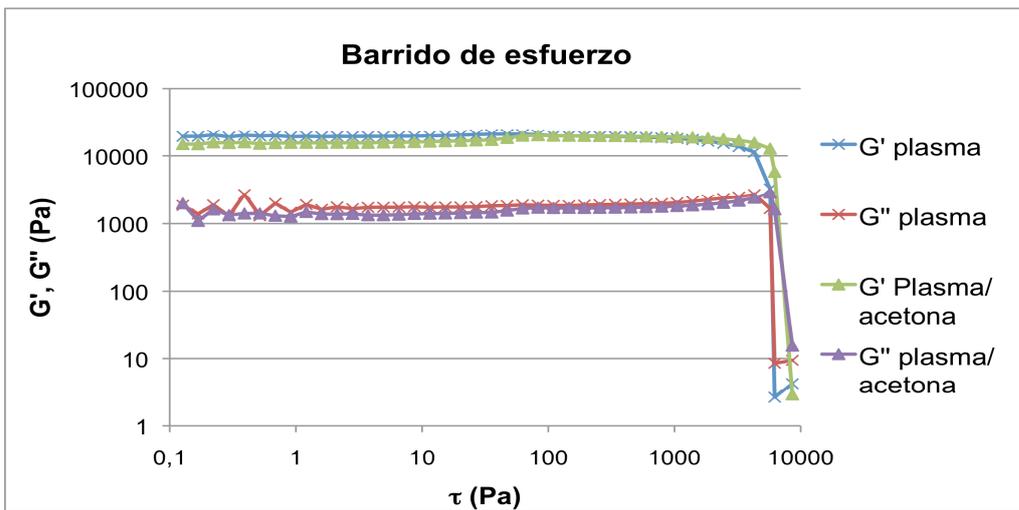
Pa, donde se produce la ruptura de los geles (G' y G'' descienden bruscamente). La resistencia estructural es bastante parecida en ambos casos a pesar de que el contenido proteico es diferente en cada muestra. Ambos geles resultaron más elásticos que viscosos (G' mayor que G'') para todos los esfuerzos aplicados, algo que resulta lógico debido a la gelificación conseguida con la transglutaminasa. Estos resultados se observaron también en los geles elaborados a partir del plasma y los gránulos y de las fracciones delipidadas correspondientes (Figuras 12.B y 12.C). Tanto en los geles elaborados a partir de las fracciones delipidadas como sin delipidar, se obtuvieron valores de G' y G'' ligeramente superiores para los gránulos, seguidos de la yema y finalmente del plasma. (Figuras 13.A y 13.B) lo que puede deberse a la diferente naturaleza de las proteínas presentes en la yema y sus fracciones y al mayor contenido proteico de las muestras de gránulos y yema. En el caso de las tres fracciones delipidadas (Figura 13.B) estas diferencias se incrementan ligeramente, probablemente debido a que las diferencias en el contenido proteico son mayores.

Barrido de frecuencia

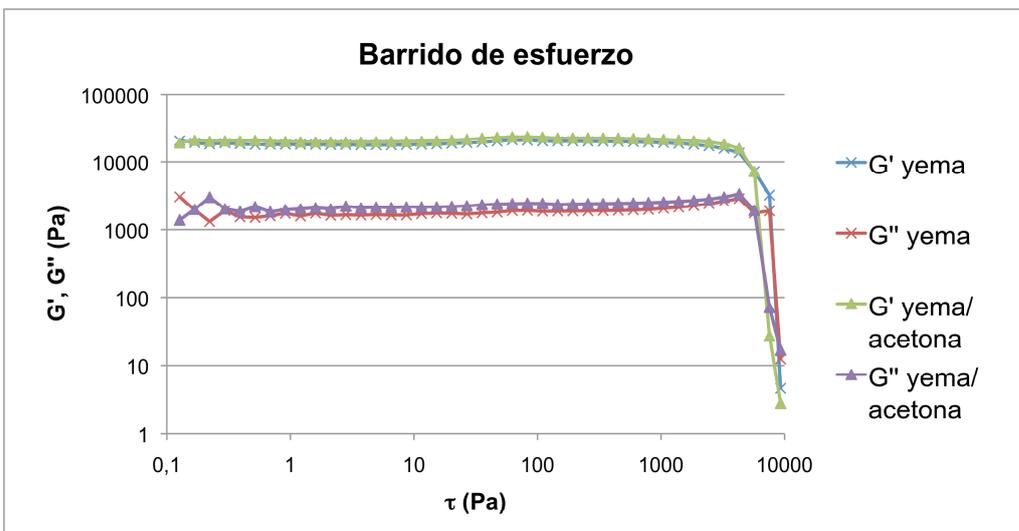
Los resultados del barrido de frecuencia de los geles elaborados a partir de yema y de yema delipidada se muestran en la Figura 14.C., donde se representan los módulos G' y G'' a distintas frecuencias. Tanto en este ensayo como en los elaborados a partir de gránulos y plasma y dichas fracciones delipidadas (Figura 14), no se aprecian diferencias notables entre las fracciones con más contenido proteico y las de mayor contenido de grasas. Lo mismo ocurre cuando se comparan los geles elaborados a partir de las distintas fracciones del huevo entre ellas (Figura 15). De nuevo el módulo elástico es superior al módulo viscoso en todos los ensayos, incrementándose ambos ligeramente a medida que aumenta la frecuencia.



