



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
Facultad de Ingeniería Química
Colegio de Ingeniería de Alimentos



Elaboración y caracterización de geles mixtos de grenetina
tipo B y proteína concentrada de suero pretratada por
ultrasonido de alta potencia

TESIS

Para obtener grado el grado de:
Licenciado en Ingeniería en Alimentos

Presenta:

Juan Carlos Ortiz Rodiles

Director de Tesis:

Dr. Héctor Ruiz Espinosa

Codirector de Tesis:

Dr. Genaro Gustavo Amador Espejo

(CONACYT-CIBA IPN)

Agradecimientos

Las palabras puestas en este texto no alcanzaran jamás la magnitud del agradecimiento que tengo con todas las personas involucradas en mi formación profesional, principalmente al núcleo familiar de cual me siento enorgullecido de formar parte y eternamente en deuda por las oportunidades que me han brindado hoy y siempre culminando en mi carrera académica con este ensayo: mi Padre por ser un hombre de palabra y de carácter que siempre ha tenido la intención de guiarme por el mejor camino, a mi Madre que es el apoyo emocional y guía sentimental que siempre ha optado por hacer lo mejor para mí y para todos en mi familia, mi hermana que siempre fue una guía en este proceso de aprendizaje con su consejos y comentarios, por ultimo a todos los profesores en especial a mi asesor y co asesor por ser un ejemplo de dedicación, convicción y de trabajo profesional que los hace para mi unos referentes en el campo de mi carrera y línea a seguir como profesionistas, así como a todos los profesores que directa o indirectamente están relacionados con mi formación profesional, a todos ustedes gracias de corazón.

Contenido

Objetivo General	3
Objetivos específicos	3
2. Marco Teórico.	5
2.1 Leche bovina y suero de leche.....	5
2.1.1 Generalidades	5
2.1.2 Suero lácteo	6
2.1.3 Productos obtenidos de procesos de separación de proteínas lácteas.....	8
2.1.4 Principales proteínas de suero	11
2.1.4.1 β -Lacto globulina (β -LG).....	12
2.1.4.2 α - Lactalbúmina (α -LA).....	13
2.1.4.3 Albúmina bovina sérica (BSA).....	14
2.1.5 Desnaturalización proteica	15

2.1.6 Gelificación de proteínas lácteas.....	17
2.2 Gelatina.....	18
2.2.1 Generalidades de la gelatina.....	18
2.2.2 Colágeno.....	19
2.2.3 Propiedades reológicas de geles.....	21
2.2.4 Tixotropía.....	24
2.2.5 Análisis de textura.....	25
2.3 Ultrasonido.....	27
2.3.1 Generalidades.....	27
2.3.2 Uso de ultrasonido de potencia como agente de modulación de propiedades de proteínas lácteas.....	30
3. Metodología.....	34
3.1 Plan de Investigación.....	34
3.2 Materiales y Métodos.....	35
3.2.1 Materiales.....	35
3.2.2 Acondicionamiento de WPC.....	36
3.2.3 Pretratamiento ultrasónico.....	36
3.2.4 Pruebas preliminares de gelificación con grenetina.....	38
3.2.5 Pruebas de gelificación en sistemas mixtos grenetina con WPC.....	39
3.2.6 Determinación de cambios estructurales de WPC sometido a USP.....	41
3.2.7 Medición de propiedades en geles.....	42
3.2.7.1 Firmeza de gel índice Bloom.....	42
3.2.7.2 Prueba de estrés mecánico.....	43
3.2.7.3 Capacidad de retención de agua.....	44
3.2.8 Pruebas reológicas en geles.....	45
3.2.9 Microscopía diferencial de barrido.....	46
3.2.10 Diseño experimental.....	47
4. Resultados.....	48
4.1 Resultados pruebas preliminares.....	48
4.2 Pruebas de gelificación en sistemas mixtos grenetina con WPC.....	49
4.3 Pruebas en geles mixtos de grenetina con WPC pretratada por USP.....	52

4.3.1	Calculo de la potencia efectiva del ultrasonido.....	52
4.3.2	Capacidad de retención de agua.....	53
4.3.3	Índice de Bloom.....	54
4.3.4	Resultados prueba de estrés mecánico	56
4.3.5	Pruebas de tixotropía	57
4.3.6	Viscosidad de geles mixtos	60
4.3.7	Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) de geles	61
4.3.8	Microscopía electrónica de geles mixtos	65
5.	Conclusiones y trabajo futuro.....	67
5.	Bibliografía	70
6.	Anexos	77

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición aproximada de leche bovina	6
Tabla 2. Distribución de las proteínas de leche (Adaptada de Badui, 2006).	7
Tabla 3. Composición aproximada de sueros dulce y ácido	8
Tabla 4. Diferencias entre productos en polvo lácteos	9
Tabla 5. Propiedades de geles de gelatinas tipa A y B	20
Tabla 6. Parámetros viscoelásticos	24
Tabla 7. Composición promedio de WPC 80%.....	35
Tabla 8. Variables de proceso en la formación de los geles mixtos	40
Tabla 9. Índice de Bloom en geles de grenetina pura	48
Tabla 10. Índice de Bloom en mixtos elaborados con WPC/ y grenetina*	51
Tabla 11. Potencia efectiva y CP de soluciones de sistemas mixtos de WPC ..	52
Tabla 12. Capacidad de retención de agua en geles mixtos	53
Tabla 13. Índice de Bloom (g) en sistemas mixtos tratados por ultrasonido	54
Tabla 14. Pruebas de estrés mecánico (g)	56
Tabla 15. Tixotropía (KPa/seg) de geles mixtos de grenetina: WPC sonicada..	58
Tabla 16. Pruebas reológicas de viscosidad (KPa/s) en geles mixtos	60
Tabla 17. Estructuras secundarias en la región de la amida I	62
Tabla 18. Áreas de los picos de espectros FTIR en por proteína	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Principales procesos de recuperación de suero de.....	10
Figura 2. Estructura tridimensional de la proteína β -Lactoglobulina.....	13
Figura 3. Estructura de α -LA	14
Figura 4. Estructura de BSA por rayos X derivada.....	15
Figura 5. Estructura de grenetina obtenida por difracción de rayos X.....	19
Figura 6. Tipos de cadenas de grenetina	20
Figura 7. Pérdida de fuerza de gel con cambios en temperatura y tiempo....	22
Figura 8. Pérdida de fuerza de gel vs pH y tiempo.....	23
Figura 9. Esquema de una prueba de relajación de estrés en geles.....	26
Figura 10. Espectro del sonido.....	27
Figura 11. Procesos estable y transitorio de cavitación.....	29
Figura 12. Firmeza de gel de tratamientos de ultrasonido.....	32
Figura 13. Posibles vías de evolución de una molécula gelificadora.....	33
Figura 14. Plan de trabajo propuesto	34
Figura 15. Arreglo de equipos para el proceso por ultrasonido de potencia..	37
Figura 16. Baño de agitación recíprocante Polyscience	40
Figura 17. Espectrofotómetro de FTIR	42
Figura 18. Texturómetro Texture Technologies TAXT-Plus	43
Figura 19. Reómetro Brookfield RST-CPS.....	46
Figura 20. FE-SEM Teascan.....	45
Figura 21. Geles de de grenetina y WPC al 1% (A) y al 5% (B).....	52
Figura 23. Espectros IR de geles mixtos de gelatina.....	63
Figura 24. Espectros IR de geles mixtos	63

1. Introducción

La industria alimenticia busca constantemente mejorar las propiedades tecnológicas, nutricionales o sensoriales de los alimentos y con ello incrementar su valor agregado, acercándose más a satisfacer las necesidades del consumidor. (Chemat *et al.*, 2011).

El desarrollo tecnológico moderno ha permitido encontrar nuevas y más eficientes maneras de transformar, utilizar y disponer de recursos alimenticios que anteriormente eran desechados o poseían un uso limitado. Dentro de estos componentes sub aprovechados en la industria alimentaria actual destaca el suero de leche, derivado de la producción quesera y que se considera un importante contaminante ambiental cuando no se dispone de él de manera apropiada. Sin embargo, cada vez se desarrollan nuevas tecnologías que permiten recuperar la mayoría de sus componentes, los cuales en su mayoría poseen un alto valor nutrimental y comercial; dentro de estos constituyentes, destacan las proteínas séricas, las cuales una vez recuperadas y concentradas son ampliamente usadas para el desarrollo de productos alimenticios.

Los productos lácteos obtenidos a partir de suero son variados y su funcionalidad y costo dependen de la técnica de separación y purificación empleada; dentro de estos destacan aquellos separados a través de procesos con membranas, como micro, nano y ultrafiltración. El tamaño de poro de las membranas de ultrafiltración permite retirar de fluidos partículas en el rango de tamaño de 0.001 a 0.1 μm , como las proteínas. Al emplearse en suero de leche y acoplarse a secado por aspersion y, de requerirse, técnicas de dialfiltración, se obtienen concentrados de proteína de suero de leche (WPC), definidos como productos de suero en polvo con una concentración de proteína del 60 al 85% de proteína o aislados de proteína de suero de leche (WPI) con una concentración superior al 90% (Yadav *et al.* 2015).

Los productos adicionados con proteínas séricas concentradas se han multiplicado en las últimas décadas. Aunque las proteínas de suero son resistentes a un amplio rango de valores de pH, lo que las hace versátiles para usarse en diversos tipos de productos, su termorresistencia es limitada, iniciando su desnaturalización a temperaturas superiores a 70°C, con β -LG rigiendo el

comportamiento térmico, al ser la proteína mayoritaria (Chandrapala *et al.*, 2011). Por ello, es necesario encontrar alternativas de proceso que limiten o modulen las modificaciones estructurales de éstas, diversificando con ello sus aplicaciones. Por ello diversos grupos de investigación se han abocado a explorar el empleo de tecnologías no térmicas en la conservación y procesamiento de alimentos. Dentro de estas tecnologías, recientemente se ha propuesto el uso de ultrasonido de potencia (USP) como una alternativa viable y de costo asequible para su uso en el procesamiento de alimentos (Frydenberg, 2015; Jambrak *et al.*, 2014; Chandrapala *et al.*, 2011; Jiang, 2010; Villamiel *et al.*, 2000); el USP posee una relativa facilidad de aplicación, permite medir de manera precisa la potencia efectiva del tratamiento y genera efectos sobre las matrices alimenticias tratadas aún a tiempos cortos de proceso. El USP ha sido extensamente estudiado en leche, suero y otros productos lácteos, centrándose en la modificación de propiedades microestructurales y fisicoquímicas de proteínas (Chandrapala *et al.*, 2011; Cameron *et al.*, 2008; Villamiel *et al.*, 2000). Estudios recientes como los de Barajas *et al.* (2018) han demostrado que se pueden generar cambios estructurales y mejoras funcionales en WPI, WPC y en otros ingredientes con polímeros alimenticios a través de la aplicación de ultrasonido de potencia, por lo que esto abre la posibilidad de usarlo como una herramienta útil en la generación de productos y procesos alimenticios novedosos.

Una de las aplicaciones más comunes de las proteínas de suero es en la formación de geles, los cuales comúnmente se elaboran por medio de un tratamiento térmico severo. Estos geles altamente deformables, con puntos isoeléctricos alejados de los rangos óptimos de pH, poseen una baja fuerza iónica y pueden presentar turbidez (Walstra *et al.*, 2006). Estas características pueden ser consideradas como defectos en aplicaciones específicas, por lo que se deben estudiar alternativas de proceso para modularlas o modificarlas. Se han explorado modificaciones en la formulación y la aplicación de tecnologías emergentes como el USP para reducir algunos defectos específicos de geles obtenidos a partir de WPC y WPI. La gelificación de proteínas de suero puede controlarse por adición de otras proteínas (Aguilera & Stanley, 1999), sean o no de origen lácteo. Así, Pang *et al.*

2014) exploraron el efecto sobre propiedades reológicas, texturales y microestructurales de geles de gelatina tipo B con diferentes fuentes de proteínas lácteas, entre ellas WPI, obteniendo resultados promisorios, dado que, aunque la adición de proteínas de suero no implicó un cambio en la estructura del gel de gelatina, produjo importantes modificaciones en su comportamiento reológico. Por otra parte, Barajas (2018) estableció un bosquejo de condiciones de trabajo para el USP con la finalidad de mejorar las capacidades físicas y estructurales de WPI mediante la formación de agregados proteicos y propuso la aplicación de estos para mejorar las características tecno-funcionales de productos gelificados. Sin embargo, a la fecha no se han reportado estudios sobre USP como pretratamiento de WPI y su efecto sobre la formación de geles de gelatina.

Tomando en cuenta lo anteriormente expuesto, esta investigación tiene los siguientes objetivos

Objetivo General

Determinar el efecto de tratamientos de ultrasonido de potencia (USP) en proteína concentrada de suero (WPC) mezclada en diferentes razones con grenetina tipo B (colágeno) a través de un procedimiento preestablecido y medir su efecto sobre las características fisicoquímicas y reológicas de los geles formados.

Objetivos específicos

- Definir un procedimiento estándar de preparación de geles de grenetina tipo B a escala laboratorio, estableciendo las condiciones de temperatura y concentración proteica más apropiadas para obtener geles uniformes.
- Establecer una metodología apropiada para la elaboración de geles mixtos de grenetina y WPC a razones de mezcla específicas.

- Elaborar y evaluar geles termoformados de dispersiones de WPC pretratadas por condiciones selectas de USP con la adición de grenetina tipo B a razones selectas.

Adicionalmente, se partirá de la siguiente hipótesis de trabajo

El ultrasonido de alta potencia como pre tratamiento de dispersiones acuosas de WPC modificará las propiedades tecnológico-funcionales y estructurales de geles termoformados mixtos elaborados con éstas y grenetina tipo B en comparación con geles estándar de grenetina.

2. Marco Teórico.

2.1 Leche bovina y suero de leche

2.1.1 Generalidades

La leche es la secreción mamaria normal de animales lecheros obtenidos mediante uno o más ordeños sin ningún tipo de adición o extracción, destinados al consumo en forma de leche líquida o a elaboración ulterior (FAO 2011). Ésta es comercialmente extraída de animales con una alta tasa de producción de leche y una amplia tolerancia a condiciones ambientales, así como geográficas donde destacan los bovinos, ovinos y caprinos a nivel global.

La leche bovina representa alrededor del 85% de toda la leche de venta directa, mientras que el 11% corresponde a leche de búfala y el 2% por leche ovina y caprina (Fox 2011), por ello es la principal materia prima para la elaboración de productos lácteos, con ello la mayoría de los procesos tecnológicos, analíticos e industriales se desarrollan en función de este tipo de leche; entre ellos uno de los procesos más recurrentes aplicados en leche bovina es la elaboración de queso. La composición aproximada de leche bovina se muestra en la Tabla 1.

La leche es un alimento diseñado biológicamente para crianza de mamíferos; contiene por naturaleza una alta cantidad de proteínas que se dividen en dos grandes grupos de acuerdo con su estado de dispersión: las caseínas con el 80% de contenido total y las proteínas de suero o con el 20% restante (Badui, 2006). Aun con esta diferenciación, las proteínas lácteas en lo individual aportan diferentes propiedades tecnológicas y funcionales incluso algunas formando complejos importantes para el comportamiento tecnológico de la leche como la elaboración el queso o fermentación de ácido lácticas para la fabricación de yogurt. La complejidad y concentración de las proteínas de leche afecta directamente su comportamiento reológico, fisicoquímico y funcional; los principales tipos de proteínas consideradas en cada fracción, las características más relevantes de éstas, así como sus propiedades fisicoquímicas principales se detallan en la Tabla 2.

Tabla 1. Composición aproximada de leche bovina

Componentes	Rango de proporción (g/100g)
Agua	85.3-88.7
Sólidos no grasos	7.9-10.0
Grasa sobre extracto seco	22.0 – 38.0
Lactosa	3.8 - 5.3
Grasa	2.5 - 5.5
Proteína	2.3 - 4.4
<u>Caseína</u>	1.7 - 3.5
Minerales	0.57 - 0.83

El queso es uno de los alimentos más complejos y variados que consume el ser humano; generado a través de múltiples procesos, siendo el más común el basado en la precipitación de las caseínas de la leche por medio de la fermentación por bacterias ácido lácticas (que reducen el pH de la leche) y la adición posterior del conjunto de peptidasas extraídas de fuentes animales, vegetales o microbianas conocidas genéricamente como cuajo y que en conjunto actúan sobre la estabilidad de las micelas de caseína de la leche. La estabilidad de las micelas se atribuye a su carga negativa neta y a la repulsión estérica por parte de la región macro peptídica flexible de k-caseína, así como a la baja afinidad de esta última por las sales de calcio; a través de la acidificación (que reduce la repulsión electrostática) y proteólisis de la región antes mencionada de k-caseína (que disminuye la repulsión estérica), las micelas se agregan, forman agrupaciones, que eventualmente constituyen la red tridimensional proteica que contiene agua, grasa y algunos compuestos solubles a la que se le denomina queso (Lucey, 2011).

2.1.2 Suero lácteo

Paralelamente a la elaboración de queso se genera suero como subproducto, el cual está constituido por todos los componentes solubles e hidrofílicos que no se pueden retener en la matriz de la cuajada. Dependiendo del tipo de procedimiento empleado en la elaboración del queso, el suero resultante puede ser ácido (cuando se lleva a cabo una coagulación ácida, como en la elaboración de queso cottage) y

dulce (cuando la coagulación es enzimática, como todos los quesos fabricados con adición de cuajo). La composición aproximada de sueros dulce y ácido se muestra en la Tabla 3 (Tommaso *et al.*, 2012).

Tabla 2. Distribución de las proteínas de leche (Adaptada de Badui, 2006).

Proteína	% de proteína	Peso molecular (kDa)	Numero de aminoácidos	Punto isoeléctrico
<u>Caseínas</u>	80			
as ₁	34	23.6	199	4.1
as ₂	8	24.2	207	
B	29	23.9	209	4.5
K	9	19.0	169	4.1
<u>Proteína de suero</u>	20			
β – lactoglobulina	9	18.2	162	5.3
α – lactoalbúmina	4	14.1	123	5.1
Inmumoglobulinas	2	1500		4.5 – 8.3
Seroalbúmina	1	69		4.7

*Fracción de beta caseína producida por hidrólisis enzimática

El suero se define como la porción líquida de leche sin caseínas y grasas (De Wit, 2001). El suero representa aproximadamente 85-95% del volumen de leche y contiene hasta el 55% de sus sólidos (González, 1996). Esta alta concentración de nutrientes, aunado a su alta tasa de producción son los factores por los que el aprovechamiento del suero de leche se ha convertido en una prioridad para la industria láctea. Al obtenerse aproximadamente 9 L de suero por cada Kg de queso producido (Jelen *et al.*, 2011), el problema medioambiental que representa la disposición de suero en aguas residuales o en suelos es enorme; a esto se le añade el hecho que, potenciado por las actuales tendencias de consumo y demandas del mercado, la producción de los productos lácteos coagulados generadores de suero ácido (como yogurt griego) se han triplicado en los últimos años, por lo que la industria se enfrenta a un problema asociado con el uso que se debe dar a 1.6 mil millones de L de suero de leche por año en el mundo (Chandrapala *et al.*, 2015).

Tabla 3. Composición aproximada de sueros dulce y ácido

Componentes	Suero ácido (g/100g)	Suero dulce (g/100g)
Sólidos	6	6.6
Lactosa	3.9	4.8
Proteína	0.72	0.9
Minerales	0.72	0.6
Ácido láctico	0.6	0.13
Grasa	0.05	0.06

Hasta hace algunas décadas, a este líquido amarillo-verdoso solo se le consideraba un residuo debido a su poca aplicación industrial; uno de sus usos alimenticios más frecuentes es la coagulación ácida de proteína del suero, filtrada y salada, para elaboración de queso *ricotta* o requesón. Si no se le da un uso práctico, el suero de leche es considerado un contaminante grave ya que impone una tasa muy alta de demanda biológica de oxígeno (DBO) de 30,000 a 50,000 mg/L y demanda química de oxígeno (DQO) de 60,000-80,000 mg/L, representando un coadyuvante en el crecimiento de microorganismos nativos de drenajes o ríos representando un riesgo para el equilibrio del ambiente donde se desecha (Silviya *et al.* 2016). Debido al alto contenido proteico del suero de leche, se vislumbran una alta cantidad de aplicaciones desde el punto de vista tecnológico, por lo que se han desarrollado diversas técnicas de extracción y purificación, para su posterior implementación en la industria en general. Esto le confiere al concentrado de suero un balance de proteínas y carbohidratos característicos diferente entre cada producto lácteo deshidratado y el método ocupado para su extracción, las cuales son presentadas en la Tabla 4.

2.1.3 Productos obtenidos de procesos de separación de proteínas lácteas

El desarrollo de la tecnología de separación por membranas permitió la recuperación de proteínas de suero sin desnaturalizar, dando como resultado los primeros concentrados o aislados de proteínas de suero, que se utilizan como proteínas funcionales o en fórmulas infantiles (Fox, 2011). A partir de ello, la industria láctea ha hecho énfasis en la importancia de la utilización, estudio y trans-

Tabla 4. Diferencias entre productos en polvo lácteos
(Modificado de Walstra, 2006).

Producto	Método de obtención	Materia prima	Proteína	Carbohidratos	Cenizas	Grasa
Caseína de cuajo	Cuajada	Leche descremada	83	0.5	8	2
Caseína ácida	Ácido	Leche descremada	90	0.5	2.5	2
Caseinato de sodio	Ácido + NaOH	Leche descremada	86	0.5	5	2
Concentrado de caseína micelar	MF/DF	Leche descremada	83	1	8	1
Suero en polvo	UF	Suero de leche	10.5	71	9	1
Concentrado de suero	UF	Suero de leche	31-57	51	7	3
Aislado de suero	UF/DF	Suero de leche	88+	26	4	3

UF= Ultrafiltración
DF= Diafiltración

formación de este tipo de concentrados con la finalidad de diversificar o modular la funcionalidad que exhiben; los diferentes métodos de obtención de concentrados, que se muestran en la Figura 1, dan como resultado un amplio mercado de productos de consumo directo (como fórmulas y suplementos alimenticios) y permite desarrollar ingredientes ricos en proteínas con aplicaciones tecnológicas diversas y complejas.

La técnica de extracción que se ocupa hasta la fecha para la extracción de proteínas de suero de leche es la ultrafiltración (UF) donde mediante un proceso de retención por membranas se pueden atrapar partículas de 0.001 – 0.1 μm en un fluido. Debido a este alto valor proteico alcanzado en las extracciones por filtración se ha planteado el uso de concentrados de proteína de suero en diversos productos, principalmente por su aporte nutrimental. No obstante, mediante el uso de estos concentrados también se busca una mejora tecnológica gracias a la versatilidad funcional de las proteínas mayoritarias de suero, incluyendo β - lactoglobulina (β -LG) y α -lactalbúmina (α -LA), capaces de gelificar, retener agua, retener aceite, dispersarse en medios acuosos, emulsificar, espumar y de servir como agentes para

acentuar el *flavor* (Bulut Solak y Akın, 2012). Debido a lo anterior, cada vez se investiga más a fondo hasta donde todas estas propiedades pueden ser explotadas en alimentos, con esto ampliando el espectro de aplicación día con día de estos agregados.

