



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

**ESTUDIO TÉRMICO DE LAS PROTEÍNAS SARCOPLÁSMICAS DEL MÚSCULO
DE BOVINO *Psoas major***

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA
Q. VERÓNICA JEANNETH TACO TACO



TUTOR: M. en C. María de los Ángeles Valdivia López
Año: 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado Asignado

Presidente: Dr. Miguel Antonio Costas Basín

Vocal: Dra. Adela Rodríguez Romero

Vocal: Dra. Edith Ponce Alquicira

Vocal: Dr. Enrique García Hernández

Secretario: Dr. Ernesto Carrillo Nava

Sustentante Q. Verónica Jeanneth Taco Taco

Tutor M. en C. María de los Ángeles Valdivia López

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorios 313, 322 y 323. Departamento de Alimentos y Biotecnología. Conjunto E de la Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.

Resultados preliminares de este trabajo se presentaron en el 45° Congreso Mexicano de Química, organizado por la Sociedad Química de México, celebrado en la Riviera Maya-Quintana Roo, del 18 al 22 de septiembre del 2010.

AGRACECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme prepararme profesionalmente con un alto nivel académico y porque es un verdadero honor pertenecer a la mejor universidad de Latinoamérica.

Al Posgrado de Ciencias Químicas por darme las herramientas necesarias para un completo desarrollo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para la realización de mis estudios de posgrado.

Al Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal por el apoyo al proyecto PICS08-42.

A la M. en C. María de los Ángeles Valdivia por incluirme en el proyecto, por los recursos proporcionados, los comentarios y las correcciones realizadas al presente trabajo.

Al Dr. Alberto Tecante por su apoyo constante desde los inicios hasta la culminación de la investigación, por su tiempo, accesibilidad, cordialidad y comentarios realizados para mejorar y desarrollar mi trabajo, por las revisiones y correcciones que me motivaron a concluir mi tesis de la mejor manera.

Al Dr. Enrique García Hernández, miembro del jurado, por su gran ayuda, observaciones y recomendaciones, por su paciencia y su tiempo en la interpretación de los resultados.

A los Dres. Edith Ponce, Adela Rodríguez, Miguel Costas y Ernesto Carrillo, miembros del jurado, por sus acertados y valiosos comentarios, por todas sus sugerencias para perfeccionar la presentación e interpretación de los resultados del presente trabajo.

A la M. en C. Karina Jiménez Durán por la asesoría con las muestras observadas en el microscopio confocal de barrido láser.

A Julieta Sandoval y Mariana Ramírez Gilly por la disponibilidad de los recursos para el desarrollo experimental de la investigación.

A Juan Ramírez Orejel por su asesoría en el montaje de técnicas para el análisis, por sus recomendaciones y su valiosa amistad.

A Emmanuel Flores por su ayuda en el manejo del microcalorímetro de barrido diferencial, y su predisposición a aclarar dudas académicas.

A Alejandra Espinosa por su valiosa amistad, por sus consejos siempre atinados, por recordarme la importancia de ser prudente frente circunstancias adversas y por su ayuda en la preparación de muestras para microscopia confocal de barrido láser.

A Ixchel por ser una amiga incondicional, compañera de lucha en el laboratorio, por su sencillez, carisma, bondad y alegría que me contagia. Por todas las palabras de aliento y ayudarme cuando más lo necesitaba y por siempre estar pendiente de mi. Eres una gran amiga.

A Marlenita y Susi, quienes compartieron conmigo tristezas y alegrías y fueron un apoyo importante y con su forma de ser tan dulces me hicieron sentir muy querida y respaldada en todo momento.

A todos mis compañeros de los laboratorios 313 y 322-323, por ser siempre amigables y sencillas con quienes compartí gratos momentos.

A Flavio López por su amistad y sus enriquecedoras conversaciones, por resolverme mis dudas, ser una persona sensata, sincera, descomplicada y estar pendiente de mi seguridad.

A Guadalupe Mejía, Lupita e Iván López, quienes me brindaron su confianza, me hicieron sentir como una miembro más de la familia y por abrigarme en el seno de su hogar. Por todo su respaldo, apoyo, cuidados y cariño. Les estoy eternamente agradecida.

A Raúl Bahamonde por ser un amigo maravilloso, acolite, incondicional al que llevo en mi corazón con un cariño de hermano. Un agradecimiento especial para él, pues hizo de mi vida en México, divertida y llevadera, quien me cuidó con mucho ahínco cumpliendo la promesa a mis papis, por impulsarme con sus palabras de aliento, por todo ello y mucho más... gracias mi Gordis preñadis!

A mi familia extraordinaria que desde lo lejos siempre me han respaldado, a ti, papito lindo y mamita preciosa por todas sus oraciones y por ser unos padres maravillosos, que me han enseñado que el trabajo, la perseverancia, la humildad y el positivismo son importantes en la vida. He aquí el fruto de su esfuerzo. Los amo mucho.

A Vladimir López quien ha traído a mi vida una luz preciosa que me motiva a renovarme como persona todos los días con su enorme dedicación, dulzura, alegría, espontaneidad y amor para encaminarnos a un futuro juntos bendecido por Dios... Te amo mucho mi Luquitas precioso! Gracias porque junto a ti me siento segura, ampliamente respaldada y amada. Gracias mi amor porque sin tu gran ayuda incondicional no hubiese sido posible la culminación de este trabajo.

Bendita la hora en que nos conocimos....Bendita tu luz mi querubín amado

*Con todo mi amor a Dios por ser mi inspiración cada día y a mis padres
Carlitos y Piedadcita por su valentía, ternura y ejemplo de lucha constante.*

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN	3
OBJETIVOS.....	5
General	5
Específicos.....	5
CAPITULO I.....	6
MARCO TEÓRICO.....	6
I. 1 Composición y estructura de las proteínas de la carne.....	6
I.1.1 Proteínas sarcoplásmicas.....	6
I.1.2 Proteínas miofibrilares o fibrosas	6
I.1.2.1 Miosina.....	7
I.1.2.2 Actina	8
I.1.3 Proteínas del estroma.....	8
I.2 Ciclo de contracción y de relajación muscular	9
I.3 Solubilidad de las proteínas	9
I.3.1 Interacciones proteína-agua	10
I.4 Efecto del calentamiento sobre las proteínas de la carne.....	10
I.5 Desnaturalización térmica de proteínas.....	11
I.5.1 Consideraciones termodinámicas	13
I.6 Procesos de equilibrio	14
I.7 Equilibrio entre más de dos estados.....	15
I.8 Procesos de no equilibrio	15
CAPITULO II.....	18
ESTUDIOS PREVIOS	18
II.1 Análisis térmico de la carne.....	18
II.2 Proteínas del músculo.....	19
II.2.1 Proteínas miofibrilares	20
II.2.2 Proteínas sarcoplásmicas.....	21

II.2.3 Proteínas del estroma	22
II.3 Factores que influyen en la estabilidad térmica de las proteínas	22
II.3.1 pH y sales	22
II.4 Perfil electroforético de las proteínas sarcoplásmicas extraídas del músculo	24
II.5 Microscopia confocal de barrido láser	25
CAPITULO III	27
METODOLOGÍA	27
III.1 Análisis de la composición de la carne	27
III.2 Fuerza iónica de las soluciones extractoras	27
III.3 Extracción de las proteínas sarcoplásmicas del filete	29
III.3.1 Solución amortiguadora de lavado (B); 0.1 M Tris-HCl en 20 mM EDTA, pH 7 (Pérez-Juan et al., 2007).	29
III.3.2 Solución de Ringer modificada (R); 0.15 M NaCl, 3mM KCl y 3 mM MgCl ₂ , pH 5.7 (Wagner y Añon, 1985).....	29
III.4 Cuantificación de proteínas solubles	30
III.5 Cuantificación de grupo sulfhidrilo (Soottawat et.al., 1997)	30
III.6 pH de las fracciones líquidas.....	30
III.7 Calorimetría de barrido diferencial.....	31
III.7.1 Ensayos cinéticos	33
III.7.1.1 Efecto de la velocidad de calentamiento.....	33
III.7.1.2 Estudios de reversibilidad	33
III.7.1.3 Efecto de la concentración de proteínas solubles sobre la temperatura máxima y la entalpia de transición	33
III.8 Microscopia confocal de barrido láser (Dürrenberg et al., 2001).....	34
III.9 Perfil electroforético de las proteínas sarcoplásmicas (Schägger y von Jagow, 1987).	34
III. 10 Análisis estadístico	36
CAPITULO IV.....	37
ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	37
IV.1 Composición	37
IV.2 Extracción de las proteínas sarcoplásmicas del filete.....	37
IV.2.1 Solución amortiguadora de lavado	37
IV.2.2 Solución de Ringer modificada	38

IV.3 pH.....	39
IV.4 Proteína soluble	40
IV.5 Análisis térmico.....	41
IV.5.1 Perfiles térmicos de las fracciones líquidas y sólidas extraídas de la carne.....	45
IV.5.2 Reversibilidad de la desnaturalización y la agregación de las proteínas sarcoplásmicas.....	54
IV.5.3 Ensayos cinéticos.....	55
IV.5.1.1 Efecto de la velocidad de calentamiento	55
IV.5.1.2 Efecto de la concentración de proteína soluble sobre la temperatura y la entalpía de transición	58
IV.6 Balance de masa en la extracción de las proteínas sarcoplásmicas del filete	64
IV.7 Microscopía confocal de barrido láser.....	67
IV.8 Perfil electroforético de las proteínas sarcoplásmicas del filete SDS-PAGE con el sistema Tris-tricina	70
CONCLUSIONES	72
RECOMENDACIONES	73
REFERENCIAS.....	74
ANEXO A.....	79
ANEXO B.....	81
ANEXO C.....	82
ANEXO D.....	83
ANEXO E.....	84
ANEXO F.....	85
ANEXO G.....	87
ANEXO H.....	89
ANEXO I.....	90
ANEXO J.....	92
ANEXO K.....	93
ANEXO L.....	94

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Muestras de filete presurizadas a: a) 172, b) 310, c) 483 y d) 621 MPa, durante un minuto.	4
Figura 2. Modelo de la organización de la fibra muscular y las miofibrillas en el que se muestran las bandas I, la banda A y la línea Z, el sarcómero y los filamentos de actina y miosina (http://magisnef.files.wordpress.com/2007/04/organizacion.jpg . Consultada en Octubre del 2010).....	7
Figura 3. Localización de la meromiosina pesada y ligera (Fenema, 1993).	8
Figura 4. Proceso de desnaturalización de una proteína.	12
Figura 5. Diagrama de la desnaturalización proteínica y formación del glóbulo fundido.	12
Figura 6. Curvas de capacidad calorífica contra temperatura de rSk en fosfato de sodio 10 mM pH 7.5. La línea continua corresponde a los datos experimentales. La línea discontinua (corta) representa la suma de las cuatro transiciones individuales (líneas discontinuas largas).....	15
Figura 7. Señal típica del músculo compuesto de tres principales zonas: A, subunidades de miosina; B, proteínas sarcoplásmicas y colágeno y C, actina (Findlay et. al., 1989)..	18
Figura 8. Termogramas de DSC de las proteínas sarcoplásmicas aisladas del bagre rayado (15 mg/mL proteína) para varios pHs durante el calentamiento de 10 a 100 °C a 1 °C/min (Tadpitchayangkoon et al. 2010).....	24
Figura 9. Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE por sus siglas en inglés) que muestra los patrones de las proteínas sarcoplásmicas solubles tratadas a varios pHs (Tadpitchayangkoon et al., 2010).	25
Figura 10. Diagrama con las etapas del trabajo experimental.....	28
Figura 11. Esquema de las celdas de referencia y muestra del microcalorímetro de barrido diferencial. (http://www.setaram.com/microDSC7-evo.htm . Consultada en Marzo del 2011).....	32
Figura 12. Fracciones líquidas obtenidas en la extracción de las proteínas sarcoplásmicas del filete con la solución solución amortiguadora de lavado. a) FL-B-1; b) FL-B-2 y c) FL-B-3.	38
Figura 13. Termogramas de filete congelado a -18 °C por 2 y 30. Velocidad de calentamiento 1.2 °C/min.	42

Figura 14. Termograma de la fracción líquida FL-R (línea continua azul) que contiene a las proteínas sarcoplásmicas del filete. Velocidad de calentamiento 1.2 °C/min. Las letras indican la posición de las dos transiciones. La curva continua de color marrón corresponde a la derivada de la curva de flujo de calor que es usada para establecer la posición de las transiciones. Los óvalos rojos representan la incertidumbre en la asignación de puntos iniciales y finales de integración. Las líneas punteadas verticales indican los límites para cada transición.	43
Figura 15. Termograma de la fracción sólida FS-R (línea continua azul) que contiene a las proteínas miofibrilares del filete. Velocidad de calentamiento 1.2 °C/min. Las letras indican la posición de las dos transiciones. La curva continua de color marrón corresponde a la derivada de la curva de flujo de calor que es usada para establecer la posición de las transiciones. Los óvalos rojos representan la incertidumbre en la asignación de puntos iniciales y finales de integración. Las líneas punteadas verticales indican los límites para cada transición.	44
Figura 16. Transiciones exotérmica y endotérmica en las fracciones líquidas FL-B-1 y FL-R extraídas con solución amortiguadora de lavado y solución de Ringer modificada del filete. Velocidad de calentamiento 1.2 °C/min.....	45
Figura 17. Termogramas de las fracciones líquidas FL-B-1 con temperaturas de centrifugación de 5 y 25 °C. Velocidad de calentamiento 1.2 °C/min.....	46
Figura 18. Termogramas de las fracciones líquidas FL-B-1, FL-B-54°C, FL-B-60°C Y FL-B-64°C. Velocidad de calentamiento 1.2°C/min.	47
Figura 19. Transiciones endotérmicas de las fracciones sólidas FS-R y FS-B-3 extraídas con solución amortiguadora de lavado y la solución de Ringer modificada del filete. Velocidad de calentamiento 1.2°C/min.	48
Figura 20. Termogramas de las fracciones sólidas FS-B-1, FS-B-2 y FS-B-3 correspondientes al primero, segundo y tercer lavado del filete con B. Velocidad de calentamiento 1.2°C/min.	49
Figura 21. Termogramas de las fracciones líquidas FL-B-1, FL-B-2 y FL-B-3 correspondientes al primero, segundo y tercer lavado del filete con B. Velocidad de calentamiento 1.2 °C/min.....	50
Figura 22. Termogramas de las fracciones sólidas empobrecidas de proteínas sarcoplásmicas usando la solución extractora de Ringer modificada con dos metodologías distintas (método de Ringer y método de lavado). Velocidad de calentamiento 1.2 °C.	51

Figura 23. Efecto del EDTA sobre las endotermas de las fracciones sólidas. Velocidad de calentamiento 1.2°C/min.	52
Figura 24. Efecto del pH de la solución de Ringer modificada sobre las transiciones de las fracciones sólidas. Velocidad de calentamiento 1.2 °C/min.	53
Figura 25. Efecto del pH de la solución de Ringer modificada sobre las transiciones de las fracciones líquidas. Velocidad de calentamiento 1.2 °C/min.	53
Figura 26. Termograma que muestra la irreversibilidad de las transiciones exotérmica y endotérmica de la fracción líquida FL-R, realizada con dos rampas de calentamiento-enfriamiento de 20 - 95 °C consecutivas. Velocidad de calentamiento 1.2 °C/min.....	54
Figura 27. Efecto de la velocidad de calentamiento sobre la temperatura máxima y la entalpía de transiciones de la fracción FL-B-1.....	55
Figura 28. Efecto de la velocidad de calentamiento sobre la temperatura máxima y entalpía de las transiciones endotérmicas de la fracción FS-B-3.	57
Figura 29. Efecto de la concentración de proteínas solubles en las suspensiones preparadas a partir de la FL-B sobre la T_m de la transición exotérmica y su entalpía. Velocidad de calentamiento 1.2 °C/min.....	59
Figura 30. Relación entre las diferencias de las temperaturas de los picos exotérmicos T_1-T_2 y la concentración.....	60
Figura 31. Efecto de la concentración de proteínas solubles en el traslape de la transición exotérmica con la endotérmica de las proteínas sarcoplásmicas del corte filete. Velocidad de calentamiento 1.2°C/min.	61
Figura 32. Relación de la temperatura máxima T_m de la transición exotérmica en función de la concentración de proteínas solubles (mg/mL) extraídas con solución amortiguadora de lavado.....	61
Figura 33. Relación de la entalpía (ΔH) de la transición exotérmica en función de concentración de proteínas solubles (mg/mL) extraídas con solución amortiguadora de lavado del corte filete.....	62
Figura 34. Efecto de la concentración de proteína soluble de las suspensiones preparadas a partir de la FL-R sobre la temperatura máxima (T_m) y la entalpía (ΔH) de transición exotérmica. Velocidad de calentamiento 1.2 °C/min.	63
Figura 35. Relación de la temperatura máxima de la transición exotérmica en función de concentración de proteínas solubles (mg/mL) extraídas con solución de Ringer modificada.....	64

Figura 36. Relación de la entalpía (ΔH) de la transición exotérmica en función de concentración de proteínas solubles (mg/mL) extraídas con solución de Ringer modificada.....	64
Figura 37. Extracción de las proteínas sarcoplásmicas del filete con la solución de Ringer modificada.....	65
Figura 38. Extracción en tres etapas de las proteínas sarcoplásmicas del filete con la solución amortiguadora de lavado.....	66
Figura 39. (a) Micrografía de la red de agregados Agr-B-1 formados por el tratamiento térmico que sufrió la fracción FL-B-1 marcada con ANS (objetivo 40X, zoom 1.8). (b) Micrografía de la morfología de los agregados de Agr-B-1 de las proteínas sarcoplásmicas (objetivo 40X, zoom 3.5).	67
Figura 40. Efecto del ANS en la T_m de desnaturalización y agregación de las proteínas sarcoplásmicas extraídas con la solución amortiguadora de lavado y Ringer modificada. Velocidad de calentamiento 1.2 °C/min.	68
Figura 41. Perfil electroforético de las proteínas sarcoplásmicas solubles extraídas con la solución amortiguadora de lavado y Ringer modificada (M es el marcador, con bandas de pesos moleculares conocidos).....	70