A

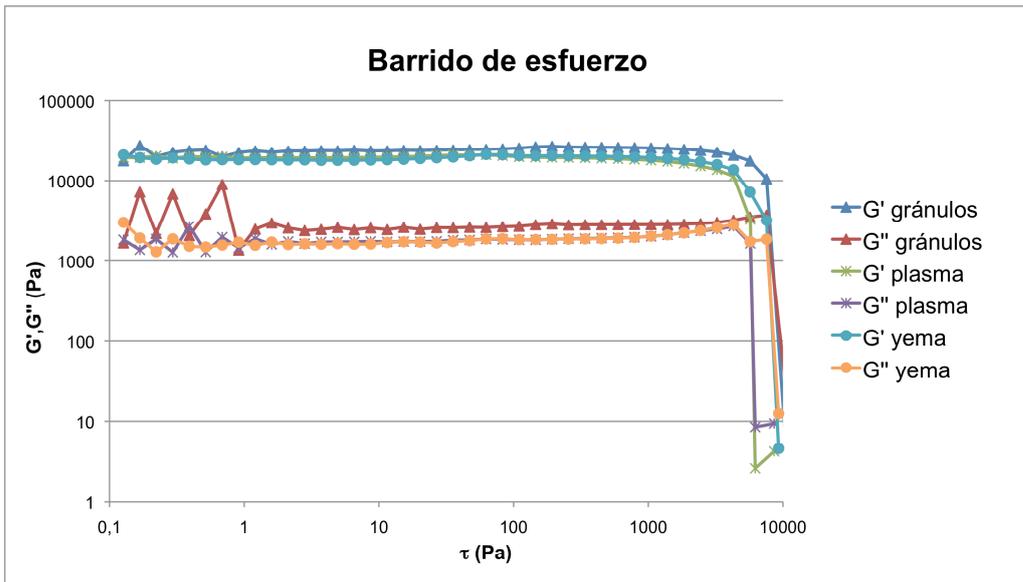


B

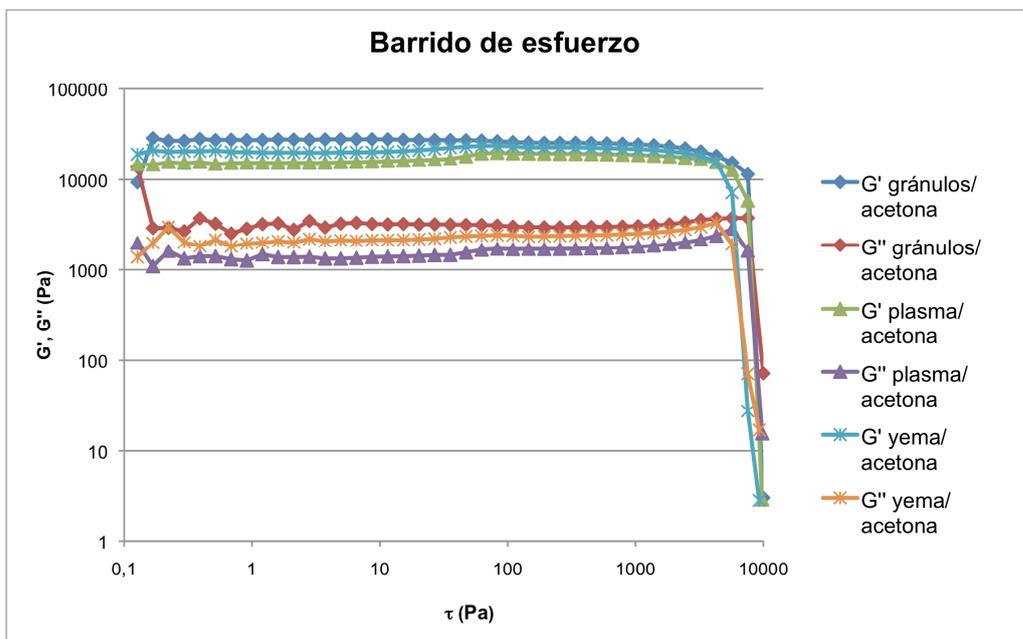


C

Figura 12. Resultados de los barridos de esfuerzo realizados con una frecuencia de 1 Hz y a 20°C. **A.** Comparación de geles granulos de yema de huevo y granulos delipidados con acetona. **B.** Comparación de los geles de plasma de yema de huevo y plasma delipidado con acetona. **C.** Comparación de los geles de de yema de huevo y yema delipida con acetona.

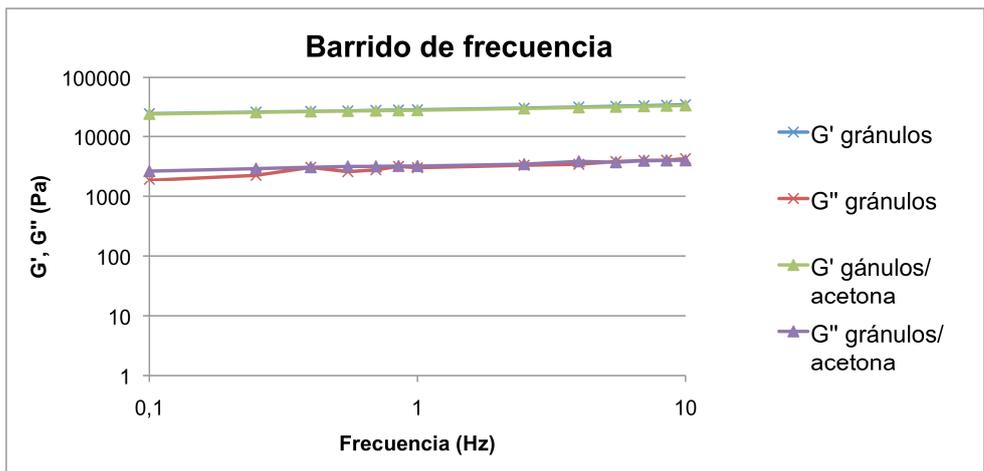


A

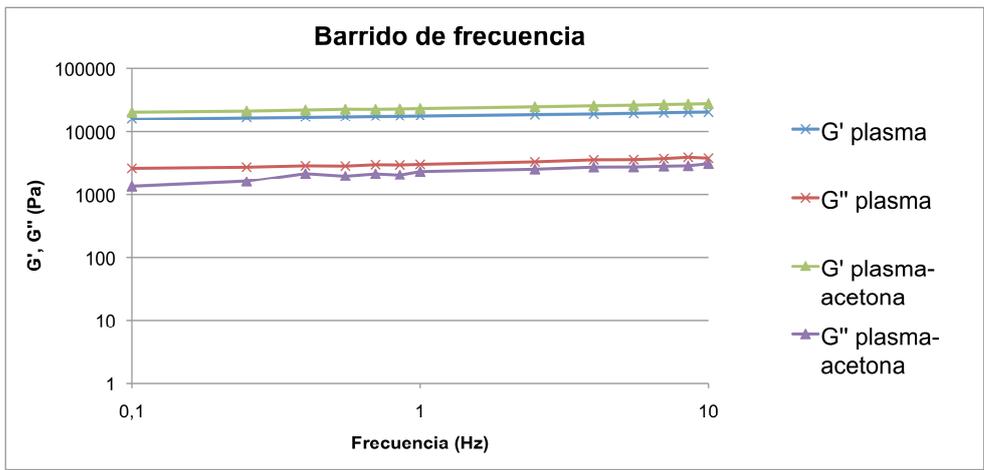


B

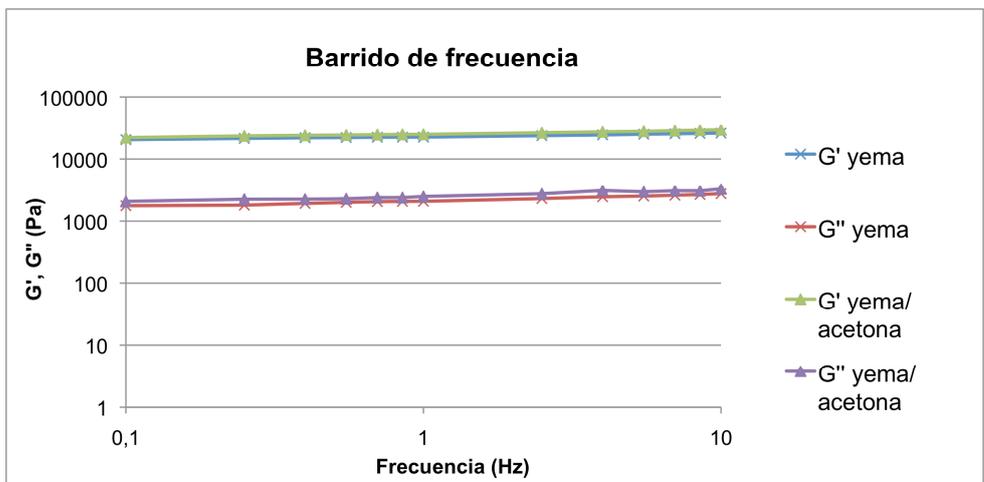
Figura 13. Resultados del barrido de esfuerzo en los geles elaborados a partir de gránulos, plasma y yema de huevo con una frecuencia de 1 Hz y a una temperatura de 20°C (A) y a partir de las fracciones lavadas con acetona (B).