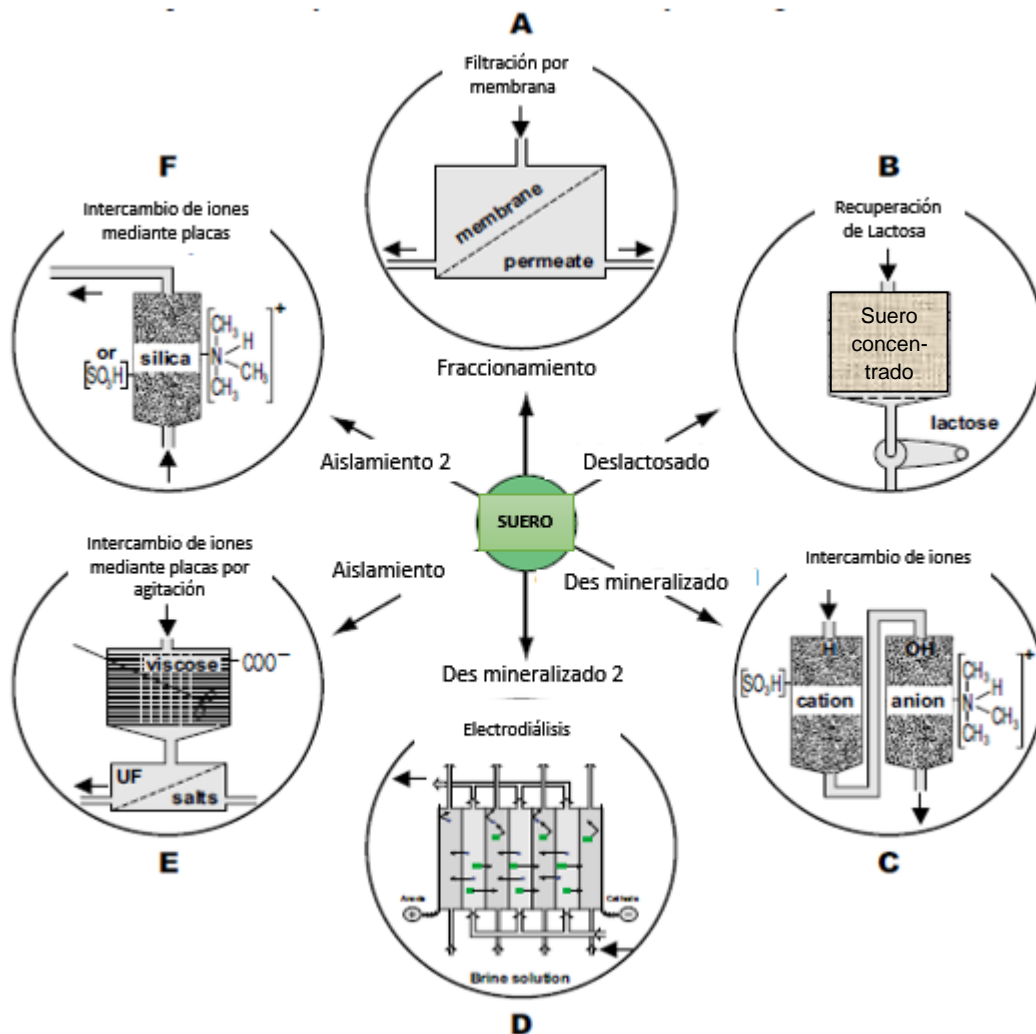


Figura 1. Principales procesos de recuperación de suero de leche (De Wit, 2001).

Se consideran como concentrados de proteína de suero lácteo a los productos que contengan de 35 hasta 85% de contenido de proteínas séricas, lo cual varía dependiendo de la manera de obtención de ellas y del tipo de suero a tratar. Por otro lado, el WPI (aislado de proteína de suero, por sus siglas en inglés) es un producto con una concentración mayor a 90%, donde la materia está

compuesta mayoritariamente por proteína sérica. Preferiblemente, el suero utilizado para su elaboración es relativamente puro; es aún mejor emplear un proceso de microfiltración permeado a partir de leche descremada. El WPI puede ser producido, como WPC, por ultrafiltración; aunque, al menos un paso de di filtración es necesario (Walstra *et al.*, 2006).

El mercado global de los concentrados de proteína ha crecido de manera muy importante en los últimos años, debido a la versatilidad sensorial, tecnológica y nutrimental de las proteínas de lácteas. Estadísticas estiman un crecimiento en el mercado global anual de 0.7% (Statista, 2018) por lo que representa un mercado en crecimiento con necesidad de tecnologías nuevas a su disposición.

2.1.4 Principales proteínas de suero

El suero contiene por su naturaleza bastantes componentes de la leche cruda como lactosa, lípidos y un alto contenido de proteína donde predominan la β -LG, algunos glicomacropéptidos (GMP) y α -LA, así como inmunoglobulinas, lactoferrinas y lactoperoxidasas (Walstra, 2006). A pesar de ser todas estas proteínas de la misma naturaleza, si son sometidas a diferentes procesos como tratamientos térmicos, cambio de pH o cambios de presión se puede alterar su estructura y propiciar cambios funcionales, los cuales generen productos con características únicas.

Los concentrados y aislados han ganado terreno en el ámbito industrial como un ingrediente fortificante con proteínas de alta calidad nutrimental, principalmente β -LG y α -LA. Adicionalmente, dado que su proceso de obtención afecta mínimamente las propiedades estructurales y fisicoquímicas de las proteínas, la ultrafiltración permite mantener intacta su funcionalidad y con ello, su uso como agente emulsificante, espesante, espumante o gelificante, así como para la formación de bio-películas, recubrimientos y encapsulados (Yadav *et al.* 2015). Las características más relevantes de las principales proteínas séricas se describen a continuación.

2.1.4.1 β -Lacto globulina (β -LG)

β -LG es la principal proteína de suero en la leche bovina, se sabe que se unen a ligandos hidrófobos tales como vitaminas y otras moléculas. Más allá de la contribución nutricional de los componentes individuales (β -lg y ligandos), las funciones biológicas de la proteína compleja / ligando son todavía especulativas. (Le Maux *et. al*, 2014). Este alto potencial hidrófobo permite a la estructura ser potencialmente compatible con otros agregados para mejorar o propiciar propiedades conjuntas en sus estructuras.

Con una concentración de 3.2 g/L en leche bovina, la β -LG representa aproximadamente el 10% del total de proteínas de la leche y alrededor del 50-60% del total de proteínas de suero (Le Maux *et al.*, 2014). Por ello, es la proteína que mayoritariamente interactúa con el medio al que se incorpora, por lo que es de interés tomarla en cuenta como una proteína prioritaria de modificación.

Existen variantes genéticas de β -lg, siendo las variantes A y B las más comunes (Godovac *et al.*, 1996). Estas dos variantes contienen 162 aminoácidos, pero difieren en dos aminoácidos en las posiciones 64 y 118. La variante A tiene un ácido aspártico residuo en la posición 64 y un residuo de valina en la posición 118, mientras que la variante B tiene glicina y alanina en estas posiciones, respectivamente. Ambas variantes contienen cinco residuos de cisteína (Cys), ubicados en las posiciones 66, 106, 119, 121 y 160. Estas cisteínas forman dos enlaces disulfuro, entre Cys66 y Cys160, y entre Cys106 y Cys119 (Papiz *et al.*, 1986; Brownlow *et al.*, 1997). Por otra parte, la Cys121 es un grupo tiol libre que se encuentra atrapado en el centro de estructura β -lg y que al desnaturalizar la proteína llega a mostrarse al medio para formar redes más grandes o agregados proteicos (Qin *et al.* 1998; Burova *et al.*, 1998).

La estructura secundaria de la β -lg (Figura 1) se compone de un 15% de hélice α , un 50% de hoja β y 15-20% de giro inverso (Creamer *et al.* 1983; Sawyer y Kontopidis 2000). En la proteína nativa, los enlaces disulfuro unen las cadenas G a H (Cys106 – Cys119) y la cadena D al C terminal (Cys66 – Cys160). El grupo tiol libre es inaccesible para los solventes en los nativos de la estructura de la proteína y por lo tanto no está disponible para reacciones de baja intensidad (Qin *et al.* 1998; Burova *et al.* 1998).

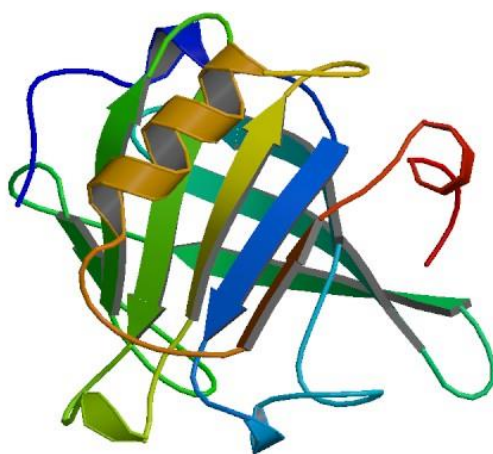


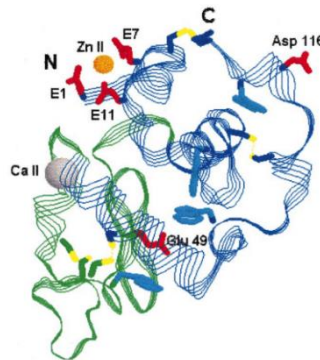
Figura 2. Estructura tridimensional de la proteína β -Lactoglobulina (Protein Data Bank 2005).

2.1.4.2 α -Lactalbúmina (α -LA)

Es una de las principales proteínas encontradas en la leche humana como bovina, en conjunto con la β -lg gobiernan la variedad de propiedades funcionales que puede ofrecer el WPC. En proporción, es aproximadamente el 25% de la proteína de suero total y contiene una amplia variedad de aminoácidos de cadena ramificada y esencial (Bulut *et al.*, 2012).

La α -Lactalbúmina (α -LA) es un componente proteico importante de la fracción de suero de leche bovina debido a su relativa abundancia y facilidad de purificación. Esta proteína sirvió como modelo para el desarrollo temprano de métodos de investigación de las propiedades químicas y biofísicas de proteínas (Brew, 2011). Un modelo propuesto de α -LA se muestra en la Fig. 3.

La mayoría de las α -lactalbúminas, incluidas las de cerdo, humano, cobaya, bovino, cabra, camello, equino y conejo, consisten en 123 residuos de aminoácidos. Consta de dos grandes aglomerados: un gran dominio α -helicoidal y un pequeño dominio de hoja β , que están conectados por un bucle de enlace de ion calcio (Permyakov & Berliner, 2000).



. **Figura 3.** Estructura de α -LA nativa (Permyakov & Berliner, 2000).

La desnaturalización de esta proteína sérica comienza alrededor de los 64°C y a un pH arriba de 8 (Walstra, 2006). El ion calcio de α -LA es imprescindible en el mantenimiento de la estructura lo cual genera al desconfigurarse una estructura semi estable conocida como *glóbulo fundido* que es una desnaturalización parcial, en el que la proteína mantiene su estructura secundaria, pero con una estructura terciaria poco definida (Coto, 2014). En consecuencia, la resistencia a la desnaturalización de α -LA es mayor que la exhibida por BLG. Este proceso especial de desnaturalización es un factor primordial en el reordenamiento proteico cuando se sufren procesos como el ultrasonido de potencia.

2.1.4.3 Albúmina bovina sérica (BSA)

La albúmina de suero bovino (BSA) es un polipéptido de cadena sencilla que contiene 583 aminoácidos, que se pliegan en tres dominios homólogos. Cada uno de estos dominios contiene dos subdominios A y B (Carter & Ho, 1994). La BSA tiene dos residuos de triptófano (Trp), Trp 134 en el primero dominio y Trp 213 en el segundo dominio, lo cual lo hace una proteína estabilizadora importante dentro

de la composición proteica de la leche en general (Moriyama *et al* 1996). La BSA (ver Figura 4) representa del 5-10% del contenido de proteína total en leche, con un peso molecular de 66 kDa, su punto isoeléctrico es de pH 5.3 y su temperatura de desnaturalización es de 64°C cuenta con 17 puentes de bisulfuro intramoleculares y un grupo tiol libre en la posición Cis34 (Thompson *et al.*, 2009).

Existen estudios acerca de la estabilidad térmica y el comportamiento reológico de mezclas hidrocoloides con BSA que proporcionan esbozos acerca una guía teórica para el diseño de nuevos hidrocoloides alimentarios en la industria alimentaria. Asimismo, las interacciones vinculantes de ellos en mezclas de proteínas y alimentos hidrocoloides también puede afectar las propiedades funcionales de los alimentos. (Xu & Wang., 2019)

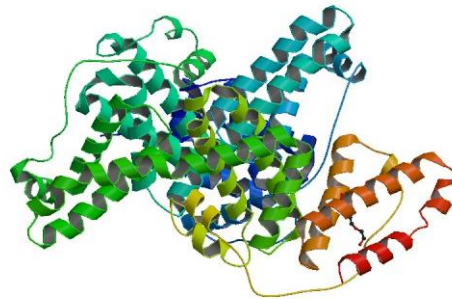


Figura 4. Estructura de BSA por rayos X derivada (Majorek *et al.*, 2012).

2.1.5 Desnaturalización proteica

La desnaturalización proteica es un proceso de reordenamiento en las cadenas peptídicas de las proteínas sometidas a un proceso de estrés, donde aquellos enlaces más débiles en la estructura de la matriz sufren un reacomodo, perdiendo la estabilidad original. Al mismo tiempo, se generan propiedades que surgen a partir de la nueva interacción molecular que pueden generar los enlaces rotos en condiciones con proteínas compatibles. La desnaturalización de las proteínas puede ser reversible o irreversible. Además, generalmente es una transición cooperativa. Esto significa que la mayoría de los enlaces débiles que estabilizan la conformación nativa se rompen casi simultáneamente. En

consecuencia, el proceso se produce en un pequeño rango de intensidad del agente empleado (Walstra, 2006).

Muchos factores pueden causar desnaturalización en las proteínas de suero, algunos más efectivos que otros, los más ocupados en la industria alimenticia son:

- Altas temperaturas: Se sabe que temperaturas altas siempre conducen a la desnaturalización (mayor efecto del cambio en la entropía conformacional), aunque la temperatura necesaria para desnaturalizar proteínas de WPC se encuentra en un valor promedio de 70 °C.
- Bajas temperaturas: puede hacer que algunas proteínas se desnaturalicen al debilitar algunos enlaces hidrofóbicos de baja intensidad; casi siempre se necesita una reducción de la temperatura de al menos -20 °C.
- Alta presión, es decir, una presión hidrostática considerablemente superior a la ambiental; en términos de proceso, se considera alta presión a aquella superior a 100 MPa, aunque por lo regular se aplica en magnitudes mucho mayores (300-600 MPa). La presión elevada también puede causar desnaturalización pues afecta principalmente los enlaces de puentes de hidrógeno que estabilizan las estructuras superiores (terciaria, secundaria) de las proteínas.
- pH alto (>8), puede causar desnaturalización, debido a la repulsión entre grupos con carga negativa.

A menudo, una combinación de dos agentes puede causar desnaturalización rápida, por ejemplo, un aumento moderado de temperatura y un aumento moderado de pH. Por lo que manejar todas las variables involucradas es de crucial importancia para saber por qué medio se está desnaturalizando el sistema.

Una de las reacciones entre proteínas que resultan con mayor frecuencia de los procesos de desnaturalización en leche es la formación de complejo beta lactoglobulina-kappa caseína (β -LG-KCN); la KCN tiene grupos sulfhidrilos no asociados que, por su ubicación en el exterior de la micela, pueden interactuar con otros grupos sulfhidrilos disponibles en otras estructuras propias de la leche; la β -LG posee grupos SH en su interior (5) con posibilidad de que uno de ellos no se

encuentre asociado en forma de puente disulfuro y, por tanto, quede disponible para reaccionar; siendo β -LG una proteína globular con estructura terciaria compleja, gran parte de los factores de desnaturalización antes citados pueden modificar su estructura, exponiendo los grupos funcionales de esta proteína sérica y facilitando la formación del complejo antes citado. Las reacciones sulfhidrido-disulfuro entre β -LG y KCN y la formación del complejo resultante, independientemente del tratamiento que las propició, tienen implicaciones importantes en la funcionalidad de la leche y en sus aplicaciones tecnológicas.

2.1.6 Gelificación de proteínas lácteas

Dentro de las capacidades funcionales de los concentrados lácteos, la formación de geles se produce gracias a la capacidad de desnaturalización de proteínas como β -LG (beta lactoglobulina) y α -LA (alfa lactoalbúmina), propiciando la exposición de sus grupos sulfhidrilos que permiten la interacción con el medio y formar agregados mediante puentes bisulfuro, además de que la proteína desplegada es más susceptible a las proteínas con interacción proteica a través de puentes de calcio y enlaces hidrofóbicos (Chandrapala *et al.*, 2011).

Con todo esto se busca expandir la gama de aplicaciones tecnológicas que puedan tener las proteínas séricas sobre sistemas mixtos en concentración sometidos a tratamientos alternativos como es el ultrasonido de potencia y con ello establecer el abanico de aplicaciones de estas condiciones en la industria alimenticia.

Fu y Nakamura (2017) argumentan en un su estudio de geles a partir de WPI mixtos con almidón que las similitudes en la activación térmica de WPI y geles de almidón sugieren la posibilidad de obtener una mezcla gel calentando una solución de mezcla de almidón y WPI, y que todavía existe una gran cantidad de conocimiento sobre propiedades físicas o propiedades viscoelásticas que cambian dependiendo las proteínas y los sistemas de polisacáridos siguen siendo investigados.

2.2 Gelatina

2.2.1 Generalidades de la gelatina

El *Food Chemicals Codex* define a la gelatina como el producto obtenido de la hidrólisis del colágeno sea por uso de ácidos o álcalis o procesos enzimáticos. Es el principal componente proteico de la piel, los huesos y el tejido conectivo de los animales, incluidos los peces y las aves de corral (GMIA 2012). Este compuesto es capaz de agrupar en condiciones de temperatura específicas agua en forma de redes tridimensionales, también funcionando como soporte al estrés mecánico de la estructura formada.

La gelatina (Figura 5) es uno de los biopolímeros más versátiles y tiene numerosas aplicaciones en alimentos, confitería, farmacéutica, cosmética y productos técnicos. Esto también se refleja en las más de 300 000 Ton de gelatina producida anualmente en todo el mundo. La gelatina ha sido investigada y estudiado por científicos al menos desde principios del siglo XX, pero se ha aplicado en alimentos incluso antes de esto. El origen del colágeno y la diversidad de los procedimientos de extracción determinan las propiedades de la gelatina final (Haug y Draget, 2011). Por lo mismo, se han desarrollado diferentes metodologías para la medición y estandarización de esta matriz alimentaria dentro de ellas el número de Bloom, que es una prueba fisicoquímica utilizada como medición de resistencia mecánica en estructuras tridimensionales como geles, tiene una escala de 0 a 400 (g) que se traduce como la fuerza o resistencia del gel ante una presión externa ejercida desde la superficie (GMIA, 2012).

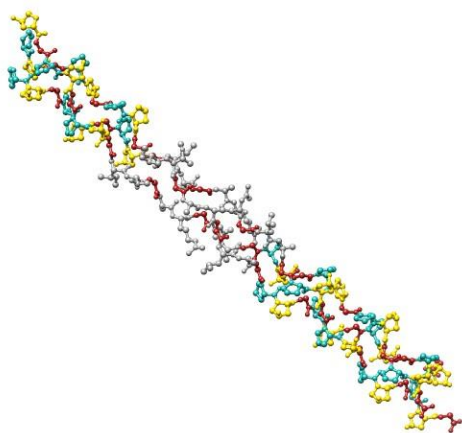


Figura 5. Estructura de grenetina obtenida por difracción de rayos X (Majorek et al., 2012).

2.2.2 Colágeno

El colágeno es una proteína estructural y es el constituyente principal de todos los tejidos conectivos fibrosos blancos que ocurren en animales desde cuerpos como cartílago, tendones, fibras musculares, piel entre otros; la mayoría de las proteínas estructurales posee versatilidad fisicoquímica dependiente de variables del medio, incluyendo temperatura o pH por lo que, dependiendo de las condiciones implementadas en los métodos de extracción estos conferirán diferentes propiedades a la gelatina.

El proceso de fabricación de grenetina implica la limpieza de los tejidos de origen seguidos por pre tratamiento, extracción de gelatina, filtración / purificación / esterilización, concentración, secado y molienda final dando como resultado una mezcla de cadenas de polipéptidos con diferentes composiciones y pesos moleculares (Haug y Draget, 2011). Todos estos procesos varían en función del tipo de gelatina a extraer ya que dependiendo la procedencia animal que puede ser desde peces, bovinos hasta aves se cambiarán las condiciones del proceso que permitan un menor deterioro de esta proteína en el proceso de la extracción. Los tipos de cadenas de colágeno obtenidas por hidrólisis y sus rangos de pesos moleculares correspondientes se muestran en la Figura 6.

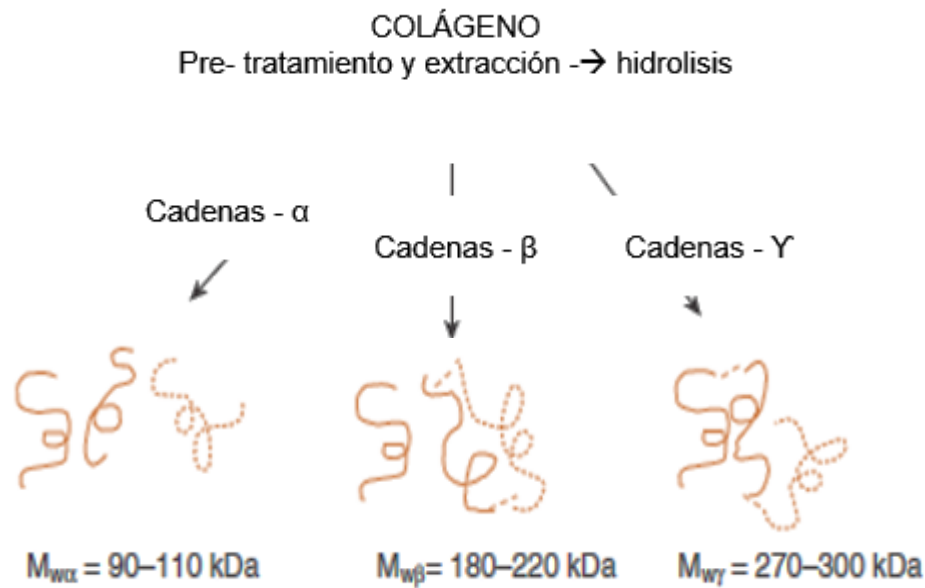


Figura 6. Tipos de cadenas de grenetina obtenidas por hidrólisis de colágeno (Haug y Draget, 2011).