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Temperaturas máximas (°C) de las transiciones en DSC para algunos músculos (Findlay & Barbut, 1990).....	19
Tabla 2. Composición proteínica del músculo post-rigor del músculo de bovino (Findlay & Barbut, 1990).....	20
Tabla 3. Costos* de proteínas miofibrilares aisladas y purificadas a nivel comercial.....	33
Tabla 4. Soluciones preparadas para electroforesis Tri-tricina-SDS-PAGE.	35
Tabla 5. Preparación de geles concentrador y separador para electroforesis Tris-tricina-SDS-PAGE.	36
Tabla 6. Composición del músculo de bovino <i>Psoas mayor</i> (corte filete).	37
Tabla 7. pHs de las soluciones extractoras y fracciones líquidas obtenidas en la extracción de las proteínas sarcoplásmicas del corte filete con R y B.	39
Tabla 8. Concentración de proteínas solubles de las fracciones líquidas obtenidas en las extracciones con R y B.	40
Tabla 9. Rendimientos de las extracciones de las proteínas sarcoplásmicas contenidas en el filete usando las soluciones de Ringer modificada y solución amortiguadora de lavado.....	41
Tabla 10. Variación en la temperatura máxima y entalpía de las transiciones de las fracciones FL-R y FS-R, considerando varios puntos iniciales y finales para la integración del área bajo la curva.	44
Tabla 11. Contenidos de proteínas solubles en fracciones líquidas FL-B-1, FL-B-54°C, FL-B-60°C Y FL-B-64°C.	48
Tabla 12. Energía de activación (E_a) de la transición exotérmica (a) de las proteínas sarcoplásmicas, calculada por cuatro métodos.	56
Tabla 13. Energía de activación (E_a) de la transición endotérmica (b) de las proteínas sarcoplásmicas, calculada por cuatro métodos.	56
Tabla 14. Energía de activación de la miosina calculada por cuatro métodos.....	58
Tabla 15. Contenido de proteínas solubles (mg/mL) de las fracciones líquidas FL-B-1, FL-R, FL-B-1-D y FL-R-D.	69
Tabla 16. Contenido de grupo sulfhidrilo ($\mu\text{mol SH/mL}$) de las fracciones líquidas FL-B-1, FL-R, FL-B-1-D y FL-R-D.....	69
Tabla 17. Peso de los agregados formados por las proteínas sarcoplásmicas extraídas con la solución amortiguadora de lavado y Ringer modificada.....	69

RESUMEN

Se estudió el comportamiento térmico por microcalorimetría de barrido diferencial de las fracciones proteínicas del músculo de bovino *Psoas major*. Las fracciones se extrajeron con una solución amortiguadora de lavado (B: pH 7.0; I = 0.3 mol/L) y una solución de Ringer modificada (R: pH 5.7; I = 0.2 mol/L). La fracción soluble está constituida por proteínas sarcoplásmicas y la insoluble principalmente por las proteínas miofibrilares miosina y actina. Los rendimientos de extracción de las proteínas sarcoplásmicas con B y R fueron 61.1 y 52.5 %, respectivamente. Se determinó la presencia de transiciones térmicas irreversibles de las proteínas solubles e insolubles de 20 a 95 °C. Independientemente de la extracción con B o R, la fracción soluble, la cual contiene varias proteínas de peso molecular entre 11 y 97 kDa, mostró dos transiciones principales, una exotérmica y otra endotérmica. Algunas proteínas sarcoplásmicas parecen ser agregadas fácilmente a 50 y 54 °C, como lo muestra la transición exotérmica con una energía de activación de 243.8 kJ/mol. Los agregados, observados por microscopia confocal, fueron densos, continuos y desordenados y mostraron zonas hidrofóbicas expuestas al solvente. Asimismo, se observó otra transición endotérmica en 63 y 65 °C con una energía de activación de 591.6 kJ/mol. Se determinó el efecto de la concentración de las proteínas solubles sobre la temperatura máxima y entalpía de las transiciones y se estableció una relación de proporcionalidad inversa entre la concentración de proteínas solubles y su temperatura y entalpía de transición.

Las proteínas de la fracción insoluble mostraron transiciones endotérmicas en 54 y 62 °C para la miosina y 68 y 70 °C para la actina, con energías de activación de 604.7 y 359.0 kJ/mol, respectivamente, atribuidas a su desnaturalización. La extracción con B tuvo un efecto significativo sobre las transiciones endotérmicas de la miosina y la actina; la disminución de las entalpías de sus transiciones fue de 4 y 87%, respectivamente, en comparación con las entalpías de las transiciones obtenidas con R.

Al disminuir la velocidad de calentamiento de 1.2 a 0.6 °C/min, la entalpía de la transición exotérmica de la fracción soluble disminuyó 80%. Un efecto similar se observó en las entalpías de las transiciones endotérmicas de la miosina y actina de la fracción insoluble, que disminuyeron 7 y 11%, respectivamente. La desnaturalización de las proteínas cárnicas depende de la velocidad de calentamiento, por lo tanto, está gobernada cinéticamente. La electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE por sus siglas en inglés) con el sistema Tris-tricina, mostró que la mayor proporción de las proteínas sarcoplásmicas tiene pesos moleculares entre 35 y 45 kDa y que básicamente se extraen las mismas proteínas con B que con R.

ABSTRACT

The thermal behavior of the protein fractions of the bovine muscle *Psoas major* was studied by differential scanning microcalorimetry. The fractions were extracted with rinse buffer (B: pH 7.0; I = 0.3 mol/L) and modified Ringer's solution (R: pH 5.7; I = 0.2 mol/L). The soluble fraction is constituted by sarcoplasmic proteins and the insoluble one mainly by the myofibrillar proteins, myosin and actin. Extraction yields for sarcoplasmic proteins with B and R were 61.1 and 52.5%, respectively. The presence of thermal irreversible transitions for soluble proteins was determined from 20 to 95 °C. Regardless of the extraction solvent, the soluble fraction, which contains several proteins with molecular weights in the range of 11 to 97 kDa, showed an exothermic and an endothermic transition. Some sarcoplasmic proteins seem to be easily aggregated at 50 and 54 °C, as shown by the exothermic transition with activation energy of 243.8 kJ/mol. Dense, continuous and disordered aggregates, observed under confocal microscopy, showed the presence of hydrophobic zones exposed to the solvent. Another endothermic peak was observed from 63 to 65 °C with activation energy of 591.6 kJ/mol. The effect of soluble proteins concentration on peak temperature and transition enthalpies was examined and a relationship of inverse proportionality between soluble proteins concentration and their transition temperature and enthalpy was observed.

Proteins of the insoluble fraction exhibited endothermic transitions from 54 to 62 °C for myosin and 68 to 70 °C for actin, with activation energies of 604.7 and 359.0 kJ/mol, respectively, attributed to denaturation. Extraction with B had a significant effect on the endothermic transitions of myosin and actin; the decrease in their transition enthalpies was 4 and 87%, respectively, in comparison to the transition enthalpies obtained with R.

A decrease in heating rate from 1.2 to 0.6 °C/min resulted in 80% decrease of the exothermic transition enthalpy. A similar effect was observed for the endothermic transition enthalpies of the insoluble fraction; 7 and 11% for myosin and actin transitions, respectively. Denaturation of bovine meat proteins is kinetically controlled.

Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) with the Tris-Tricine system showed a major proportion of sarcoplasmic proteins with molecular weights from 35 to 45 kDa with basically the same proteins extracted by B and R.

INTRODUCCIÓN

La carne es la porción comestible de animales sanos destinados para el consumo humano. Está constituida primordialmente por tejido muscular y cantidades variables de tejido conectivo, epitelial, nervioso y adiposo, según la localización anatómica, edad, género y especie animal. La relación de estos tejidos se refleja en las características de calidad y consecuentemente en el costo de la carne (Ponce Alquicira, 2006). El músculo de bovino *Psoas mayor*, comercialmente llamado filete, es uno de los cortes más caros y tiene una composición variada y compleja de fracciones de proteínas. Para estudiar el comportamiento térmico de las proteínas cárnicas se hace necesario desarrollar métodos de separación para aislarlas y caracterizar sus transiciones térmicas por microcalorimetría de barrido diferencial (μ DSC por sus siglas en inglés). Las transiciones son el resultado de eventos de desnaturalización y agregación de las proteínas cárnicas. Otras técnicas usadas para corroborar los resultados obtenidos por μ DSC incluyen la microscopia confocal de barrido láser (CLSM por sus siglas en inglés), por medio de la cual es posible observar la agregación de las proteínas sarcoplásmicas, que se produce por efecto del tratamiento térmico y la electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE por sus siglas en inglés), sistema Tris-tricina, que permite obtener el perfil electroforético de las proteínas extraídas. Las proteínas sarcoplásmicas y las miofibrilares, actina y miosina, son los constituyentes mayoritarios en el músculo, aunque no son las únicas. Aparte de tener una función fisiológica, son además las principales responsables de importantes propiedades funcionales como la capacidad de retención de agua, la capacidad emulsionante, la formación de geles en la carne y en varios productos cárnicos. Se han desarrollado numerosos métodos para aislar las proteínas cárnicas, dependiendo del objetivo de la investigación, la mayoría de las cuales, se ocupan de la miosina y de la actina, mientras que, aquellas relacionadas con las propiedades térmicas de las proteínas sarcoplásmicas de la carne de bovino son escasas. Asimismo, resulta importante conocer la temperatura a la cual las proteínas sarcoplásmicas se desnaturalizan por efecto del calentamiento debido a que en recientes investigaciones se ha demostrado que estas proteínas, en estado nativo, tienen capacidad antioxidante (Fernández et.al., 2006). Esto es significativo, ya que supone la oportunidad potencial para que sean aprovechados los fluidos residuales provenientes de los procesadores de carne para generar antioxidantes naturales de gran utilidad para alimentos funcionales (Di Bernardini et. al., 2011). Uno de los objetivos de este estudio fue investigar de qué manera, el método de extracción de las proteínas sarcoplásmicas del músculo de bovino *Psoas mayor*, tiene influencia sobre el comportamiento térmico de las

proteínas sarcoplásmicas y las miofibrilares. Además, determinar el efecto de la concentración de las proteínas sarcoplásmicas sobre la temperatura máxima y la entalpía de transición correspondientes a la desnaturalización y la agregación, inducidas por el calentamiento de estas proteínas. Con este propósito, se usaron dos soluciones extractoras, que fueron seleccionadas, considerando que extrajeran la máxima cantidad de proteínas solubles de la carne, sin alterar la integridad estructural de las proteínas miofibrilares. Las soluciones extractoras básicamente contienen sales que son usadas como aditivos en el procesamiento de los productos de la carne como el cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de magnesio, (Barbut y Mittal, 1988; Kijowski y Mast, 1988 citado en Barbut y Findlay, 1991) y el EDTA que protege la actividad de la enzimas. Los resultados obtenidos en esta investigación se usarán para seleccionar el método y las condiciones más adecuadas de extracción para la separación sistemática de los componentes proteínicos del filete y estudiar su comportamiento térmico individual así como su contribución a las señales térmicas completas. En forma global, todo esto servirá de base para estudiar posteriormente, el efecto de las altas presiones hidrostáticas comprendidas entre 100 y 1000 MPa (Herrero y Romero de Avila, 2006), sobre la estabilidad de las proteínas cárnicas, y evaluar su posible uso como método de conservación, alternativo a la congelación, para cortes de carne de bovino de alto costo y demanda. En un ensayo previo, se presurizaron muestras de filete a 172, 310, 483 y 621 MPa, durante un minuto. Las diferencias en la apariencia entre las muestras presurizadas fueron notables a simple vista, como se muestra en la Figura 1.

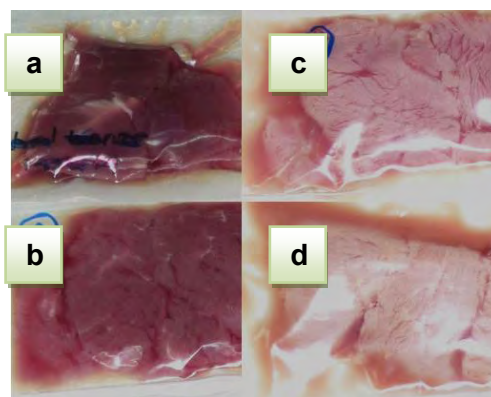


Figura 1. Muestras de filete presurizadas a: a) 172, b) 310, c) 483 y d) 621 MPa, durante un minuto.

Marcos et.al., (2010) proponen que los cambios inducidos por alta presión hidrostática en proteínas sarcoplásmicas de carne de bovino, confirman una relación entre la modificación de la fracción proteínica soluble y la alteración de las características de calidad de la carne, por tanto, estas modificaciones podrían ser usadas como indicadores de calidad.

OBJETIVOS

General

Caracterizar el comportamiento térmico de las fracciones solubles e insolubles de proteínas del músculo de bovino *Psoas major* extraídas con dos soluciones diferentes para determinar la influencia de la extracción sobre dicho comportamiento.

Específicos

Determinar el efecto de dos soluciones extractoras: amortiguadora de lavado que contiene 0.1 M Tris-HCl en 20 mM EDTA y de Ringer modificada que contiene 0.15 M NaCl, 3 mM KCl y 3 mM MgCl₂, sobre las curvas calorimétricas de las fracciones solubles e insolubles de la proteínas del músculo de bovino y el perfil electroforético de la fracción soluble para seleccionar aquella que permita una mayor extracción de proteínas sarcoplásmicas, sin alterar la integridad de las proteínas miofibrilares.

Evidenciar de manera cualitativa por medio de microscopia confocal de barrido láser, la formación de agregados, inducidos por el calentamiento de las proteínas sarcoplásmicas para determinar su microestructura.

Determinar el efecto de la variación de la concentración de proteínas sarcoplásmicas sobre la temperatura máxima y entalpia de la transición térmica para encontrar la concentración mínima detectable y cuantificable en el μ DSC.

Establecer el efecto de la velocidad de calentamiento sobre las transiciones de las fracciones solubles e insolubles de las proteínas del músculo de bovino para determinar los parámetros cinéticos de desnaturalización.

CAPITULO I

MARCO TEÓRICO

I. 1 Composición y estructura de las proteínas de la carne

El músculo contiene 75% de agua, 20% de proteína total, 3% de grasa y 2% de sustancias solubles no proteínicas. El 2% correspondiente a las sustancias solubles no proteínicas está formado por 3% de metales y vitaminas, 45% de sustancias que contienen nitrógeno no proteínico, 34% de carbohidratos y 18% de compuestos inorgánicos (Tornberg, 2005). Las proteínas desempeñan un papel fundamental en la función biológica del músculo *in vivo*, así como en los procesos *postmortem* y se clasifican en tres grupos.

I.1.1 Proteínas sarcoplásmicas

Este tipo constituye 35% del total de las proteínas cárnicas, son solubles en agua y se encuentran en el citoplasma celular. Alrededor de 100 diferentes proteínas están presentes dentro de este grupo que en su mayoría son globulinas de bajo peso molecular y albúminas, que constituyen el sistema enzimático que modula el metabolismo de la célula. Dentro de las proteínas sarcoplásmicas se encuentran además las catepsinas, la creatinquinasa, citocromos, fosforilasa b, mioglobina y flavoproteínas (Tornberg, 2005).

I.1.2 Proteínas miofibrilares o fibrosas

Este tipo constituye 50% del total de las proteínas de la carne, forman la estructura del músculo y el sistema contráctil. Estas proteínas no sólo son responsables de la transformación de energía química en energía cinética sino también de procesos de emulsión y gelificación. Las proteínas miofibrilares se dividen en tres subclases: las proteínas fibrosas miofilamentosas miosina y actina que constituyen la estructura miofibrilar, las proteínas reguladoras que incluyen el complejo tropomiosina-troponina, α y β -actina, M-proteína y C-proteína y por último las proteínas de andamio, es decir, las que se ocupan de mantener el armazón estructural en el que funcionan las proteínas musculares, tales como la titina (filamentos de Gap), nebulina (línea N2), vimentina y sinemina (línea Z). La titina o conectina es la proteína presente mayoritariamente en el citoesqueleto y es la tercera más abundante del músculo (8–10%), es una proteína de gran peso molecular y presenta propiedades elásticas (Varnam y Sutherland, 1995; Robson et. al., 1997).

I.1.2.1 Miosina

De acuerdo con la Figura 2, el sarcómero, que es la unidad de contracción del músculo, es la región entre dos líneas Z adyacentes que se repite a lo largo de las miofibrillas. Las miofibrillas están constituidas por dos tipos de filamentos; los filamentos gruesos formados principalmente por miosina, la cual se localiza a lo largo de la banda A, y los filamentos delgados que corresponden a la actina, los cuales están anclados a la línea Z formando la banda I (Ponce Alquicira, 2006).

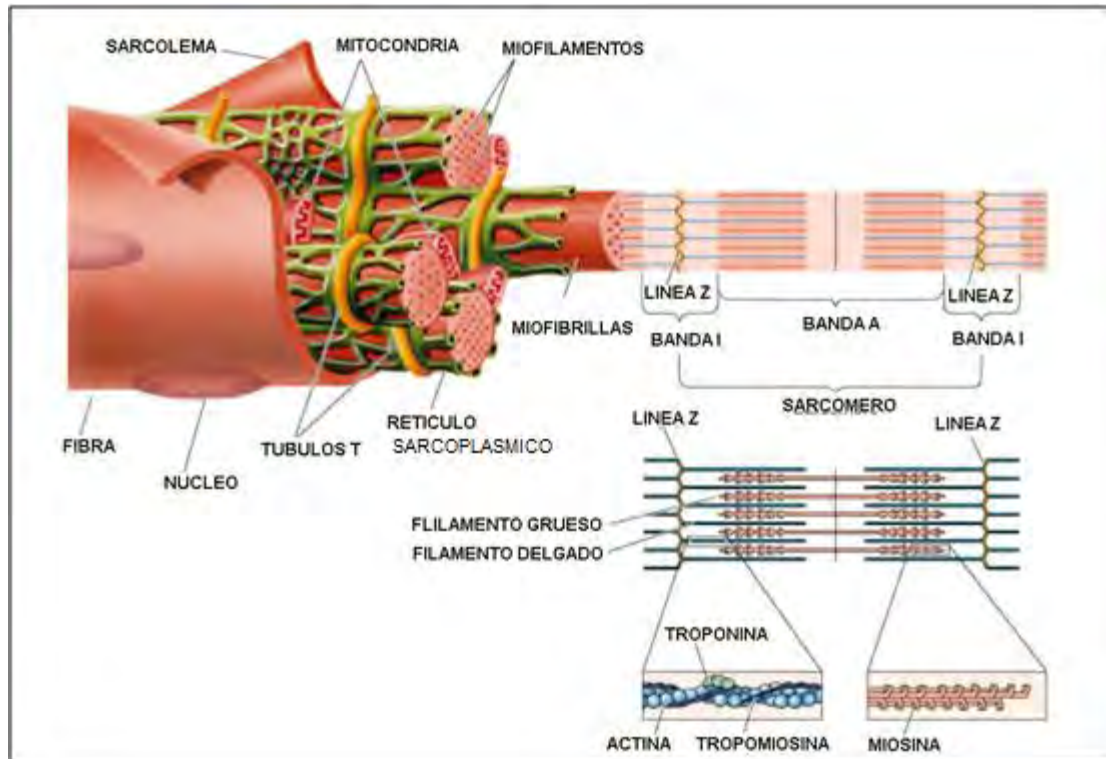


Figura 2. Modelo de la organización de la fibra muscular y las miofibrillas en el que se muestran las bandas I, la banda A y la línea Z, el sarcómero y los filamentos de actina y miosina (<http://magisnef.files.wordpress.com/2007/04/organizacion.jpg>. Consultada en Octubre del 2010).