A

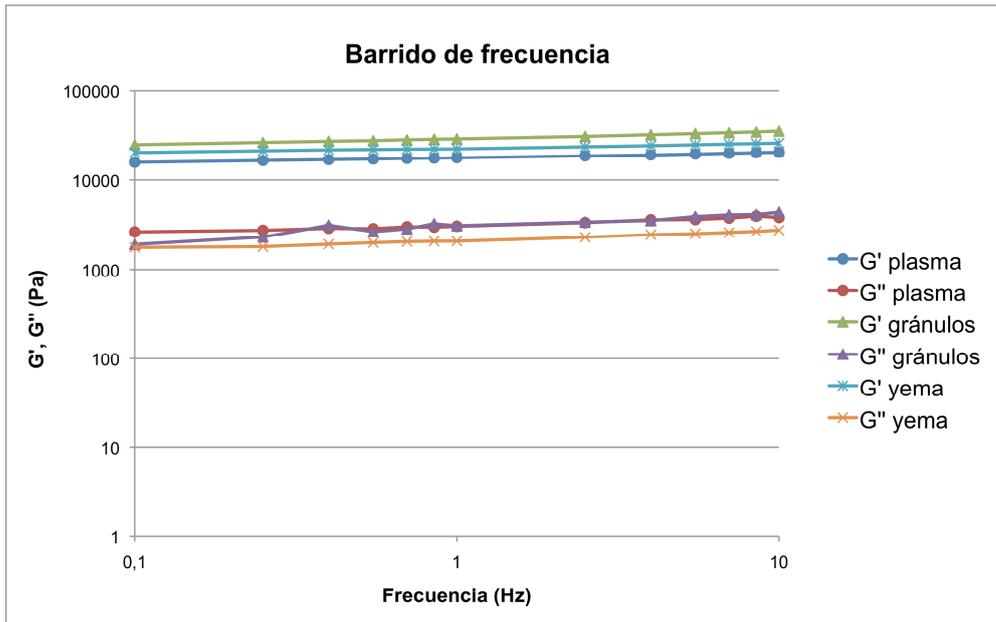


B

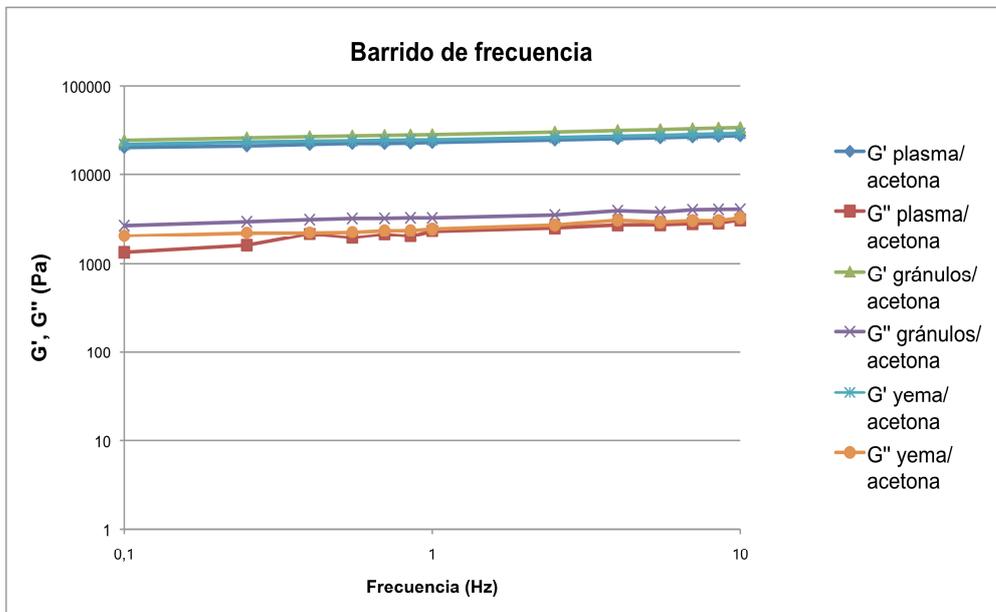


C

Figura 14. Resultados de los barridos de frecuencia realizados en los geles elaborados a partir de: **A.** gránulos y gránulos delipidados con acetona, **B.** plasma de yema de huevo y plasma delipidado con acetona, **C.** yema de huevo y yema delipidada con acetona.



A



B

Figura 15. Resultados del barrido de frecuencia realizados en los geles elaborados a partir de: **A.** plasma, gránulos y yema de huevo, **B.** plasma, gránulos y yema de huevo delipidados con acetona.

Se calculó el número de coordinación z y el coeficiente de proporcionalidad A . Tal como se observa en los valores de R^2 de la Tabla 6 el ajuste de los datos a la ecuación $G^* = A \cdot \nu^{1/z}$ (Gabriele et al., 2001) fue en todos los casos muy bueno. Parece que a mayor cantidad de proteína en las muestras, mayor es la fuerza de las uniones que se forman entre ellas: la fuerza de unión en los geles de gránulos es superior a la fuerza de la yema, que a su vez es superior a la del plasma. En el caso de los geles de yema y plasma delipidados se observa un aumento en la fuerza de las uniones, mientras que en

el caso de los geles de gránulos lavados con acetona se mantiene prácticamente el mismo z que en dicha fracción sin delipidar. Esto puede deberse a que el aumento del porcentaje de proteína en la yema y el plasma en las muestras delipidadas es mucho mayor que en los gránulos. Sin embargo, no está tan claro como afecta el contenido proteico el número de uniones. En este caso podría no afectar tanto el contenido proteico sino la estructura de las proteínas presentes en cada fracción. Mientras que los gránulos están constituidos fundamentalmente por HDLs y fosvitina, en el plasma predominan LDLs y livetinas.

Tabla 6. Parámetros A y z obtenidos a partir de los barridos de frecuencia realizados con los geles elaborados a partir de las distintas fracciones de la yema de huevo.

	Sin delipidar			Delipidado		
	A (kPa)	z	R^2	A (kPa)	z	R^2
Yema	22,8±4,7	19,3±2,4	0,97	25,2±2,5	17,0±3,0	0,98
Gránulos	29,2±1,1	13,3±1,3	0,99	28,7±2,4	14,2±1,2	0,99
Plasma	17,9±0,4	17,8±0,4	0,99	23,4±0,7	15,3±3,2	0,99

4.4.1.2. Texturometría

En la Figura 16 se muestra un ejemplo del tipo de gráfica obtenida en los ensayos de texturometría para un gel elaborado a partir de gránulos de yema de huevo lavados con acetona. Las gráficas obtenidas fueron similares para todos los geles. En ellas se representa el pico de ruptura, relacionado con la fuerza (en g) necesaria para romper los geles, y la distancia de ruptura (en mm), relacionada con la elasticidad de los mismos.

En la Tabla 7 se muestran los resultados de fuerza y distancia de todos los geles elaborados a partir de las distintas fracciones de la yema de huevo. Se puede ver que en el caso del plasma y la yema, los geles obtenidos a partir de las fracciones delipidadas necesitan una fuerza mayor para llegar a romperse y son más elásticos que las fracciones sin delipidar, ya que la distancia de ruptura es mayor.

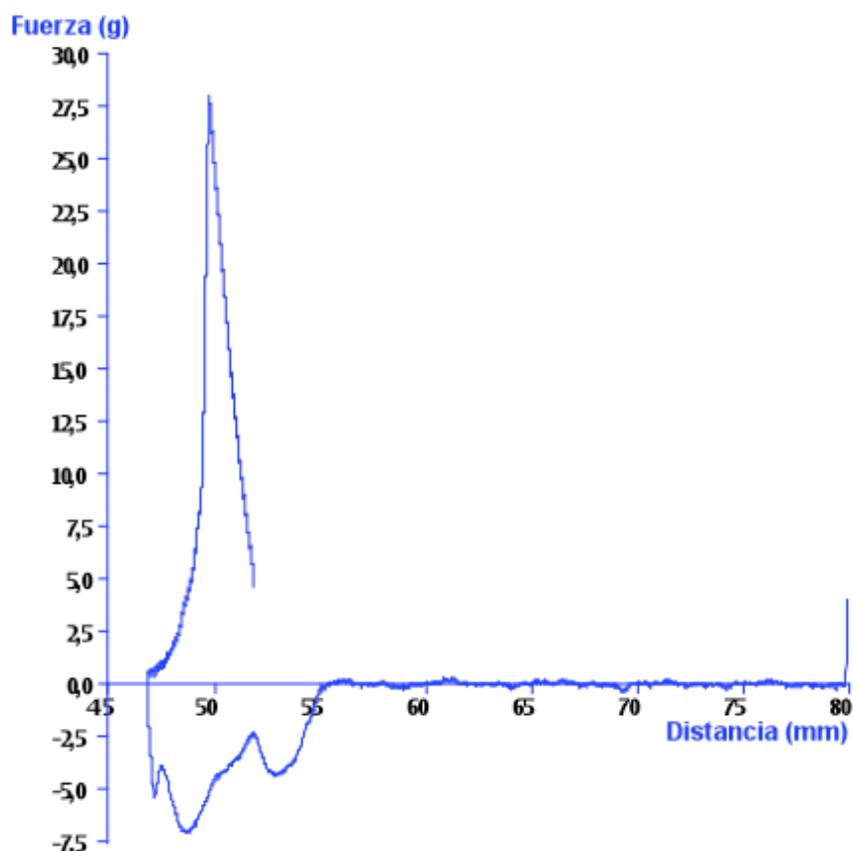


Figura 16. Gráfica resultante del ensayo de texturometría en un gel elaborado a partir de gránulos de yema de huevo lavados con acetona.