Dependiendo de la fuente de extracción del colágeno y sus propiedades se han clasificado las gelatinas en tipo A y B, siendo la Tipo A proveniente de derivados porcinos y tipo B provenientes de vacunos (GMIA 2012), de esto dependerán diferentes factores en las características de la gelatina final, temperatura y tiempo de gelación, pH, etc. La utilidad de ambos tipos de gelatina varía principalmente en el número de Bloom; la fuerza de gel regula entre 175 y 275 unidades Bloom en gelatinas comerciales, ya que, a mayor Bloom, mayor cantidad de colágeno se requiere. Por ejemplo, una gelatina con Bloom de 275 requerirá aproximadamente 1.3% de gelatina, mientras que una gelatina 175 Bloom deberá contener 2.0% para obtener una firmeza similar. A pesar de estas diferencias, las gelatinas comestibles tienen diversas aplicaciones desde jugos, emulsiones cárnicas, pastelería, panadería, confitería y alimentos dietéticos (GMIA, 2012). Las características de cada tipo de gelatina se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Propiedades de geles de gelatinas tipa A y B (GMIA, 2012).

	Tipo A	Tipo B
pH	3.8 – 5.5	5.0 – 7.5
Punto isoeléctrico	7.0 – 9.0	4.7 – 5.4
Fuerza de gel (Bloom)	50 – 300	50 – 300
Viscosidad (mps)	15 – 75	20 – 75
Cenizas (%)	0.3 – 2.0	0.5 -2.0

2.2.3 Propiedades reológicas de geles

Los geles son sistemas muy complejos que dependen directamente tanto de las propiedades intensivas como de las extensivas por lo que las capacidades que se pueda mostrar en su tiempo de vida dependerán de todas las variables que le puedan afectar.

Las gelatinas comestibles son derretidas a temperatura del cuerpo humano 37°C, con ello en mente desde su elaboracion la temperatura a la que se encuentre la gelatina definira las futuras y finales condiciones tecnologicas de la gelatina incluyendo la de la activacion,refrigeracion y consumo final. La temperatura adecuada de gelificación de acuerdo con lo planteado por el GMIA (2012) se refiere a una correlación de pérdida de fuerza en el gel de acuerdo con el tiempo y la temperatura de exposición ejercida en la formación de la gelatina, como se muestra en la Figura 7.

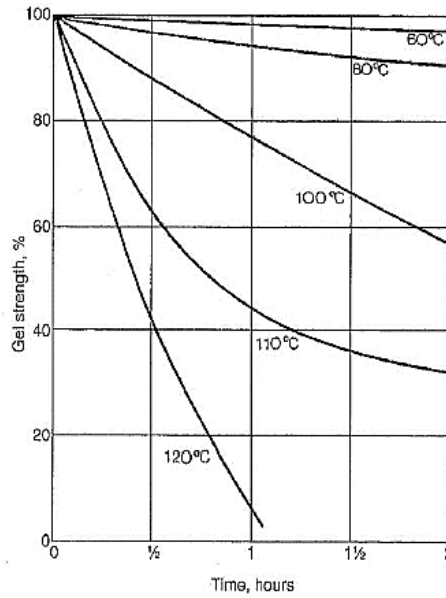


Figura 7. Pérdida de fuerza de gel de con cambios en temperatura y tiempo (GMIA, 2012).

El punto óptimo de activación de cada gelatina depende del tipo de grenetina, la concentración y la firmeza necesaria. Por otra parte, el exceso de temperatura deteriora las propiedades que esta pueda presentar en el gel formado y, si la temperatura es mínima, el gel no retendrá la capacidad de retención de agua apropiada ni alcanzará la firmeza deseada; por ello las variables de proceso que involucren aumento de temperatura ya sea por la cavitación del ultrasonido o la activación de la proteína, son de crucial énfasis ya que un aumento repentino influirá en la calidad final del gel a formarse.

De manera similar, el pH influye de manera sustancial en la formación y firmeza del gel que se quiera formar, ya que dependiendo del tipo de grenetina, el punto isoeléctrico se ubica por encima o debajo de la neutralidad en la escala del pH. Las interacciones y repulsiones debido a las cargas de los iones entre más cercanas se encuentren al punto isoeléctrico contribuirán a la estabilidad a largo plazo de la estructura del gel incluyendo cuando se tratan de gelatinas compuestas de múltiples materiales. Mientras más lejano sea el pH de los materiales a utilizar del pH óptimo del colágeno, se complicará más la formación de redes tridimensionales resistentes, como se puede observar en la Figura 8.

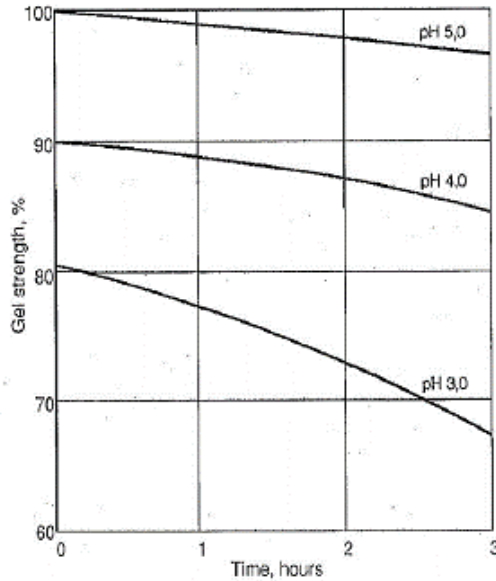


Figura 8. Pérdida de fuerza de gel vs pH y tiempo (GMIA 2012).

Diversas propiedades son evaluadas para caracterizar a los geles alimenticios; dentro de las más importantes se encuentran las reológicas y las texturales. Los sólidos blandos como los geles son sistemas sometidos a cambios propiciados en función de la concentración, temperatura y tiempo principalmente, por lo mismo al depender de esto su estado sólido o líquido la manera más efectiva de evaluar sus propiedades a través del tiempo y en función de la temperatura es la reometría de este sistema. Schalek & Szegvari (2009) justifican que las transiciones sol-gel no solo podían ser inducidas por cambios de temperatura, pero también mediante agitación mecánica a temperatura constante, reafirmando la importancia de este análisis para el estudio presente.

Los reómetros de fluidos proporcionan una determinación definitiva de transición sol-gel en dispersiones WPI, esto puede proporcionar una base para aplicar mediciones reológicas para investigar la influencia de las variables de procesamiento en la capacidad de formación de gel de WPI dispersiones (Labropoulos y Hsu, 1996). Los fenómenos ocurridos en la transición sol-gel aún deben de ser estudiadas a fondo para encontrar y describir de manera precisa de puntualizar estos fenómenos, estos técnicamente son definidos como parámetros de cizalla.

Los parámetros que se necesitan considerar para determinar las propiedades de los alimentos con comportamiento viscoelástico están en función de la naturaleza del producto, en tipo de equipo (reómetro de plato y cono o reómetro oscilatorio), la propiedad que se desea analizar y el modelo de ajuste al experimento, los principales parámetros con sus variables de operación se enlistan en la Tabla 6.

Tabla 6. Parámetros viscoelásticos de cizalla, extensión simple y compresión a granel (Rao.1999)

Parámetro	Gradiente	Extensión simple	Compresión a granel
Relajación por estrés	$G(t)$	$E(t)$	$K(t)$
Compresión volumétrica	$J(t)$	$D(t)$	$B(t)$
Módulo de Almacenamiento	$G'(\omega)$	$E'(\omega)$	$K'(\omega)$
Módulo de pérdida	$G''(\omega)$	$E''(\omega)$	$K''(\omega)$
Modulo complejo	$G^*(\omega)$	$E^*(\omega)$	$K^*(\omega)$
Viscosidad dinámica	$\eta'(\omega)$	$\eta'_e(\omega)$	$\eta'_v(\omega)$
Viscosidad compleja	$\eta^*(\omega)$	$\eta^*_e(\omega)$	$\eta^*_v(\omega)$

2.2.4 Tixotropía

La tixotropía es uno de los fenómenos reológicos documentados más antiguos en la ciencia coloidal, ya que los cambios en la microestructura sistema dentro de un modelo reológico puede ser capaz de describir completamente las diferentes características del fluido a través del tiempo (Mewis & Wagner., 2009). Al ser sistemas semisólidos los geles son sistemas complejos en constante transición en función de los diferentes factores mencionados anteriormente, por lo que estas transiciones de estados en función de la temperatura en estos casos fueron estudiados a través de la reológica y en este proyecto en específico son la tixotropía.

Los geles conformados por agentes mixtos y que contienen más de un agente gelificante pueden ser clasificados en 3 tipos: geles acoplados, inter compenetrados

y de redes de fases separadas (Morris,1986); en estos los las redes intercompenetradas crear redes independientes si mezclarse entre los componentes de las mezclas y cada fase en el gel tendrá características diferentes, mientras que los geles acopladas se forman en presencias favorables de interacción molecular entre los diferentes tipos de polímeros a ocupar, y por el lado contrario los geles que tienden a tener componentes que se causen repulsión molecular o variación grande de afinidad formaran geles de fases separadas concluye el autor. El comportamiento de los sistemas mixtos ha sido esencialmente estudiado durante la formación de gel usando pequeñas técnicas de deformación reológica (Turgeon & Beaulieu., 2001).

2.2.5 Análisis de textura

El índice de Bloom es un auxiliar en técnicas de textura sobre geles y a su vez como un sólido blando pueden presentarse comportamientos reológicos, congruentes con las pruebas de resistencia al estrés mecánico. Este índice es medido en función de la fuerza del gel, que es un importante parámetro fisicoquímico ya que refleja la cantidad de contenido de triple hélice de gelatinas y determina las propiedades mecánicas, reológicas y térmicas correspondientes, así como comportamientos de biodegradación y mecanismos de liberación componentes (Chou *et.al.*, 2016). Un alto valor en el índice de Bloom a menudo sugiere un mayor contenido de triple hélices en gelatinas, lo que significativamente reduce el grado de hinchamiento y mejora el módulo elástico de Young en películas bio poliméricas como demostraron Bigi *et al.* (2004). Asimismo, el aumento en la cantidad de grenetina cambia el índice de Bloom debido al aumento en el contenido de aminoácidos y el aumento en la cantidad de prolina e hidroxiprolina, lo que afecta aún más la solubilidad de la gelatina (Kempka *et al.*, 2014). Por ello, la consideración del índice de Bloom se hace crucial en la caracterización de matrices gelificantes

Otra prueba textural típica que se realiza en geles alimenticios es la relajación del estrés. Esta prueba a pesar de ser utilizada en productos de diversas industrias incluyendo panificación, industria médica y de envases (GMIA, 2012), La estrategia en el desarrollo de nuevos los materiales visco elásticos, requieren la consideración

de una estructura multinivel, que conduce a una serie de propiedades, características o comportamientos en un determinado entorno, necesarios para satisfacer el rendimiento deseado del producto (Aliya, 2012). El comportamiento las pruebas de relajación de estrés de hidrogeles está fuertemente afectado por polímeros que están reticulados. En geles con interacciones iónicas, este estrés se relaja principalmente a través de la ruptura y posterior recuperación de estas interacciones. Por el contrario, en geles con enlaces covalente el estrés se libera principalmente a través de la migración del agua como señala Zhao *et al.* (2010). La prueba de relajación al estrés puede ser expresada como:

$$\sigma(t) = \sigma_e + f(t) \quad (\text{Ec. 2})$$

Donde:

$\sigma(t)$: es el estrés transitorio

σ_e : Es el estrés de equilibrio después del tiempo infinito

$f(t)$: Representa el componente en descomposición del estrés

El esquema de cómo se lleva a cabo una prueba de estrés-relajación en geles se muestra en la Figura 9. Se destaca la forma en que debe colocarse el gel entre los platos rígidos y los reogramas típicamente generados.

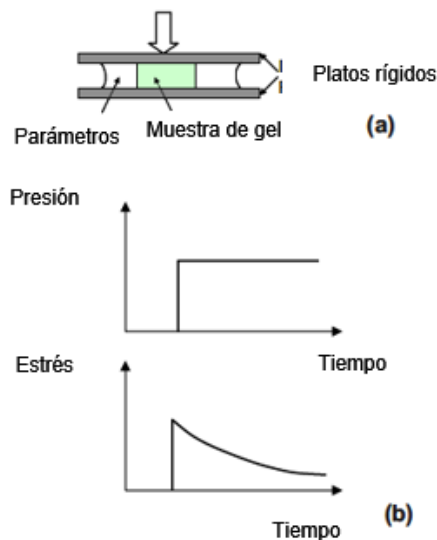


Figura 9. Esquema de una prueba de relajación de estrés en geles.

2.3 Ultrasonido

2.3.1 Generalidades

El sonido es una variación en la presión, o una vibración, que se mueve a través de un medio de transmisión, ya sea el ambiente, agua o un alimento. Esta variación de presión es generalmente generada por una acción mecánica. Las ondas de sonido pueden diferenciarse entre sí por la frecuencia de vibración de la onda, ya que a mayor frecuencia se producen efectos como aumento de presión y de temperatura en el área a la que se le someta este determinado ultrasonido.

En procesos alimenticios, el ultrasonido se divide en dos rangos dependiendo la intensidad de este proceso: ultrasonido de baja potencia con una frecuencia en el rango de 100 kHz a 1 MHz y ultrasonido de alta potencia con una frecuencia en el rango de 20-100 kHz (Wu *et al.* 2018). Un esquema representativo de los tipos de ultrasonido se muestra en la Figura 10.

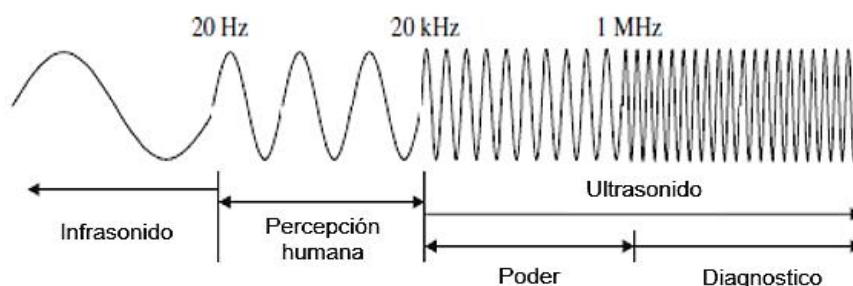


Figura 10. Espectro del sonido (Kentish y Ashokkumar, 2011)

En la industria alimenticia, el ultrasonido de potencia se ha vuelto una tecnología auxiliar e incluso principal en algunos procesos de transformación de los alimentos, entre ellos procesos de cocción, de congelación, cristalización, secado, sellado, filtración, desmolde, deformación, emulsificación, oxidación, entre otros.

Dependiendo de su intensidad, el ultrasonido puede actuar en los alimentos con diferentes fines, pero, de manera general se clasifica como US de baja intensidad o de diagnóstico o de alta intensidad o de potencia; los efectos y las aplicaciones del US dependen de los parámetros de proceso que se elijan; los

parámetros ultrasónicos generalmente controlados incluyen la amplitud (usualmente calibrable de 0 a 100% y que se puede relacionar con la proporción aplicada de la potencia de salida del equipo), la frecuencia de operación, el tiempo y el volumen de proceso.

El US de baja intensidad es empleado principalmente como herramienta de diagnóstico, de análisis fisicoquímico y de composición de materia; debido a su alta frecuencia puede ocuparse para medir viscosidad de líquidos, así como otras pruebas de carácter reológico, aunque su aplicación principal en el área de lácteos es para determinar la composición de leche en pruebas de calidad.

Por otro lado, el ultrasonido de alta potencia puede propiciar un cambio en la estructura del alimento debido a la formación de burbujas en medio líquido llamada cavitación. Este proceso intercambia energía mecánica con el entorno a través de la formación y explosión de burbujas, lo cual propicia cambios en la materia al estar inmersa en este proceso (Ashokkumar, 2011). El US de potencia se puede aplicar de manera directa a productos líquidos cuando se realiza con un dispositivo de sonda o bien, de manera indirecta, cuando se hace a través del uso de baño ultrasónico (Chemat *et al.*, 2011). El ultrasonido de alta potencia puede causar alteraciones variables de las estructuras de los productos tratados en función de la cavitación ultrasónica, la rápida formación y colapso de las burbujas de gas, que pueden producir alta cizalla y energía mecánica (Wu *et al.* 2018).

La cavitación es un proceso fisicoquímico inducido por el ultrasonido en fases líquidas, en líquidos se produce debido a la vibración y el oxígeno disperso en la mayoría de los líquidos que producen burbujas que al continuar la fuerza mecánica del ultrasonido produce una acumulación de fuerza térmica y mecánica que revienta las burbujas formadas. Esto libera la energía contenida en la burbuja produciendo un cambio de temperatura y presión en el entorno de la burbuja; además de ello, esta liberación de energía propicia la formación de radicales libre en el medio. (Chandrapala *et al.*, 2011).

Los fenómenos de transporte involucrados en la cavitación son los tres principales, de materia cuando el oxígeno de la burbuja explota y se mezclan el aire encapsulado con el medio exterior, de energía cuando el calor de la burbuja explota

debido al aumento de temperatura/presión, con ello transfiriéndola al medio exterior, y de momento con la energía suministrada por el ultrasonido a manera constante. Una representación del proceso de cavitación asociado a los tratamientos ultrasónicos se muestra en la Figura 11.

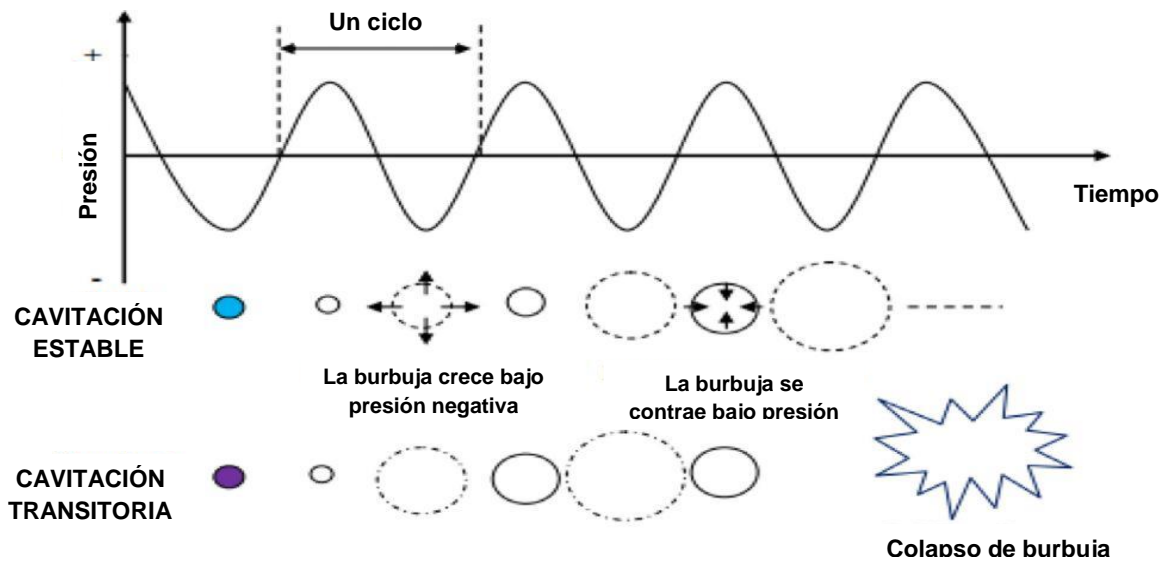


Figura 11. Procesos estable y transitorio de cavitación (Zheng y Sun, 2006).

La cavitación acústica se puede dividir en dos tipos, transitoria y estable. La transitoria ocurre cuando la cavitación produce burbujeo en el sistema, llena con gas o vapor, y forma implosiones, produciendo con esto un aumento en la temperatura y presión que puede romper células y estructuras biológicas, así como desnaturalizaría enzimas y proteínas. Por otro lado, la cavitación estable, se refiere a burbujas que oscilan de manera regular para muchos ciclos acústicos. Estas burbujas producen microcorrientes en el líquido que a su vez puede inducir estrés microbiológico. Estos choques pueden alterar los componentes estructurales y funcionales de la muestra (Chemat *et al.*, 2011).

2.3.2 Uso de ultrasonido de potencia como agente de modulación de propiedades de proteínas lácteas.

A partir del conocimiento de transformación que provoca el ultrasonido de potencia por medio de la cavitación, múltiples estudios se han realizado con la finalidad de conocer el alcance y la capacidad de modificación sobre diversas propiedades de la matriz alimenticia a configurar.

El USP en productos de naturaleza láctea ha sido empleado en diversas ocasiones con una variedad de finalidades sustentadas en la potencia y energía fisicoquímica que trasmite el proceso, desde intentar sustituir procesos térmicos convencionales como la pasteurización como lo reporta Cameron *et al.*, (2008), quienes descubrieron que el USP es capaz de eliminar microorganismos patógenos y deteriorativos a niveles aceptados por la legislación local, logrando disminuciones de 100% en cuentas de *E.coli*, *Pseudomonas fluorescens* y *Listeria monocytogenes* tras tratamientos de sonicación a 750 W, 20 KHz tras 10, 6 y 10 min de proceso, respectivamente demostrando el alcance de esta tecnología en términos de conservación de productos alimenticios.

Por otro lado, la exploración de esta tecnología emergente no solo se ha enfocado con la intención de sustituir el abanico de procesos de conservación que ya se desarrollan en la industria láctea, también se han explorado propiedades y procesos que se realizan (incluso indirectamente) gracias a la múltiple cantidad de operaciones que involucra la cavitación en sí. Ejemplo de esto es el efecto de reducción en tamaño de partícula y peso molecular en las proteínas de suero causado por ultrasonido, como fue reportado por Jambrak *et al.* (2014) Se estudió y observo el efecto del ultrasonido en el tamaño de partícula y el peso molecular de proteínas de suero, demostrando que a 20 kHz, el ultrasonido causó una reducción en el tamaño de partícula, reduciendo su distribución con una disminución significativa en el peso molecular y el fraccionamiento de proteínas; mientras tanto, a 40 kHz, hubo una reducción significativa en el tamaño de partículas, también encontrando cambios significativos en la composición del peso molecular de las fracciones proteicas, concluyendo que con un tratamiento prolongado baño ultrasónico de 40 kHz fomentara la formación de agregados de moléculas en WPI.

La disminución de partícula y peso molecular tiene una vital relevancia para la industria láctea como materia prima, ya que al reducirse el tamaño de los glóbulos lácteos es posible lograr una integración más efectiva despertando el interés en las tecnologías de homogeneización y emulsificación en particular las áreas de producción de leche, productos lácteos fermentados y hielo fabricación de cremas, donde la homogeneización es un paso clave de procesamiento (Wu et al.,2001).