La miosina es la principal proteína de los filamentos gruesos, se encuentra en mayor concentración en el tejido muscular en comparación con la actina, constituye el 55% de las proteínas miofibrilares. La miosina es una molécula muy grande de 540 kDa aproximadamente. Contiene dos cadenas pesadas idénticas de 230 kDa cada una y cuatro cadenas ligeras de unos 20 kDa cada una. Las micrografías electrónicas muestran que la miosina consta de una región globular en forma de doble cabeza, unida a una cola (bastón) que está formada por un α -hélice de dos hebras, a su vez enrolladas en super hélice, que corresponde a las cadenas pesadas. La miosina se puede dividir enzimáticamente en dos

fragmentos denominados meromiosina ligera y merimiosina pesada (Stryer, 1995), como se muestra en la Figura 3.

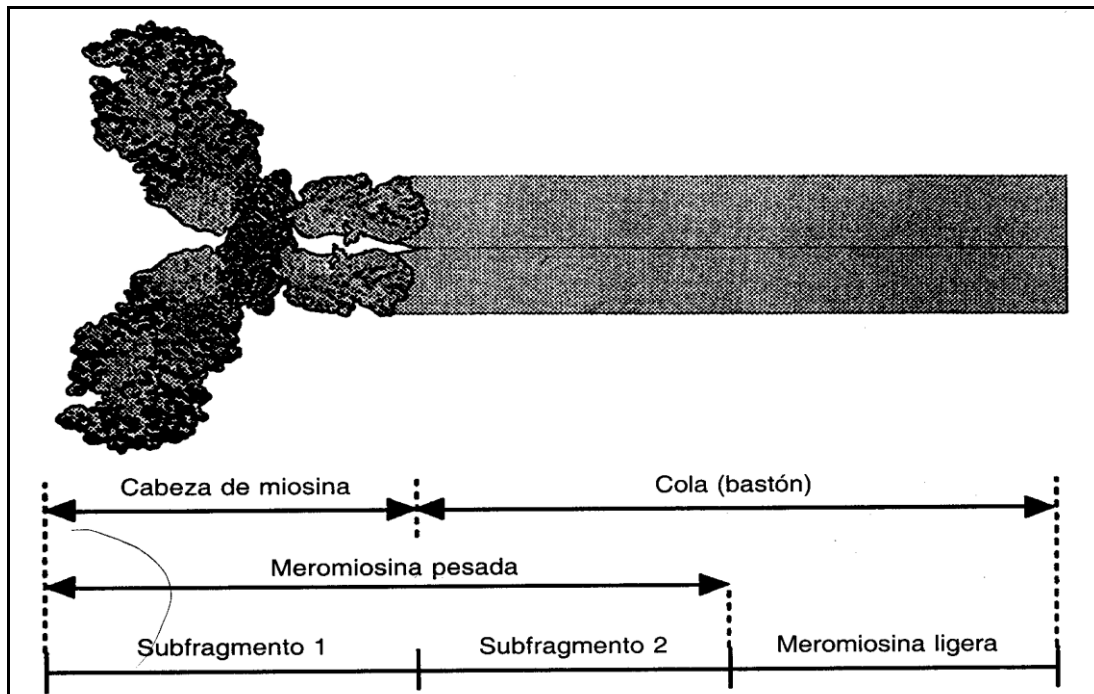


Figura 3. Localización de la meromiosina pesada y ligera (Fenema, 1993).

I.1.2.2 Actina

La actina es la proteína principal de los filamentos delgados y forma el 20% del total de las proteínas miofibrilares del músculo. La actina está unida a la estructura del músculo con mucho más fuerza que la miosina. La forma de la actina puede ser descrita como dos dominios en forma de cacahuete, de igual tamaño situados uno al lado del otro. Los monómeros de actina llamados actina globular se ensamblan en una doble estructura helicoidal denominada actina fibrilar que constituye la porción principal del filamento delgado. La actina globular tiene una masa molecular de 42 a 48 kDa. Es estable en agua donde puede existir también como dímero. Los filamentos de la actina fibrilar interactúan con la porción de cabeza de la miosina, se ensamblan con polaridades opuestas en relación con la unión con miosina, en cada lado de la línea Z, lo cual permite que los filamentos gruesos de los sarcómeros adyacentes se desplacen hacia la línea Z (Fenema, 1993).

I.1.3 Proteínas del estroma

Estas proteínas constituyen el 15% del total de las proteínas del músculo y forman el tejido conectivo. Dentro de este grupo se encuentran el colágeno, la elastina y la reticulina. Son

parte integral de las membranas del epimisio, endomisio y perimisio que ayudan a mantener la forma y dar soporte a los músculos y fibras musculares (Ponce Alquicira, 2006).

I.2 Ciclo de contracción y de relajación muscular

La contracción muscular se inicia por un impulso nervioso y consiste en la formación y ruptura del complejo actomiosina entre la cabeza de la miosina y los filamentos de F-actina. La unión de estas dos proteínas se debe a la sucesión de múltiples etapas que en conjunto se denominan ciclo de contracción y relajación muscular, el cual comprende un cambio de conformación de la cabeza de miosina, hidrólisis de ATP y el desplazamiento de los filamentos de actina sobre los filamentos de miosina. Todo esto genera un golpe de fuerza que finalmente origina el movimiento (Yuri et.al, 1998; Murray, 1997 citado en Ponce Alquicira, 2006). La energía necesaria para la contracción muscular procede de la hidrólisis de ATP catalizada por la ATPasa de las cabezas de miosina. La relajación se produce por la eliminación de calcio y la desactivación de la actividad ATPásica de la miosina, provocando la disociación del complejo actomiosina. Tan pronto como se reduce la concentración de iones Ca^{2+} y se desactiva la miosina-ATPasa, se forma el complejo ATP-magnesio que relaja y flexibiliza la estructura contráctil. El retículo sarcoplásmico consiste en una red de sacos que en su interior retiene iones Ca^{2+} unido a una proteína llamada calsequestrina. La concentración de calcio en el sarcoplasma del músculo en reposo es de 10^{-7} a 10^{-8} M, debido a que el calcio es bombeado al interior del retículo sarcoplásmico a través de un sistema de transporte activo llamado Ca^{2+} -ATPasa. Cuando el sarcolema se excita por el impulso nervioso, la señal se transmite hacia el sistema de túbulos T, el cual es una extensión de la membrana celular y posteriormente al conducto liberador de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico que permite la salida del ion hacia el sarcoplasma y da inicio al proceso de contracción muscular (Ponce Alquicira, 2006).

I.3 Solubilidad de las proteínas

Las proteínas no forman disoluciones en el sentido estricto sino suspensiones o soles. La solubilidad de la proteína está determinada por los aminoácidos presentes en la superficie de la molécula y el balance entre las interacciones energéticas dentro de la proteína, así como entre la proteína y el disolvente (Totosaus y Guerrero, 2006).

I.3.1 Interacciones proteína-agua

El agua es un componente esencial de toda la materia viva y por supuesto, también de los alimentos. La estructura nativa de una proteína, es una consecuencia de las interacciones entre la proteína y el disolvente agua, por tanto, la función de la proteína en un alimento está íntimamente relacionado con sus interacciones con el agua. Las moléculas de agua se unen a grupos polares y apolares (hidratación hidrofóbica) presentes en las proteínas vía interacciones dipolo-dipolo, ion-dipolo y dipolo-dipolo inducido. Debido a que la mayoría de residuos de aminoácidos no polares y un número significativo de grupos polares (e.g., residuos de glutamina y asparagina) son enterrados en el interior de una proteína plegada, el cual no es hidratado, la capacidad de hidratación de las proteínas puede ser el resultado, predominantemente, de los enlaces del agua con los residuos de los aminoácidos presentes en la superficie de la proteína (Damodaran y Paraf, 1997).

I.4 Efecto del calentamiento sobre las proteínas de la carne

Una proteína está formada por una larga cadena polimérica de aminoácidos, llamada cadena polipeptídica, que constituye la estructura primaria. Las distintas cadenas laterales dan a cada proteína su característica distintiva. Existen tres categorías generales de cadenas laterales: no polares, polares no cargadas y polares cargadas (Dickerson y Geis, 1969). Esta cadena polipeptídica adopta conformaciones específicas en soluciones, llamadas estructura secundaria, por ejemplo: α -hélice, β -hoja plegada o hebra aleatoria (random coil). Las estructuras terciaria y cuaternaria de las proteínas se refieren a la estructura en tres dimensiones y a la asociación de las entidades de proteína en solución, respectivamente. La estabilización de estas estructuras depende sobre todo de las interacciones no covalentes como puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals, interacciones electrostáticas e hidrofóbicas. La formación de proteínas globulares es un ejemplo típico de cómo las interacciones hidrofóbicas estabilizan este tipo de estructura terciaria. La mioglobina, que da el color a la carne, es un ejemplo de proteína globular.

Otra estructura de las proteínas, la cual prevalece entre las proteínas de la carne, es la forma fibrosa. La actina, la miosina y el colágeno son ejemplos representativos de proteínas fibrosas. Estas proteínas están constituidas por tres estructuras principales llamadas α -hélice (miosina), hojas antiparalelas β -extendidas y triple hélice; esta última solamente en el caso del colágeno. Los puentes de hidrógeno son los que frecuentemente estabilizan estas estructuras (Dickerson y Geis, 1969). Al aumentar la temperatura, las cadenas laterales hidrofóbicas, por razones entrópicas, pueden quedar expuestas al medio acuoso y en el caso

de las proteínas globulares, dan lugar a una expansión y un despliegue parcial. La gran cantidad de puentes de hidrógeno e interacciones electrostáticas que mantienen extendidas a las proteínas fibrosas, se rompen con el calentamiento. Esto da lugar a que las proteínas tengan una mayor libertad para adoptar una configuración al azar impulsada por la entropía del sistema. Dado que las proteínas están relativamente extendidas en la forma fibrosa, las proteínas fibrosas se contraen en la cocción en contraste con las proteínas globulares, las cuales se expanden (Tornberg, 2005). Además, el calentamiento de la carne es acompañado de cambios estructurales en el tejido y fibras del músculo, dependiendo de los parámetros de calentamiento y de su composición. El encogimiento transversal y longitudinal de las fibras empieza cerca de 40 °C y se incrementa como función de la temperatura, mientras que, el tejido conectivo comienza a encogerse alrededor de 60 °C (Tornberg, E. et.al, 1997).

I.5 Desnaturalización térmica de proteínas

Se entiende por desnaturalización proteínica a cualquier modificación de la conformación terciaria o cuaternaria debida esencialmente a la ruptura de enlaces no covalentes, que provoque pérdida de la función de la proteína. Los cambios inducidos en proteínas de alimentos por tratamientos térmicos a menudo producen desnaturalización, la cual es un fenómeno complejo en el que aparece una nueva conformación o cambio parcial. Un cambio en el grado de estructuración con respecto a la estructura nativa se considera también como una forma de desnaturalización (Lupano y Añón, 1986; Tornberg, 2005; Damodaran y Paraf, 1997). Una definición más estricta de la desnaturalización involucra la pérdida de una o más de las propiedades de la proteína, por ejemplo pérdida de solubilidad, actividad enzimática o cambios en el peso molecular. Dependiendo de las condiciones, la desnaturalización puede ser parcial (solo en una región) o total (en toda la proteína). Las proteínas generalmente poseen una estructura única y bien definida en su estado nativo, después de la desnaturalización la misma proteína tiene diferentes estructuras no específicas y con organización al azar esto depende del tipo y grado de desnaturalización como se muestra en la Figura 4 (Damodaran y Paraf, 1997; Fenema, 1993).

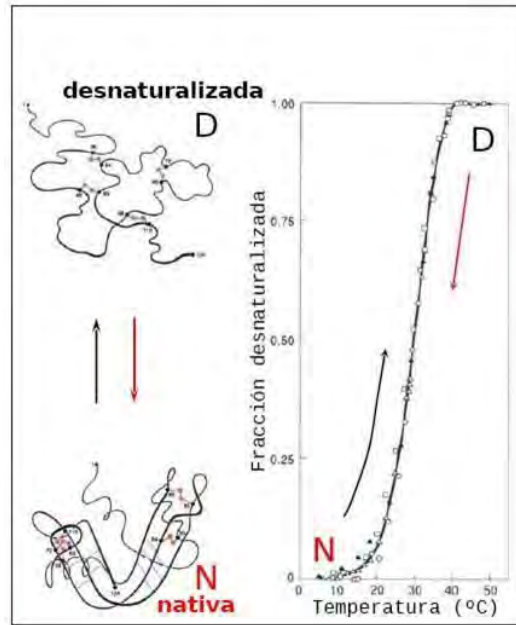


Figura 4. Proceso de desnaturalización de una proteína.

Por ejemplo, las proteínas globulares toman una conformación simple en su estado nativo, cuando se aumenta la temperatura hay un rompimiento de interacciones, las cadenas se abren y una vez abiertas se asocian entre sí debido a las interacciones hidrofóbicas. Puede estar presente el estado glóbulo fundido, que se conoce como una conformación intermedia entre las formas nativa y totalmente desnaturalizada (Figura 5).

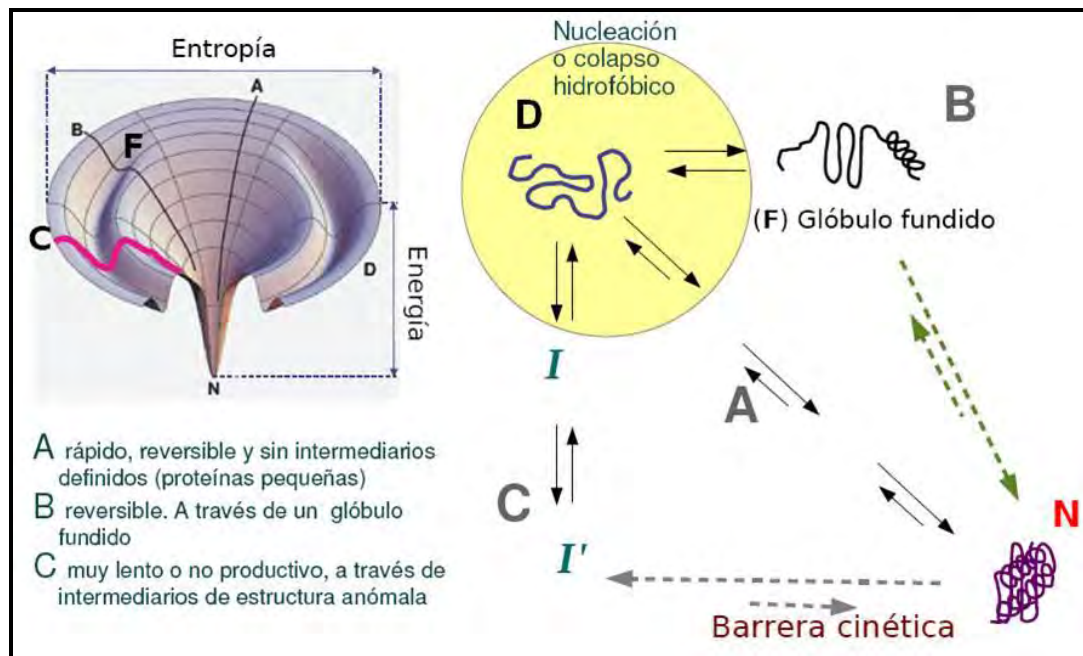


Figura 5. Diagrama de la desnaturalización proteínica y formación del glóbulo fundido.

El estado glóbulo fundido se describe como una conformación proteínica intermedia compacta que contiene una estructura secundaria igual que en el estado nativo, pero con una pobremente definida estructura terciaria. El término “glóbulo” hace referencia a la compacidad nativa y “fundido” hace referencia al incremento de la entalpía y entropía en la transición desde la estructura nativa al nuevo estado. El estado glóbulo fundido es un fuerte candidato para explicar la conformación molecular de alimentos proteínicos funcionales (Damodaran y Paraf, 1997).

I.5.1 Consideraciones termodinámicas

En términos termodinámicos, la desnaturalización puede ser descrita como la transición reversible entre dos estados; Nativo (N) y Desnaturalizado (D). Para un conjunto de condiciones ambientales definidas como temperatura, presión y concentración de solutos es posible determinar la relación de estas dos poblaciones en equilibrio. Durante la desnaturalización se pierde la estructura compacta de la proteína, el interior no polar se expone al disolvente y en consecuencia las moléculas de agua se estructuran de tal manera que solvatan a estos grupos, por lo que en la proteína desnaturalizada se requiere de una energía extra para romper las interacciones dipolo inducido-dipolo formadas entre los grupos no polares y el agua (Damodaran y Paraf, 1997; Fenema, 1993). El desdoblamiento de las proteínas generalmente incrementa la exposición de los grupos reactivos especialmente los hidrofóbicos de las proteínas globulares, por lo que se favorecen las interacciones hidrofóbicas entre proteínas favoreciendo su agregación. El entrecruzamiento de los agregados proteínicos, seguido de la desnaturalización, involucra uno o más de los siguientes mecanismos:

1. Reacciones de oxidación química de las proteínas como resultado de la interacción covalente de sus grupos funcionales.
2. Entrecruzamiento de proteínas por agentes polifuncionales (incluyendo iones metálicos) en solución.
3. Disminución de la solubilidad porque se favorecen las interacciones hidrofóbicas y la consecuente modificación en la estructura proteínica.

Los puentes de hidrógeno, así como puentes disulfuro e interacciones iónicas, están involucrados en el entrecruzamiento de agregados de proteínas desnaturalizadas (Damodaran y Paraf, 1997). En alimentos, la desnaturalización es normalmente irreversible, debido a la agregación posterior de las moléculas desdobladas. La susceptibilidad de las proteínas a la desnaturalización por calor depende de numerosos factores, como la

naturaleza de la proteína, su concentración, la actividad de agua, el pH, la fuerza iónica y la naturaleza de los iones presentes. Al hablar de agregación térmica de proteínas es necesario diferenciar dos términos; la coagulación y la gelificación térmica. La coagulación térmica es la interacción al azar de las moléculas de proteínas por tratamiento térmico, liderado por la formación de agregados que pueden ser tanto solubles como insolubles (precipitados). Por otra parte, la gelificación térmica es la formación de una red tridimensional que exhibe cierto grado de orden.

El anión 1-anilino-8-naftalensulfonato (ANS) convencionalmente se considera que se une a superficies hidrofóbicas (no polares) preexistentes de proteínas, a través de su grupo no polar anilina-naftaleno. Tal unión es seguida por un incremento de la intensidad de la fluorescencia del ANS. En general se supone que ni la carga negativa del grupo sulfonato del ANS, ni las cargas positivas de la proteína, participan significativamente en las interacciones ANS-proteína. Sin embargo, la calorimetría de titulación ha demostrado que la mayoría de uniones de ANS con las proteínas se produce a través de fuerzas electrostáticas, en el que los pares de iones son formados entre grupos sulfonato del ANS y grupos catiónicos de las proteínas, a pH bajos. Es por tal motivo que el anión ANS es considerado como un “explorador hidrofóbico” para proteínas, membranas, etc. (Matulis et.al., 1999).