Por el contrario los geles de gránulos parecen ser más resistentes y elásticos que los elaborados a partir de los gránulos lavados con acetona, lo que podría deberse a que las proteínas de esta fracción se vean afectadas de alguna manera por el lavado con un disolvente orgánico. No obstante, estos datos concuerdan con trabajos anteriores, donde se hace referencia al comportamiento anómalo de los gránulos con respecto a la yema y sus fracciones (Laca et al., 2011).

Tabla 7. Resultados del ensayo de texturometría en geles elaborados a partir de distintas fracciones de huevo.

	Punto de ruptura (g)	Distancia (mm)
Gránulos	25,8±2,1	2,2±0,1
Gránulos/acetona	16,1±3,2	1,6±0,3
Plasma	11,2±0,3	1,1±0,2
Plasma/acetona	33,0±7,5	3,0±0,5
Yema	17,0±1,3	1,9±0,1
Yema/acetona	26,1±2,9	2,7±0,3

4.4.1.3. Microscopia electrónica de barrido (SEM)

Las microfotografías a 200x de los geles elaborados con transglutaminasa se muestran en la Figura 18. En dichas fotografías se observan materiales con una estructura compacta y homogénea y una superficie granular, salvo en el caso del gel de plasma. Aunque este último parece poseer una superficie lisa, en la fotografía a 35000x (Figura 17.A.) también se ven estas estructuras globulares, que podrían corresponderse con proteínas ya que se observan mejor en los geles elaborados a partir de las fracciones lavadas con acetona (con mayor contenido proteico). En todos los casos salvo en el plasma pueden verse poros en la superficie, que parecen ser poco profundos como se muestra en la Figura 17.B., pudiendo tratarse más bien de huecos superficiales que de poros propiamente dichos.

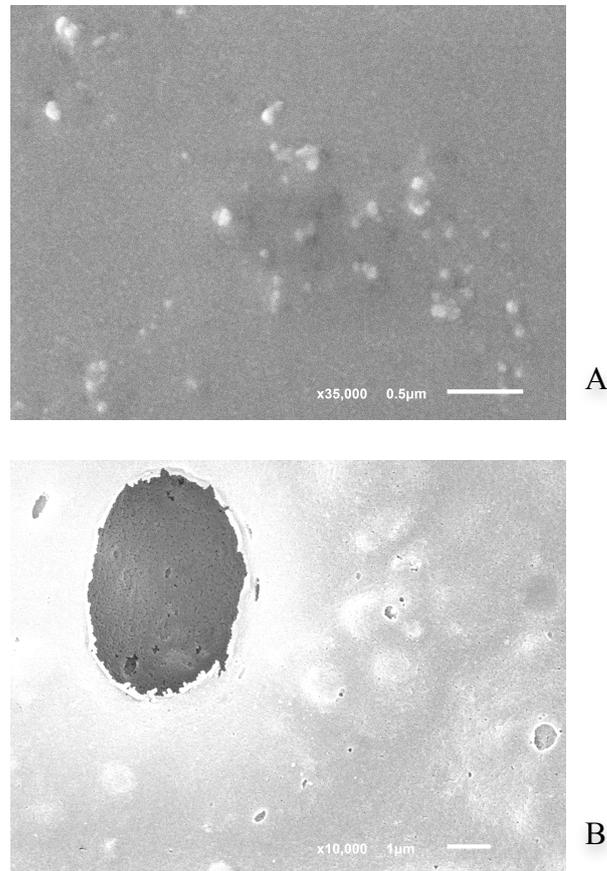


Figura 17. **A.** Microfotografía a 35000x y una escala de 0,5 μ m de la superficie de un gel de plasma de yema de huevo. **B.** Microfotografía a 10000x y una escala de 1 μ m de la superficie de un gel yema de huevo.

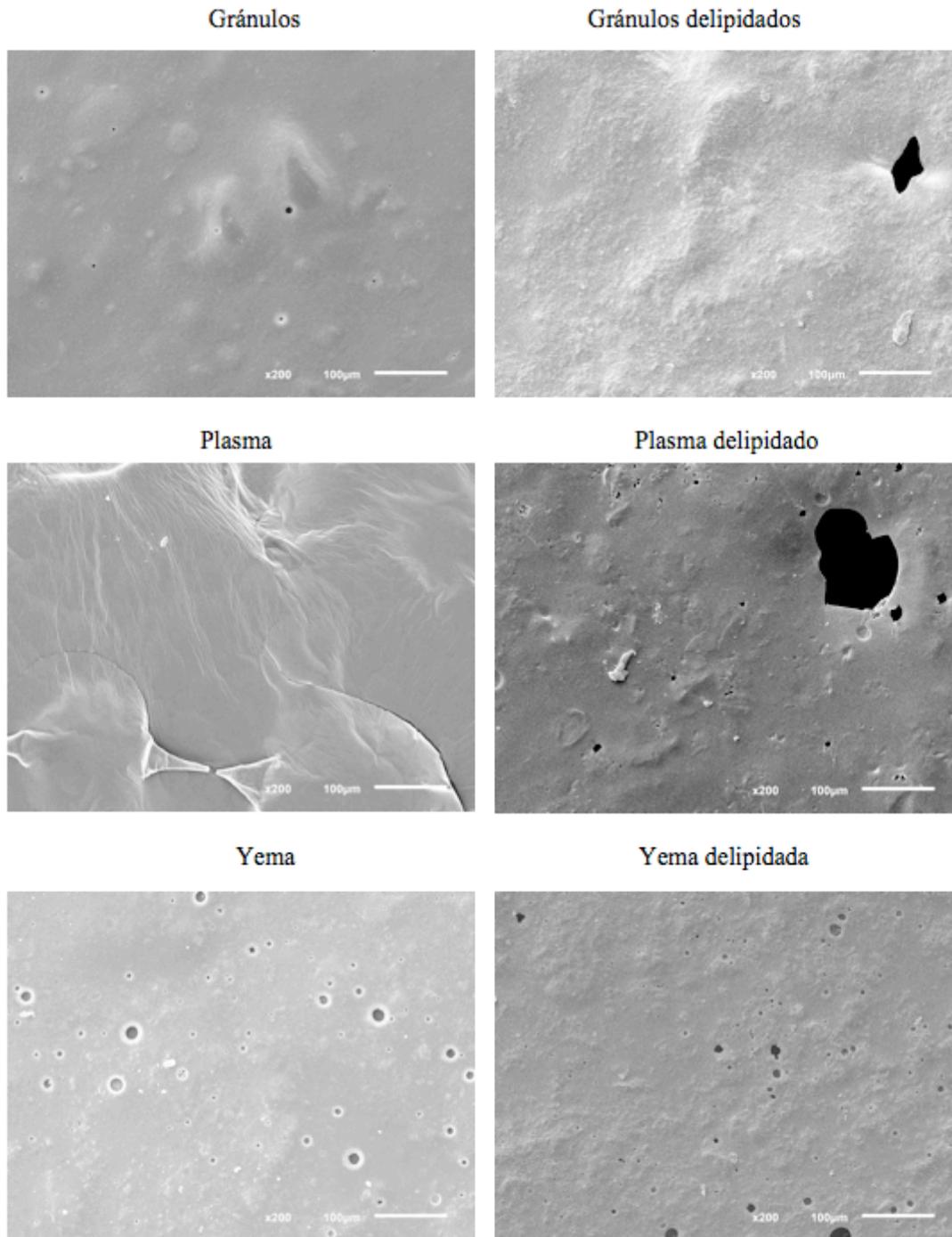


Figura 18. Microfotografías a 200x y con una escala de 10 μ m de los geles elaborados a partir de las distintas fracciones de la yema de huevo delipidadas y sin delipidar.