En un estudio reciente, Nöbel *et al.* (2016) investigaron los efectos del ultrasonido durante la fase de fermentación y acidificación en la fabricación de yogur, centrándose en partículas detectables visualmente, granulosis y grumos en el producto final. En donde si hay partículas grandes (> 1 mm), se considera una textura defecto y afecta negativamente la percepción del yogur revuelto homogéneo. En este estudio se identificó un rango crítico de pH para la formación de una red de proteína. Al aplicar una sonicación de 5 min cuando el producto estaba en el pH crítico de 5.4 - 5.1 estos factores contribuyeron a una percepción granulada de las muestras de yogurt revuelto por un panel sensorial.

Investigaciones como la de Armenta (2016) han corroborado que el ultrasonido a partir de la inercia energética de la cavitación con el aumento de temperatura que este produce puede propiciar cambios significativos en muchos factores de las proteínas de suero pero que a su vez a tiempos prolongados mayores a 14 min esta desnaturalización se ve disminuida y concluyendo que se puede lograr una desnaturalización proteica parcial sin necesidad de llegar a la temperatura de desnaturalización, además de que se promueven cambios en las propiedades funcionales de formación y firmeza de geles. (Fig 12)

A partir de la comprobación del cambio sustancial en ciertas propiedades específicas que realizaba por medio del USP en productos lácteos, la aplicación directa sobre productos de consumo directo ha sido desarrollando conforme fue avanzando la información acerca de las ventajas que puede ofrecer el USP como tecnología emergente en lácteos. Recientemente, diversos grupos de investigación se han abocado a explorar la gelificación de solventes que emplean una molécula que es activada a través de la tecnología del ultrasonido de potencia (Banderlang, 2012). Lo anterior es debido a que el proceso de sonicación involucra los fenómenos

de intercambio de energía, aumento de presión y un reordenamiento intermolecular, mencionados anteriormente.

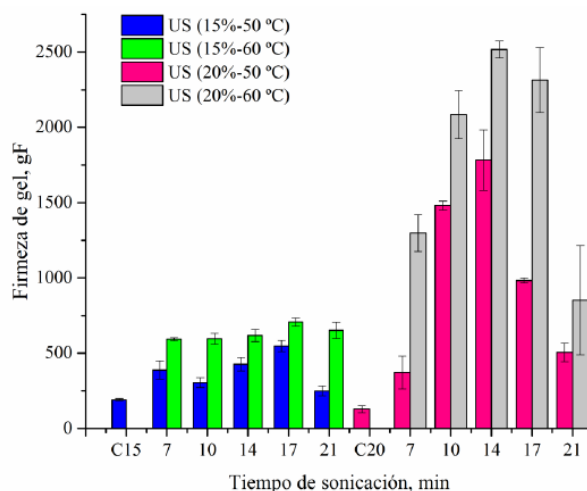


Figura 12. Firmeza de gel de tratamientos de ultrasonido (Armenta 2016).

Existe interés por desarrollar posibles aplicaciones del US en sistemas alimenticios y sus implicaciones en las propiedades funcionales de las proteínas una vez tratadas, las cuales, dependiendo la naturaleza de la proteína se pueden aumentar o disminuir. Dentro de las características del producto que pueden verse influidas se encuentran la solubilidad, la viscosidad, gelificación, emulsificación y otras propiedades intensivas o independientes como son la temperatura, el tiempo de sonicación y la frecuencia de este. En la Figura 13 se ejemplifican los posibles casos de activación de moléculas funcionales por efecto del ultrasonido.

El incremento de temperatura en muestras líquidas sometidas a US ocurre como consecuencia de una serie de factores prevalentes, como la transmisión de una onda acústica a través del medio, que incluye absorción molecular, disipación de turbulencia, dispersión de ondas acústicas por burbujas gaseosas y pérdidas viscosas (O'Sullivan *et al.*, 2017). El conocimiento del comportamiento de las proteínas de suero bajo la influencia de un proceso ultrasónico es de fundamental importancia para el desarrollo de la transición sólido gel en los experimentos de esta

investigación, por lo que la generación de las muestras permitirá un mejor entendimiento de la influencia de estos sistemas y el USP.

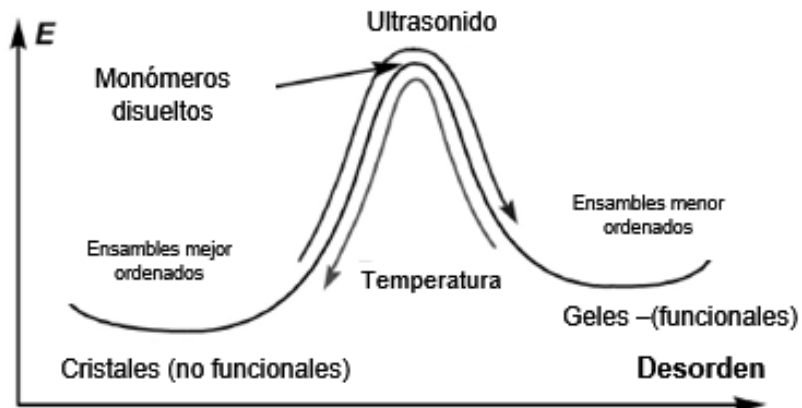


Figura 13. Posibles vías de evolución de una molécula gelificadora sensible a ultrasonido según el estímulo aplicado (Banderlang, 2012).

3. Metodología

3.1 Plan de Investigación

La metodología de este proyecto se encuentra dividida en 3 etapas principales, las cuales se describen a continuación; asimismo, se presenta un resumen gráfico en la Figura 14:

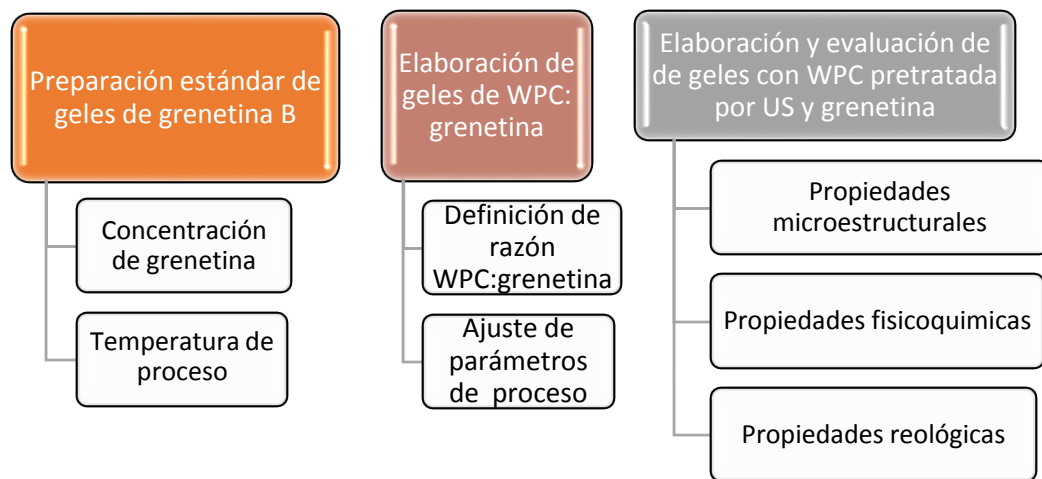


Figura 14. Plan de trabajo propuesto

- *Etapa 1.* Pruebas preliminares: Se llevaron a cabo para establecer parámetros generales de proceso de elaboración de gelatina con grenetina, donde se determinó la concentración a emplear y el proceso general de elaboración, en específico, posibles variaciones en la formación de gel atribuibles a cambios en la temperatura de proceso.
- *Etapa 2:* Ajustes del proceso de elaboración de geles mixtos: se evaluaron las posibles modificaciones de proceso requeridas para introducir WPC a los geles elaborados, estableciendo una razón WPC: grenetina adecuada para su fabricación.
- *Etapa 3:* Evaluación de modificaciones en el concentrado de proteína de suero (WPC) a través del uso del ultrasonido de potencia y su efecto sobre el comportamiento de los geles mixtos: se procesaron dispersiones acuosas de WPC mediante tratamientos ultrasónicos selectos y se determinaron cambios

en sus propiedades reológicas, texturales y microestructurales, así como la determinación de posibles cambios estructurales en WPC mediante espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR).

3.2 Materiales y Métodos

3.2.1 Materiales

Se empleó WPC instantaneizado Hilmar™ 8010 (Hilmar Ingredients, Hilmar, California, E.U.A) con una pureza de WPC 80%; este producto de rápida dispersión e hidratación está elaborado con suero dulce de leche bovina, el cual, posteriormente a ser ultrafiltrado y secado por aspersión es sometido a un proceso de aglomeración y tratamiento superficial; el producto típicamente contiene un máximo de 7.5mg de partículas quemadas /25 g de producto seco; el contenido nutricional del concentrado se encuentra en la Tabla 7.

Tabla 7. Composición promedio de WPC 80%

Componentes	Porcentaje
<u>Proteína (base seca)</u>	82.5%
Proteína (efectiva)	78.2%
Lactosa	5.2%
Grasa	6.0%
Humedad	5.2%
Cenizas	2.7%
<u>Ph</u>	6.0 – 6.8

Por su parte, la grenetina en polvo Bloom 290 (Coloidales Duche S.A de C.V, Ciudad de México) empleada es un producto instantáneo sin sabor, que genera dispersiones acuosas viscosas y geles firmes y estables, con un nivel de uso recomendado en el rango de 20-25 g/L y un contenido promedio de proteína del 85%.

3.2.2 Acondicionamiento de WPC

Las propiedades físicas inducidas en los geles dependen de: las condiciones utilizadas para producir los polímeros de proteína de suero y las condiciones para formar geles. Un calentamiento más largo aumenta el tiempo en la etapa de formación del polímero la dureza del polímero de proteína de suero inducido al gel, (Ju y Kilara 1998). Considerando lo anterior, la estructura inicial del WPC se debe garantizar el desdoblamiento óptimo en dispersión acuosa ya que de esto dependerá la condición adecuada de interacción proteica funcional que se inducirá por el ultra sonido, por consiguiente:

La preparación de las dispersiones acuosas del concentrado de proteína de suero se realizó pesando 1 o 5 g de WPC, para posteriormente añadirlos a 100 mL de agua des ionizada, dejándose en agitación por 24 h para garantizar su hidratación y la correcta exhibición de sus características funcionales.

3.2.3 Pretratamiento ultrasónico

Las dispersiones de WPC a dos concentraciones (1 y 5 g/100g) se colocaron en un reactor enchaquetado de 500 mL y se sometieron a diferentes tratamientos de USP variando el tiempo proceso, de acuerdo con diseño experimental descrito en la sección 4.2.7.5. El USP se aplicó utilizando un procesador de sonda Hielscher UP400S (Teltow, Alemania) que opera a una frecuencia fija de 24 kHz, con una potencia de salida de 400 W aplicada a través de una sonda de titanio de 22 mm de diámetro (H22D, Hielscher). El equipo trabajó a una amplitud de 100% en todos los tratamientos (correspondientes a 400 W teóricos de salida), introduciendo la sonda 3 cm en la dispersión proteica; para controlar el aumento de temperatura y con esto evitar desnaturalización proteica inducida por calor los parámetros empleados se empleó un baño de recirculación digital Polyscience AD07R20 empleando agua destilada como fluido de enfriamiento. El arreglo del sistema de tratamiento USP se muestra en la Figura 15.

Asimismo, la potencia efectiva de los tratamientos USP aplicados se calculó a través de un método calorimétrico (Torkamani *et al.*, 2014), empleando la Ec. 1:

$$P_n = m_n C_p \left(\frac{dT}{dt} \right) \quad (\text{Ec. 1})$$

Dónde:

P_n = Potencia efectiva en W

m_n = la masa utilizada en el tratamiento, en kg

(dT/dt) = diferencial tiempo/temperatura para cada tratamiento de sonicación

C_p = calor específico para la muestra en J/ (kg °C).

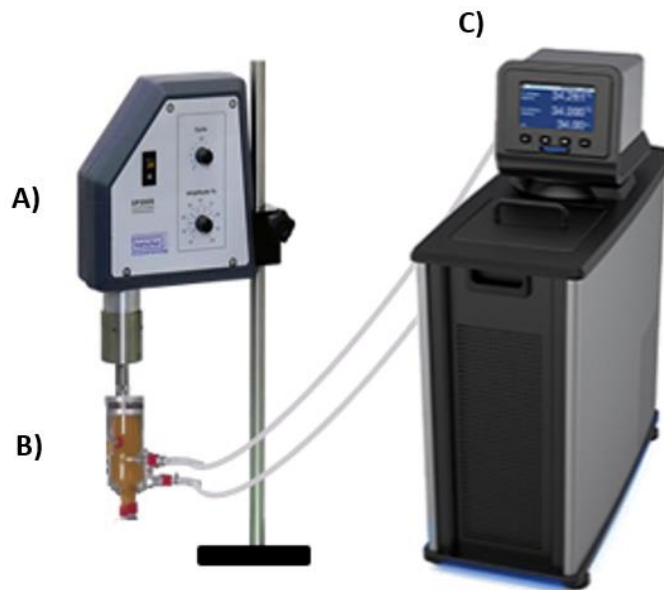


Figura 15. Arreglo de equipos para el proceso por ultrasonido de potencia. A) Procesador ultrasónico, B) reactor encaquetado y C) baño recirculador

El C_p se calculó con los datos de composición proporcionados por el proveedor, empleando la ecuación de Choi y Okos (Singh & Heldman, 2009) (Ec. 2):

$$C_p = \sum_{i=1}^n C_{pi} X_i \quad (\text{Ec. 2})$$

Donde:

C_{pi} : Calor específico para el componente i

X_i : Fracción peso del componente i

Los calores específicos para cada uno de los componentes del WPI se determinaron mediante las Ecuaciones 3-7 (Singh & Heldman, 2009) utilizando la temperatura promedio (T) registrada en cada tratamiento:

$$Cp_{\text{Proteína}} = 2.0082 + 1.2089 \times 10^{-3} T - 1.3129 \times 10^{-6} T^2 \quad (\text{Ec. 3})$$

$$Cp_{\text{Grasa}} = 1.9842 + 1.4733 \times 10^{-3} T - 4.8008 \times 10^{-6} T^2 \quad (\text{Ec. 4})$$

$$Cp_{\text{Lactosa}} = 1.5488 + 1.9625 \times 10^{-3} T - 5.9399 \times 10^{-6} T^2 \quad (\text{Ec. 5})$$

$$Cp_{\text{Cenizas}} = 1.0926 + 1.8896 \times 10^{-3} T - 3.6817 \times 10^{-6} T^2 \quad (\text{Ec. 6})$$

$$Cp_{\text{Agua}} = 4.1762 - 9.0864 \times 10^{-5} T + 5.4731 \times 10^{-6} T^2 \quad (\text{Ec. 7})$$

3.2.4 Pruebas preliminares de gelificación con grenetina

Las pruebas preliminares desarrolladas tuvieron la finalidad de establecer una metodología de elaboración de geles concreta y confiable en función del tipo de grenetina a ocupar; los parámetros adecuados de elaboración del gel involucran diversos factores incluyendo el punto de temperatura adecuado que propicia la activación de la grenetina, la dureza del gel y los parámetros de apreciación visual de un gel estándar; a su vez era necesario que el método implementado permitiera obtener datos replicables tanto durante la elaboración como durante el almacenamiento de los geles como es sugerido por Mleko & Foegeding (2000). La temperatura está directamente asociada con las tendencias reológicas ya que las fuerzas hidrofóbicas de la proteína son responsables de la gelación. De acuerdo con lo anterior se consideraron dos metodologías alternas de preparación de geles que diferían principalmente en la concentración de grenetina requerida para elaborar geles estándar y en la firmeza resultante. Una medición precisa de la firmeza del gel es esencial, pues los diversos tipos de grenetina se venden con base en esta propiedad; la firmeza deseada define la concentración de grenetina empleada y el método de elaboración apropiado.

El primer método probado fue el estándar establecido por el Gelatin Manufacturers Institute of America (GMIA, 2012) para determinación de firmeza (Bloom) el cual emplea una concentración de grenetina de 6.67% w/w (peso/volumen). Por su parte, el segundo método uso una concentración de 7.5% w/w de

grenetina que corresponde a aquella establecida en las instrucciones de fabricación proporcionadas por el fabricante (Coloidales Duche, S.A. de C.V, México). Dispersiones acuosas preparadas a ambas concentraciones fueron sometidas a diferentes temperaturas de hidratación de la grenetina de acuerdo con el diagrama de deterioro de firmeza de geles en función de la temperatura a la que se activa la grenetina mencionado anteriormente. Para determinar la temperatura óptima las dos concentraciones de grenetina fueron sometidas a calentamiento a tres temperaturas que no comprometieran la desnaturalización del colágeno. El rango de temperatura empleado se fijó considerando la temperatura mínima de preparación de muestras de grenetina (45°C), definida como punto de activación de colágeno por Walkenström *et al.* (1994) mientras que el límite superior fue de 65°C, temperatura establecida por GMIA (2012) como límite de desnaturalización y pérdida de fuerza en los geles; la temperatura intermedia considerada fue de 55°C.

Las dispersiones fueron hidratadas y sometidas a agitación durante 10 min para posteriormente tratarlas térmicamente durante 5 min a 110 ciclos de agitación en un baño de agitación recíprocante Polyscience (WDS 28A; Illinois, EUA) (Fig. 16) a las temperaturas previamente mencionadas. Estas muestras fueron posteriormente enfriadas a 10°C por 24 h para permitir la formación del gel. Todos los experimentos se realizaron por duplicado. Mediante el análisis de los resultados obtenidos se estableció una temperatura de proceso y una concentración de grenetina específicas, mismas que fueron empleadas en el resto de los experimentos del proyecto.

3.2.5 Pruebas de gelificación en sistemas mixtos grenetina con WPC

El proceso de gelificación de los aislados de proteína de suero es un equilibrio de la repulsión y atracción entre proteínas moléculas globulares como β -LG, cuando la concentración de proteína se mantiene constante, pH o la fuerza iónica conduce a cambios de geles su microestructura, algunas propiedades físicas y a la capacidad de retención de agua Fu & Nakamura (2017), por ello las formulaciones mixtas deben ser sometidas a una metodología concreta para poder compararse entre ellas de manera correcta.



Figura 16. Baño de agitación recíprocante Polyscience

Empleando la metodología descrita por Pang *et al.* (2014) y Cameron *et al.*, (2008) se establecieron los procedimientos para la formación de los sistemas gelificantes con WPC sonicada, como se describió con anterioridad. La concentración empleada para todas las pruebas fue de 6.67% de grenetina que se mantuvo fija por dos concentraciones de WPC al 1% (p/p) y al 5% (p/p); a cada una de estas concentraciones se realizaron experimentos independientes con 4 niveles de tiempos de sonicación: 0, 2, 4 y 6 min de proceso ultrasónico. En la Tabla 8 se muestran las variables empleadas en el experimento y sus niveles respectivos.

Tabla 8. Variables de proceso en la formación de los geles mixtos

Concentración Grenetina (% w/w)	Concentración WPC (% w/w)	Tiempos de sonicación (min)	No. de código de experimento
6.77	1	0	1
		2	2
		4	3
		6	4
	5	0	5
		2	6
		4	7
		6	8

3.2.6 Determinación de cambios estructurales de WPC sometido a USP

Como parte de las pruebas preliminares, se planteó la posibilidad de tratar con USP la mezcla de grenetina-WPC, con la intención de medir el efecto de esta tecnología sobre ambas estructuras. Sin embargo, al realizarse este ejercicio, se notó que, en la mayoría de los casos, los geles formados carecían de firmeza y resultaba imposible determinar su firmeza por medios instrumentales. Esto pudo deberse a la desnaturalización de la grenetina por medio de la cavitación del USP, rompiendo esta estructura e impidiendo la formación del gel en el sistema mixto, por lo que esta idea fue descartada de manera categórica desde el principio de la investigación.

La determinación de modificaciones estructurales de proteínas séricas en WPC se llevó a cabo por medio de un análisis de espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR). Esta técnica detecta la vibración de los enlaces químicos presentes en la muestra, que al hacer incidir energía de radiación en la longitud de onda que corresponde al espectro electromagnético en la sección del infrarrojo, arroja respuesta óptica de la misma como son la absorbancia, reflexión, transmisión, dispersión o fluorescencia. Mediante la aplicación de esta técnica analítica podemos visualizar la estructura secundaria de la proteína y observar cambios en ella. Para esto, se utilizó un espectrómetro marca Bruker® modelo Vertex 70 (Figura 17) en el modo de Reflectancia Total Atenuada (ATR por sus siglas en inglés). Para el análisis, se colocó una alícuota de 10 μL de cada una de las muestras y se colectó el espectro dentro de la región del infrarrojo mediano entre $4000\text{-}650\text{ cm}^{-1}$ realizando mediciones por muestra, después del proceso de sonicación y tras realizar las dispersiones de éstas con la grenetina. Posteriormente, los datos espectrales de las muestras fueron analizados mediante el software OriginPro 8.0 (OriginLab Corp; Northampton, MA, E.U.A) para evaluar las modificaciones que sufrieron los grupos funcionales en las estructuras secundarias del WPC y otras modificaciones provocadas por el USP.

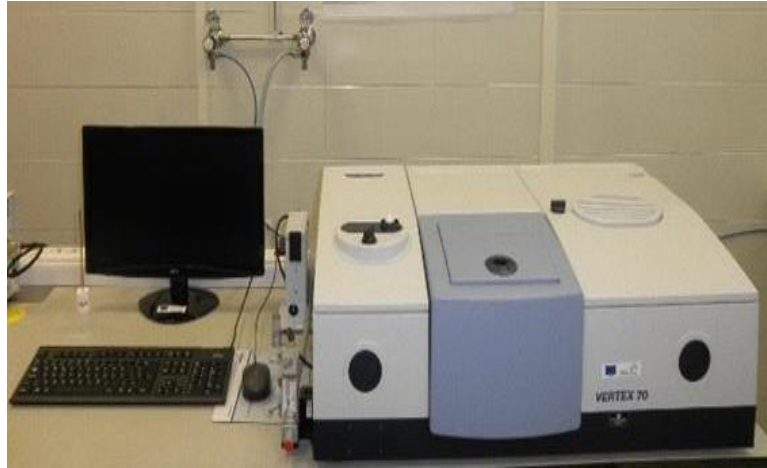


Figura 17. Espectrofotómetro de FTIR (Bruker)

3.2.7 Medición de propiedades en geles

Todas las pruebas de gelificación se llevaron a almacenamiento de acuerdo con las reglamentaciones establecidas por el GMIA (2012). Previo a las pruebas realizadas, los geles se mantuvieron a una temperatura de $4^{\circ}\text{C}\pm 2$ por un mínimo de 24 h.