I.6 Procesos de equilibrio

La información que se puede obtener de un termograma de DSC es diferente cuando el proceso de desnaturalización de la proteína está en equilibrio durante el barrido de temperatura (transición reversible), en comparación con un proceso que está gobernado cinéticamente (transición irreversible). En los casos de reversibilidad en la desnaturalización seguidas por DSC, se acepta, por lo general, la aplicación de la termodinámica de equilibrio para el análisis de datos. La desnaturalización más simple es aquella en la que solamente los estados nativo y desnaturalizado están poblados significativamente y sus cantidades relativas a una temperatura dada están determinadas por el valor de la constante de equilibrio de desnaturalización. Para este proceso, el calor absorbido a una temperatura establecida es proporcional al avance de la reacción. Por lo tanto, la constante de equilibrio del proceso (K_D) a cada temperatura se puede obtener fácilmente a partir de la curva calorimétrica y de la ecuación de van't Hoff se puede calcular el cambio de entalpia (ΔH^{vH}) correspondiente al proceso $N \rightleftharpoons D$, según:

$$\frac{d \ln K_D}{dT} = \frac{\Delta H^{vH}}{RT^2}$$

Si este proceso es, como se ha supuesto, un equilibrio de dos estados (N) y (D), los valores de ΔH^{vH} y ΔH^{cal} (entalpía total de la transición o entalpía calorimétrica) deben ser iguales (Beldarraín, 2001).

I.7 Equilibrio entre más de dos estados

Si $\Delta H^{vH} < \Delta H^{cal}$, entonces el proceso no es de dos estados ya que existen intermediarios estables termodinámicamente (Privalov, 1980). Esto ocurre generalmente cuando ciertas regiones de la proteína, o dominios cooperativos, se desnaturalizan más o menos independiente el uno del otro. El modelo más frecuentemente usado para explicar estos casos es el modelo secuencial, el cual consiste en varios estados consecutivos durante el proceso de desnaturalización, como se muestra en la Figura 6, en la cual se ilustra el caso de la transición térmica de la Estreptoquinasa recombinante (rSk) a pH neutro analizado con este modelo.

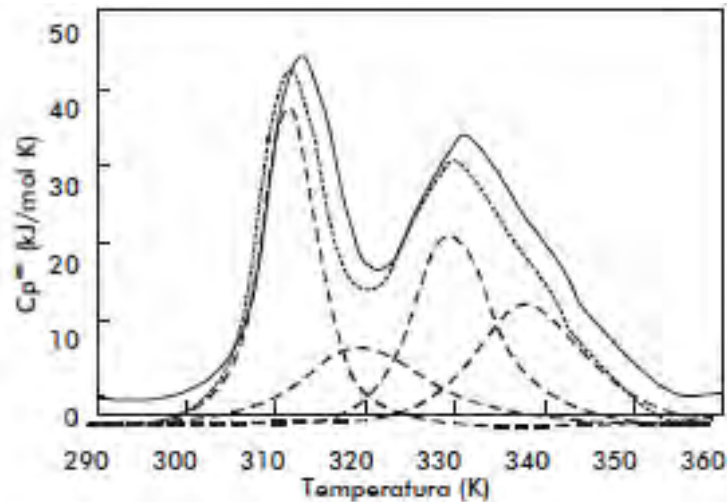


Figura 6. Curvas de capacidad calorífica contra temperatura de rSk en fosfato de sodio 10 mM pH 7.5. La línea continua corresponde a los datos experimentales. La línea discontinua (corta) representa la suma de las cuatro transiciones individuales (líneas discontinuas largas).

I.8 Procesos de no equilibrio

Los equilibrios descritos anteriormente no se cumplen para muchas proteínas solubles y para ninguna de las proteínas de membrana estudiadas. Es por ello que los parámetros termodinámicos que se obtienen con los criterios descritos anteriormente pueden ser

incorrectos, excepto el área bajo la curva que sigue representando la entalpía calorimétrica de desnaturalización. La desnaturalización térmica irreversible es atribuida en forma general a alteraciones en el estado final, como la autólisis, las agregaciones, las alteraciones químicas de los residuos de los aminoácidos, entre otros, que impiden que la proteína adopte su estructura nativa. Estas alteraciones irreversibles son fundamentalmente procesos cinéticos que se pueden describir a través de ecuaciones de velocidad. Para los procesos irreversibles, la dependencia de las transiciones calorimétricas con la velocidad de barrido ha sido en muchos casos analizada exitosamente en términos de un modelo cinético que considera dos estados, originalmente desarrollado por Sanchez-Ruiz et.al. (1988). Este modelo supone que una transición calorimétrica puede ser representada como $N \rightarrow F$, donde N es el estado nativo, F el estado final con una cinética de primer orden y una constante de velocidad k. Este modelo ha dado lugar a varias formas para analizar las curvas calorimétricas, generando cuatro métodos diferentes para el cálculo de la energía de activación E_a del proceso cinético (Davoodi et. al., 1998).

1. El primer método relaciona la dependencia con la temperatura de la constante de velocidad, k, que puede ser obtenida con las siguientes ecuaciones:

$$k = \frac{v \Delta C_p}{\Delta H - \langle \Delta H \rangle}$$

$$k = A \exp\left(-\frac{E_a}{RT}\right)$$

Donde v (K/min) es la velocidad de calentamiento, ΔC_p es la capacidad calorífica en exceso, ΔH es el calor total del proceso (proporcional al área bajo la curva del termograma), $\langle \Delta H \rangle$ es el calor desarrollado a una temperatura dada (el área total bajo el termograma entre la temperatura inicial y una temperatura dada, T) y E_a es la energía de activación.

2. El segundo método muestra la dependencia de la temperatura con el calor desarrollado y está dada por la ecuación:

$$\ln\left(\ln\left(\frac{\Delta H}{\Delta H - \langle \Delta H \rangle}\right)\right) = \frac{E_a}{R} \left(\frac{1}{T_m} - \frac{1}{T}\right)$$

Donde T_m es la temperatura en el máximo de la transición y R es la constante universal de los gases (Kreimer et. al., 1995).

3. El efecto de la velocidad de calentamiento, v , sobre la temperatura máxima de la transición (T_m) del estado nativo al desnaturalizado, está dada por la siguiente ecuación:

$$\ln \frac{v}{T_m^2} = \ln \frac{AR}{E_a} - \frac{E_a}{T_m}$$

Donde A es el factor pre-exponencial de la ecuación de Arrhenius, por lo que, a partir de un gráfico del $\ln \frac{v}{T_m^2}$ en función del recíproco de la temperatura, se obtendrá una línea recta y con el valor de la pendiente se calcula E_a (Tello-Solís y Arroyo-Reyna, 2002).

4. La energía de activación, E_a , puede ser directamente calculada a partir de la ecuación:

$$E_a = \frac{eRC_p^m T_m^2}{\Delta H}$$

Donde C_p^m es la capacidad calorífica en el máximo de la curva y e representa la base de los logaritmos naturales y tiene un valor de 2.7182.

En los procesos de no equilibrio las transiciones dependen en gran medida de la velocidad de barrido (Beldarraín, 2001).

CAPITULO II

ESTUDIOS PREVIOS

II.1 Análisis térmico de la carne

El comportamiento térmico de las proteínas puras es generalmente observado en condiciones de dilución extrema, en ambientes en los que las interacciones proteína-proteína son mínimas. Los investigadores en el campo de alimentos requieren información fundamental acerca de las reacciones de las proteínas en mezclas complejas y en altas concentraciones, condiciones encontradas en los alimentos. En la ciencia de alimentos, la DSC ha sido usada para estudiar comportamientos polimórficos de los lípidos, la gelatinización del almidón y el comportamiento térmico de numerosas proteínas. Una curva típica de las transiciones térmicas observadas en la carne se muestra en la Figura 7. La señal está compuesta por tres zonas principales: A, B y C.

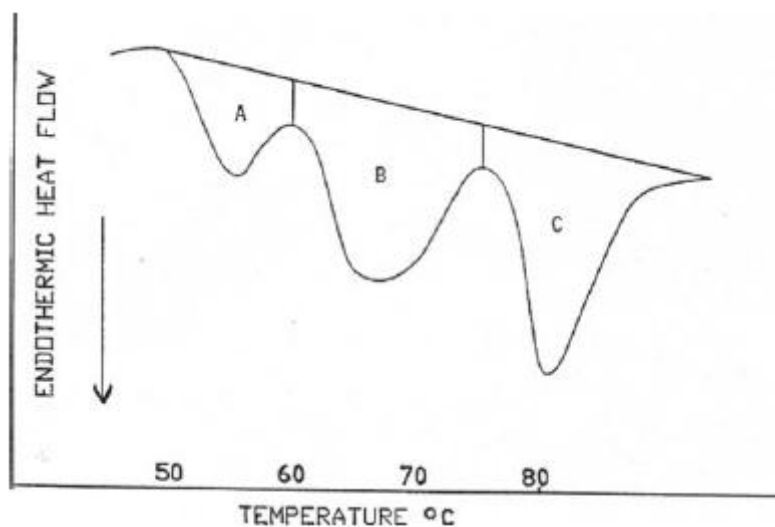


Figura 7. Señal típica del músculo compuesto de tres principales zonas: A, subunidades de miosina; B, proteínas sarcoplásmicas y colágeno y C, actina (Findlay et. al., 1989).

Un resumen de las investigaciones de varios autores se muestra en la Tabla 1. Si bien se acepta que las transiciones alrededor de 55 y 80 °C corresponden a la miosina y a la actina, respectivamente, la transición alrededor de 67 °C puede ser debida a las proteínas sarcoplásmicas, el tejido conectivo o meromiosina pesada y es probablemente la contribución de todas ellas. Wright et. al. (1977) demostraron que la desnaturalización de las

proteínas de la carne calentadas entre 7 a 107 °C con una velocidad de calentamiento de 10 °C/min es irreversible.

Tabla 1. Temperaturas máximas (°C) de las transiciones en DSC para algunos músculos (Findlay & Barbut, 1990)

Condiciones del músculo	T1	T2	T3
Músculo de bovino sternomandibularis	57.0	67.0	80.0
Músculo de lomo y pierna de conejo			
<i>Músculo completo</i>	60.0	67.0	80.0
<i>Miofibrillas</i>	62.0	67.0	80.0
<i>Sarcoplasma</i>		67.0	
<i>Actomiosina</i>	54.0	64.0	80.0
<i>Actina</i>			83.5
<i>F-actina</i>			92.0
Semimembranas de músculo de bovino			
<i>Meromiosina ligera pH 5.5</i>	58.0		
<i>Meromiosina ligera pH 8.7</i>	61.0		
<i>Meromiosina pesada pH 5.5</i>		65.0	
<i>Meromiosina pesada pH 8.7</i>	52.0		
<i>Sarcoplasma pH 5.4</i>	55.0	66.0	
<i>Sarcoplasma pH 6.1</i>	55.0	71.0	
<i>Colágeno pH 5.4 y 6.1</i>		67.0	
<i>G-actina pH 5.4 y 6.1</i>			77.0
Músculo de bovino sternomandibularis pH 5.4			
4 días postmortem			
<i>Sarcómero longitud 1.4 µm</i>	57.0	66.1	82.4
<i>Sarcómero longitud 2.4 µm</i>	55.6	66.6	82.9
1.9 µm longitud del sarcómero			
2 días postmortem	57.8	66.3	81.8
8 días postmortem	55.2	67.0	83.2
Miosina de conejo pH 5.5			
<i>KCl (0.012 M)</i>	53.8	67.0	
<i>KCl (0.212 M)</i>	51.7	58.9	
<i>KCl (0.962 M)</i>	48.6	63.6	

II.2 Proteínas del músculo

Después del agua, las proteínas forman el mayor componente del músculo. La respuesta producida por la naturaleza compleja de la textura de la carne puede obtenerse considerando que cada proteína individual responde a cambios en su entorno y sabiendo cómo interactúan unas con otras. Para poder entender la importancia relativa de las

proteínas musculares individuales, es útil conocer su proporción relativa y su relación dentro del mecanismo contráctil como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Composición proteínica del músculo post-rigor del músculo de bovino (Findlay & Barbut, 1990)

Componente	%	Peso molecular (kDa)
Agua	75.0	
Proteínas	19.0	
(a) <i>Miofibrilares</i>	11.5	
Miosina	6.50	
Cadena Pesada		200
Cadena Ligera 1		21
Cadena Ligera 2		17
Cadena Ligera DTNB		19
Actina	2.50	42
Tropomiosina	1.50	35
Troponinas	0.40	
C		18
I		21
N		31
alfa-actina	0.40	103
Proteína-M	0.20	160
Proteína Lineal-N	0.30	600
Conectina	1.40	1000
(b) <i>Sarcoplásmicas</i>	5.50	
G-3-PD	1.20	35
Aldolasa	0.60	40
Enolasa	0.50	41
Creatina-quinasa	0.50	40
LDH	0.40	35
Piruvato-quinasa	0.30	60
Fosforilasa	0.25	90
Mioglobina	0.20	17
Proteínas adicionales menores	1.55	
(c) <i>Estromales</i>	2.00	
Colágeno	1.00	180
Elastina	0.05	1000
Organelos insolubles	0.95	

II.2.1 Proteínas miofibrilares

Las principales proteínas miofibrilares son la miosina y la actina. Las dos subunidades principales de la miosina son la meromiosina ligera (LMM) y la meromiosina pesada (HMM).

La LMM es relativamente estable en el intervalo de pH de 5.5 a 8.7. Los dominios globulares de la HMM generan una doble cabeza (S_1 y S_2). La cabeza globular S_1 es sensible a cambios de pH y fuerza iónica. *In vivo*, la G-actina es polimerizada en una doble hélice llamada F-actina. El comportamiento de las tres formas en que se presenta la actina que son G-actina, F-actina y actomiosina es totalmente diferente. La G-actina es estable a pH de 5.4 a 6.1 y la transición térmica aparece alrededor de 77 °C. La F-actina es más estable y tiene su transición cerca de 92 °C. En la actomiosina la transición de la actina es alrededor de 81 °C. La tropomiosina se asemeja a la LMM, por ello tienen temperaturas de transición térmica cercanas. Las troponinas C, I y N que son proteínas reguladoras están localizadas en los filamentos delgados de la actina y se ha reportado que aisladas muestran una temperatura máxima de transición a 70 °C. Las actininas están asociadas con cualquiera de los extremos de los filamentos delgados de la actina. La α -actina que sirve de ancla entre los filamentos delgados de actina y la línea Z, es relativamente estable al calor mientras que la β -actina que actúa limitando la polimerización de la G-actina, se desnaturaliza alrededor de 50 °C. Las propiedades térmicas del resto de las proteínas miofibrilares aisladas todavía no han sido estudiadas.

II.2.2 Proteínas sarcoplásmicas

Las proteínas solubles del sarcoplasma están compuestas por moléculas enzimáticas y de transporte. Constituyen 5.5% del músculo magro. Las 5 proteínas más abundantes son gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (G-3-PD), aldolasa, enolasa, creatin-quinasa y lactosa deshidrogenasa (LDH), las cuales tienen pesos moleculares altos entre 35 y 41 kDa. Su similitud en tamaño y solubilidad sugiere que pueden responder de manera similar al calentamiento. Las evidencias sugieren que las proteínas sarcoplásmicas sufren una transición térmica entre 65 y 68 °C. Las proteínas sarcoplásmicas no tienen un papel estructural, su impacto en la terneza de la carne puede ser en la pérdida de su capacidad de retención de agua junto a la desnaturalización, con la tendencia de agregarse en los filamentos adyacentes. Existen algunas evidencias de que a medida que aumenta la temperatura, la actividad proteolítica se incrementa, hasta el punto de desnaturalización de las enzimas responsables. La terneza de la carne “cocida lentamente” es atribuida a la ruptura de las proteínas estructurales causadas por este efecto.

II.2.3 Proteínas del estroma

Las proteínas del estroma son las más resistentes químicamente de todas las proteínas musculares. En el nivel celular ellas componen el endomisio que contiene a las fibras musculares. El tejido conectivo perimisio y epimisio provee el entorno estructural de los paquetes musculares y el músculo, respectivamente. El endomisio junto con el retículo sarcoplásmico envuelve a la fibra muscular, el endomisio está compuesto principalmente de colágeno. Se ha demostrado que el colágeno se encoge alrededor de 67 °C. Es interesante mencionar que a la misma temperatura que el colágeno se encoge, la elastina se ablanda. Esto es atribuido a la disminución de la fuerza de las interacciones hidrofóbicas (Findlay y Barbut, 1990).

II.3 Factores que influyen en la estabilidad térmica de las proteínas

II.3.1 pH y sales

La concentración de sales y el pH pueden ser controlados para aumentar o disminuir la estabilidad de las proteínas. El pH de la carne roja normal es cercano a 5.4, el cual está en la vecindad del punto isoeléctrico de la mayoría de las proteínas presentes en el músculo (aproximadamente 5.5). Se ha reportado que independientemente del pH natural de la carne post rigor, el acondicionamiento en una solución amortiguadora puede inducir las mismas transiciones térmicas que las observadas en el mismo pH logrado naturalmente. Otro factor en la desnaturalización de las proteínas es la proporción de agua libre en el sistema. La reducción de agua libre tiende a desplazar la temperatura de desnaturalización hacia temperaturas mayores con una reducción de la entalpía de transición (Findlay y Barbut 1990).

Wright y Wilding (1984) estudiaron la influencia del pH y la fuerza iónica sobre la respuesta térmica de la miosina del músculo de conejo, usando un buffer de fosfatos. Las diferencias dramáticas particularmente entre los extremos de pH y los niveles de sales, demuestran la susceptibilidad de la miosina.

Wagner y Añon (1985) usaron la solución de Ringer modificada que contiene bajas concentraciones de NaCl, KCl y MgCl₂ para obtener proteínas miofibrilares empobrecidas de proteínas sarcoplásmicas. Ellos observaron tres transiciones térmicas y sugieren que los filamentos gruesos formados en su mayoría de miosina corresponden al pico I y II que aparecieron entre 57 y 64 °C, y son más sensibles al calentamiento que los filamentos delgados formados por la actina y las proteínas menores que corresponden al pico III (73 a

74 °C). La transición de desnaturalización, correspondiente al pico I, se observa más fácilmente a pH 5.4 a 5.6 que para valores altos de pH. El efecto opuesto se observa en la desnaturalización de los picos II y III.

Quinn et. al., (1980) observaron que la presencia de NaCl en altas concentraciones (2 % p/v) alteró drásticamente la estabilidad de las proteínas de carne de bovino durante su procesamiento, reduciendo la temperatura de desnaturalización. Ellos también revelan la complejidad de los sistemas cárnicos en términos de su respuesta térmica.