4.4.2. Cultivo de fibroblastos

Los geles de yema y sus fracciones sembrados con fibroblastos de la línea “Swiss 3T3” no resultaron tóxicos para las células, ya que en el microscopio invertido se observó crecimiento en todos los pocillos. Además, cuando estos geles se visualizaron en el SEM, se pudo ver como las células se quedaban adheridas al gel, utilizándolo como soporte (“scaffold”) para su crecimiento (Figuras 19 y 20). Se

visualizaron fibroblastos en los geles elaborados a partir de la yema y de sus dos fracciones (gránulos y plasma), si bien es cierto que en los geles de gránulos se pudo apreciar mayor crecimiento que en el resto. En este caso se pudieron ver redes de abundantes células formando capas continuas como se muestra en la Figura 19.B., algo que se había conseguido anteriormente empleando como soporte membranas testáceas de huevo (Yi et al., 2004). Sin embargo, es importante destacar que nunca antes se habían empleado geles desarrollados a partir de proteínas de la yema en el campo de la ingeniería de tejidos como soporte para el cultivo de células. El mayor crecimiento de los fibroblastos en los gránulos puede deberse al mayor contenido proteico o a la naturaleza de las proteínas de dicha fracción, ya que en el caso de los geles de plasma se observaron fibroblastos con formas totalmente esféricas (Figura 20.C.), lo que podría indicar que el mayor contenido en lípidos o la naturaleza de las proteínas no sean favorables para la adhesión y extensión de los filopodios, o que el tiempo de cultivo no fuera necesario para que se produjera la adhesión (Albuschies y Vogel, 2013). En el caso de la yema, se pudieron encontrar tanto células estrelladas como células con formas esféricas, con filopodios más largos y con más uniones que en el caso del plasma (Figura 20.B.).

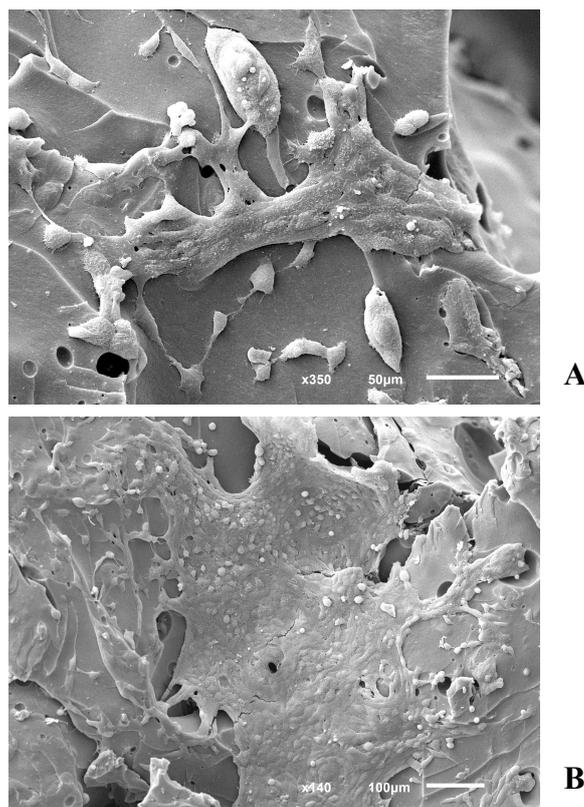
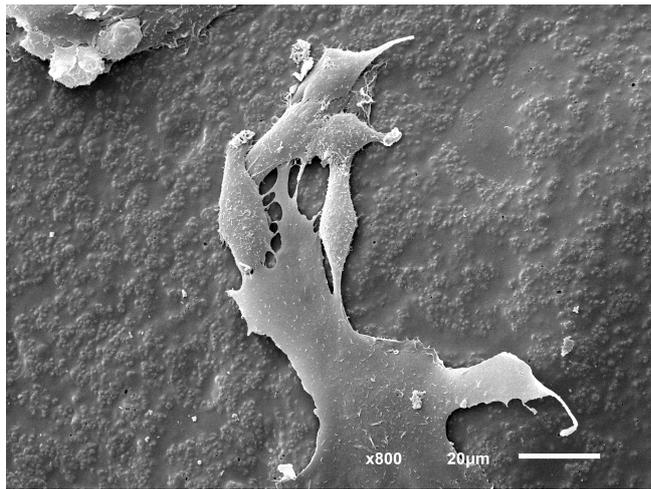
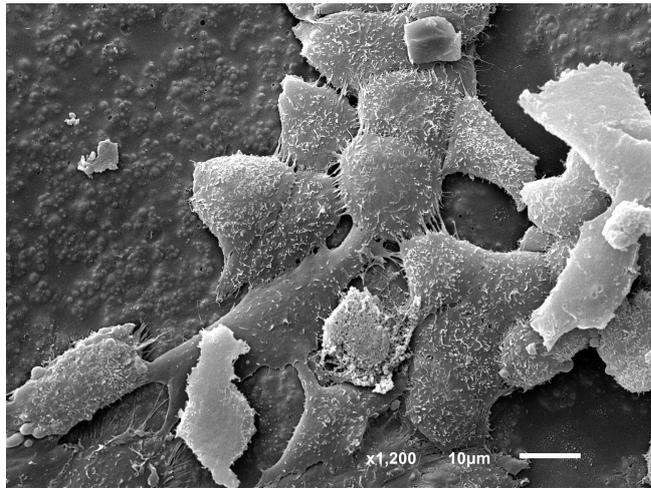


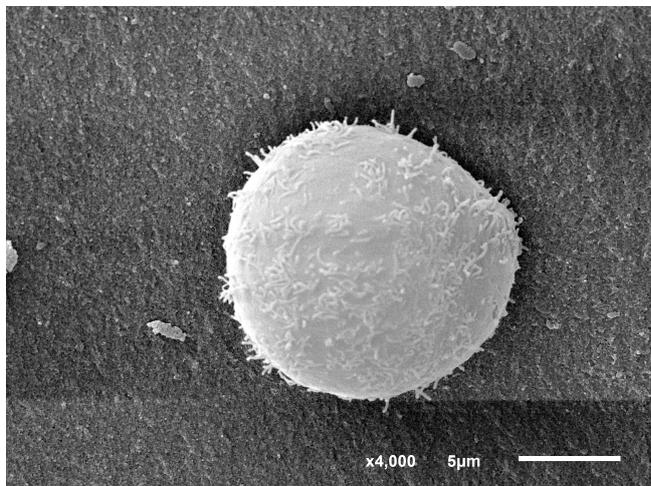
Figura 19. Fibroblastos en geles elaborados a partir de gránulos de yema de huevo. Microfotografías tomadas a 350x y con una escala de 50 µm (A) y 140 aumentos con una escala de 100 µm (B).