3.2.7.1 Firmeza de gel (índice Bloom)

En los alimentos multi componentes como coloides poliméricos (proteínas y polisacáridos) la concentración y estado de proteínas o polisacáridos se relacionan directamente con la textura de los alimentos Fu & Nakamura (2017), por ello la fuerza del gel refleja la estabildades físicas y químicas de la estructura formada cuando el sistema es compuesto por diferentes factores, así como cuando son sometidos a diferentes metodologías para su elaboración. Para medir la firmeza de gel, se realizó la prueba conocida como índice de Bloom, se utilizó un texturómetro Texture Technologies, TAXT-Plus (Surrey, Reino Unido) con una sonda estándar de 0.5 ± 0.001 in de diámetro y a una profundidad de 4 mm en la superficie del gel, de acuerdo con el procedimiento oficial. La velocidad de inmersión fue de 1 mm/s con una distancia de compresión de 10 mm a la muestra, la prueba se realizó a temperatura ambiente (20 ± 2 °C). El análisis se realizó por triplicado y se registró el número de Bloom para determinar la temperatura a la que el gel era más firme.



Figura 18. Texturómetro Texture Technologies TAXT-Plus

La firmeza de los nuevos geles adicionados con WPC sonicado, también fue sometida a la prueba del número de Bloom a las condiciones de operación idénticas a las de las pruebas preliminares, con ello se planeó obtener la estabilidad de estas en función del tiempo de sonicación y concentración de WPC añadido, las muestras se verificaron con duplicado y se tomó el valor de Bloom en fuerza G.

Las condiciones de análisis textural empleadas para esta medición fueron las siguientes: sonda estándar de 0.5 +/- 0.001 pulgadas de diámetro y a una profundidad 4 mm en la superficie.

3.2.7.2 Prueba de estrés mecánico

Las pruebas de estrés mecánico se realizaron con el mismo texturómetro TAXT-Plus, salvo con diversas modificaciones de parámetros en las mediciones ya que la prueba de estrés mecánico se fundamenta en la capacidad de la muestra para resistir una carga mecánica de mayor área sobre la matriz alimenticia a una fuerza constante y un tiempo determinado.

Las condiciones de análisis textural empleadas para esta medición fueron las siguientes: sonda estándar de 10 cm +/- 0.001 de diámetro bajo una presión la muestra de 5 g constantes, un tiempo de suspensión de fuerza de 120 s y a una distancia de 1.870 mm y una aproximación de 0.25 mm/s.

3.2.7.3 Capacidad de retención de agua

La capacidad de retención de agua (CRA), es la afinidad que tiene la naturaleza de una proteína para absorber agua y retenerla de acuerdo con su afinidad iónica de la matriz. Esta propiedad es primordial en matrices como geles o dispersiones ya que la composición de los geles es mayor de 90% de agua.

Entre los factores que pueden afectar la CRA se incluyen la concentración proteica, el pH, la fuerza iónica, la presencia de otros componentes como polisacáridos, lípidos y sales, y las condiciones de almacenamiento (Zayas, 1996). Procesos como el ultrasonido pueden afectar estructuralmente a los componentes que conforman el gel y/o a las interacciones entre los mismos.

Para la determinación de la CRA se realizaron dos tipos de pruebas; en la primera se determina el porcentaje de humedad final en geles por medio de una prueba gravimétrica. La segunda de ellas consiste en una prueba de centrifugado para conocer la pérdida de agua del gel por sinéresis. Las dos pruebas en cuestión se describen a continuación.

- a) Prueba gravimétrica: Se emplearon geles preparados de acuerdo con la metodología anteriormente descrita; posteriormente se dejaron templar hasta alcanzar temperatura ambiente. Para la determinación de porcentaje de humedad, se utilizó un horno convencional de convección (Binder, Alemania) y se usaron charolas de aluminio que anteriormente habían sido puestas a peso constante a 105°C por 24 h; una vez colocada la muestra dentro de la cámara, se calculó la concentración de humedad del gel por la pérdida de peso tras 4 h de secado a 105°C.

- b) Prueba de sinéresis: Se pesaron 3 g de muestra en un tubo Falcon de 15 mL y se centrifugó a 4500 rpm, 10 °C por 40 min en una centrífuga refrigerada Hettich (E.U.A). Una vez terminado el tiempo indicado, se midió el volumen del exudado (mL). Para la determinación de CRA se utilizó la ecuación 8:

$$CRA = \left(\frac{M * m_o}{100} - E \right) \left(\frac{100}{M - E} \right) \quad (\text{Ec. 8})$$

Dónde: M = Peso de la muestra antes de centrifugar
 E = Masa de exudado
 m_o = % inicial de contenido de humedad de la cuajada (base húmeda).

Cabe hacer notar que después de 3 días de almacenamiento, no se observaron signos de sinéresis ni otros cambios apreciables de apariencia en los geles elaborados; esto está en concordancia con trabajos previos (Walkenstrom & Hermanson, 1994) donde, al elaborar geles mixtos de proteínas séricas adicionadas con gretina, se observó que la red de proteínas séricas no sufría alteración por la presencia del otro polímero.

3.2.8 Pruebas reológicas en geles.

Para las pruebas de viscosidad, se utilizó un Reómetro marca Brookfield, modelo RST-CP, EU, se colocó 1 mL de la dispersión; los parámetros para la medición fueron los siguientes: velocidad 100 rpm durante 2400 s, tomando 10 puntos de medición a temperatura constante $25 \pm 1^\circ\text{C}$; de acuerdo con resultados preliminares, se determinó la viscosidad a 150 s de proceso.

Por su parte, la tixotropía de los geles fue medida en un reómetro de rotación marca Brookfield modelo RST-CPS empleando el módulo de sólidos suaves; los geles fueron refrigerados 24 h antes de su uso y la medición se realizó a temperatura ambiente ($16 \pm 2^\circ\text{C}$) durante 180 s para cada muestra, con 90 s de bloque ascendente y descendente. El equipo operó a un esfuerzo constante fijo de 8 Pa evaluando la deformación del gel para el posterior cálculo de los bloques ascendentes y descendentes para determinar el coeficiente de tixotropía general de las muestras (Pa/s)



Figura 19. Reómetro Brookfield RST-CPS

3.2.9 Microscopía diferencial de barrido

Para determinar la microestructura de los geles mixtos de grenetina y WPC se empleó un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FE-SEM) Tescan Maia3 de ultra alta resolución (Brno, República Checa) (Figura 20); previo a su observación, los geles se almacenaron en un ultracongelador ScienTemp 43 (Adrian, Michigan, EUA) a -40°C por 48 h; posteriormente fueron colocados en una liofilizadora Freezone Labconco (Kansas City, MO, EUA) programada a 0.135 mPa; las muestras fueron deshidratadas por 24h y conservadas en bolsas de vacío hasta su observación. El FE-SEM operó a un voltaje de aceleración de 2.0 kV con una magnificación del 1000x.



Figura 20. FE-SEM Tescan

3.2.10 Diseño experimental

Para la Etapa 1 se llevó a cabo un diseño completamente aleatorizado con dos variables independientes. La concentración de grenetina (variable 1) se probó a dos niveles diferentes (6.77 y 7.5%) de acuerdo con lo explicado en la Sección 4.2.4. Asimismo, se emplearon tres niveles (45°C, 55°, 65°C) de temperatura de gelificación (variable 2). La variable dependiente fue el grado de firmeza de gel (Bloom).

La Etapa 2, al tratarse de una verificación de parámetros de formulación y proceso en geles mixtos se realizó variando la razón de grenetina:WPC (dos niveles, 6.77:1; 1.35:1) para confirmar si este rango de valores de concentración de los polímeros eran apropiados para la elaboración de geles con niveles medibles de firmeza a través de la prueba de Bloom.

Para la Etapa 3 se implementó nuevamente un diseño completamente aleatorizado con dos variables independientes: razón de grenetina:WPC (dos niveles, 6.77:1; 1.35:1) y tiempo de sonicación (cuatro niveles: 0, 2 4 y 6 min). Las variables dependientes fueron: viscosidad de gel, tixotropía, microestructura de gel por SEM, FTIR, CRA, pérdida de estrés mecánico y firmeza de gel (Bloom).

Todas las pruebas anteriores se realizaron por duplicado y las mediciones de las variables de respuesta se llevaron a cabo por triplicado. Los resultados se analizaron por modelo lineal general (etapas 1 y 3) o ANOVA de una vía (etapa 2) con nivel de significancia de $\alpha=0.05$ y realizando comparaciones entre medias con el método de Tukey Minitab 17.0 (Minitab Inc., State College, PA, USA).

4. Resultados

4.1 Resultados pruebas preliminares

De acuerdo con los objetivos específicos se buscó establecer una metodología de procesamiento estándar adecuada para la formación de geles de grenetina con base en dos variables principales que permitieran la formación y medición de sus propiedades: la temperatura de activación de la grenetina y la concentración de grenetina en las soluciones.

La firmeza de geles expresada en Bloom para las dos formulaciones establecidas (grenetina al 7.5% (p/p) y al 6.77% (p/p), correspondientes a las concentraciones de proteína sugeridas por el fabricante -Coloides Duche- y por la GMIA, respectivamente) y a tres temperaturas de activación de grenetina se presenta en la Tabla 9.

Tabla 9. Índice de Bloom en geles de grenetina pura*

Concentración Grenetina (% w/w)	Temperatura de activación de grenetina (°C)		
	45	55	65
6.77	364±4.5 ^{Aa}	319±10.7 ^{Ab}	329±13.7 ^{Ab}
7.5	285±8.8 ^{Ba}	250±17.2 ^{Bb}	312±17 ^{Aa}

*N= 4

^A Mayúsculas diferentes en la misma columna indican diferencia significativa (p<0.05)

^a Minúsculas diferentes en la misma columna indican diferencia significativa (p<0.05)

El índice de Bloom es un importante parámetro fisicoquímico que refleja la cantidad de contenido de triple hélice de gelatinas y su firmeza resultante (Chou *et al.*, 2016). Como puede observarse en la tabla previa, los valores más altos de firmeza de gel para cada formulación se presentaron a temperaturas de activación de 45°C para la de 6.77% de grenetina y a 65°C para aquella de 7.5% de grenetina; se puntualizan estos valores dado que se deseaba asegurar el mayor nivel de firmeza en los geles de grenetina pura, considerando que la adición de otros

hidrocoloides se sabe que puede generar una disminución en la magnitud de dicho parámetro por tratarse de polímeros distintos, los cuales no siempre presentan un comportamiento sinérgico, si no que en ocasiones pueden exhibir un comportamiento antagónico (Morris, 1986). También es notorio que, en términos generales, los geles formados con 6.67% de grenetina muestran una dureza significativamente mayor en comparación con sus contrapartes de mayor concentración de grenetina, en particular los formados con proteína activada a 45° y 55°C; el tratamiento a 65°C también exhibe un comportamiento similar pero no existe una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los valores de firmeza a distintos grados de concentración de grenetina; este resultado es similar a lo reportado por Osorio *et al.*, (2007) donde se afirma que tanto la temperatura de fusión como la de gelificación en estos sistemas aumentan con la concentración de grenetina a diversos grados de concentración de hidrocoloide y a valores de pH en el rango de 3 a 6; estos autores concluyeron que este efecto se puede atribuir a que a mayores concentraciones de grenetina en el sistema requieren de una mayor aplicación de energía para lograr la activación de la misma. Dado que la mayor firmeza en el sistema con alta concentración de grenetina se presenta a 65°C se optó por trabajar con la formulación del GMIA (2012) en el remanente de esta investigación, debido a que la temperatura de activación requerida para maximizar la firmeza de gel (45°C) se encuentra muy por debajo de aquella reportada como inicial para observar cambios conformacionales en proteínas séricas (65°C) y podría comprometer su funcionalidad (Walstra *et al.*, 2006). Adicionalmente, es importante hacer notar que la formulación recomendada por el fabricante (7.5% p/p) y activada a 45°C presentó un valor de índice de Bloom (285 ± 8.8) que no difería significativamente ($p < 0.05$) del indicado en la etiqueta del producto empleado (290).

4.2 Pruebas de gelificación en sistemas mixtos grenetina con WPC

Las pruebas de gelificación subsecuentes (ver Etapa 2 del plan de investigación) tuvieron la finalidad de corroborar la eficacia de la metodología establecida en las investigaciones de Pang *et al.* (2014) y de Cameron *et al.* (2008),

en las cuales se elaboraron geles mixtos de grenetina:WPC a diferentes razones, buscando que la proporción de WPC usada no afectara el proceso de formación de gel de manera importante. Los geles mezclados conteniendo dos o más sustancias gelificantes se pueden clasificar en tres categorías: interpenetrados, acoplados y de redes de fases separadas; dependiendo de la proporción de biopolímeros y técnica de elaboración, una misma mezcla de dos gelificantes puede producir diferentes tipos de geles (Turgeon y Bealieu, 2001). Con base en la metodología desarrollada en las pruebas preliminares y de acuerdo con los resultados de Pang *et al* (2014) se establecieron los límites superior e inferior de concentración de WPC en 1% p/p y en 5% p/p; por su parte, de acuerdo con los resultados de la etapa previa, la proporción de grenetina se mantuvo fija al 6.67%. Mezclas de hidrocoloides en los porcentajes indicados fueron empleadas para formar geles de acuerdo con la metodología anteriormente descrita en pruebas preliminares para corroborar que la gelificación se llevaba a cabo de manera apropiada, sin interferencia por la presencia de WPC, a ambas concentraciones exploradas. Los resultados obtenidos (ver Tabla 11) demostraron que la adición de WPC, si bien produjo una reducción significativa en el nivel de firmeza de los geles en comparación a la observada en las pruebas de la Etapa 1 (364) éstos se encontraban dentro de un rango de valores de índice de Bloom de otras grenetinas comerciales. Una revisión de diversas grenetinas disponibles en el mercado nacional permitió observar que para las 8 principales marcas comercializadas en México el rango de Bloom declarado en etiqueta fue de un mínimo de 230 a un máximo de 315; así, marcas selectas fabrican productos con Bloom en el rango de 230-315 (Progel®); de 260-290 (Coloides Duche®) y de 250-280 (Regia®) por citar algunas. Como puede observarse en la Tabla 11, los valores del Bloom de los geles de grenetina añadidos con WPC (a 2 concentraciones) se encontraban dentro del rango de firmeza de gel de los productos comerciales citados, por lo que no fue necesario realizar ajustes en la formulación o en su proceso de elaboración. Por otra parte, se puede apreciar que el valor de dureza de gel se redujo significativamente al incrementarse la concentración de proteína de suero. Así, los geles al 5% de WPC exhibieron una firmeza promedio de gel 11.6% menor que la observada en geles con 1% de WPC

((Bloom 258 vs Bloom 288). Diversos trabajos han explorado cambios en la gelificación de grenetina con otros hidrocoloides. Somboon *et.al.* (2013) usando gelatina de pescado y agar como agentes gelificantes mixtos de gelificación concluyeron que las propiedades de una dispersión de 1% de agar pueden ser significativamente modificadas por la adición de gelatina de pescado (0-25%). Por su parte, Pang *et al.*, (2014) destacan que la concentración de grenetina, el pH y la adición y de proteínas de leche afectan el comportamiento de gelificación de gelatina; mediante la manipulación de estos tres factores se pueden modular las propiedades de geles mixtos de gelatina y proteínas lácteas para que exhiban el nivel de firmeza deseado. Martin *et al* (2016) mencionan que los geles mixtos de proteínas de diferente origen presentan propiedades complejas que deben analizarse cuidadosamente, pues dependiendo de los tipos de biopolímeros empleados puede presentarse separación segregativa de fases, lo cual induce la formación de redes discontinuas bifásicas que afectan las propiedades texturales de los geles.

Tabla 10. Índice de Bloom en mixtos elaborados con WPC/ y grenetina*

Concentración WPC (% p/p)	Formación de gel	Bloom
1	Si	288 ± 6.1 ^A
5	Si	258 ± 8.6 ^B

*N= 4

^A Mayúsculas diferentes en la misma columna indican diferencia significativa (p<0.05)

Los geles con 1 y 5% de WPC añadida (ver Figura 21) mostraron niveles de estabilidad y firmeza similares a los de una gelatina comercial y no exhibieron separación de fases al día 1 y durante 3-4 días de almacenamiento refrigerado; por ello, se consideró adecuado mantener el uso de estas dos concentraciones de WPC para el resto de la investigación.

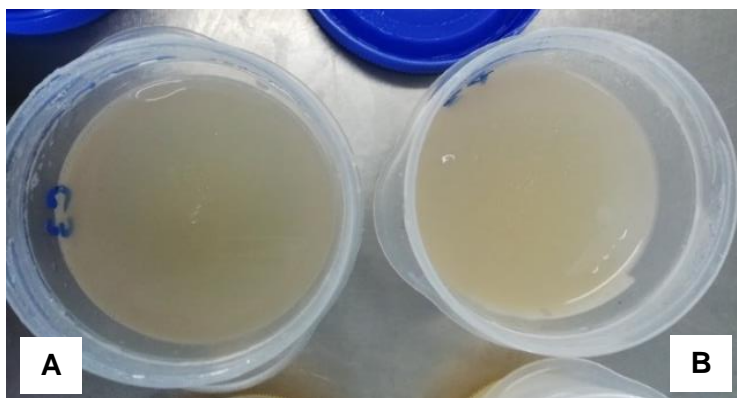


Figura 21. Geles de de grenetina y WPC al 1% (A) y al 5% (B)

4.3 Pruebas en geles mixtos de grenetina con WPC pretratada por USP

4.3.1 Calculo de la potencia efectiva del ultrasonido

Se estimó el calor específico (C_p) de la dispersión de composición conocida (1, 5% WPC) y tratada a temperatura ambiente mediante la ecuación de Choi y Okos (Ec. 2) para posteriormente determinar la potencia efectiva de los tratamientos USP aplicados a través del método calorimétrico de Torkamani *et al.*, 2014 (Ec. 1). Los resultados de estos cálculos se presentan en la Tabla 11. La potencia real efectiva de las dispersiones al 1 y 5% no varió, presentando una magnitud de 96.64 W; este resultado se asemeja al reportado por Armenta-Ortega (2016) quien reportó un valor de potencia efectiva de 88.5 W para una dispersión de WPC de 15 % de concentración, correspondiente a un valor de C_p de 3.886 KJ/Kg°C; en ambos casos, la mayor concentración de WPC reduce el valor de C_p (el agua es el principal contribuyente para incrementar su valor) y esto redunde en una eficiencia de conversión de potencia ultrasónica ligeramente menor.

Tabla 11. Potencia efectiva y CP de soluciones de sistemas mixtos de WPC

Concentración WPC (% w/w)	Potencia efectiva del USP (Kwa/min)	
	C_p	Q (W)
1	4.164	96.64
5	4.076	94.60

La potencia efectiva comparada con la potencia nominal de salida de este tipo de ultrasonicador es considerablemente menor; de acuerdo con el fabricante, ésta es de 400 W cuando opera a una amplitud del 100%. Sin embargo, trabajos previos indican que la potencia nominal de este tipo mismo modelo de sonicador es usualmente menor; en este sentido, Gallegos-Pineda (2015) reporta una potencia nominal real de 344 ± 17 W; tomando en cuenta este valor, se observa que en el presente trabajo hay una pérdida considerable de energía (de 70.7 a 73.5%) en forma de calor.

4.3.2 Capacidad de retención de agua

El tipo de interacción y la movilidad del agua como molécula en sistemas acuosos como los geles son relevantes pues ayudan a definir factores de calidad sensorial y tecnológica y de estabilidad de los productos alimenticios; Hinrichs *et al.* (2003) estudiaron los cambios en capacidad de retención (CRA) de agua de geles elaborados con proteínas lácteas, incorporando otros hidrocoloides; estos autores hacen énfasis en que las interacciones de hidrocoloides con proteínas lácteas son complejas, pueden incluir fenómenos como miscibilidad y coacervación y, en última instancia, pueden alterar las características de los geles, los cuales pueden exhibir defectos como sinéresis y textura arenosa, entre otros. Los resultados de las pruebas de CRA en sistemas mixtos grenetina: WPC pretratada por USP se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12. Capacidad de retención de agua en geles mixtos pretratados por USP % de agua exudada

Concentración WPC (% w/w) en sistemas mixtos grenetina:WPC	USP (min)			
	0	2	4	6
1	0.11±0.0 ^{Aa}	0.09±0.0 ^{Aa}	0.09±0.0 ^{Aa}	0.09±0.0 ^{Aa}
5	0.09±0.0 ^{Ba}	0.07±0.0 ^{Ba}	0.08±0.0 ^{Ba}	0.08±0.0 ^{Ba}

*N= 4

^A Mayúsculas diferentes en la misma columna indican diferencia significativa ($p < 0.05$)

^a Minúsculas diferentes en la misma fila indican diferencia significativa ($p < 0.05$)

La CRA de geles mixtos de WPC sonicada con gelatina sólo exhibió una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las concentraciones de WPC 1% y 5% a los mismos tiempos de sonicación, pero no a diferentes tiempos de sonicación a la misma concentración proteica, demostrando que los valores exhibidos por esta propiedad están en función del contenido de proteína de la mezcla y no de la intensidad del proceso ultrasónico. De acuerdo con Mao *et al.* (2011) la evaluación de la CRA en geles es de vital importancia para determinar su estabilidad; estos investigadores evaluaron la CRA de geles de goma gellan preparados a diferentes concentraciones de calcio y almacenados bajo condiciones de refrigeración (4°C) reportando una variación mínima tras 4 meses con pérdidas de agua del 1-2% (p/p) durante independientemente de la concentración de calcio empleada.