Otros investigadores demostraron que incrementos en la concentración de NaCl resultan en un descenso de la temperatura (T_1) y la entalpía (ΔH_1) de transición de la miosina. La temperatura de desnaturalización de las proteínas sarcoplásmicas y el colágeno (T_2) se incrementan significativamente por encima del control (carne de bovino sin adición de las soluciones salinas), cuando se agrega una solución de NaCl 1.25% (p/v), pero las temperaturas fueron las mismas que en el control cuando se usó soluciones de 2.5 y 5.0% (p/v). La temperatura de desnaturalización de la actina (T_3) tiende a incrementarse cuando se agrega NaCl, pero la entalpía (ΔH_3) decrece. El KCl mostró efectos similares sobre T_1 , T_2 , ΔH_1 y ΔH_3 que el NaCl. El incremento en la concentración de $MgCl_2$ tuvo efectos más pronunciados sobre la disminución de la segunda entalpía comparado con las sales monovalentes. Con una solución de $MgCl_2$ 5% (p/v), T_1 se incrementó significativamente (Barbut y Findlay, 1991).

Por otro lado, los termogramas de DSC de las proteínas sarcoplásmicas aisladas del bagre rayado (*Pangasius hypophthalmus*), tratadas de pH 7 a 9, exhibieron dos picos principales; exotérmico y endotérmico como se muestra en la Figura 8. Algunas proteínas sarcoplásmicas parecen agregarse fácilmente, como lo demuestra la transición exotérmica en 53.6 °C, el cual representa un valor neto de reacciones endotérmicas y exotérmicas. Además, se observaron transiciones endotérmicas a 67.7 y 85.8 °C, indicando que las proteínas sarcoplásmicas se desnaturalizaron a una temperatura relativamente más alta que para la miosina de pescado, la cual apareció a una temperatura cercana a 35 °C (Yongsawatdigul y Park, 2003). La estructura de "glóbulo fundido" de las proteínas sarcoplásmicas a pH de 5 a 9 promueve la agregación a través de interacciones hidrofóbicas y puentes disulfuro. Las proteínas sarcoplásmicas poseen una carga neta prácticamente nula en el punto isoeléctrico, lo que les permite agregarse fácilmente a bajas temperaturas. Cuando se desplazó el pH a valores alcalinos, las proteínas tuvieron carga neta negativa, requiriendo mayor temperatura para superar las repulsiones electrostáticas e inducir las interacciones proteína-proteína.

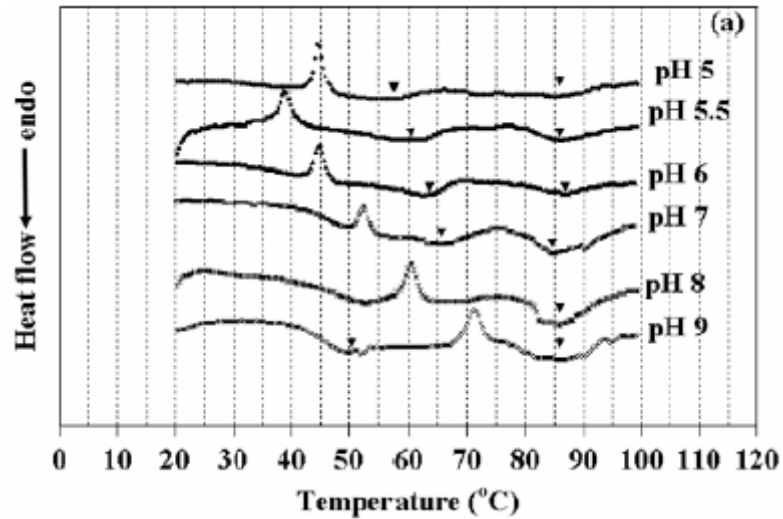


Figura 8. Termogramas de DSC de las proteínas sarcoplásmicas aisladas del bagre rayado (15 mg/mL proteína) para varios pHs durante el calentamiento de 10 a 100 °C a 1 °C/min (Tadpitchayangkoon et al. 2010).

II.4 Perfil electroforético de las proteínas sarcoplásmicas extraídas del músculo

En otras investigaciones en músculo porcino se usaron buffers para aislar las fracciones proteínicas que usualmente contienen EDTA (ácido etilendiaminotetracético) o EGTA (ácido etilenglicol-bis(2-aminoetilen)-N,N,N',N'-tetracético) para eliminar los metales pesados y proteger la actividad enzimática de las proteínas. Se usó una solución amortiguadora de lavado (Tris-HCl con EDTA, pH 7) para extraer las proteínas sarcoplásmicas. La mayoría de las proteínas sarcoplásmicas fueron eliminadas en el primer lavado, la concentración de proteínas extraídas fue de 18.4 mg/mL, en el segundo y tercer lavados el contenido de proteínas fue de 8.7 y 2.8 mg/mL, respectivamente. Los pesos moleculares de la mayoría de proteínas sarcoplásmicas se observaron en el intervalo de 31 a 97 kDa (Pérez-Juan et al., 2007).

Tadpitchayangkoon et al. (2010) estudiaron los cambios de conformación y las propiedades reológicas de las proteínas sarcoplásmicas aisladas de bagre rayado (*Pangasius hypophthalmus*), tratado a varios pHs (2 a 12) para las cuales se determinó que el punto isoeléctrico fue a pH 5. La mayoría de las proteínas sarcoplásmicas, independientemente del tratamiento con distinto pH, tuvieron una masa molecular alrededor de 43 kDa (Figura 9).

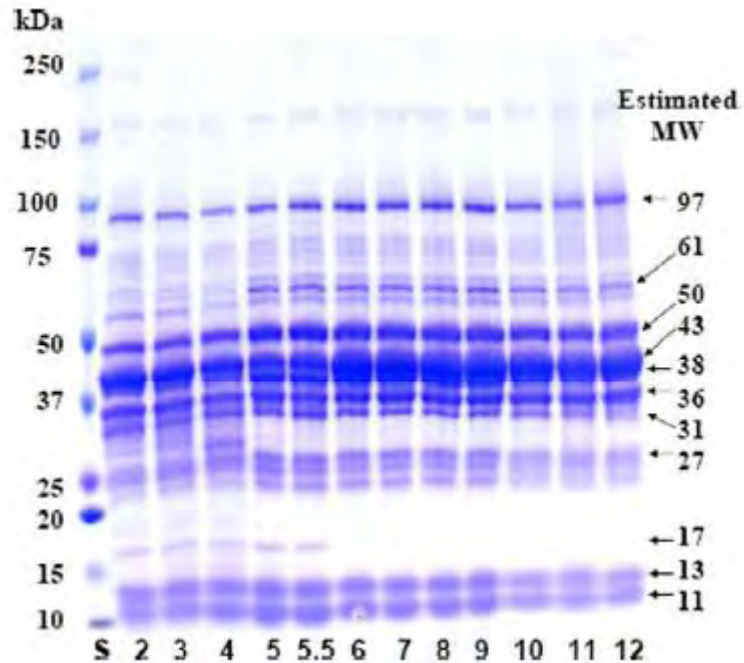


Figura 9. Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE por sus siglas en inglés) que muestra los patrones de las proteínas sarcoplásmicas solubles tratadas a varios pHs (Tadpitchayangkoon et al., 2010).

II.5 Microscopia confocal de barrido láser

La microscopia confocal de barrido de láser (CSLM por sus siglas en inglés) tiene varias aplicaciones en el estudio de la microestructura de alimentos y productos alimenticios. La CSLM ofrece numerosas ventajas sobre las técnicas convencionales en estudios en los que se busca relacionar la composición, el procesamiento y las propiedades finales de estos sistemas. La preparación de las muestras es fácil y disminuye la creación o aparición de efectos espurios, imperfecciones o distorsiones artificiales impropias de la muestra. El gran potencial de la CSLM en estudios de microestructura de alimentos fue demostrado con la observación simultánea en tres dimensiones de proteínas y lípidos de varios tipos de grasas para untar y quesos (Blonk y van Aalst, 1993). Otros investigadores demostraron que la CSLM es una herramienta útil para obtener información acerca de las propiedades de las proteínas y las redes de almidón de productos de trigo (Dürrenberg et al., 2001).

El microscopio confocal trabaja con muestras que absorben y emiten fluorescencia, la cual es una propiedad que tienen ciertas moléculas de absorber luz de una determinada longitud de onda y emitir luz en una longitud de onda superior. Existen dos tipos de fluorescencia, la primaria, i.e. auto fluorescencia y la secundaria, i.e. fluorocromos. De esta última existen los tipos directos y conjugados. Algunos investigadores han usado marcadores fluorescentes

extrínsecos no covalentes en varios campos del análisis de proteínas. Por ejemplo, en la caracterización de intermediarios de plegamiento, medición de superficie hidrofóbica y detección de agregación o fibrilación. En estos últimos tiempos se ha incrementado el uso de marcadores fluorescentes extrínsecos como el ANS, debido a su versatilidad y sensibilidad (Hawe et al., 2007).

CAPITULO III

METODOLOGÍA

Se utilizó carne de bovino del músculo *Psoas major*, llamado comercialmente filete, nombre que se utiliza de aquí en adelante, adquirida en el Sistema de Tiendas de Autoservicio de la Universidad Nacional Autónoma de México, ubicada dentro del campus de Ciudad Universitaria. La grasa y el tejido conectivo fueron removidos cuidadosamente en forma manual y la carne fue cortada en pequeños trozos con un tamaño aproximado de 2 x 2 x 1 cm. Aproximadamente 30 g de carne picada se empacaron a vacío en bolsas de polietileno y las muestras fueron almacenadas en congelación a -18 °C. Se adquirió un lote de carne de 500 g por mes, con el fin de evitar almacenar la carne por más tiempo y con ello introducir el tiempo de almacenamiento como variable.

III.1 Análisis de la composición de la carne

Se hizo el análisis químico proximal del filete de acuerdo con las técnicas de la Asociación Oficial de Químicos Analíticos (A.O.A.C. por sus siglas en inglés, 1995):

Determinación del contenido de humedad en carne: método oficial 950.46.

Determinación del contenido de cenizas en carne: método oficial 920.153.

Determinación del contenido de nitrógeno total en carne: método oficial 928.08.

El contenido de grasa se determinó usando la metodología reportada por Bligh y Dyer, 1959.

III.2 Fuerza iónica de las soluciones extractoras

La fuerza iónica de las soluciones extractoras de las proteínas sarcoplásmicas; solución amortiguadora de lavado y de Ringer modificada, se calculó usando la expresión:

$$I = \frac{1}{2} \sum m_i z_i^2$$
 donde m_i es la concentración del elemento i (mol/L) y z_i es la carga del elemento

i . La fuerza iónica de la solución de Ringer modificada (0.15 M NaCl, 3 mM KCl y 3 mM MgCl₂) y de la solución amortiguadora de lavado (0.1 M Tris-HCl en 20 mM EDTA) fueron 0.2 mol/L y 0.3 mol/L respectivamente.

Las etapas experimentales llevadas a cabo en este trabajo se muestran en la Figura 10.

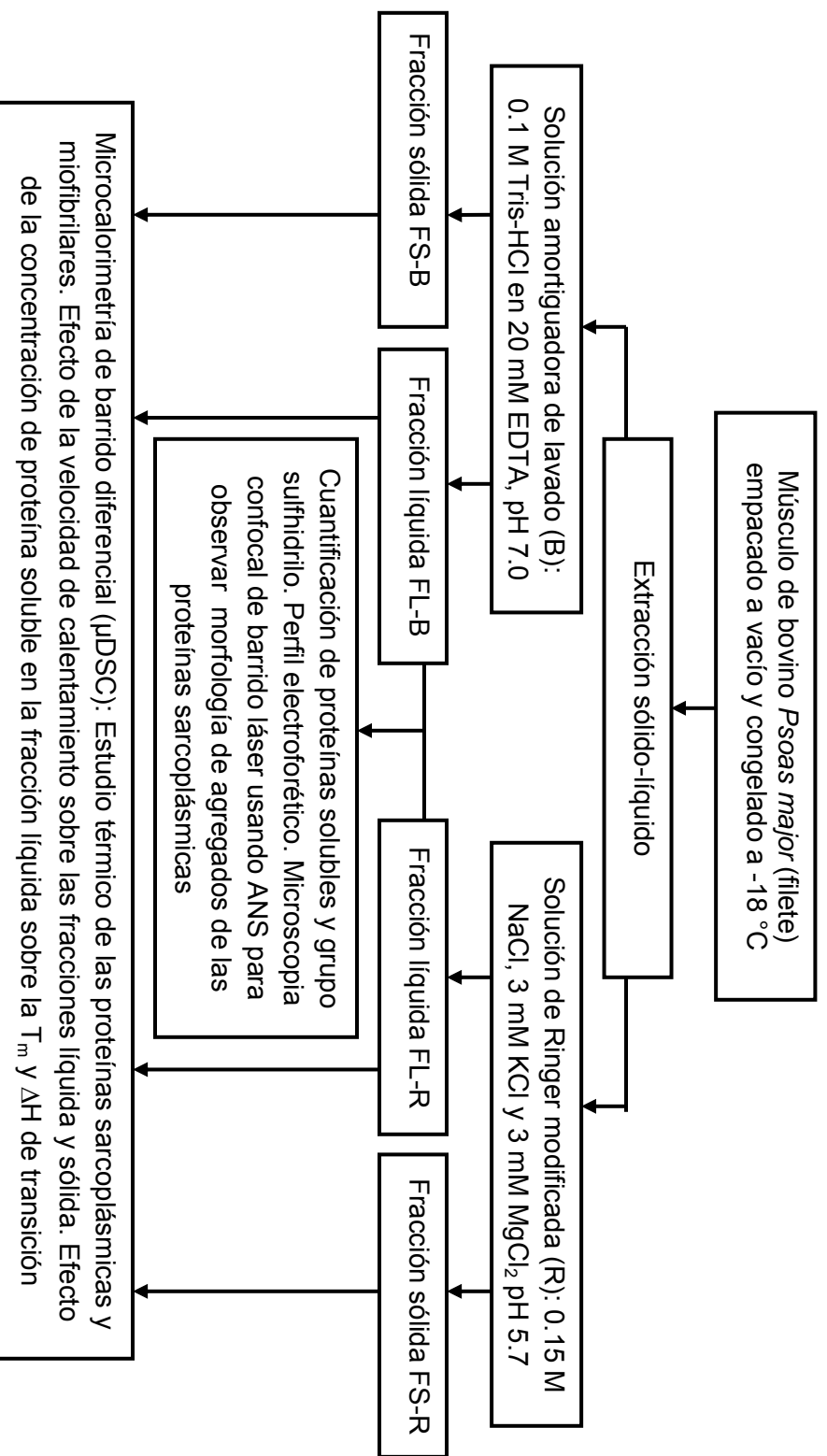


Figura 10. Diagrama con las etapas del trabajo experimental.

III.3 Extracción de las proteínas sarcoplásmicas del filete

En esta etapa se usaron dos soluciones extractoras: amortiguadora de lavado (B) y Ringer modificada (R), para separar las proteínas sarcoplásmicas del filete y obtener las fracciones proteínicas solubles e insolubles respectivas. En primera instancia se optimizaron los factores que afectan la extracción tales como: a) la relación muestra-extractor; b) el tiempo de agitación magnética de la mezcla muestra/extractor y c) la temperatura de extracción. Luego de realizar ensayos previos se estableció que la relación en peso muestra-extractor, adecuada fue de 1:3, el tiempo de agitación y la temperatura de extracción se mencionan en los apartados III.3.1 y III.3.2.

III.3.1 Solución amortiguadora de lavado (B); 0.1 M Tris-HCl en 20 mM EDTA, pH 7 (Pérez-Juan et al., 2007).

Se pesaron 5 g de filete, cortado en trozos finos, se retiró cuidadosamente el tejido conectivo y la grasa. Se adicionaron 15 g de B, se agitó magnéticamente por 10 minutos, se centrifugó (H-1650 Centrifuge Labtronic Scientific, USA) a 12000 rpm por 30 minutos, se obtuvo la fracción líquida (FL-B-1) y se registró el peso. La fracción sólida resultante se secó durante 10 min a temperatura ambiente, con ayuda de papel filtro y se registró el peso. Se repitió el procedimiento anterior de extracción y secado dos veces más para obtener las fracciones líquidas FL-B-2 y FL-B-3 y una única fracción sólida final FS-B-3, después de los tres lavados. Para otro ensayo, en el cual se demostró, el efecto del proceso de lavado sobre las transiciones de las fracciones sólidas, se usaron 3 muestras de 5 g de filete cada una. A la primera muestra se realizó un solo lavado con B, se obtuvieron las fracciones FL-B-1 y FS-B-1. A la segunda muestra se realizaron dos lavados con B y se obtuvieron las fracciones FL-B-1 y FL-B-2 y FS-B-2. A la tercera muestra se realizaron tres lavados con B y se obtuvieron las fracciones FL-B-1, FL-B-2, FL-B-3 y FS-B-3.

III.3.2 Solución de Ringer modificada (R); 0.15 M NaCl, 3mM KCl y 3 mM MgCl₂, pH 5.7 (Wagner y Añon, 1985).

Se pesaron 5 g de filete, cortado en pequeños trozos, se retiró cuidadosamente el tejido conectivo y la grasa. Se adicionaron 15 g de R, se agitó magnéticamente por 4 horas a 4 °C. Pasado este tiempo se almacenó la mezcla en refrigeración por una noche, se centrifugó (H-1650 Centrifuge Labtronic Scientific, USA) a 11000 rpm por 10 minutos, se obtuvo la fracción líquida (FL-R) y se registró el peso. La fracción sólida resultante (FS-R) se secó por 10 min a

temperatura ambiente con ayuda de papel filtro y se registró su peso. Se realizó el balance de masa.

III.4 Cuantificación de proteínas solubles

Se determinó la concentración de proteínas solubles en las fracciones líquidas FL-R, FL-B-1, FL-B-2 y FL-B-3, por el método de Lowry et. al. (1951). La concentración de proteínas se obtuvo interpolando en una curva patrón preparada con albúmina bovina sérica con concentraciones de 10 a 100 µg/mL, tratada de la misma forma que las muestras. La absorbancia fue medida en un espectrofotómetro (Perkin Elmer UV/Vis Spectro-photometer Lambda 3B, USA). Para cuantificar las proteínas solubles en las muestras fue necesario diluir en la solución extractora respectiva. Para la fracción FL-R, la dilución fue de 1 mL en 150 mL de R; para las fracciones FL-B-1, FL-B-2 y FL-B-3 las diluciones fueron de 1 mL en 150, 30 y 10 mL de B, respectivamente.

III.5 Cuantificación de grupo sulfhidrilo (Soottawat et.al., 1997)

Se agregó 1 mL de la suspensión de proteínas solubles en un tubo de ensayo, se mezcló con 9 mL de solución amortiguadora Tris-HCl pH 6.8 que contenía 8 M de urea, 2% (p/v) sulfato dodecil de sodio (SDS) y 10 mM de EDTA; de esta mezcla se tomó una alícuota de 4 mL y se hizo reaccionar con 0.4 mL de disolución 0.1% (p/v) de 5,5-ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico), la mezcla resultante se incubó en un baño a 40°C, durante 25 minutos. Finalmente se midió la absorbancia del color desarrollado a una longitud de onda de 412 nm en un espectrofotómetro (Perkin Elmer UV/Vis Spectro-photometer Lambda 3B, USA). La concentración de grupo sulfhidrilo se obtuvo interpolando en una curva patrón preparada con L-cisteína con concentraciones de 10 a 100 µg/mL, tratada de la misma forma que las muestras.