A



B



C

Figura 20. Fibroblastos en geles elaborados a partir de yema de huevo. Imágenes tomada a 800 aumentos con una escala de 20 μm (A) y a 1200 aumentos y 10 μm (B). C. Fibroblasto en un gel elaborado a partir de plasma de yema de huevo. Imagen tomada a 4000 aumentos con una escala de 5μm.

4.5. Elaboración de cápsulas a partir de fracciones del huevo

Se consiguieron cápsulas de diversos tamaños (entre 1 y 5 mm de diámetro) a partir de los gránulos, el plasma, la yema y las tres fracciones delipidadas con acetona. En algunos casos se obtuvieron bolas de morfología irregular, siendo las cápsulas de yema y yema delipidada con acetona (Figuras 21.A. y 21.B.) las que poseían una geometría más esférica y más homogénea.

En las fotografías tomadas en el estereomicroscopio de fluorescencia (Figura 22) se observa como las bolas de aproximadamente 1,8-2 cm de diámetro se hinchan al hidratarse alcanzando diámetros de hasta 2,3 cm y se encongen al realizar el lavado con acetona volviendo a alcanzar diámetros de 1,8 cm. Por tanto, las bolas llegan a aumentar entre un 25 y un 27% su tamaño inicial al hidratarse, regresando al diámetro inicial al añadir la acetona. Como se puede comprobar en la Figura 21.C., la adición de transglutaminasa no ayudó a mejorar la estructura de las cápsulas sino que se obtuvieron bolas más aglomeradas.

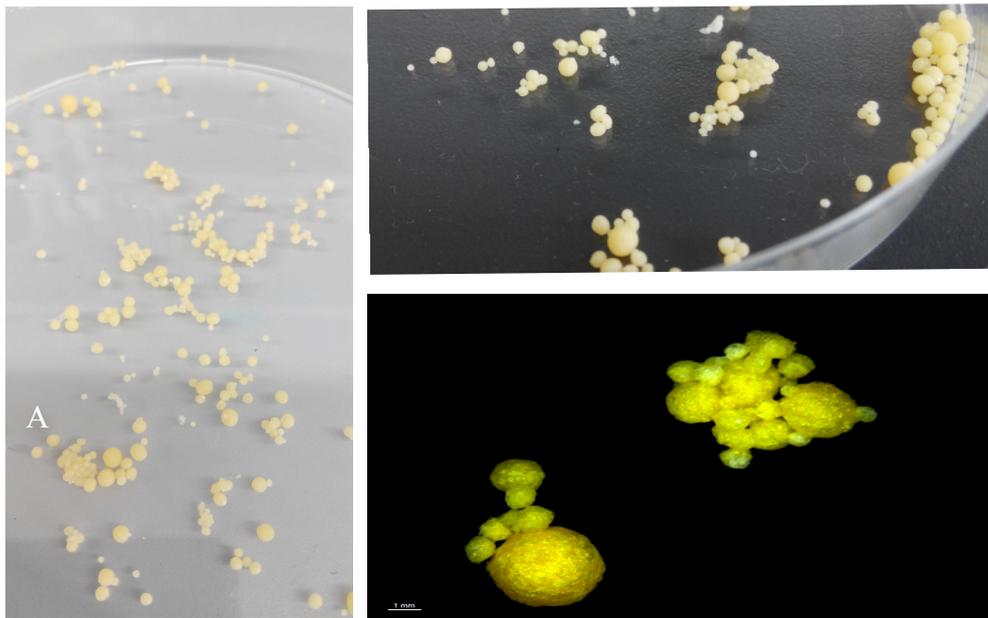


Figura 21. A y B. Fotografías de cápsulas elaboradas a partir de yema delipidada con acetona. C. Fotografía del estereomicroscopio de fluorescencia de las cápsulas elaboradas con adición de transglutaminasa. Escala: 1 mm.

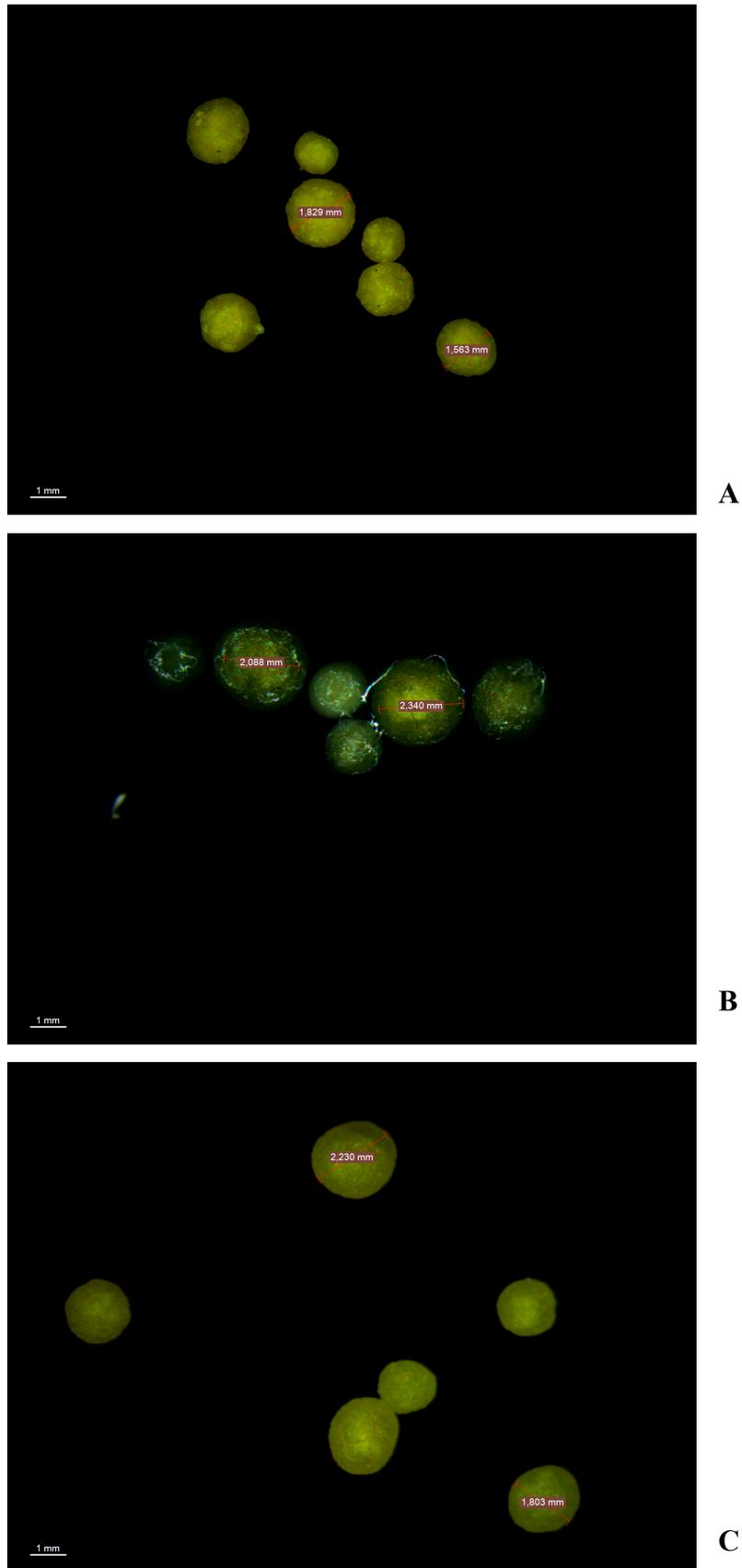


Figura 22. Fotografías de las cápsulas elaboradas a partir de yema de huevo: **A.** en el momento inicial tras secarlas a temperatura ambiente, **B.** tras llevar una hora hidratándose en agua, **C.** tras realizar el lavado final con acetona. Escala: 1 mm.