4.3.2 Índice de Bloom

La grenetina y las proteínas presentes en el WPC son proteínas globulares, capaces de formar geles cuando se encuentran a concentraciones suficientemente altas y, dependiendo de su proporción o si se desnaturalizan o gelifican previamente, es posible obtener diferentes microestructuras y respuestas reológicas de las mismas (Martin *et al.*, 2016). En el presente proyecto, se exploraron pretratamientos ultrasónicos en dispersiones de WPC que, como se ha reportado en trabajos previos, pueden generar una desnaturalización parcial de éstas y, con ello, propiciar cambios microestructurales que, a su vez, impacten en las características estructurales y la funcionalidad de los geles formados. Los resultados del índice de Bloom para geles mixtos de grenetina con WPC previamente ultrasonicada se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13. Índice de Bloom (g) en sistemas mixtos tratados por ultrasonido

Concentración WPC (% w/w) en sistemas mixtos grenetina:WPC	USP (min)			
	0	2	4	6
1	290±2.4 ^{Aa}	264±12.2 ^{Ab}	222±18.0 ^{Ac}	253±17 ^{Ab}
5	258±3.4 ^{Ba}	230±3.7 ^{Bb}	197±9.8 ^{Ac}	225±9.1 ^{Bb}

*N= 4

^A Mayúsculas diferentes en la misma columna indican diferencia significativa ($p < 0.05$)

^a Minúsculas diferentes en la misma fila indican diferencia significativa ($p < 0.05$)

Los resultados de las pruebas de Bloom en los geles mixtos con WPC pretratado por USP muestran una disminución significativa ($p < 0.05$) en el grado de firmeza de los geles al incrementarse el porcentaje de WPC de 1 a 5% para todos los tratamientos realizados con y sin aplicación previa de US, con excepción del tiempo de proceso ultrasónico de 4 min (donde también se observó una reducción, pero no significativa). Estos resultados concuerdan con lo obtenido en la sección previa, donde se atribuyó este efecto de reducción en firmeza de gel a una posible falta de afinidad entre las proteínas empleadas, donde la concentración de 1% de WPC pudo establecer interacciones estables con la grenetina; mientras que, al incrementarse la concentración del WPC al 5%, la imposibilidad de formar interacciones entre todas las proteínas del WPC y la grenetina generó un ablandamiento significativo de los geles. Por otra parte, se observó una disminución significativa ($p < 0.05$) en el grado de firmeza al incrementarse el tiempo de sonicación hasta 4 min, de manera independiente de la concentración de WPC. Asimismo, para ambas concentraciones de WPC existe un incremento de la firmeza del gel al aumentar el tiempo de tratamiento ultrasónico a 6 min, regresando la firmeza a una magnitud similar a la observada en los tratamientos de 2 min de USP. Chandrapala *et al* (2011) mencionan que la sonicación de dispersiones de WPC reconstituido altera el comportamiento térmico de las proteínas, recalcando que es posible que una sonicación prolongada derive en la reagrupación de las mismas y provocando una reconstrucción estructural que impacta en la firmeza final del gel. Esto podría explicar el repunte de índice de bloom en ambas concentraciones a 6 min con respecto a las muestras elaboradas con dispersiones pretratadas por 4 min a ambos niveles de concentración. Jambrak *et al.* (2014) reportan que tratamientos ultrasónicos de potencia selectos (20 KHz, potencia efectiva de 43-48 W/cm²) son capaces de disminuir el tamaño de partícula y el peso molecular de las proteínas séricas y de incrementar el área superficial de las mismas; los cambios en estas propiedades implican modificaciones en la funcionalidad de estas proteínas y en el tipo de interacciones que pueden establecer con otras proteínas, como la grenetina y con esto puede existir un reforzamiento estructural de la matriz.

4.3.3 Resultados prueba de estrés mecánico

Las propiedades reológicas son una herramienta fundamental en la caracterización de sólidos blandos como los obtenidos en el presente estudio. Las propiedades reológicas en geles alimenticios se determinan usualmente a través de pruebas de relajación al esfuerzo con la intención de comprobar si existe un entrecruzamiento estructural de los componentes incluidos en la mezcla como lo establece Tang *et al.*, (1999). Los resultados de las pruebas de estrés mecánico de los geles mixtos de WPC: grenetina se enlistan en la Tabla 14.

Tabla 14. Pruebas de estrés mecánico (g) en geles mixtos WPC con y sin tratamiento ultrasónico

Concentración WPC (% w/w) en sistemas mixtos grenetina:WPC	USP (min)			
	0	2	4	6
1	2.9±0.2 ^{Aa}	5.1±0.3 ^{Ab}	3.4±0.2 ^{Aa}	5.1±0.1 ^{Ab}
5	2.7±0.2 ^{Aa}	3.5±0.2 ^{Bb}	2.6±0.2 ^{Ac}	3.5±0.2 ^{Bb}

*N= 4

^A Mayúsculas diferentes en la misma columna indican diferencia significativa ($p < 0.05$)

^a Minúsculas diferentes en la misma fila indican diferencia significativa ($p < 0.05$)

Los resultados mostrados de la prueba de relajación al esfuerzo no exhiben una diferencia significativa ($p < 0.05$) en geles no ultrasonificados a ambas concentraciones de WPC (2.9, 2.7 g para concentraciones de WPC de 1% y 5%, respectivamente) lo cual implica que no existe un efecto en los geles elaborados con WPC en función de la concentración proteica. Por el contrario, la aplicación de tratamientos selectos de USP al WPC produce incrementos significativos en los valores de resistencia con relación a los obtenidos en geles no sonicados. En todos los casos, las pruebas de estrés mecánico con geles al 1% de WPC presentaron valores significativamente ($p < 0.05$) mayores que aquellos obtenidos con muestras al 5% de WPC. Por otra parte, los tratamientos de USP a 2 y 6 min presentaron valores de resistencia similares a ambas concentraciones proteicas, (5.1 g) con 1% WPC y 3.5 g para 5% WPC. En cambio, a los 4 min de sonicación se muestra una disminución de la resistencia con respecto a la determinada a 2 y 6 min de USP (33% para los geles al 1% WPC y 25% para los geles al 5%WPC). Estas magnitudes

de valores de resistencia (3.4 g para 1%; 2.6 g para 5%) no exhibieron diferencias significativas con aquellos reportados en geles no sonicados a sus respectivas concentraciones proteicas. Zhao *et al.* (2010) realizaron pruebas de relajación al esfuerzo con hidrogeles de alginato, reportando que, dependiendo del tipo de enlaces cruzados formados, éstos pueden disociarse y volverse a formar en diversos lugares de la matriz. De acuerdo con esto, es posible que exista una falta de asociación y afinidad estructural en los geles sonicados a 4 min a ambas concentraciones, debido al grado de desnaturalización parcial del WPC. Por otro lado, los geles mixtos sonicados a 2 y 6 min mostraron una mejor resistencia al estrés mecánico, lo cual puede atribuirse al entrecruzamiento de las estructuras poliméricas por efecto de la sonicación, permitiendo que sean geles más estables ante la manipulación mecánica a largo plazo; asimismo, el reordenamiento molecular provocado por la cavitación y su efecto sobre grado de desnaturalización del WPC pudieron afectar este proceso. El hecho de que al incrementarse el tiempo de proceso a 6 min se revirtieran los cambios texturales en geles observados a los 4 min de sonicación puede indicar que la desnaturalización proteica y el reordenamiento estructural subsecuente son reversibles. Tang *et al.* (1999) mencionan que mayores índices de relajación al esfuerzo mecánico están asociados con un mayor tamaño de poro en la matriz y que este equilibrio se refleja en el grado de entrecruzamiento de la red polimérica, considerando que, bajo las condiciones de mejor desempeño, el sistema permite un reordenamiento estructural más eficiente de la matriz ante las fuerzas mecánicas externas.

4.3.4 Pruebas de tixotropía

El módulo tixotrópico es un análisis de sólidos blandos que surge de la capacidad de los polímeros que los conforman para adoptar estructuras ordenadas cuando se encuentran dispersos en un medio acuoso (Morris, 2013). Cuando los polímeros se asocian intermolecularmente tienden a desarrollar una estructura tridimensional y exhibir tixotropía, la cual se ve reflejada en un cambio en la viscosidad de la dispersión polimérica en función del tiempo y se caracteriza por un incremento en este parámetro cuando una dispersión permanece en reposo por un

cierto periodo de tiempo; cuando la cizalla aplicada en un sistema disperso que exhibe tixotropía excede un nivel crítico, la estructura puede romperse y la viscosidad reducirse de manera importante (Federsen & Thorp, 1993). Un valor más alto de coeficiente de tixotropía refleja que el sistema analizado requiere un mayor esfuerzo para generar su deformación. Los resultados de las pruebas de tixotropía en geles mixtos de WPC:grenetina se presentan en la Tabla 15.

Tabla 15. Tixotropía (KPa/seg) de geles mixtos de grenetina: WPC sonicada

Concentración WPC (% w/w)	USP (min)			
	0	2	4	6
1	28.6 ± 1.7 ^{Aa}	34.8 ± 1.2 ^{Ab}	25.6 ± 0.7 ^{Ac}	32.5 ± 2.9 ^{Ab}
5	21.0 ± 0.4 ^{Ba}	26.5 ± 0.2 ^{Bb}	20.6 ± 0.3 ^{Ba}	21.7 ± 2.3 ^{Ba}

*N= 2

^A Mayúsculas diferentes en la misma columna indican diferencia significativa (p<0.05)

^a Minúsculas diferentes en la misma fila indican diferencia significativa (p<0.05)

Como puede observarse en la Tabla 15, los resultados de esta prueba concuerdan con aquellos de las pruebas texturales en geles y de viscosidad en dispersiones poliméricas. Debido a que en todos los casos los geles con concentración de 1% exhibieron valores significativamente (p<0.05) más altos de coeficiente de tixotropía en comparación con todos los tratamientos a 5% WPC (control y tratamientos experimentales), esto indica que se requiere un mayor esfuerzo para deformar a los primeros, probablemente como resultado de una mayor firmeza estructural. Por otra parte, el tiempo de USP tuvo un efecto significativo sobre el coeficiente de tixotropía exhibido por los geles mixtos formados, con diferencias importantes asociadas al porcentaje de proteína sérica sonicada incorporada a la matriz. En este sentido, se observó que no existe una diferencia significativa (p<0.05) entre los tratamientos USP de 2 y 6 min a una concentración de WPC de 1%, reafirmando la tesis del reagrupamiento proteico propiciado por el tiempo prologando de USP enunciado por Chandrapala *et al.* (2011). Por otro lado, el USP de 4 min con un 1% de WPC nuevamente representó el tratamiento con menor esfuerzo de deformación requerido, encontrando evidencia de soporte adicional que a este tiempo de USP se afectan de manera

importante la organización proteica, afectando la estructura del gel y haciéndolo más débil en comparación a los obtenidos con otros tratamientos. Por su parte, el coeficiente tixotrópico de los geles con 5%WPC sonicado sólo exhibieron un incremento significativo con 2 min de USP. Mantelet *et al* (2018) describen que es posible que ocurra un proceso de atenuación mediante el USP en la transición sol-gel de diversos polímeros; este proceso se puede ubicar entre el punto de inflexión de USP en la curva de atenuación y temperatura de transición sol-gel de varios sistemas. Esto se debe a que las cadenas de gelatina y otros agregados cambian progresivamente su conformación para formar respectivamente redes helicoidales triples y dobles dependiendo del tratamiento USP aplicado, por lo que esta disminución de dureza a 4 min de USP en geles de 1% WPC puede ser propiciado por un cambio irreversible en la estructura helicoidal de ambas proteínas, lo cual inhibe el entrelazamiento molecular de éstas con mayor firmeza. Sin embargo, a los 6 min de USP el orden estructural se reconstituye parcialmente, por lo que una disminución funcional en la firmeza podría atribuirse a un entrelazamiento no sinérgico, pero compatible a nivel estructural. Probablemente debido a lo anterior, los geles jamás mostraron una separación de fases, concluyéndose que el WPC puede ser considerado un agente funcional efectivo para incorporarse en geles de gelatina, dependiendo del porcentaje de adición seleccionado.

Otra posible explicación de la disminución en el coeficiente tixotrópico al usar WPC tratado por 2 min de USP se asocia a lo planteado por Mewis & Wagner (2009) quienes describen un fenómeno conocido como activación proteica, que se refiere a un incremento de temperatura requerida para desdoblar una proteína pero que puede deberse también al efecto de un tipo de estrés mecánico, como el ultrasónico. La activación causa cambios lentos en la microestructura, tanto reversibles o irreversibles por lo que podemos intuir que el fenómeno de activación proteica se ve influenciado por el tiempo de sonicación aplicado, donde 2 y 6 min de USP se observa una activación similar en comparación con una reversión de este proceso a los 4 min de tratamiento ultrasónico.

4.3.5 Viscosidad de geles mixtos

Carvalho *et al.* (2007) describen el comportamiento mostrado en geles mixtos de WPI con almidón y establecen que la gelificación en sistemas complejos como el usado en este proyecto esté muy relacionado con el mecanismo de reorganización de los polímeros cuando se someten a un estrés mecánico (agitación, cavitación ultrasónica) y con la velocidad de calentamiento/enfriamiento. Por tanto, las pruebas de viscosidad son importantes para la caracterización de los geles termoformados en función de la concentración de polímeros empleados y los posibles efectos del USP sobre sus propiedades de flujo; los resultados de las pruebas de viscosidad se muestran a continuación Tabla 16.

Tabla 16. Pruebas reológicas de viscosidad (KPa/s) en geles mixtos

Concentración WPC (% w/w) en sistemas mixtos grenetina :WPC	USP (min)			
	0	2	4	6
1	0.0319± 0.0 ^{Aa}	0.0128± 0.0 ^{Ab}	0.0082 ± 0.0 ^{Ac}	0.0119 ± 0.0 ^{Ab}
5	0.0093± 0.0 ^{Ba}	0.0076 ± 0.0 ^{Bb}	0.0049 ± 0.0 ^{Bc}	0.0075 ± 0.0 ^{Bb}

*N= 2

^A Mayúsculas diferentes en la misma columna indican diferencia significativa (p<0.05)

^a Minúsculas diferentes en la misma fila indican diferencia significativa (p<0.05)

Como puede observarse en la tabla previa, la viscosidad depende de la concentración de WPC añadida y del tiempo de sonicación empleado en este componente. Tanto para los sistemas control con 1% WPC (3.2×10^{-2} KPa/s) como para aquellos con 5% WPC (9.3×10^{-3} KPa/s) la viscosidad se redujo significativamente (p<0.05) al adicionar WPC sonicado, con cambios en su magnitud de acuerdo con el tiempo de sonicación. Así, no se observó una diferencia significativa en las muestras adicionadas con WPC sonicado a 2 y 6 min a ambas concentraciones proteicas; por otra parte, las muestras tratadas por 4 min presentaron una disminución significativa (p<0.05) en la viscosidad de la muestra en ambas concentraciones con respecto a los otros tiempos de sonicación (8.15×10^{-3} y 4.9×10^{-3} KPa/s, para 1% y 5% de WPC, respectivamente). Jambrak *et al.* (2014) apuntan que los cambios estructurales inducidos por el USP en las proteínas

están asociados con la ruptura parcial de interacciones hidrofóbicas intermoleculares. A medida que aumenta el tratamiento ultrasónico, el tamaño de partícula de proteína y su distribución se reducen, por lo que esto explicaría la disminución progresiva en la magnitud de la viscosidad en los tratamientos USP hasta los 4 min de proceso; al prolongarse el tiempo de sonicación, es posible que exista una reasociación proteica que provoca que las características reológicas del gel se reviertan al estado observado a los 2 min de proceso. Es importante hacer notar que la disminución en el valor de viscosidad a los USP de 4 min a ambas concentraciones de WPC concuerda con el comportamiento significativamente diferente de los geles correspondientes a este tiempo de proceso en las pruebas previas de índice de Bloom, módulo de tixotropía y prueba de relajación por estrés.

4.3.6 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) de geles

La identificación de cambios estructurales en los geles mixtos se realizó por medio de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier. El uso de FTIR-ATR acoplado con análisis multivariado ha probado tener un gran potencial como técnica analítica de alta precisión para detectar modificaciones estructurales, cambios conformacionales, concentración de proteína y adulteraciones en productos lácteos con alto contenido proteico (Andrade *et al.*, 2018). La región del infrarrojo en donde se pueden observar cambios en la estructura de productos ricos en proteína como el WPC es entre los 1600 y los 1700 cm^{-1} , que corresponde a la amida I. En esta región, se han determinado los cambios en la estructura secundaria proteica (incluyendo hélices α , láminas β , giros y la estructura desordenada). En este proyecto, para la identificación de las estructuras secundarias particulares, se empleó la segunda derivada de la citada región de amida I, la cual nos proporciona información sobre la absorbancia de la proteína a un determinado número de onda; asimismo, para llevar a cabo el proceso de deconvolución se utilizó la información contenida en la Tabla 17. De acuerdo con Byler y Purcell (1989), la deconvolución de la segunda derivada de un espectro de FTIR de proteínas globulares como las séricas puede ayudar a elucidar componentes de banda traslapados tales como aquellos observados regularmente en la región de la Amida I; dado que los

componentes asociados con esta región están asociados con estructuras que poseen diversos tipos de estructuras secundarias, la deconvolución de estos espectros puede ofrecer una nueva y más detallada comprensión de los cambios conformacionales que acompañan a la desnaturalización proteica por factores físicos externos, como aquellos producidos por el ultrasonido de potencia.

Tabla 17. Estructuras secundarias en la región de la amida I (Barth, 2007)

Estructura secundaria	Posición de la banda	
	Promedio	Extremos
α - hélices	1654	1648-1657
Láminas β	1633	1623-1641
	1684	1674-1695
Giros	1672	1662-1686
Estructuras desordenadas	1654	1642-1657

Los picos de los espectros después de aplicar la segunda derivada del espectro y la deconvolución de la proteína tratada por USP, así como la concentración de WPC respectiva, se muestran en las Figuras 23 y 24; el cálculo del área de los picos en las respectivas bandas de absorción se incluye en el Anexo B y se presentan en la Tabla 18 y en la Figura 25.

Tabla 18. Áreas de los picos de espectros FTIR en por proteína

Concentración WPC(% w/w) en sistemas mixtos grenetina:WPC	USP (min)	Picos Correspondientes a estructuras				
		α - hélices	Láminas β	Giros	Estructuras desordenadas	
1	0	-0.0149	-0.0283	-0.0334	-0.0022	-0.0097
	2	-0.0174	-0.0344	-0.0346	-0.0093	-0.0665
	4	-0.0155	-0.0297	-0.0291	-0.0091	-0.0051
	6	-0.0176	-0.0564	0.0496	-0.0095	0.0035
5	0	-0.0171	-0.5402	-0.0042	-0.0208	-0.0291
	2	-0.0144	-0.6509	-0.1447	-0.0207	-0.0186
	4	0.0190	-0.0161	-0.0178	-0.0270	-0.0054
	6	-0.0142	-0.0301	-0.1409	0.0241	-0.0328

Los resultados de la integración de las áreas para cada número de onda evaluado permiten conocer la modificación en la estructura secundaria del WPC por efecto del USP. En este sentido, las hélices α muestran un área similar en los

tratamientos de 2 y 6 min a 1% de concentración. Asimismo, el área más baja se ubicó en la muestra sin tratamiento. Esto concuerda con lo discutido previamente, debido a que las hélices α son las estructuras que dan firmeza y son las más expuestas a modificación (Andrade *et. al*, 2018).

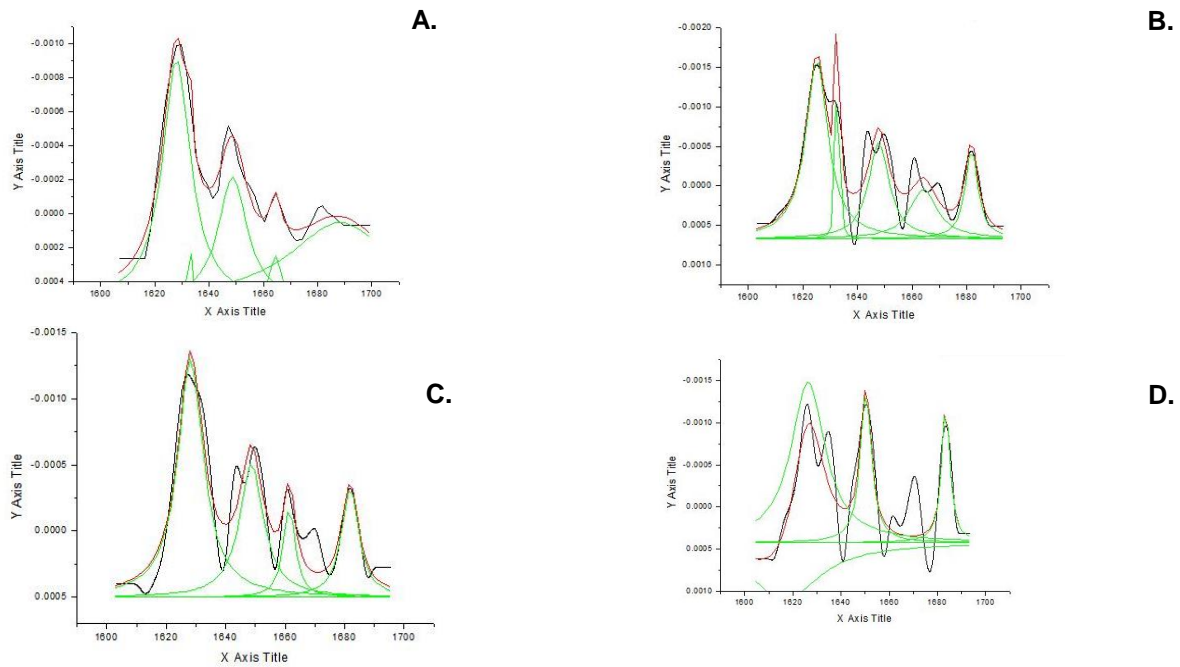


Figura 23. Espectros IR de geles mixtos de gelatina + 5% WPC a distintos tiempos de sonicación **A.** 0 min **B.** 2 min **C.** 4 min **D.** 6 min

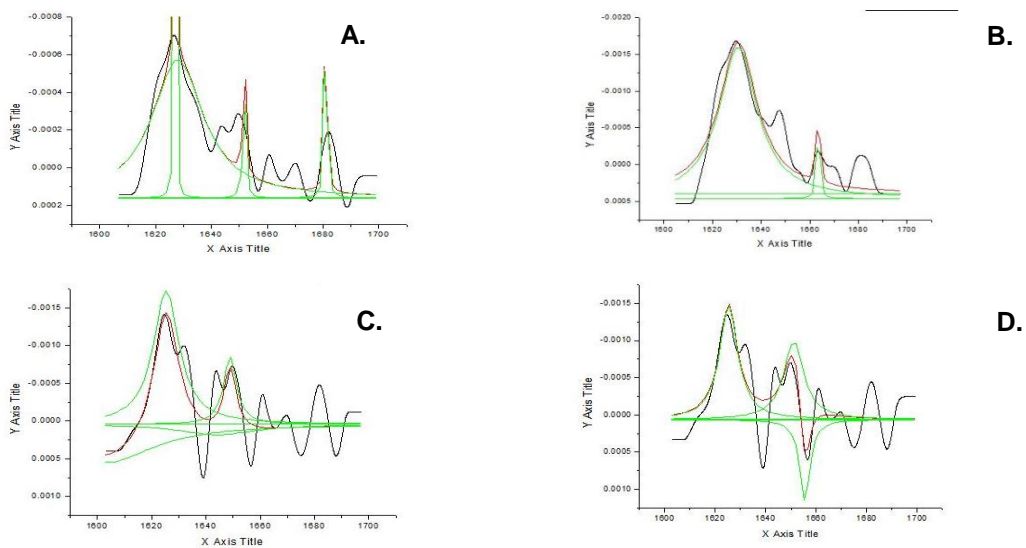


Figura 24. Espectros IR de geles mixtos de gelatina + 5% WPC a distintos tiempos de sonicación **A.** 0 min **B.** 2 min **C.** 4 min **D.** 6 min

Las contribuciones en la estructura de los giros que va de 1662-1686 cm^{-1} no muestran movimientos sensibles entre sus valores y entre sus respectivas concentraciones o tratamientos aplicados, por lo que estas estructuras pueden ser menos impactadas por el tratamiento ultrasónico. Los cambios más notorios se observan en las áreas correspondientes a la estructura desordenada, donde a medida que aumenta el tiempo de sonicación el área de estos picos en ambas concentraciones disminuye, alcanzando sus valores mínimos a los 6 min de tratamiento para ambas concentraciones. Esto posiblemente se ligue al efecto de disminución de tamaño de partícula y reordenamiento molecular citado anteriormente en función de la cavitación lo cual haría esta señal más débil conforme el paso del tiempo (Barth, 2007),.