III.6 pH de las fracciones líquidas

Antes de realizar las mediciones se calibró el pH-metro (Model 420 A, Orion, España) con tres soluciones amortiguadoras de pH 4, 7 y 10. Se midió el pH del agua desionizada que se usó para preparar las soluciones extractoras, de las soluciones extractoras y de las fracciones líquidas FL-R, FL-B-1, FL-B-2 y FL-B-3.

III.7 Calorimetría de barrido diferencial

Las características térmicas de las proteínas sarcoplásmicas y miofibrilares (miosina y actina) fueron analizadas usando un microcalorímetro de barrido diferencial (μ DSC7 evo, Setaram, Francia). Se hicieron varios ensayos para determinar la cantidad de muestra de la fracción soluble y de la fracción insoluble, que se obtuvieron con cada método de extracción, la selección de la sustancia de referencia para las respectivas fracciones, la velocidad de calentamiento y el intervalo de temperatura para las rampas de calentamiento y enfriamiento, que permitieron obtener termogramas definidos y claros. La capacidad de las celdas de muestra y referencia del microcalorímetro es de 1 mL. Para muestras líquidas no es recomendable llenar las celdas completamente, se deja suficiente espacio por encima del líquido para permitir la dilatación sin presión interna excesiva. En la práctica, el peso de la muestra y referencia no debe ser mayor de 850 mg (Setaram, 2010). El peso de la muestra y la referencia seleccionado fue 838 mg, las sustancias de referencia fueron agua desionizada para las muestras de filete, solución de Ringer modificada para las fracciones FL-R y FS-R y solución amortiguadora de lavado para las fracciones FL-B-1, FL-B-2, FL-B-3, FS-B-2, FS-B-3. La velocidad de calentamiento y enfriamiento fue de 1.2 °C/min, el tratamiento térmico incluyó una isoterma de 5 minutos a 20 °C seguida de calentamiento de 20 a 95 °C y posterior enfriamiento de 95 a 20 °C. Cada vez que se encendió el microcalorímetro, se procedió a purgarlo con nitrógeno gas a una presión de 300 kPa por 3 horas, para los ensayos con las muestras se trabajó con una presión de nitrógeno gas de 100 kPa. La Figura 11 muestra un esquema de la forma y ubicación en el μ DSC, de las celdas de referencia y de muestra.

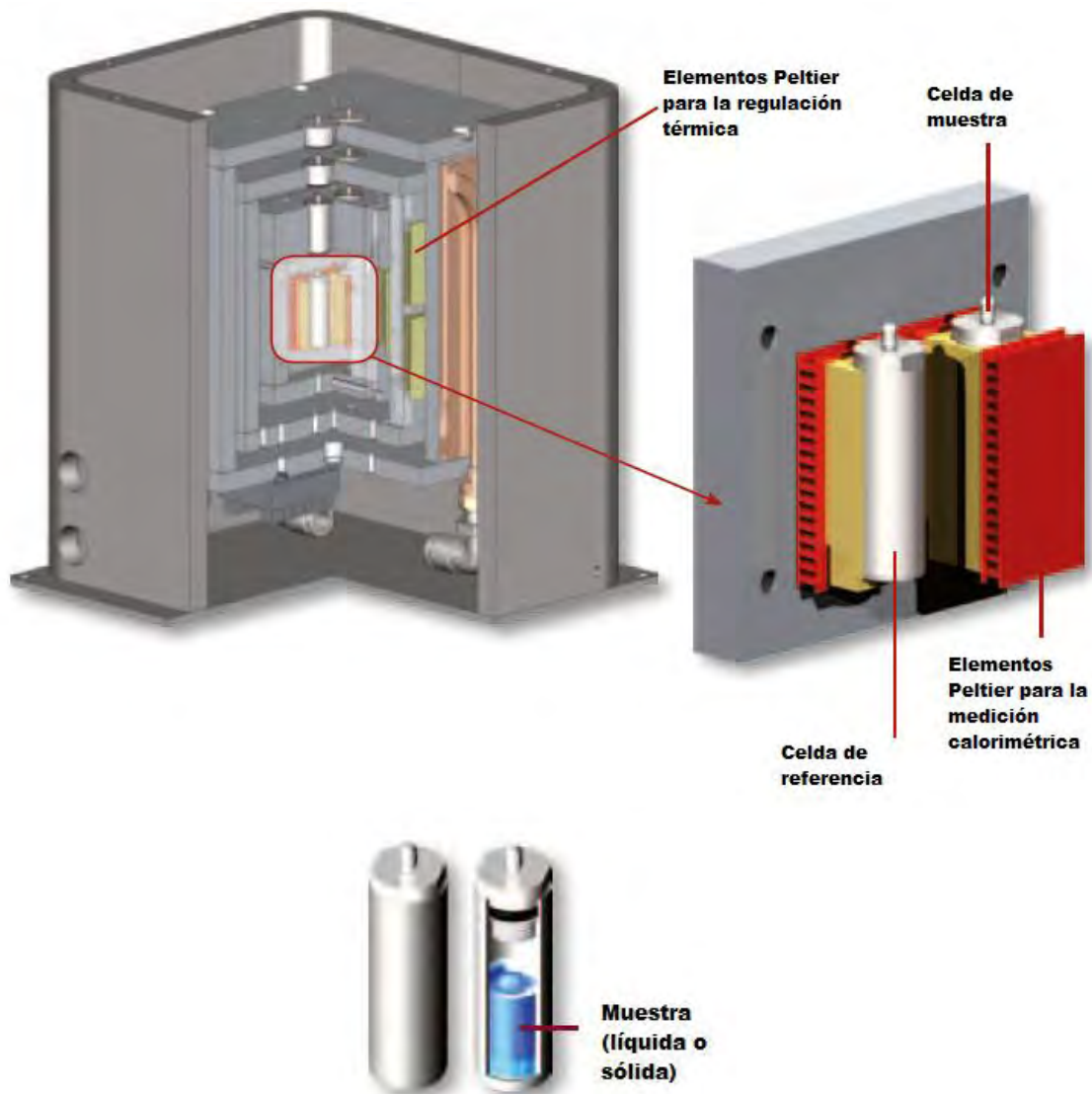


Figura 11. Esquema de las celdas de referencia y muestra del microcalorímetro de barrido diferencial. (<http://www.setaram.com/microDSC7-evo.htm>. Consultada en Marzo del 2011).

La designación de las transiciones, que aparecieron en las curvas calorimétricas, a las principales proteínas cárnicas, se fundamentó en la gran cantidad de resultados publicados en años anteriores, como se mencionó en el Capítulo II. El uso de proteínas cárnicas aisladas y purificadas, como sustancias control para la designación de las transiciones térmicas de la carne de bovino, sería el caso ideal, no obstante, el alto costo que tienen algunas de las proteínas cárnicas como la miosina y actina, cuyos precios se muestran en la Tabla 3, o la no existencia de otras como las sarcoplásmicas a nivel comercial, hacen que esta opción no sea viable. Por otro lado, realizar la separación de las principales proteínas

miofibrilares en el laboratorio involucra métodos de aislamiento y purificación largos y tediosos (Pérez-Juan et.al., 2007).

Tabla 3. Costos* de proteínas miofibrilares aisladas y purificadas a nivel comercial.

Reactivo	Cantidad (mg)	Precio (Pesos Mexicanos)	Características
Miosina de músculo de conejo	1700	19890	solución de aproximadamente 5-15 mg/mL
Actina de músculo de bovino	10	12850	polvo liofilizado

*(<http://www.sigmaaldrich.com/technical-service-home/product-catalog.html>. Consultada en Marzo del 2011)

III.7.1 Ensayos cinéticos

III.7.1.1 Efecto de la velocidad de calentamiento

Para determinar el efecto de la velocidad de calentamiento sobre la temperatura máxima y la entalpía de transición de las proteínas sarcoplásmicas y miofibrilares, se calentó a velocidades programadas de 0.6, 0.9 y 1.2 °C/min, a las fracciones líquida FL-B-1 y sólida FL-B-3, obtenidas con el procedimiento III.3.1.

III.7.1.2 Estudios de reversibilidad

Se programaron dos rampas consecutivas de calentamiento-enfriamiento en el ensayo con la fracción líquida FL-R obtenida con el procedimiento III.3.2, para establecer la presencia de transiciones en el enfriamiento o en el recalentamiento de la muestra.

III.7.1.3 Efecto de la concentración de proteínas solubles sobre la temperatura máxima y la entalpía de transición

Para determinar el efecto de la concentración de proteínas solubles sobre la temperatura máxima y la entalpía de las transiciones de las proteínas sarcoplásmicas de las fracciones líquidas FL-R y FL-B-1, se hicieron diferentes diluciones empleando las soluciones de Ringer modificada y solución amortiguadora de lavado, respectivamente. Para la FL-B-1, se utilizaron concentraciones dentro del intervalo de 0.45 a 11.16 mg/mL, mientras que para la FL-R se emplearon concentraciones dentro del intervalo de 0.43 a 10.67 mg/mL. La concentración está expresada en mg de proteína soluble por mL de fracción líquida.

III.8 Microscopia confocal de barrido láser (Dürrenberg et al., 2001)

Para observar la formación de agregados debida al tratamiento térmico de las proteínas sarcoplásmicas, se mezcló la FL-B-1 con una solución 0.5% (p/v) de fluorocromo ácido 8-anilino-1-naftalen sulfónico (ANS) que se excita y emite a 364 y 450 nm, respectivamente, en una relación en volumen extracto-fluorocromo de 100:1.50. La mezcla se calentó de 20 a 95 °C en el μ DSC a una velocidad de calentamiento de 1.2 °C/min. Se preparó una placa para microscopia con el contenido de la celda de muestra después del ciclo calentamiento-enfriamiento; la placa se observó con un objetivo de 40X (zoom 1.8 y 3.5) en un microscopio confocal de barrido con un láser de argón-criptón de inmersión en aceite (FV1000 Olympus, Japón). Se repitió el mismo procedimiento con la FL-R. El contenido de la celda de muestra donde se encontraron los agregados en medio acuoso, se vertió en un Eppendorf de 1 mL y se centrifugó en una micro centrífuga (IEC Centra-Mcentrifuge, USA) por 1 minuto a 13000 rpm. Con ello, se obtuvieron un sobrenadante FL-B-D y un sólido correspondiente a los agregados libres del disolvente al que se denominó Agr-B. Para el caso de los agregados de las proteínas sarcoplásmicas extraídas con solución de Ringer modificada se obtuvieron las fracciones FL-R-D y Agr-R. En las fracciones FL-B-D y FL-R-D también se determinó la concentración de proteínas solubles por el método de Lowry y el contenido de grupo sulfhidrilo.

III.9 Perfil electroforético de las proteínas sarcoplásmicas (Schägger y von Jagow, 1987).

Mediante la electroforesis es posible separar moléculas biológicas dependiendo fundamentalmente de su carga bajo la influencia de un campo eléctrico. Esta técnica permite estimar el peso molecular (PM) de una proteína o el perfil electroforético de una mezcla de ellas, comparando su movilidad electroforética con la de proteínas de PM conocido (marcadores). Estas determinaciones poseen un margen de error de aproximadamente 10%. Las soluciones que se prepararon se describen en la Tabla 4.

Tabla 4. Soluciones preparadas para electroforesis Tri-tricina-SDS-PAGE.

Solución	Reactivo	Concentración o cantidad	Condiciones
Amortiguadora de cátodo	Tris-base	100 mM	aforar 500mL
	Tricina	100 mM	
	SDS	0.1% (p/v)	
	Agua destilada		
Amortiguadora de ánodo	Tris-base	200 mM	aforar 500mL, ajustar el pH 8.9
	Agua destilada		
Amortiguadora de gel (Tris-HCl/SDS)	Tris-base	200 mM	aforar 100mL, ajustar el pH 8.45
	Agua destilada		
	SDS	0.3% (p/v)	
Amortiguadora de muestra	Tris-HCl	1.0 M	ajustar el pH 6.8
	Glicerol	2.4 mL	
	SDS	0.8 g	
	Comassie G-250	2.0 mg	
	Agua destilada		
Acilamida (37.5:1)*	Acilamida	37.1 g	aforar 100mL
	Bis-acilamida	0.38 g	
	Agua destilada		
Glicerol diluido	Glicerol	80% (p/p)	
Persulfato	Persulfato de amonio	10% (p/v)	

*%T = 37.5 representa el porcentaje en peso de acilamida (monómero lineal) y %C = 1 representa el porcentaje de bis-acilamina (monómero de entrecruzamiento)

Los geles concentrador y separador se prepararon con las cantidades de reactivos mostradas en la Tabla 5. Una vez que los geles polimerizaron y los pocillos estuvieron formados, éstos se montaron en una cámara MINIPROTEAN II de BioRad. En el reservorio interior se colocó la solución amortiguadora de cátodo hasta cubrir los pocillos y en el reservorio exterior se colocó la del ánodo hasta llegar a una tercera parte del volumen de la cámara. Los estándares de peso molecular incluyeron: β -galactosidasa (116 kDa), albúmina bovina sérica (66.2 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), lactato deshidrogenasa (35 kDa), REase Bsp98I (25 kDa), β -lactoglobulina (18.4 kDa) y lisozima (14.4 kDa).

Tabla 5. Preparación de geles concentrador y separador para electroforesis Tris-tricina-SDS-PAGE.

Reactivo	Gel Separador	Gel Concentrador
Acrilamida	1.63 mL	324 μ L
Amortiguadora de gel (Tris HCl/SDS)	1.66 mL	0.62 mL
Agua destilada	1.17 mL	1.56 mL
Glicerol	0.53 mL	
Persulfato*	25 μ L	13.3 μ L
Tretametilendiamino (TEMED)	3.33 μ L	3.0 μ L

*Se preparó el mismo día que se usó

La muestra se preparó mezclando 17 μ L de FL-B-1, que contiene 3 mg/mL de proteínas solubles, con 3 μ L de solución amortiguadora de muestra. Los geles se cargaron con 20 μ L de mezcla muestra/amortiguadora y en el caso del estándar de alto peso molecular se cargó con 5 μ L. Las muestras se corrieron a un voltaje constante de 100 V hasta que el frente azul de Comassie llegó casi al borde inferior del gel (45-60 min) (Lomonte, 1985). El gel se retiró de la cámara cuidadosamente con ayuda de un bisturí, se colocó en un frasco de plástico de boca ancha con tapa y se agregaron 100 mL de solución de teñido formada por 100 mL de ácido acético glacial, 900 mL metanol:agua en una relación 1:1 y 1 g de Comassie G-250, y se dejó en reposo una noche a temperatura ambiente. Al día siguiente el gel se colocó en 100 mL de solución desteñidora formada por 100 mL de ácido acético glacial y 900 mL metanol:agua en una relación en volumen de 1:1, y cada tres horas se cambió la solución desteñidora hasta observar bandas claras.

III. 10 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó el programa estadístico STATGRAPHICS PLUS 5.1 (www.statgraphics.com). Se realizó la prueba F de Snedecor para la comparación de dos varianzas y el ensayo de Barlett para más de dos varianzas para verificar la homogeneidad de los resultados. Para determinar diferencias significativas entre dos medias se usó la prueba t-student, mientras que, para más de dos medias se realizó el análisis de varianza (ANOVA). Cuando se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el ANOVA se usó la prueba de múltiples rangos de Tukey al 5%.

CAPITULO IV

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

IV.1 Composición

La composición del músculo de bovino *Psoas mayor* se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6. Composición del músculo de bovino *Psoas mayor* (corte filete).

Lote N°	Humedad (g/100 g de muestra)	Proteína (g/100g de muestra húmeda)	Lípidos	Cenizas
1	72.65 ^a ± 0.51	23.24 ^a ± 1.00	0.85 ^b ± 0.01	1.02 ^a ± 0.02
2	75.97 ^b ± 0.49	23.07 ^a ± 1.15	1.01 ^c ± 0.02	1.09 ^b ± 0.05
3	73.70 ^a ± 1.25	23.44 ^a ± 0.07	0.62 ^a ± 0.01	1.12 ^a ± 0.03

Los datos representan los promedios ± desviación estándar de tres repeticiones para un coeficiente de variación (CV) menor de 5%. Los promedios con letras distintas son estadísticamente diferentes con un riesgo o grado de error (α) de 0.05 de acuerdo a la prueba de intervalos múltiples de Tukey ($\alpha = 0.05$) realizada por columnas.

El porcentaje de humedad del lote 2 fue diferente estadísticamente del de los lotes 1 y 3. El contenido de proteína total de los tres lotes analizados fue homogéneo estadísticamente. En el contenido de grasa de los tres lotes analizados se observaron diferencias estadísticamente significativas. Finalmente en el porcentaje de ceniza, el lote 2 resultó ser estadísticamente diferente a los lotes 1 y 3. Los resultados de la Tabla 5 muestran que el filete es pobre en lípidos (1%) y rico en proteína total (23%) en relación con otros cortes de bovino como el Rib eye, New York y Chuleta (Ramírez Orejel, 2009). Estas y otras características del filete como su ternura, suavidad y jugosidad, hacen de este corte uno de los de mayor precio y alta demanda. El alto porcentaje de humedad en el filete, aproximadamente 75%, permitió seleccionar el agua desionizada como la sustancia de referencia para los ensayos en el microcalorímetro.

IV.2 Extracción de las proteínas sarcoplásmicas del filete

IV.2.1 Solución amortiguadora de lavado

El color fue una característica importante de las fracciones líquidas y sólidas observada a simple vista. El color de la fracción líquida FL-B-1 obtenida en el primer lavado del filete con solución amortiguadora de lavado fue rojo intenso. El color de la fracción FL-B-2 producto del segundo lavado fue rosado. Finalmente, la fracción líquida FL-B-3 tuvo una tonalidad

amarillenta ligera. Las tres fracciones líquidas obtenidas fueron traslúcidas (Figura 12).

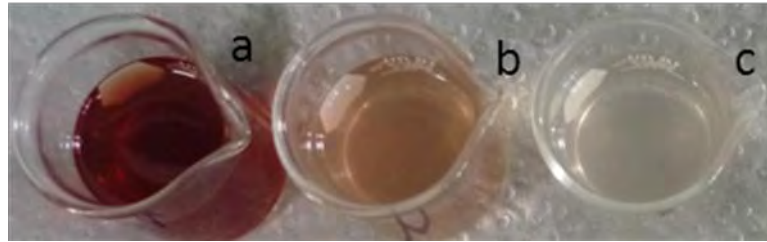


Figura 12. Fracciones líquidas obtenidas en la extracción de las proteínas sarcoplásmicas del filete con la solución solución amortiguadora de lavado. a) FL-B-1; b) FL-B-2 y c) FL-B-3.

Dentro del conjunto de proteínas solubles extraídas de la carne de bovino se encuentra la mioglobina, que le da el color rojo característico (Tornberg, 2005). Esta proteína fue removida del filete en su mayoría en el primer lavado, como se observa en la Figura 12. Por otra parte, el color de las fracciones sólidas FS-B-1, FS-B-2 y FS-B-3 obtenidas en cada lavado se modificó de rosado ligero a amarillo pálido. Estas fracciones sólidas son empobrecidas en proteínas sarcoplásmicas en cada lavado, quedando en la fracción FS-B-3 casi exclusivamente las proteínas miofibrilares.