Ninguna de las cápsulas realizadas con yema o sus fracciones absorbió ácido salicílico. Esto puede deberse a que, como se vió más tarde en las fotografías tomadas en el SEM (Figura 23), todas las cápsulas tenían una estructura compacta y carecían de poros. Además, en este ensayo se observó cómo las cápsulas parecían deshacerse durante la agitación, probablemente debido al bajo pH del ácido salicílico (entre 2 y 3) que pudo afectar a la estructura de las proteínas.

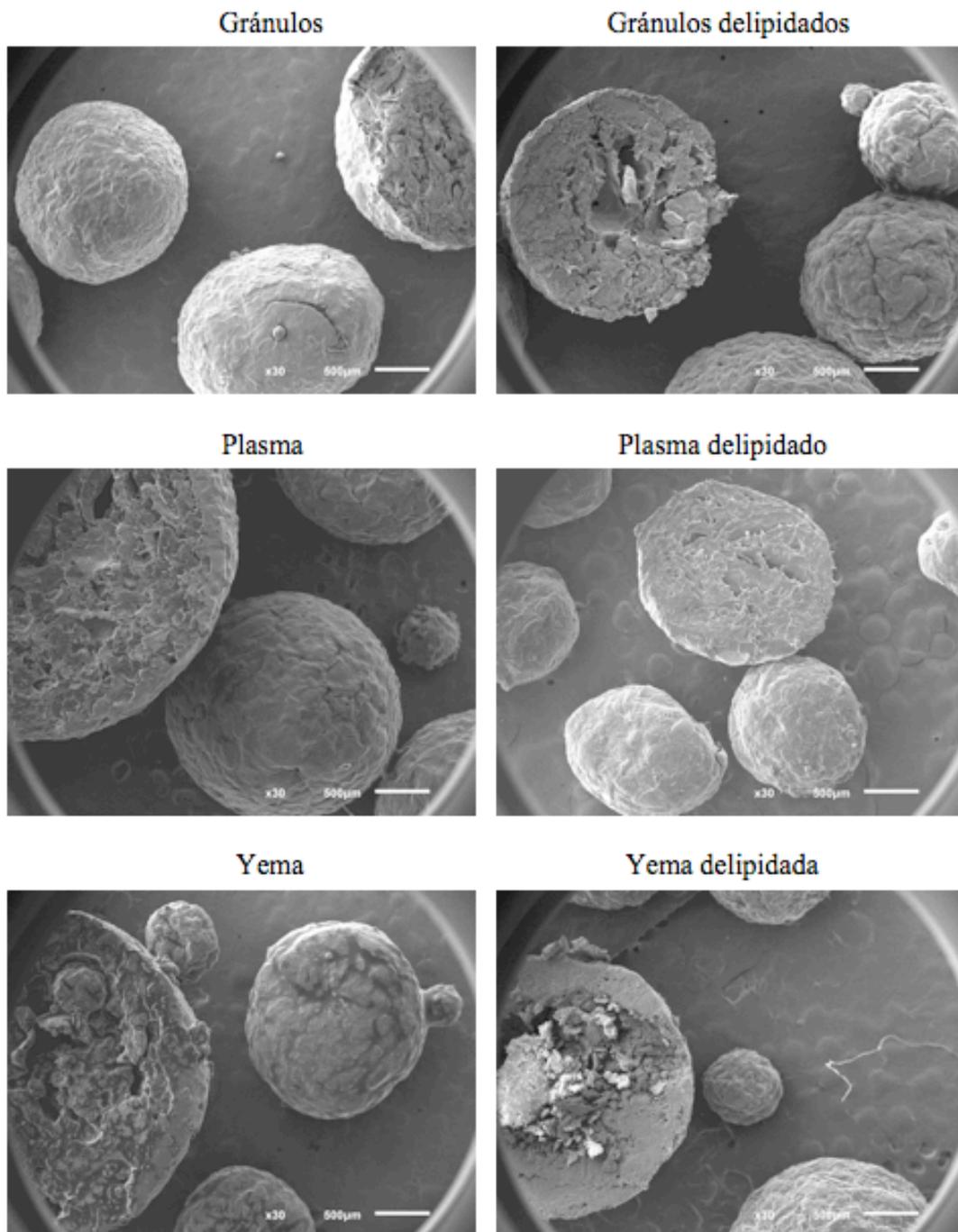


Figura 23. Fotografías tomadas en el SEM a 30x y con una escala de 600 μm de las cápsulas elaboradas a partir de las distintas fracciones de la yema de huevo.

5. Conclusiones

1. La yema de huevo y sus fracciones tratadas con diferentes disolventes orgánicos (acetona, hexano, etanol y cloroformo) presentan un mayor contenido proteico que dichas muestras sin delipidar. La acetona fue el disolvente que presentó un mejor rendimiento de extracción, con aproximadamente un 10% más de proteína en las muestras delipidadas que en las muestras sin tratar. Tanto en las muestras delipidadas como sin delipidar, los gránulos fueron la fracción con mayor contenido proteico, seguidos por la yema y el plasma.

2. El perfil proteico de la yema de huevo y sus fracciones no se vio afectado por el tratamiento de concentración de proteína de las muestras realizado con acetona.

3. El aumento del contenido proteico de las muestras logrado con los diferentes disolventes orgánicos no fue suficiente para conseguir obtener biofilms a partir de las fracciones de la yema de huevo utilizando ácido oleico y glicerol. Las muestras con una concentración de ácido oleico mayor dieron mejores resultados pero aun así insuficientes, debido probablemente a la estructura de las proteínas de la yema, que se encuentran en forma de lipoproteínas constituyendo estructuras muy compactas que podrían impedir la formación del film.

4. Se consiguieron cápsulas de diversos tamaños (entre 1 y 5 mm de diámetro) a partir de todas las fracciones de la yema de huevo, siendo las cápsulas de yema y yema delipidada con acetona las que poseían una geometría más esférica y más homogénea. Ninguna de las cápsulas absorbió ácido salicílico probablemente debido a que, como se vió en las fotografías tomadas en el SEM, todas las cápsulas tenían una estructura compacta y carecían de poros. Además, el ácido salicílico no parece una sustancia adecuada para encapsular con yema de huevo, ya que su bajo pH puede afectar a la estructura de las proteínas.

5. La adición de transglutaminasa (9U/g) a la yema de huevo, el plasma y los gránulos, y a las fracciones delipidadas, permitió obtener geles resistentes y elásticos tras calentar las mezclas a 50°C en la estufa durante 90 minutos. Dichos geles presentaron un comportamiento más elástico que viscoso. Tanto en los barridos de esfuerzo realizados como en los barridos de frecuencia, no se observaron diferencias considerables entre los geles elaborados a partir de las distintas fracciones a pesar de su diferente contenido

proteico. Se observó mayor fuerza de unión entre las proteínas de los geles con mayor contenido proteico en las muestras sin delipidar. Sin embargo, el tratamiento con acetona parece afectar a las proteínas de los gránulos, ya que en las muestras delipidadas la yema y el plasma presentan una fuerza de unión mayor. En cuanto al número de uniones, no dependería tanto de la cantidad de proteína sino de la estructura de las mismas.

6. Los geles de yema y sus fracciones sirven como soporte para el crecimiento de fibroblastos de la línea "Swiss 3T3", siendo los geles elaborados a partir de gránulos los más favorables para la adhesión y crecimiento de las células, probablemente debido al mayor contenido proteico de esta fracción y a la naturaleza de sus proteínas. En ellos se consiguieron abundantes redes de fibroblastos formando capas continuas, algo que nunca se había llevado a cabo antes utilizando las fracciones de la yema de huevo.