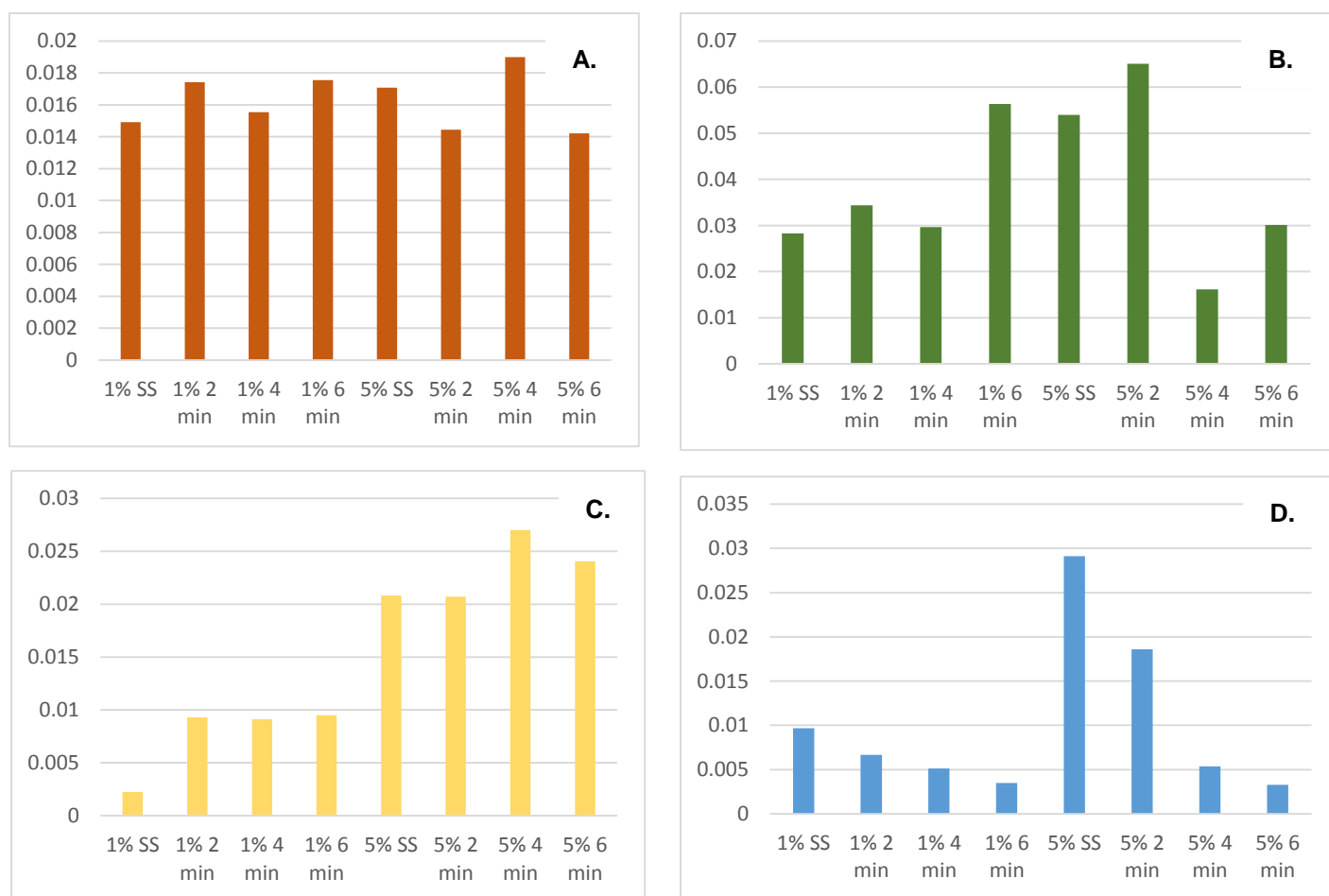


Figura 25 Áreas de los picos de USP en geles mixtos WPC grenetina.
A. Hélices α , **B.** Láminas β , **C.** Giros, **D.** Estructuras desordenadas

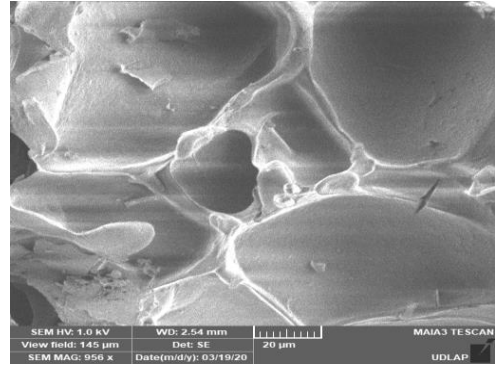
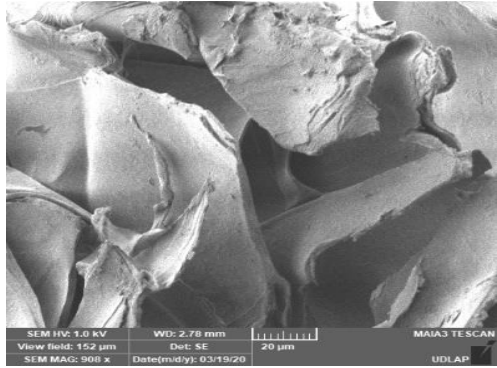
Por último, las láminas β demuestran una disminución en su pico en ambas concentraciones en el tiempo de 4 min confirmando la hipótesis del desorden estructural que sufren las muestras a este tiempo de sonicación ultrasónica y como estas impactan todas las estructuras secundarias del WPC.

5.3.7 Microscopía electrónica de geles mixtos

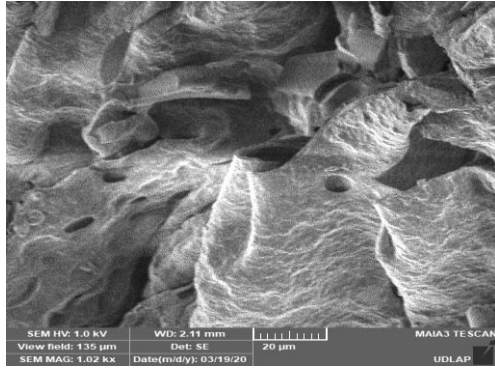
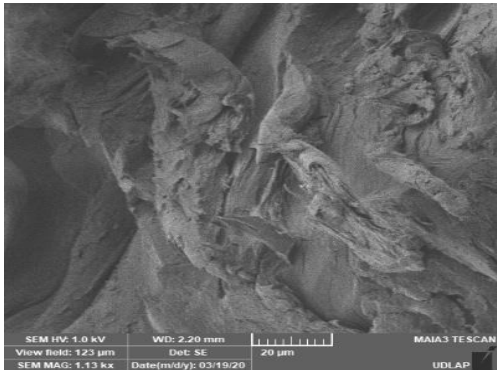
Se realizaron microscopias como análisis complementario para determinar las propiedades estructurales de los geles mixtos formados de manera análoga a como reportan Lupano *et. al.* (2000), quienes realizaron la misma prueba en sistemas mixtos de WPC con gluten, con la finalidad de observar cambios en propiedades de textura, así como el posible entrecruzamiento de redes proteicas formadas en sistemas mixtos; en esta investigación todos los tratamientos, de sonicación y controles (0 min) fueron sometidos a microscopia para su posterior análisis visual acerca de las estructuras generadas por las variables experimentales empleadas (ver Figura 26).

Los resultados de las microscopias de todas las muestras muestran una diferencia óptica apreciable en la distribución estructural de los componentes de la mezcla entre los geles de gelatina con WPC sonicado y sin sonicar a ambas concentraciones (1, 5%); los geles con WPC sin sonicar exhiben una estructura típica de celda (especialmente en aquella de 5% WPC), que hace presumir que las estructuras proteicas entrelazadas coexisten dentro del mismo bloque de formación. Por otro lado las estructuras de las muestras USP se aprecian menos agregadas, más abiertas que los controles, en particular aquellas sonicadas por 4 min a ambos niveles de concentración de WPC, las cuales exhiben una mayor proporción de área lisa en su estructura lo cual sugiere un menor grado de entrelazamiento que coincide con las muy diferentes propiedades texturales y reológicas descritas en secciones anteriores para estas muestras, por lo que podemos atribuir estas áreas de textura uniforme a fragilidad en la estructura de un gel; por otro lado las demás muestras USP exhiben estructuras más afiladas y porosas atribuidas a la naturaleza de las proteínas para retener agua en la estructura y volverse más firmes (Yamul y Lupano, 2003).

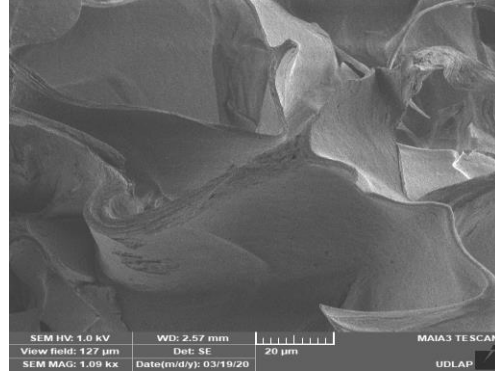
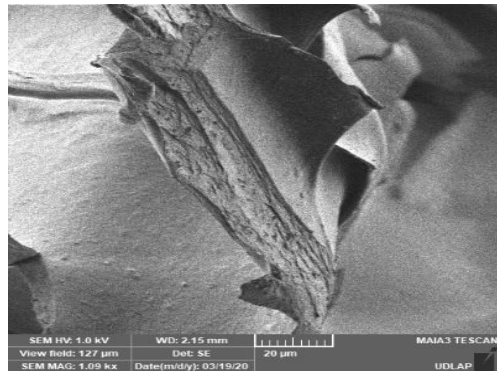
0 min



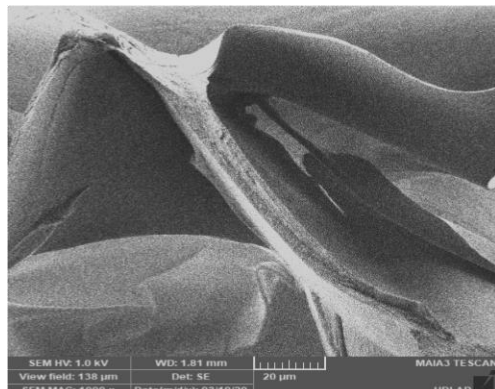
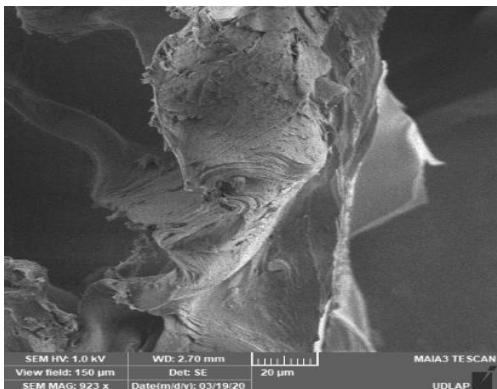
2 min



4 min



6 min



1% WPC

5% WPC

Figura 26 Micrografías de gels mixtos de grenetina y WPC sonificado a diferentes concentraciones (columnas) y tiempos de proceso (filas)

5. Conclusiones y trabajo futuro

Conclusiones

- Se definió un procedimiento estándar de preparación de geles de grenetina tipo B a escala laboratorio basada en la concentración proteica más apropiada para obtener geles uniformes; a una concentración de 7.5 % de grenetina, considerando una temperatura de activación de 45°C se obtuvieron geles con una firmeza en el rango de Bloom esperado; la temperatura se seleccionó buscando minimizar un posible daño proteico a las proteínas séricas cuando eventualmente se preparasen los geles mixtos.
- Se estableció una metodología para la elaboración de sistemas mixtos gelificantes con WPC grenetina que permitió desarrollar las mediciones de las propiedades texturales, reológicas y microestructurales del sistema de manera fundamentada y sin presentar anomalías en su reproducción lo cual permitió la evaluación de estos. Los geles de grenetina con WPC adicionada hasta 5% mostraron niveles de estabilidad y firmeza similares a los reportados en gelatinas comerciales y no exhibieron separación de fases durante el almacenamiento refrigerado.
- El proceso de sonicación altera las características fisicoquímicas y tecnológico funcionales del WPC, así como su capacidad de interactuar con otras proteínas al elaborar sistemas gelificantes mixtos.
- La mayoría de las propiedades fisicoquímicas de geles mixtos de grenetina: WPC (índice de Bloom, estrés mecánico y pruebas reológicas) tienden a cambiar en función del tiempo de sonicación y la proporción de WPC incorporado y varían significativamente con respecto al control. Se observaron similitudes importantes entre las características de diversas propiedades de geles elaborados por incorporación de 1 y 5% de WPC sonificado por 2 y 6 min y diferencias significativas en los sistemas fabricados con WPC sonificado por 4 min. En términos generales, los geles elaborados

con WPC sonicado resultaron ser menos firmes y viscosos, con mayor resistencia al estrés y mayor índice de trixotropía a tiempos selectos de sonicación de WPC, sin cambios apreciables en su capacidad de retención de agua; los resultados de estas observaciones correspondieron adecuadamente con los resultados de las pruebas de FTIR y microscopía de geles.

- El USP resulto ser el factor determinante en la modificación de las propiedades de gelificación, principalmente la resistencia mecánica, la interacción de componentes poliméricos y las propiedades reológicas de los geles mixtos. Por su parte, algunas otras propiedades como el índice de Bloom, la capacidad de retención de agua y las señales del FTIR son más dependientes de la concentración de los componentes del gel, línea que se recomienda explorar en estudios futuros.
- El uso de geles mixtos de grenetina y WPC con funcionalidad tecnológica modulada por USP resulta de interés para la industria alimenticia para la generación de productos alimenticios con características texturales y reológicas únicas.

Trabajo a futuro

Los proyectos subsecuentes pueden explorar algunas de las siguientes líneas de trabajo:

- A) Observar cambios en el comportamiento de geles mixtos de grenetina y WPC durante el almacenamiento a diferentes temperaturas, en particular a condiciones de refrigeración.
- B) Evaluar cambios estructurales de WPC para emplearse como ingrediente de geles mixtos con grenetina empleando otros parámetros de USP como variaciones en la potencia o porcentaje de amplitud.

- C) Evaluar el efecto de cambios en las condiciones del medio sobre las propiedades de geles mixtos, incluyendo el pH y la fuerza iónica, entre otros y determinar el efecto de esos cambios sobre las propiedades reológicas y estructurales de los geles mixtos; asimismo, se recomienda evaluar diversas concentraciones de WPC para explorar el desarrollo de funcionalidades distintas en los geles elaborados.
- D) En este estudio, se evaluó principalmente el efecto del USP sobre la formación del gel y sus propiedades, como son las reológicas, capacidad de retención de agua y pruebas de Bloom. Sin embargo, en una siguiente etapa se puede ampliar el estudio para evaluar el efecto estructura del USP en las proteínas del WPC con pruebas de carácter químico como pruebas de sulfhídricos libres, análisis de calorimetría diferencial de barrido y otras pruebas tecnológico-funcionales (p.e. solubilidad). Asimismo, se puede evaluar la vida útil de los geles a diferentes temperaturas e incluir otras pruebas de tipo sensorial.

5. Bibliografía

Aguilera, J.M., Stanley, D.W. (1999). Microstructural principles of food processing and engineering. 2nd Ed. Aspen/ Chapman & Hall. Gaithersburg, MD.

Aliya, D. The Failure Analysis Process: An Overview; ASM International: Materials Park, OH, USA, 2002; pp. 315–323.

Andrade, J., Pereira, Cristina.Guimarães., Carlos de Almeida Junior, J., Ramos Viana, C.C., Natália de Oliveira Neves, L., Fonseca da Silva, P.H., Valenzuela Bell, Maria.José., de Carvalho dos Anjos, Virgí., FTIR-ATR determination of protein content to evaluate whey protein concentrate adulteration, LWT - Food Science and Technology (2018),

Andriakopoulou, C. E., Zadpoor, A. A., Grant, M. H., & Riches, P. E. (2018). Development and mechanical characterisation of self-compressed collagen gels. *Materials Science and Engineering: C*, 84, 243–247.

Armenta-Ortega, A.K. (2016). Evaluación de propiedades funcionales de proteína concentrada de suero tratada por ultrasonido de potencia. Tesis de Licenciatura. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Barth, A. (2007). Infrared spectroscopy of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1767(9), 1073–1101.

Bigi, A., Panzavolta, S., Rubini, K. (2004). Relationship between triple-helix content and mechanical properties of gelatin films. *Biomaterials* 25, 5675–5680.

Brew, K. (2011). Milk Proteins | α -Lactalbumin. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 780–786. doi:10.1016/b978-0-12-374407-4.00432-5

Brownlow S, Cabral JHM, Cooper R, Flower DR, Yewdall SJ, Polikarpov I, North ACT, Sawyer L (1997) Bovine beta-lactoglobulin at 1.8 angstrom resolution—still an enigmatic lipocalin. *Structure* 5(4):481– 495

Bulut Solak, Birsen & Akın, Nihat. (2012). Functionality of Whey Protein. *International Journal of Health & Nutrition*. 3. 1-7.

Byler, D. M., & Purcell, J. M. (1989). FTIR Examination Of Thermal Denaturation And Gel-Formation In Whey Proteins . 7th Intl Conf on Fourier Transform Spectroscopy.

Cameron M., McMaster LD, Britz TJ (2009) Impact of ultrasound on dairy spoilage microbes and milk components. *Dairy Sci.Tec.* 89(1): 83–98.

Carter, D. C., & Ho, J. X. (1994). Structure of Serum Albumin. *Advances in Protein Chemistry*, 153–203. doi:10.1016/s0065-3233(08)60640-3

Chandrapala, J., Zisu, B., Palmer, M., Kentish, S., & Ashokkumar, M. (2011). Effects of ultrasound on the thermal and structural characteristics of proteins in reconstituted whey protein concentrate. *Ultrason. Sonochem.* 18: 951–957.

Chandrapala, J., Duke, M. C., Gray, S. R., Zisu, B., Weeks, M., Palmer, M., & Vasiljevic, T. (2015). Properties of acid whey as a function of pH and temperature. *Journal of Dairy Science*, 98(7), 4352–4363.

Chou, S.-F., Luo, L.-J., Lai, J.-Y., & Ma, D. H.-K. (2016). On the importance of Bloom number of gelatin to the development of biodegradable in situ gelling copolymers for intracameral drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 511(1), 30–43.

Chung, Ch., Degner, B., McClements, D.J. (2013). Creating novel texture cgs: Modifying rheology of starch granule suspensions by cold-set whey protein gelation. *LWT.* 54(2): 335-345.

De Wit, J. N. 2001. *Lecturer's Handbook on Whey and Whey Products*. Eur. Whey Prod. Assoc., Brussels, Bélgica

Emery, J. R., Chatellier, J. Y., & Durand, D. (1986). Application des techniques ultrasonores à l'étude de la transition pelote-hélice dans les solutions aqueuses de gélatine. *Journal de Physique*, 47, 921–925.

FAO/OMS.(2011).*Codex Alimentarius Leche y productos lácteos (2da edición)*.

Frydenberg, R.P., Hammershøj, M., Andersen, U., Greve, M.T., Wiking, L., (2015) Protein denaturation of whey protein isolates (WPIs) induced by high intensity ultrasound during heat gelation, *Food Chem.* 192:415-423.

Fox, P. F. (2011). Introduction | History of Dairy Products and Processes. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 12–17. doi:10.1016/b978-0-12-374407-4.00541-0

Fox, P. F. (2011). Milk | Bovine Milk. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 478–483.

Gelatin Manufacturers Institute of America. 2012. Gelatin Handbook. GMIA. Woburn, MA.

Gonzalez S. (1996). The biotechnological utilization of cheese whey: A review. *Bioresource Tech.* 57:1-11.

Godovac-Zimmermann J, Krause I, Baranyi M, Fischer-Frühholz S, Juszczak J, Erhardt G, Buchberger J, Klostermeyer H (1996) Isolation and rapid sequence characterization of two novel bovine betalactoglobulins I and J. *J Protein Chem* 15(8):743–750

Fu W. & Takashi Nakamura (2017): Explaining the texture properties of whey protein isolate/starch co-gels from fracture structures, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry.*

Furukawa, T., Ohta, S., and Yamamata, A. 1979. Texture-structure relationships in heat-induced soy protein gels. *J. Texture Studies* 21: 213.

Gallegos-Pineda, A.B. (2015). Efecto del pretratamiento de termosonicación en la elaboración y maduración de queso Chihuahua. Tesis de Maestría. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Gentile, G., Greco, F., & Larobina, D. (2013). Stress-relaxation behavior of a physical gel: Evidence of co-occurrence of structural relaxation and water diffusion in ionic alginate gels. *European Polymer Journal*, 49(12), 3929–3936.

Hansen, L.M., Hosney, R.C., and Faubian, J.M. 1990. Oscillatory phase rheometry as a tool for determining the rheological properties of starchwater systems. *J. Texture Studies* 21: 213.

Haug, I. J., & Draget, K. I. (2011). Gelatin. *Handbook of Food Proteins*, 92–115.

Hinrichs, R., Götz, J., & Weisser, H. (2003). Water-holding capacity and structure of hydrocolloid-gels, WPC-gels and yogurts characterised by means of NMR. *Food Chemistry*, 82(1), 155–160.

Jambrak A., Mason, T.J., Lelas, V., Paniwnyk, L., Herceg, Z. (2014). Effect of ultrasound treatment on particle size and molecular weight of whey proteins *J. Food Eng.* 121: 15–23.

Jelen, P. (2003). Whey processing. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, Roginski H, Fuquay JW & Fox PF, 4: 2739–2751.

Jelen, P. (2011). WHEY PROCESSING | Utilization and Products. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 731–737.

Jiang Y., Yanxia L., Chai Z., and Leng X. (2010). Study of the Physical Properties of Whey Protein Isolate and Gelatin Composite Films. *J. Agric. Food Chem.* 58: 5100–5108.