IV.2.2 Solución de Ringer modificada

En la extracción con la solución de Ringer modificada se obtuvieron dos fracciones, una líquida (FL-R), correspondiente a las proteínas sarcoplásmicas de color rojo no traslúcido con partículas que sedimentaban con facilidad cuando no se refrigeraba inmediatamente al extracto, y otra sólida (FS-R), de color rosado ligero, correspondiente a las proteínas miofibrilares. La solubilidad de las proteínas sarcoplásmicas fue favorecida por las sales presentes en bajas concentraciones en las soluciones extractoras. Las sales afectan la solubilidad de las proteínas de dos diferentes maneras dependiendo de las características fisicoquímicas de la superficie de las proteínas. Generalmente, para una fuerza iónica baja (< 0.5 M) la solubilidad de las proteínas con un gran número de sitios hidrofóbicos expuestos decrece (salting-out), mientras que, con el aumento de la fuerza iónica la solubilidad de las proteínas con una alta incidencia de grupos hidrofílicos en la superficie (salting-in) se incrementa (Damodaran y Paraf, 1997). A bajas concentraciones (< 0.2 M), las sales aumentan la capacidad de fijación de agua de las proteínas debido a que los iones salino hidratados se fijan, aunque débilmente, a los grupos cargados de las proteínas. A estas concentraciones, la fijación de los iones a las proteínas no afecta la capa de hidratación de

sus grupos cargados y el incremento en la capacidad de fijación de agua se debe fundamentalmente a la asociada con los iones ligados (Fenema, 1993). La concentración de sales en las soluciones Ringer modificada y solución amortiguadora de lavado fue baja ($I < 0.5 \text{ M}$); cuando esto ocurre los efectos estabilizadores durante la desnaturalización de proteínas por calor se han atribuido a una respuesta electrostática (Damodaran y Paraf, 1997).

IV.3 pH

Los valores de pH de las soluciones extractoras así como de las fracciones líquidas FL-R, FL-B-1, FL-B-2 y FL-B-3, se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. pHs de las soluciones extractoras y fracciones líquidas obtenidas en la extracción de las proteínas sarcoplásmicas del corte filete con R y B.

Muestras		pH	CV(%)	n
Soluciones extractoras	Agua desionizada	5.59 ^b ± 0.03	0.51	5
	Ringer modificada	5.69 ^c ± 0.04	0.66	7
	Amortiguadora de lavado	6.98 ^f ± 0.03	0.41	4
Fracciones líquidas	FL-R	5.50 ^a ± 0.03	0.48	7
	FL-B-1	5.96 ^d ± 0.02	0.34	9
	FL-B-2	6.62 ^e ± 0.05	0.72	9
	FL-B-3	6.95 ^f ± 0.01	0.10	9

Los datos representan los promedios ± desviación estándar de n repeticiones para un CV menor de 5%. Los promedios con letras distintas son estadísticamente diferentes con $\alpha = 0.05$ de acuerdo a la prueba de intervalos múltiples de Tukey ($\alpha = 0.05$) realizado por columnas.

La solución de Ringer modificada tuvo un pH ligeramente ácido de 5.69. El pH de la fracción líquida FL-R fue 5.50; este valor fue menor estadísticamente que el pH del agua desionizada. Los pHs de las fracciones líquidas FL-B-1, FL-B-2 y FL-B-3 fueron diferentes estadísticamente entre ellos (Anexo A). La fracción líquida del primer lavado tuvo un pH de 5.96, con el segundo y tercer lavados el pH se incrementó en 0.66 y 0.33 unidades respectivamente. Incluso se observó que el pH de la solución extractora B y la fracción líquida FL-B-3 fueron iguales estadísticamente. Para explicar el pH ligeramente ácido que presentaron las fracciones líquidas, se debe recordar que en el músculo del animal vivo el pH se encuentra cerca de 7.0 y con la muerte, por falta de oxígeno se activa la glucólisis anaeróbica produciéndose ácido láctico que provoca el descenso del pH muscular hasta un

valor promedio de 5.5 (Lawrie, 1982 citado en Hui et al., 2006). En soluciones acuosas, los efectos del pH y de la temperatura sobre la desnaturalización de proteínas están conectados tan estrechamente que la desnaturalización raramente puede ser considerada solo como un proceso puramente térmico. En una investigación anterior se encontró que el punto isoeléctrico (pI) de las proteínas sarcoplásmicas del bagre rayado fue a pH 5.0. La solubilidad se incrementa gradualmente a medida que el pH se aleja del pI. Las fuerzas repulsivas electrostáticas de las moléculas de proteínas son extremadamente bajas en su pI y con ello disminuyen las interacciones agua-molécula de proteína produciendo una mínima solubilidad y su precipitación (Tadpitchayangkoon et al., 2010). Considerando lo anterior, las proteínas contenidas en la fracción líquida FL-R precipitaron con facilidad a temperatura ambiente, debido posiblemente a que el pH de dicha fracción estuvo próximo al pI de las proteínas sarcoplásmicas. El efecto del pH sobre la estabilidad térmica de las proteínas sarcoplásmicas se analiza más adelante.

IV.4 Proteína soluble

La Tabla 8 muestra el contenido de proteínas solubles de las fracciones líquidas FL-R, FL-B-1, FL-B-2 y FL-B-3.

Tabla 8. Concentración de proteínas solubles de las fracciones líquidas obtenidas en las extracciones con R y B.

Fracciones	mg/mL	CV(%)
FL-R	10.67 ± 0.30	2.82
FL-B-1	11.16 ± 0.12	1.12
FL-B-2	0.79 ± 0.03	4.01
FL-B-3	0.48 ± 0.03	5.80

Los datos representan los promedios ± desviación estándar de tres repeticiones.

Estadísticamente el contenido de proteínas solubles en la fracción líquida FL-R es menor que en la FL-B-1 con un riesgo de error de 0.05, es decir, que con la solución amortiguadora de lavado se extrae más cantidad de proteínas solubles del filete que con la solución de Ringer modificada. La mayoría de proteínas sarcoplásmicas (PS) fueron extraídas en el primer lavado (FL-B-1), cuya concentración de proteínas solubles fue de 11.16 mg/mL, esto concuerda con la intensidad de color observado en esta fracción. El contenido de proteínas solubles en la fracción FL-B-2 es mayor estadísticamente a el de la fracción FL-B-3 con un riesgo de 0.05. Para ambas comparaciones de las medias, se observó que las varianzas

fueron homogéneas (Anexo B). Los rendimientos de extracción de PS del filete obtenidos con ambas soluciones extractoras, se presentan en la Tabla 9. Para realizar los cálculos de los mg teóricos PS, se consideró que un 35% del contenido total de proteínas de la carne corresponde a las PS (Tornberg, 2005) que son las proteínas solubles extraídas con las soluciones antes mencionadas. La cantidad teórica de PS fue de 406.70 mg contenidos en 5 g de filete.

Tabla 9. Rendimientos de las extracciones de las proteínas sarcoplásmicas contenidas en el filete usando las soluciones de Ringer modificada y solución amortiguadora de lavado.

Fracciones	*Cantidad de PS extraídas (mg)		%CV	%Rendimiento		%CV
FL-R	213.33	± 6.01	2.82	52.45	± 1.47	2.81
FL-B-1	223.13	± 2.50	1.12			
FL-B-2	15.87	± 0.64	4.01	61.12	± 1.23	2.01
FL-B-3	9.57	± 0.55	5.80			

Los datos representan los promedios ± desviación estándar de tres repeticiones. * Cantidad en mg de PS contenidas en 5 g de filete.

La mayor extracción de las proteínas sarcoplásmicas con el solución amortiguadora de lavado podría deberse a que la solubilidad de la proteínas sarcoplásmicas a pH 7 se incrementa, pues este valor se aleja del punto isoeléctrico de las proteínas sarcoplásmicas (Tadpitchayangkoon et al., 2010).

IV.5 Análisis térmico

La DSC puede ser usada en mezclas complejas con altas concentraciones de proteínas, como es el caso de la carne. El termograma que se obtuvo para el filete concuerda con los reportados previamente (Ojeda et al., 2001; Tornberg, 2005; Skipnes et al., 2007; Ramírez Orejel, 2009). En la Figura 13 se muestran los termogramas obtenidos para el filete almacenado 2 y 30 días en congelación a -18°C.

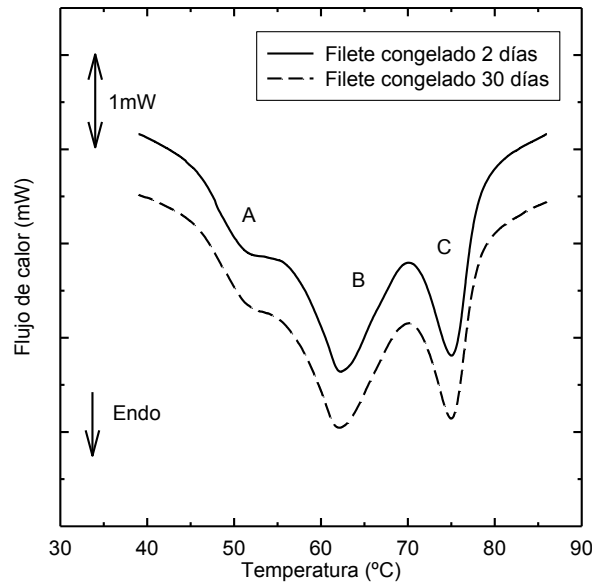


Figura 13. Termogramas de filete congelado a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 y 30. Velocidad de calentamiento $1.2\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

Se observaron tres transiciones endotérmicas a las que se denominó A, B y C. En el Anexo C se muestran los valores de la temperatura inicial (T_i), final (T_f) y máxima (T_m) así como las entalpías de las transiciones endotérmicas A, B y C del filete. Para obtener estos resultados, se consideraron 7 lotes correspondientes a los 6 meses de experimentación en calorimetría. De acuerdo con la Figura 13, durante un intervalo aproximado de un mes, las tres transiciones características de la carne de bovino no sufrieron cambios significativos, motivo por el cual, en la presente investigación se trabajó con lotes de filete almacenados hasta un mes en congelación, para evitar introducir el tiempo de congelación de las muestras como una variable de trabajo. La primera transición muestra su máximo entre 52.8 y $55.2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se atribuye a la miosina, la segunda transición, que ocurre entre 60.9 y $62.6\text{ }^{\circ}\text{C}$, fue asignada al colágeno y a las proteínas sarcoplásmicas y la tercera transición que ocurrió entre 74.5 y $75.7\text{ }^{\circ}\text{C}$, fue asignada a la actina (Martens y Vold, 1976; Wright et al., 1977; Stabursvik y Martens, 1980 citado en Tornberg, 2005). Los intervalos de temperatura mencionados anteriormente para las tres endotermas, fueron calculados con la media y la desviación estándar de las repeticiones. Se ha reportado que la entalpía de desnaturalización térmica de la miosina depende del pH y de la fuerza iónica (Wright y Wilding, 1984). Otros autores (Ojeda et al., 2001) reportan que las tres principales transiciones endotérmicas pueden atribuirse a la desnaturalización de las cabezas de miosina (transición A), a la miosina, el tejido conectivo y las proteínas sarcoplásmicas (transición B) y a la actina con la contribución de otras proteínas del filamento delgado (transición C). Se observó que los coeficientes de

variación de las temperaturas T_i , T_f y T_m fueron menores de 5%, para las repeticiones, pero no sucede lo mismo con las entalpías para las cuales los coeficientes de variación son mayores de 10%, sobre todo para la transición de la miosina (CV = 39%), se ha reportado que la miosina es muy susceptible a los cambios de pH (Wright y Wilding, 1984) inclusive si estos son menores de una unidad (Wagner y Añón, 1985). Otro factor, que posiblemente contribuyó a que los valores de entalpías presenten altos coeficientes de variación, fue la incertidumbre en el proceso de integración del área bajo la curva calorimétrica específicamente al delimitar la temperatura inicial y final de la transición. El criterio para establecer la temperatura inicial y final (T_i y T_f) para la integración del área bajo las curvas calorimétricas, fue usar el trazo de la derivada de la curva de flujo de calor con respecto al tiempo, los puntos dónde la curva es cero, son considerados como puntos críticos o singulares que ayudaron a colocar los límites de integración (Skipnes et. al., 2007). Dos ejemplos de cómo se realizó los procesos de integración se muestran en las Figuras 14 y 15.

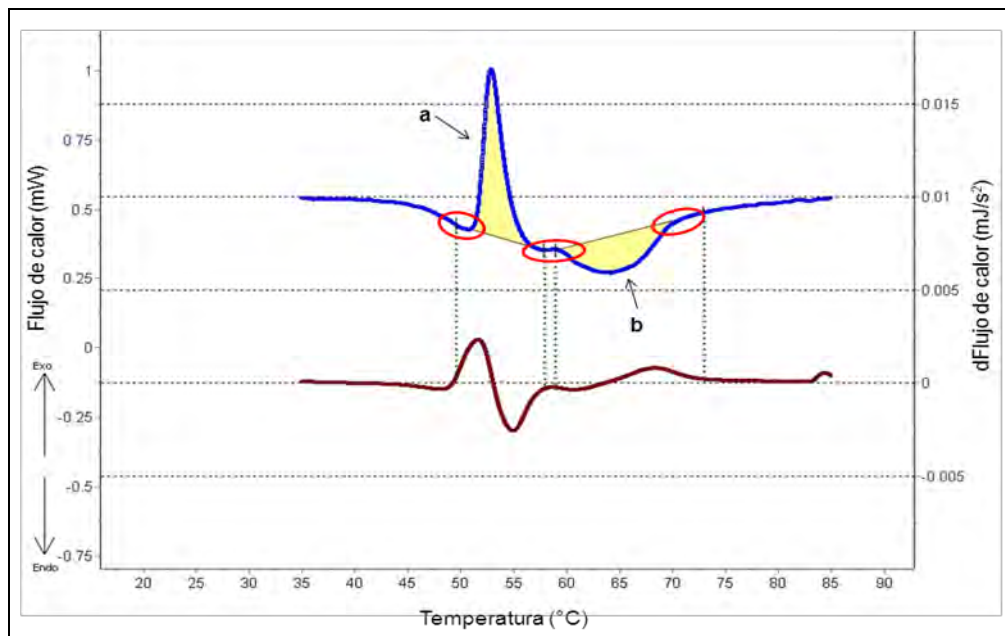


Figura 14. Termograma de la fracción líquida FL-R (línea continua azul) que contiene a las proteínas sarcoplásmicas del filete. Velocidad de calentamiento 1.2 °C/min. Las letras indican la posición de las dos transiciones. La curva continua de color marrón corresponde a la derivada de la curva de flujo de calor que es usada para establecer la posición de las transiciones. Los óvalos rojos representan la incertidumbre en la asignación de puntos iniciales y finales de integración. Las líneas punteadas verticales indican los límites para cada transición.

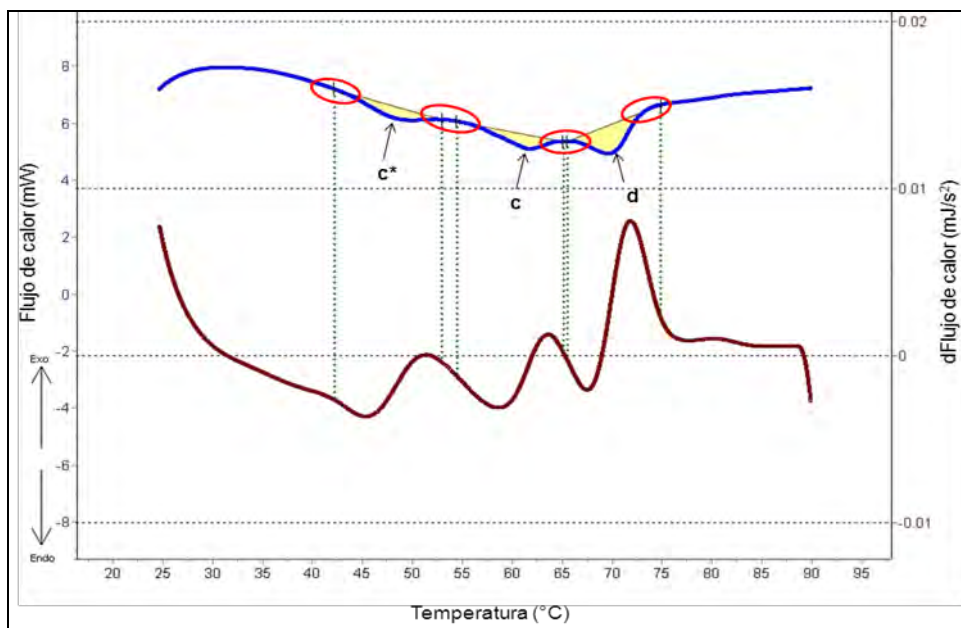


Figura 15. Termograma de la fracción sólida FS-R (línea continua azul) que contiene a las proteínas miofibrilares del filete. Velocidad de calentamiento 1.2 °C/min. Las letras indican la posición de las dos transiciones. La curva continua de color marrón corresponde a la derivada de la curva de flujo de calor que es usada para establecer la posición de las transiciones. Los óvalos rojos representan la incertidumbre en la asignación de puntos iniciales y finales de integración. Las líneas punteadas verticales indican los límites para cada transición.

El cálculo de los coeficientes de variación de las temperaturas máximas y entalpías de las transiciones de las fracciones FL-R y FS-R (cuya interpretación se analiza en la sección IV.5.1), al integrar las áreas bajo las curva, considerando los puntos iniciales y finales dentro del intervalo señalado por los óvalos rojos en las Figuras 14 y 15, se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10. Variación en la temperatura máxima y entalpía de las transiciones de las fracciones FL-R y FS-R, considerando varios puntos iniciales y finales para la integración del área bajo la curva.

Fracciones	Transición	T_m	%CV		ΔH	%CV		n
FL-R	a	52.9	± 0.0	0.0	-0.077	± 0.001	-1.426	5
	b	64.8	± 0.0	0.0	0.056	± 0.002	3.677	
FS-R	c*	48.3	± 5.9	12.1	0.144	± 0.020	14.047	4
	c	61.5	± 3.8	6.2	0.131	± 0.070	53.323	
	d	70.0	± 0.0	0.0	0.240	± 0.040	16.798	

Los datos representan los promedios ± desviación estándar de n repeticiones.

Las entalpias de las transiciones de la fracción líquida FL-R, tuvieron coeficientes de variación (CV) de -1.426 y 3.377 % para **a** y **b** respectivamente, lo que evidencia, que la posición de los puntos iniciales y finales de integración afectan el valor de la entalpia. Los CV de las T_m de ambas transiciones muestran que sin importar los límites de integración las temperaturas máximas, permanecen invariables. Los CV de las entalpias de las tres transiciones de la fracción FS-R, son altos, mayores al 10%, sobre todo para la transición de la miosina (**c**). Los coeficientes de variación de las T_m , son menores al 10%, a excepción al de la transición **c***

IV.5.1 Perfiles térmicos de las fracciones líquidas y sólidas extraídas de la carne

En la Figura 16 se muestran los perfiles calorimétricos de las fracciones líquidas FL-B-1 y FL-R obtenidas de la extracción de proteínas sarcoplásmicas con los extractores del filete B y R.