6. Abreviaturas y símbolos

°C	Grados centígrados
<i>A</i>	Coefficiente de proporcionalidad (G^* en Pa a 1 Hz)
AGP	Ácidos grasos poliinsaturados
AGS	Ácidos grasos saturados
cm ²	Centrímetro cuadrado
CD	Modo de deformación controlada
CPS	Critical Point Drying
CR	Modo de esfuerzo controlado
CS	Modo de velocidad de deformación controlada
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EDS	Energy Dispersive Spectrometer
ESEM	Environmental Scanning Electron Microscopy
g	Gramo
GP	Enzima Glutación-Peroxidasa
G'	Módulo elástico (Pa)
G''	Módulo viscoso (Pa)
G^*	Módulo complejo (Pa)
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
Hz	Hertzios
IEH	Instituto de Estudios del Huevo
IgE	Inmunoglobulina E
IgG	Inmunoglobulina G
IgY	Inmunoglobulina Y
kcal	Kilocalorías
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
p/p	Relación peso/peso
Pa	Pascal
rpm	Revoluciones por minuto
SDS-PAGE	Sodium dodecyl Sulfate- Polycacrylamide Gel Electrophoresis
SEM	Scanning Electron Microscopy
T	Temperatura (°C, K)

t	Tiempo (s)
TGasa	Transglutaminasa
v/v	Relación volumen/volumen
z	Número de coordinación (adimensional)

Letras griegas

μ	Viscosidad (Pa·s)
γ	Velocidad de deformación (s ⁻¹)
τ	Esfuerzo (Pa)
ν	Frecuencia (Hz)

7. Bibliografía

Abu Diak, O., Bani-Jaber, A., Amro, B., Jones, D. y Andrews, G.P. (2007). The manufacture and characterization of casein films as novel tablet coatings. *Food and Bioproducts Processing*, 85, 284-290.

Aeschlimann, D., y Paulsson, M. (1994). Transglutaminase: protein cross-linking enzyme in tissues and body fluids. *Thromb. Haemost*, 71, 402-415.

Albuschies, J. y Vogel, V. (2013). The role of filopodia in the recognition of nanotopographies. *Scientific Reports*, 3, 1658.

Anton, M. (2007). Composition and structure of hen egg yolk. En: Huopalahti, R., López-Fandiño, R., Anton, M. y Schade, R. (Eds), *Bioactive Egg Compunds*, Editorial Springer-Verlag, Berlin Heidelberg (Germany), pp. 1-5.

Aname (Julio, 2015): <http://www.aname.es/modules/afisicos/#textura>

Anton, M. (2013). Egg yolk: structures, functionalities and processes. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 93, 2871-2880.

Braña, M.F., Del Río, L.A., Trives, C. y Salazar, N. (2005). La verdadera historia de la Aspirina. *Real Academia Nacional de Farmacia*, 71, 813-819.

Bulgarelli, E., Forni, F. y Bernabei, M.T. (2000). Effect of matrix composition and process conditions on casein-gelatin beads floating properties. *International Journal of Pharmaceutics*, 198, 157-165.

Chang, C.M., Powrie, W.D. y Fennema, O. (1977). Microstructure of egg yolk. *Journal of Food Science*, 42(5), 1193-1200.

Colorado, A.C., Aguedlo, C.A. y Moncada, M.A. (2013). Análisis de biomateriales para uso en ingeniería de tejido de piel: revisión. *Ingeniería Biomédica*, 7, 11-23

Combarros, R. G., Rosas, I., Lavín, M., Rendueles, M. y Díaz, M. (2014). Influence of biofilm on activated carbon on the adsorption and biodegradation of salicylic acid in wastewater. *Water, Air & Soil Pollution*, 255,1858.

Egelandstal, B., Langsrud, Ø, Nyvold, T., Sontum, P.K., S Sørensen, C., Enersen, G., Hølland, S. y Ofstad R. (2001). Estimating significant causes of variation in emulsions' droplet size distributions obtained by the electrical sensing zone and laser low angle light scattering techniques. *Food Hydrocolloids*, 15(4-6), 521-532.

Froning, G. W. (2008). Egg products industry and future perspectives. En: Y. Mine (Ed.), *Egg bioscience and biotechnology*, John Wiley & Sons, Inc (New Jersey), pp. 307–325.

Gabriele, D., de Cindio, B. y D'Antona, P. (2001). A weak gel model for foods. *Rheologica Acta*, 40(2), 120-127.

Guérin-Dubiard, C. y Audic, J.C. (2007). Egg-protein-based films and coating. En: Huopalahti, R., López-Fandiño, R., Anton, M. y Schade, R. (Eds), *Bioactive Egg Compounds*, Editorial Springer-Verlag, Berlin Heidelberg (Germany), pp. 266-268.

Instituto de Estudios del Huevo (Julio, 2014): http://www.institutohuevo.com/images/archivos/composicion_yema_y_clara_de_huevo.pdf

Jozami, F. y Sesehousky, R. (2003). Usos de la Transglutaminasa en la industria alimentaria. Elaboración de carne reconstituida. *Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe. España y Portugal*, 6 (10), 157-164.

Laca, A., Paredes, B. y Díaz, M. (2010). A method of egg yolk fractionation. Characterization of fractions. *Food Hydrocolloids*, 24, 434-443.

Laca, A., Paredes, B. y Díaz, M. (2011). Thermal behaviour of lyophilized egg yolk and egg yolk fractions. *Journal of Food Engineering*, 103, 77-86.

- Langer, R. y Vacanti, J. (1993). Tissue engineering. *Science*, 260, 920-926.
- Le Denmat, M., Anton, M. y Beumal, V. (2000). Characterisation of emulsion properties and of interface composition in O/W emulsions prepared with hen egg yolk, plasma and granules. *Food Hydrocolloids*, 14(6):539-549.
- Mancini, F., Montanari, L., Pressini, D. y Fantozzi, P. (2002). Influence of alginate concentration and molecular weight on functional properties of mayonnaise. *LWT-Food Science and Technology*, 35(6), 517-525.
- Marín, P., Laca, A., y Paredes, B. (2014). Alimentos de estructura compleja. Metodología de Experimentación en Alimentación. Máster en Biotecnología Alimentaria. Universidad de Oviedo.
- Merrill, A.L. & Watt, B.K. (1973). *Energy value of foods: basis and derivation*. Agriculture Handbook No. 74. Washington, DC, ARS United States Department of Agriculture.
- Montañez, N.D. (2014). Materiales de origen natural para uso biomedico. *MÉD. UIS*, 27(1), 35-41.
- Osen, R., Toelstede, S., Wild, F., Eisner, P. y Schweiggert-Weisz, U. (2013). High moisture extrusion cooking of pea protein isolates: Raw material characteristics, extrudes responses, and texture properties. *Journal of Food Engineering*, 127, 67-74.
- Palafox, H. y García, F. (2006). Transglutaminasas: de importante papel fisiológico en los seres vivos al desarrollo novedosos de Tecnología de Alimentos. *BioTecnología*, 10.
- Patzsch, K., Riedel, K. y Pietzsch, M. (2010). Parameter optimization of protein film production using microbial transglutaminase. *Biomacromolecules*, 11, 896-903.
- Roca, P., Oliver, J. Y Rodríguez, A.M. (2003). Métodos generales de cuantificación de proteínas. En: *Bioquímica: técnicas y métodos*, Editorial Hélice, Madrid (España) pp. 155-156.

Schramm, G. (2004). A practical approach to Rheology and Rheometry. Thermo Electron GmbH, Karlsruhe (Germany).

Vázquez, G. Y Echevarría, O. (2000). Microscopía electrónica de barrido. En: Introducción a la microscopía electrónica aplicada a las ciencias biológicas, Fondo de Cultura Económica, México D.F.

Yi, F., Guo, Z.X., Zhang, L.X., Yu, J. y Li, Q. (2004). Soluble eggshell membrane protein: preparation, characterization and biocompatibility. *Biomaterials*, 25, 4591-4599.