Kempka, A.P., Ulson de Souza, S.M.A.G., Ulson de Souza, A.A., Prestes, R.C., Ogliari, D., 2014. Influence of Bloom number and plastifiers on gelatin matrices produced for enzyme immobilization. *Braz. J. Chem. Eng.* 31, 95–108.

Lupano, C. E. (2000). Gelation of mixed systems whey protein concentrate–gluten in acidic conditions. *Food Research International*, 33(8), 691–696. doi:10.1016/s0963-9969(00)00114-9

Lin Zhao, Hongying Wang, Dandan Kong, Rui Gao, & Jie Yang. (2013). *Research on thermal characteristics of whey powder, milk replacer and lactose. 2013 Kansas City, Missouri, July 21 - July 24, 2013*

Majorek, K. A., Porebski, P. J., Dayal, A., Zimmerman, M. D., Jablonska, K., Stewart, A. J Minor, W. (2012). Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins. *Molecular Immunology*, 52(3-4), 174–182.

Margulis, M.A., Margulis, I.M., 2003. Calorimetric method for measurement of acoustic power absorbed in a volume of a liquid. *Ultrasonics Sonochemistry* 10, 343–345.

Mantelet M., Panouille P., Boue F., Veronique B., Restagno F., Souchon I., Vincent Mathieu V.(2018). Impact of sol-gel transition on the ultrasonic properties of complex model foods: application to agar/gelatin gels and emulsion filled gels, *Food Hydrocoll.* 87: 506-518.

Mao, R., Tang, J., & Swanson, B. G. (2001). Water holding capacity and microstructure of gellan gels. *Carbohydrate Polymers*, 46(4), 365–371.

Mewis, J., & Wagner, N. J. (2009). Thixotropy. *Advances in Colloid and Interface Science*, 147-148, 214–227

Miano A., Carmen Rojas, Gabriela Barraza., (2014) Influence of temperature and extraction time on gel strength and yield of gelatin from speckled smooth-hound skin (*Mustelus mento*) *Scientia Agropecuaria* 5 140 – 147

Mohsenin, N. N. (1970). *Physical Properties of Plant and Animal Materials*. Gordon and Breach Science Publishers, New York.

Morris V. (1986). G.O Philips D.J Wedlock &P.A Williams, Multicomponent gels In *Gums and stabilisers for the food industry* (pp. 87-99) Vol.3 London Elsevier.

Morris, V. J. (2013). Probe microscopy and photonic force microscopy: principles and applications to food microstructures. *Food Microstructures*, 27–6

Nöbel, S., Ross, N., Protte, K., Korzendorfer, A., Hitzmann, B., Hinrichs, J., (2016). Microgelparticle formation in yogurt as influenced by sonication during fermentation. *Journal of Food Engineering* 180, 29 -38.

Ju ZY and Kilara A. (1998). Textural properties of cold-set gels induced from heat-denatured whey protein isolates. *J.Food Sci.* 63:288-299.

Labropoulos, A. E., & Hsu, S.-H. (1996). Viscoelastic behavior of whey protein isolates at the sol-gel transition point. *Journal of Food Science*, 61(1), 65–68.

Le Maux, S., Bouhallab, S., Giblin, L., Brodkorb, A., & Croguennec, T. (2014). Bovine β -lactoglobulin/fatty acid complexes: binding, structural, and biological properties. *Dairy Science & Technology*, 94(5), 409–426.

Lucey, J. A. (2011). Cheese: Acid- and Acid/Heat Coagulated Cheese. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 698–705.

Okechukwu, R.E., Rao, M.A., Ngoddy, P.O., and McWatters, K.H. 1991. Rheology of sol-gel thermal transition in cowpea flour and starch slurry. *J. Food Sci.* 56: 1744

Osorio, F. A., Bilbao, E., Bustos, R., & Alvarez, F. (2007). Effects of Concentration, Bloom Degree, and pH on Gelatin Melting and Gelling Temperatures Using Small Amplitude Oscillatory Rheology. *International Journal of Food Properties*, 10(4), 841–85

Pang, Z., Deeth, H., Sopade, P., Sharma, R., Bansal, N. 2013. Rheology, texture and microstructure of gelatin gels with and without milk proteins. *Food Hydrocoll.* 35:484-493.

Papiz MZ, Sawyer L, Eliopoulos EE, North ACT, Findlay JBC, Sivaprasadarao R, Jones TA, Newcomer ME, Kraulis PJ (1986) The structure of beta-lactoglobulin and its similarity to plasma retinol-binding protein. *Nature* 324(6095):383–385

Permyakov, E. A., & Berliner, L. J. (2000). α -Lactalbumin: structure and function. *FEBS Letters*, 473(3), 269–274.

Rector, D.J., Kella, N.K., and Kinsella, J.E. 1989. Reversible gelation of whey proteins: Melting, thermodynamics and viscoelastic behavior. *J. Texture Studies* 20: 457.

Sakiyama, T., Han, S., Torii, A., Miyawaki, O., & Yano, T. (1991). Intrinsic Thermal Conductivity of Gelatin Estimated Independently of Heat Conduction Models. *Agricultural and Biological Chemistry*, 55(2), 487–492.

Schmidt R. Vernal s. Packard y Howard A. Morris. (1984). Effect of Processing on Whey Protein Functionality. *J. Dairy Sci* 67(11): 2723-2733.

Scott R. et al. (1998) *Cheesemaking Practice*. 3ra Edicion. Springer Science Business Media New York.

Silviya R. Macwan, Bhumika K. Dabhi, S.C. Parmar and K.D. Aparnathi. (2016). Whey and its Utilization. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*. 5(8): 134-155.

Somboon, N., Karrila, T. T., Kaewmanee, T. and Karrila, S. J. (2013). Properties of gels from mixed agar and fish gelatin. *International Food Research Journal* 21(2): 485-492 (2014).

Thompson, A., Boland, M. y Singh, H. (2009). *Milk Proteins From Expression to Food*. Elsevier, New York, USA.

Thompson, L.H., Doraiswamy, L.K., (1999). Sonochemistry: science and engineering. *Industry Engineering and Chemistry Research* 38, 1215–1249.

Turgeon, S. L., & Beaulieu, M. (2001). Improvement and modification of whey protein gel texture using polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, 15(4-6), 583–591.

Villamiel M. de Jong P (2000) Influence of high intensity ultrasound and heat treatment in continuous flow on fat, protein and native enzymes of milk. *J. Agric. Food Chem.* 48: 472-478.

Walkenström, P., & Hermansson, A.-M. (1994). Mixed gels of fine-stranded and particulate networks of gelatin and whey proteins. *Food Hydrocolloids*, 8(6), 589–607. doi:10.1016/s0268-005x(09)80067-2

Walstra P., Wouters, J.T.M., Geurts, T.J. (2006). *Dairy Science and Technology* 2nd Edition. CRC/Taylor & Francis. Boca Raton, FL.

Yadav J. Shankar Singh, Yan Song, Pilli Sridhar, Kumar Lalit, Tyagi RD, Surampalli RY. (2015). Cheese whey: A potential resource to transform into bio protein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides, *Biotech. Ad.* 33(6):756-774.

Wu, H., Hulbert, G.J., Mount, J.R., 2001. Effects of ultrasound on milk homogenization and fermentation with yogurt starter. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 1, 211 -218.

Wu Q., Zhanga X., Jiab J., Kuanga C., Yang H..(2018).Effect of ultrasonic pretreatment on whey protein hydrolysis by alcalase: Thermodynamic parameters, physicochemical properties and bioactivities. *Process Biochem.*67: 46-54.

Xu, Q. Han, J. Shi, et al., Structural, thermal and rheological characterization of bovine serum albumin binding with sodium alginate, *Journal of Molecular Liquids* (2018).

Yamul, D. K., & Lupano, C. E. (2003). Properties of gels from whey protein concentrate and honey at different pHs. *Food Research International*, 36(1), 25-33.

Zayas, J. (1996). *Functionality of proteins in food*. Springer, New York, USA.

Zhao, X., Huebsch, N., Mooney, D. J., & Suo, Z. (2010). Stress-relaxation behavior in gels with ionic and covalent crosslinks. *Journal of Applied Physics*, 107(6).

6. Anexos

ANEXO A. Análisis estadísticos

8.1 Análisis estadísticos de pruebas preliminares

ANOVA de dos factores: BLOOM vs. Grenetina (%), temperatura cal

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Grenetina (%)	1	18095.0	18095.0	109.36	0.000
temperatura cal	2	7622.3	3811.2	23.03	0.000
Interacción	2	4460.3	2230.2	13.48	0.000
Error	18	2978.2	165.5		
Total	23	33156.0			

S = 12.86 R-cuad. = 91.02% R-cuad. (ajustado) = 88.52

Modelo lineal general: BLOOM vs. Grenetina (%), temperatura cal

Factor	Tipo	Niveles	Valores
Grenetina (%)	fijo	2	6.77, 7.50
temperatura cal	fijo	3	45, 55, 65

Análisis de varianza para BLOOM, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Grenetina (%)	1	18095.0	18095.0	18095.0	109.36	0.00
temperatura cal	2	7622.3	7622.3	3811.2	23.03	0.000
Grenetina (%) * temperatura cal	2	4460.3	4460.3	2230.2	13.48	0.000
Error	18	2978.2	2978.2	165.5		
Total	23	33156.0				

S = 12.8631 R-cuad. = 91.02% R-cuad. (ajustado) = 88.52%

Observaciones inusuales de BLOOM

Obs	BLOOM	Ajuste	EE de ajuste	Residuo	Residuo estandar
17	273.000	250.500	6.432	22.500	2.02 R

R denota una observación con un residuo estandarizado grande.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

Grenetina

(%)	N	Media	Agrupación
6.77	12	337.7	A
7.50	12	282.7	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

T cal	N	Media	Agrupación
45	8	324.9	A
65	8	320.6	A
55	8	285.1	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

Grenetina temperatura

(%)	cal	N	Media	Agrupación
6.77	45	4	364.3	A
6.77	65	4	329.0	B
6.77	55	4	319.8	B
7.50	65	4	312.3	B C
7.50	45	4	285.5	C
7.50	55	4	250.5	D

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferente

8.2 Análisis estadísticos de la segunda etapa

ANOVA de dos factores: BLOOM vs. concentración WPC (%), USP (MIN)

Fuente	GL	SC	CM	F	P
concentracion WPC (%)	1	6903.1	6903.13	53.77	0.000
USP (MIN)	3	11278.8	3759.58	29.29	0.000
Interacción	3	5641.1	1880.38	14.65	0.000
Error	24	3081.0	128.38		
Total	31	26904.0			

S = 11.33 R-cuad. = 88.55% R-cuad.(ajustado) = 85.21%

Modelo lineal general: BLOOM vs. concentración WPC (%), USP (MIN)

Factor	Tipo	Niveles	Valores
concentracion WPC (%)	fijo	2	1, 5
USP (MIN)	fijo	4	0, 2, 4, 6

Análisis de varianza para BLOOM, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F
concentracion WPC (%)	1	6903.1	6903.1	6903.1	53.77
USP (MIN)	3	11278.7	11278.8	3759.6	29.29
concentracion WPC (%) * USP (MIN)	3	5641.1	5641.1	1880.4	14.65
Error	24	3081.0	3081.0	128.4	
Total	31	26904.0			

Fuente	P
concentracion WPC (%)	0.000
USP (MIN)	0.000
concentracion WPC (%) * USP (MIN)	0.000
Error	
Total	

S = 11.3303 R-cuad. = 88.55% R-cuad.(ajustado) = 85.21%

Observaciones inusuales de BLOOM

Obs	BLOOM	Ajuste	EE de ajuste	Residuo estándar
7	195.000	222.500	5.665	-27.500 -2.80 R

R denota una observación con un residuo estandarizado grande.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0% concentración

WPC (%)	N	Media	Agrupación
1	16	257.4	A
5	16	228.1	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes. Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

USP

(MIN)	N	Media	Agrupación
0	8	274.3	A
6	8	239.5	B
4	8	230.6	B
2	8	226.6	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

Concentración WPC (%)	USP (MIN)	N	Media	Agrupación
1	0	4	290.0	A
1	4	4	222.5	A B
5	0	4	258.5	B
1	6	4	253.3	B C
5	2	4	230.7	C D
5	6	4	264.8	D
1	2	4	222.5	D E
5	4	4	197.3	E

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

ANOVA de dos factores: viscosidad vs. tiempo USP, % wpc

Fuente	GL	SC	CM	F	P
tiempo USP	3	0.0004496	0.0001499	1011.84	0.000
% wpc	1	0.0003177	0.0003177	2145.02	0.000
Interacción	3	0.0002555	0.0000852	574.94	0.000
Error	8	0.0000012	0.0000001		
Total	15	0.0010240			

S = 0.0003849 R-cuad. = 99.88% R-cuad.(ajustado) = 99.78%

Modelo lineal general: viscosidad vs. % wpc, tiempo USP

Factor	Tipo	Niveles	Valores
% wpc	fijo	2	1, 5
tiempo USP	fijo	4	0, 2, 4, 6

Análisis de varianza para viscosidad, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
% wpc	1	0.0003177	0.0003177	0.0003177	2145.02	0.000
tiempo USP	3	0.0004496	0.0004496	0.0001499	1011.84	0.000
% wpc*tiempo USP	3	0.0002555	0.0002555	0.0000852	574.94	0.000
Error	8	0.0000012	0.0000012	0.0000001		
Total	15	0.0010240				

S = 0.000384870 R-cuad. = 99.88% R-cuad.(ajustado) = 99.78%

Observaciones inusuales de viscosidad

Obs	viscosidad	Ajuste	EE de ajuste	Residuo	Residuo estándar
15	0.006900	0.007450	0.000272	-0.000550	-2.02 R
16	0.008000	0.007450	0.000272	0.000550	2.02 R

R denota una observación con un residuo estandarizado grande.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

% wpc	N	Media	Agrupación
1	8	0.0	A
5	8	0.0	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

tiempo USP	N	Media	Agrupación
0	4	0.0	A
2	4	0.0	B
6	4	0.0	B
4	4	0.0	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

% wpc	USP	N	Media	Agrupación
1	0	2	0.0	A
1	2	2	0.0	B
1	6	2	0.0	B
5	0	2	0.0	C
1	4	2	0.0	C D
5	2	2	0.0	D
5	6	2	0.0	D
5	4	2	0.0	E

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

ANOVA de dos factores: TIXOTROPIA vs. % wpc, tiempo USP

Fuente	GL	SC	CM	F	P
% wpc	1	2381331963	2381331963	97.93	0.000
tiempo USP	3	3234594922	1078198307	44.34	0.000
Interacción	3	2892220451	964073484	39.65	0.000
Error	8	194532157	24316520		
Total	15	8702679493			

S = 4931 R-cuad. = 97.76% R-cuad.(ajustado) = 95.81%

Modelo lineal general: TIXOTROPIA vs. % wpc, tiempo USP

Factor	Tipo	Niveles	Valores
% wpc	fijo	2	1, 5
tiempo USP	fijo	4	0, 2, 4, 6

Análisis de varianza para TIXOTROPIA, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
% wpc	1	2381331963	2381331963	2381331963	97.93	0.000
tiempo USP	3	3234594922	3234594922	1078198307	44.34	0.000
% wpc*tiempo USP	3	2892220451	2892220451	964073484	39.65	0.000
Error	8	194532157	194532157	24316520		
Total	15	8702679493				

S = 4931.18 R-cuad. = 97.76% R-cuad.(ajustado) = 95.81%

Observaciones inusuales de TIXOTROPIA

Obs	TIXOTROPIA	Ajuste	EE de ajuste	Residuo	Residuo estandar
7	83311	92475	3487	-9164	-2.63 R
8	101639	92475	3487	9164	2.63 R

R denota una observación con un residuo estandarizado grande.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

% wpc	N	Media	Agrupación
1	8	45418.9	A
5	8	21019.5	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

tiempo

USP	N	Media	Agrupación
6	4	57136.0	A
2	4	30729.8	B
4	4	23165.8	B
0	4	21845.3	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

tiempo

% wpc	USP	N	Media	Agrupación
1	6	2	32475.2	B
1	2	2	34894.9	B
1	0	2	28612.1	B C
5	2	2	26564.7	B C
1	4	2	25693.5	B C
5	6	2	21796.8	B C
5	4	2	20638.0	B C
5	0	2	21078.4	B C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

ANOVA de dos factores: stres relaxation g max vs. % Wpc, tiempo USP

Fuente	GL	SC	CM	F	P
% wpc	1	6.2293	6.22932	72.61	0.000
tiempo USP	3	12.3557	4.11857	48.01	0.000
Interacción	3	2.1416	0.71388	8.32	0.001
Error	16	1.3726	0.08579		
Total	23	22.0992			

S = 0.2929 R-cuad. = 93.79% R-cuad.(ajustado) = 95.07%

Modelo lineal general: stres relaxation g max vs. % wpc, tiempo USP

Factor	Tipo	Niveles	Valores
% wpc	fijo	2	1, 5
tiempo USP	fijo	4	0, 2, 4, 6

ANOVA para stress relaxation g max utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
% wpc	1	6.2293	6.2293	6.2293	72.61	0.000
tiempo USP	3	12.3557	12.3557	4.1186	48.01	0.000
% wpc*tiempo USP	3	2.1416	2.1416	0.7139	8.32	0.001
Error	16	1.3726	1.3726	0.0858		
Total	23	22.0992				

S = 0.292894 R-cuad. = 93.79% R-cuad.(ajustado) = 95.07%

Observaciones inusuales de stress relaxation g max

Obs	relaxation g max	Ajuste	EE de ajuste	Residuo	Residuo estandar
7	3.88850	3.38443	0.16910	0.50406	2.11 R
19	2.11707	2.60433	0.16910	-0.48726	-2.04 R

R denota una observación con un residuo estandarizado grande.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

% wpc	N	Media	Agrupación
1	12	4.1	A
5	12	3.1	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

tiempo

USP	N	Media	Agrupación
6	6	4.3	A
2	6	4.3	A
4	6	3.0	B
0	6	2.8	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

tiempo				
% wpc	USP	N	Media	Agrupación
1	6	3	5.1	A
1	2	3	5.1	A
5	2	3	3.5	B
5	6	3	3.5	B C
1	4	3	3.4	B C D
1	0	3	2.9	B C D
5	0	3	2.7	C D
5	4	3	2.6	D

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

ANEXO B Análisis estadísticos y espectros FTIR (deconvoluciones)

[21/02/2020 22:07 "/Deriv" (2458900)]
Lorentz(5) fit to Smoothed1_WPC1SINUB:
Chi²/DoF 4.10594E-9 R² 0.97359

Peak	Area	Center	Width	Height
1	-0.0096748	1632.7	0.078431	-0.078529
2	-0.014916	1648.7	12.957	-7.3288E-4
3	-0.0022257	1664.5	5.1925	-2.7288E-4
4	-0.033408	1688.2	45.943	-4.6293E-4
5	-0.028271	1628.0	12.659	-0.0014217

Yoffset = 5.15215E-4

[12/03/2020 11:51 "/Deriv" (2458920)]
Lorentz(5) fit to Smoothed2_WPC12MINB:
Chi²/DoF 8.57378E-8 R² 0.84216

Peak	Area	Center	Width	Height
1	-0.034605	1625.2	9.7460	-0.0022604
2	-0.017418	1647.8	9.0786	-0.0012214
3	-0.012003	1664.3	12.167	-6.2804E-4
4	-0.0098676	1681.8	5.5199	-0.0011380
5	-0.034366	1632.7	0.14860	-0.14723

Yoffset = 6.66799E-4

[22/02/2020 22:20 "/Deriv" (2458901)]
Lorentz(5) fit to Smoothed1_WPC14MINB:
Chi²/DoF 4.60209E-8 R² 0.85909

Peak	Area	Center	Width	Height
1	-0.029668	1628.2	10.463	-0.0018052
2	-0.029131	1619.4	1.5995E5	9.4891E-4
3	-0.015541	1648.7	9.7480	-0.0010150
4	-0.0051359	1661.4	4.7757	-6.8464E-4
5	-0.0091317	1681.9	7.0110	-8.2919E-4

Yoffset = 5.02155E-4

[24/02/2020 11:31 "/Deriv" (2458903)]
Lorentz(5) fit to Smoothed1_WPC16MINB:
Chi²/DoF 1.37389E-7 R² 0.77069

Peak	Area	Center	Width	Height
1	-0.056359	1627.0	19.534	-0.0018368
2	0.049608	1612.2	43.813	7.2083E-4
3	-0.017552	1650.0	7.2793	-0.0015350
4	0.0034862	1640.8	0.51709	0.0042921
5	-0.0095042	1683.3	3.6655	-0.0016507

Yoffset = 3.62636E-4

[12/03/2020 12:37 "/Deriv" (2458920)]
Lorentz(5) fit to Smoothed1_WPC5SS50B:

Chi^2/DoF 1.72635E-8 R^2 0.80878

Peak	Area	Center	Width	Height
1	-0.017086	1626.2	13.427	-8.1012E-4
2	-0.0041571	1648.6	9.2172	-2.8712E-4
3	-0.029123	1653.9.0	4.71E-11	3.6691E17
4	-0.54017	1694.3	1.4949E-4	-2300.4
5	-0.020825	1668.2 7.	1.5291E21	0.49627

Yoffset = -1.03743E-4

[24/02/2020 12:02 "/Deriv" (2458903)]
Lorentz(5) fit to Smoothed3_WPC52MINB:

Chi^2/DoF 1.15494E-7 R^2 0.81102

Peak	Area	Center	Width	Height
1	-0.065093	1634.1	1.3333E27	-6.4539E12
2	-0.062093	1630.6	19.242	-0.0020543
3	-0.020825	1663.5	0.11901	-0.11087
4	-0.018589	1651.7	0.14452	-34.620
5	-1446.7	-1.8261E5	9258.0	-0.099482

Yoffset = 4.56816E-4

[25/02/2020 15:01 "/Deriv" (2458904)]
Lorentz(5) fit to Smoothed1_WPC54MINB:

Chi^2/DoF 1.53484E-7 R^2 0.84802

Peak	Area	Center	Width	Height
1	-0.027020	1644.1	0.14873	-0.11565
2	-0.016136	1630.9	0.21746	-0.047239
3	-0.017754	1625.1	6.5935	-0.0017142
4	-0.0053666	1649.9	2.6573	-0.0012857
5	-0.018997	1656	2.9015E11	-0.0032976

Yoffset = 1.40045E-4

12/03/2020 12:54 "/Deriv" (2458920)]
Lorentz(5) fit to Smoothed2_WPC56MINB:

Chi^2/DoF 1.16688E-7 R^2 0.8962

Peak	Area	Center	Width	Height
1	-0.057041	1645.2	17.520	-0.0020727
2	-0.032765	1642.0	15.663	-0.0013317
3	0.012658	1639.0	3.7787	0.0021325
4	0.37827	-582.80	2233.5	1.0782E-4
5	0.12724	1622.9	64.552	0.0012548

Yoffset = -3.26829E-4