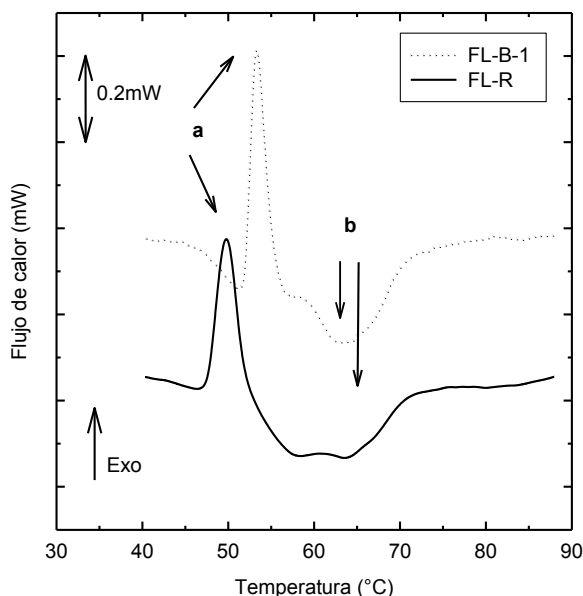


Figura 16. Transiciones exotérmica y endotérmica en las fracciones líquidas FL-B-1 y FL-R extraídas con solución amortiguadora de lavado y solución de Ringer modificada del filete. Velocidad de calentamiento 1.2 °C/min.

Para la fracción líquida, independientemente del método de extracción, se observó una transición exotérmica (**a**) a una temperatura de 50.7 y 53.7 °C para las fracciones FL-R y FL-B-1 respectivamente, que se puede atribuir a la agregación de algunas proteínas sarcoplásmicas y que representa el valor neto de los cambios endotérmicos y exotérmicos (Skipnes et.al., 2007; Tadpitchayangkoon et al., 2010). Además, se observó una transición endotérmica (**b**) en un intervalo de temperatura de 64.8 a 64.6 °C para FL-R y FL-B-1,

respectivamente. La mayoría de los investigadores han encontrado que las proteínas sarcoplásmicas, solubles en agua o en soluciones de baja fuerza iónica, se agregan entre 40 y 60 °C (Hamm, 1997, citado en Tornberg, 2005). Davey y Gilbert (1974) encontraron que en el músculo del cuello de toro, la agregación por calentamiento de las proteínas sarcoplásmicas puede extenderse hasta 90 °C. Ellos fueron los primeros en sugerir que las proteínas sarcoplásmicas pueden tener un papel en la consistencia de la carne cocida de tal manera que un agregado inducido por calentamiento puede formar un gel entre los elementos estructurales de la carne y de este modo quedar ligados entre ellos. En este punto cabe mencionar que cuando se siguió el protocolo del apartado III.3.1, se notó que durante la centrifugación la temperatura del contenido de los tubos de la centrifuga aumentó 2 °C sobre la temperatura ambiente (23 °C) una vez completo el tiempo programado (30 min). El incremento de dos grados Celsius se registró en los siguientes lavados. De esta forma la temperatura de la fracción líquida FL-B-2 fue 27 °C y 29 °C en la fracción FL-B-3. Para descartar el efecto de estos incrementos de temperatura sobre el comportamiento térmico de las proteínas sarcoplásmicas se realizó un ensayo en el que se programó una temperatura de centrifugación constan

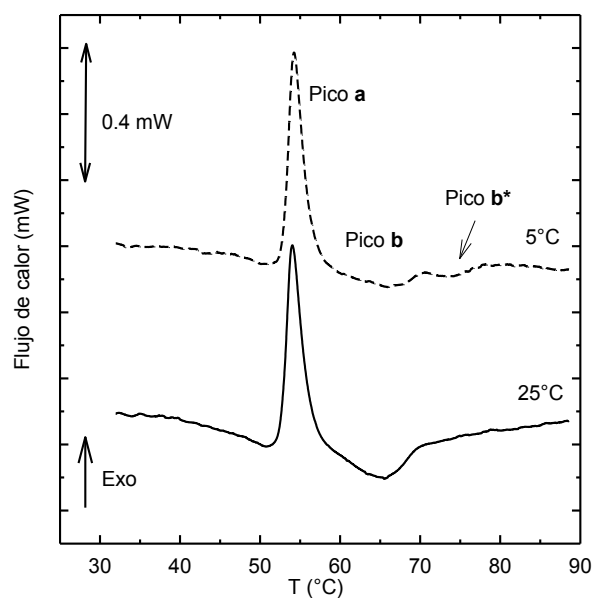


Figura 17. Termogramas de las fracciones líquidas FL-B-1 con temperaturas de centrifugación de 5 y 25 °C. Velocidad de calentamiento 1.2 °C/min.

La temperatura de la transición exotérmica en ambas curvas fue similar. Por ello se decidió trabajar el resto de la experimentación con una temperatura de centrifugación de 25 °C. No obstante, se percibió una ligera diferencia en las transiciones endotérmicas de las curvas a 5 y 25 °C. A 5 °C se observa que, además de la transición endotérmico **b**, se presentó otro

pico **b*** que aparece a una temperatura mayor. Las temperaturas de ambas transiciones fueron 65.9 y 74.2 °C y las entalpías fueron 0.026 y 0.005 J/g muestra, respectivamente. La suma de ambas entalpías es 0.031J/g. A 25 °C el pico **b** apareció a una temperatura de 65.50 °C y su entalpía fue 0.040J/g. Para confirmar que, la transición exotérmica correspondiera a dos eventos, el de desnaturalización y agregación, de una parte de la proteínas sarcoplásmicas, se realizó un ensayo, en el cual, se usaron 3 muestras de 5 mL de FL-B-1 cada una. La primera muestra se calentó hasta 54 °C, la segunda hasta 60 °C y la tercera hasta 64°C, en un baño térmico con una velocidad de calentamiento de 1.2°C/min. En las tres muestras se observaron la presencia de agregados en el fondo del tubo de ensayo. Se procedió a centrifugar el contenido de los tres tubos a 12000rpm por 10 minutos. A las 3 fracciones líquidas (libres de agregados de proteínas) resultantes, se les denominó FL-B-54°C, FL-B-60°C Y FL-B-64°C, como se muestra en la Figura 18.

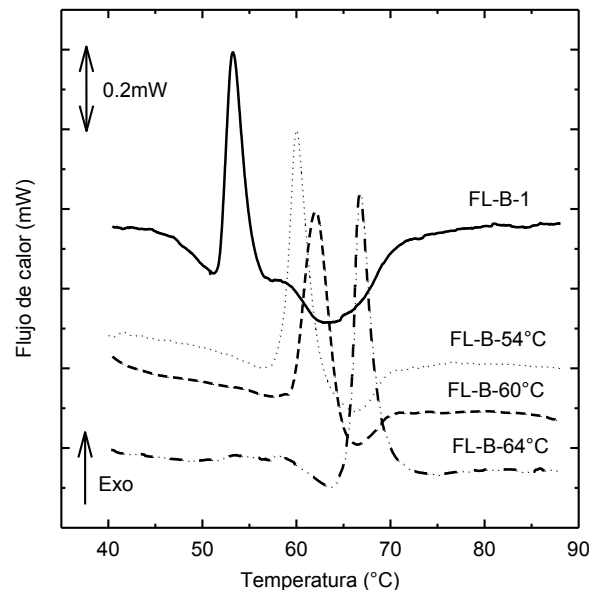


Figura 18. Termogramas de las fracciones líquidas FL-B-1, FL-B-54°C, FL-B-60°C Y FL-B-64°C. Velocidad de calentamiento 1.2°C/min.

La curva calorimétrica de la fracción FL-B-1, representa el control en este experimento, en base a ella se observó, que las transiciones exotérmicas en los termogramas de las fracciones líquidas FL-B-54°C, FL-B-60°C Y FL-B-64°C, persisten acompañadas de un desplazamiento de la T_m a temperaturas más altas. Como se muestra en la Tabla 11, a medida que se incrementó la temperatura del tratamiento en las muestras, la concentración de proteínas solubles disminuyó. Las evidencias mostradas respaldan el hecho de que las

transiciones exotérmicas son la suma de dos eventos, la desnaturalización y agregación de las proteínas sarcoplásmicas.

Tabla 11. Contenidos de proteínas solubles en fracciones líquidas FL-B-1, FL-B-54°C, FL-B-60°C Y FL-B-64°C.

Fracciones	mg/mL	%CV
FL-B-1	10.50 ± 0.01	0.08
FL-B-54°C	7.89 ± 0.02	0.23
FL-B-60°C	5.99 ± 0.02	0.32
FL-B-64°C	4.04 ± 0.03	0.72

Los datos representan los promedios ± desviación estándar de 3 repeticiones.

Por otro lado, los perfiles calorimétricos de las fracciones sólidas FS-R y FS-B-3 obtenidas en los procesos de extracción de proteínas sarcoplásmicas con los extractores B y R del filete se muestran en la Figura 19.

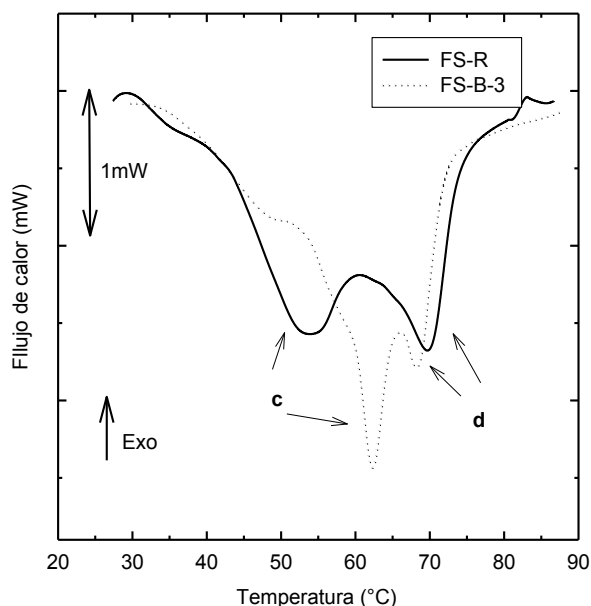


Figura 19. Transiciones endotérmicas de las fracciones sólidas FS-R y FS-B-3 extraídas con solución amortiguadora de lavado y la solución de Ringer modificada del filete. Velocidad de calentamiento 1.2°C/min.

Los perfiles calorimétricos de las fracciones sólidas extraídas del filete dependieron del método de extracción. Para la fracción sólida FS-B-1 las temperaturas de las transiciones **c** y **d** son de 62 y 68 °C, respectivamente. En cambio, para la FS-R las temperaturas se registran en 54 y 70 °C. En los termogramas de músculo de bovino empobrecido de

proteínas sarcoplásmicas y tejido conectivo, las transiciones **c** y **d** son atribuidos casi exclusivamente a la miosina y a la actina, respectivamente, ya que son las principales proteínas de las miofibrillas aunque no son las únicas (Wagner y Añón, 1985). La desnaturalización de proteínas menores como tropomiosina, troponina y actinina, puede contribuir a los endotermas totales (Wagner y Añón, 1985). Además, se observa que el proceso de lavado del filete con B. no tiene un efecto notable sobre la transición de la

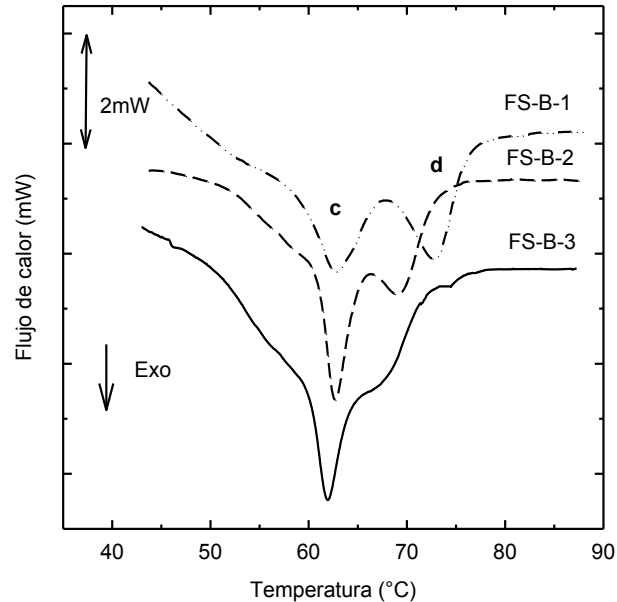


Figura 20. Termogramas de las fracciones sólidas FS-B-1, FS-B-2 y FS-B-3 correspondientes al primero, segundo y tercer lavado del filete con B. Velocidad de calentamiento 1.2°C/min.

En cada etapa de lavado las temperaturas y las entalpías de las transiciones endotérmicas, picos **c** y **d**, sufren modificaciones como se muestra en el Anexo D. En el segundo lavado existe una reducción en la entalpía de las transiciones **c** y **d** de 11 y 55%, respectivamente. En el tercer lavado la disminución fue de 5 y 77% para las transiciones mencionadas. La Figura 21 muestra los termogramas de las fracciones líquidas FL-B-1, FL-B-2 y FL-B-3, obtenidas en el proceso de lavado del filete con B.

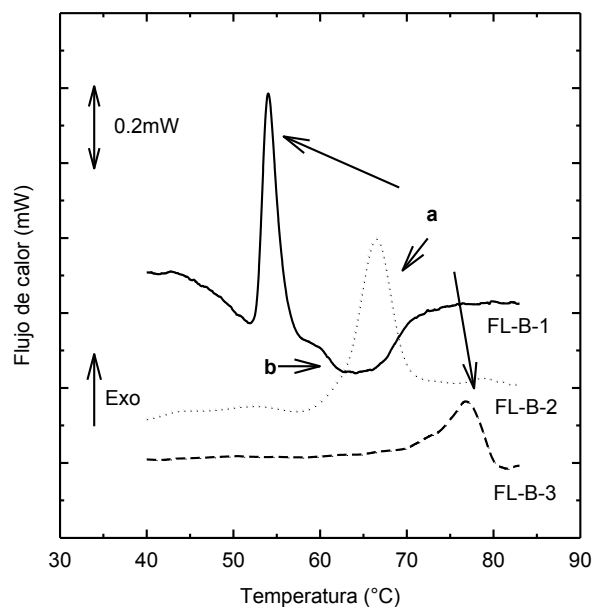


Figura 21. Termogramas de las fracciones líquidas FL-B-1, FL-B-2 y FL-B-3 correspondientes al primero, segundo y tercer lavado del filete con B. Velocidad de calentamiento 1.2 °C/min.

Los valores de las temperaturas y entalpías de las transiciones se muestran en el Anexo D. Las T_m de las transiciones **a** de las fracciones líquidas FL-B-1, FL-B-2 y FL-B-3 fueron 54.0, 64.5 y 76.9 °C, respectivamente. Se relacionó la concentración de las fracciones líquidas 11.16, 0.79 y 0.48 mg/mL con sus respectivas entalpías -0.078, -0.107 y -0.045 J/g y no se observó proporcionalidad entre ellas. En el segundo lavado, la entalpía de la transición exotérmica aumentó 37% en comparación con la fracción del primer lavado mientras que en el tercer lavado la entalpía de la fracción FL-B-3 disminuyó 58% en comparación con la fracción del segundo lavado. Estos resultados se confirman más adelante cuando se analiza el efecto de la concentración sobre la temperatura máxima y la entalpía de transición.

Regresando al análisis de las fracciones sólidas obtenidas con la solución amortiguadora de lavado, la transición endotérmica de la actina en los termogramas sufre una disminución drástica de la entalpía que podría deberse a varios factores que afectan la desnaturalización de las proteínas como son el pH y la fuerza iónica. En este trabajo otras variables son el método de extracción de las proteínas sarcoplásmicas, la presencia del EDTA en la solución amortiguadora de lavado y el pH de las soluciones extractoras. Para descartar el efecto de los métodos, mas no el efecto de las soluciones extractoras, se realizó una nueva extracción de proteínas sarcoplásmicas con solución de Ringer modificada pero con la metodología indicada en el numeral III.3.1, i.e. lavando el filete tres veces. A esta extracción se le denominó método de lavado con la que se obtuvieron las fracciones FS-R-1, FS-R-2 y FS-R-

3 y a la metodología indicada en el numeral III.3.2 se le denominó método de Ringer con la que se obtuvo la fracción

22.

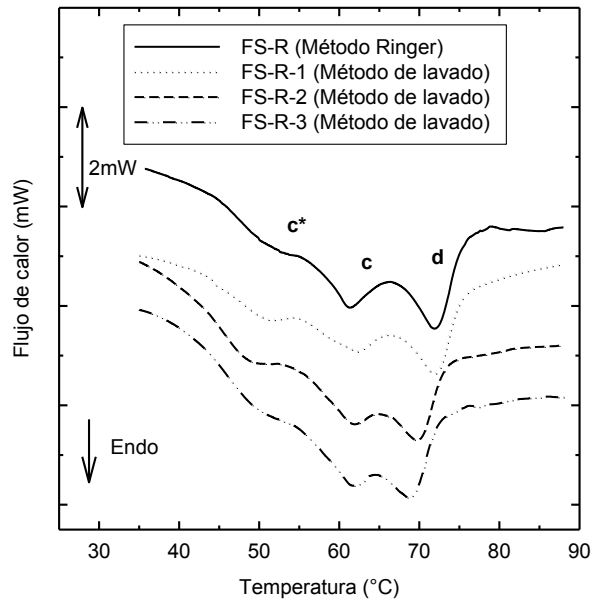


Figura 22. Termogramas de las fracciones sólidas empobrecidas de proteínas sarcoplásmicas usando la solución extractora de Ringer modificada con dos metodologías distintas (método de Ringer y método de lavado). Velocidad de calentamiento 1.2 °C.

En las dos primeras endotermas (líneas continua y punteada) que corresponden a las fracciones FS-R y FS-R-1 no existe una diferencia significativa; las temperaturas de transición son independientes del método de extracción (Ringer o de lavado). Se observó que las transiciones de las fracciones FS-R-2 y FS-R-3 (obtenidas al lavar por dos veces a la fracción FS-R-1 con la solución de Ringer modificada) ocasionan únicamente que la T_m de la transición **d** sufra desplazamientos de aproximadamente una unidad por cada lavado, hacia temperaturas más bajas, la T_m de la transición **c** prácticamente permaneció constante durante el proceso de lavado. Además, se observa que en los termogramas de la Figura 22 aparece una transición a una temperatura de 48.0 a 51.0 °C, denominada **c***, que se puede atribuir a la desnaturalización de la cabeza globular de la miosina (Ojeda et.al., 2001).

El efecto del EDTA sobre las endotermas de las fracciones sólidas, se muestra en la Figura 23.

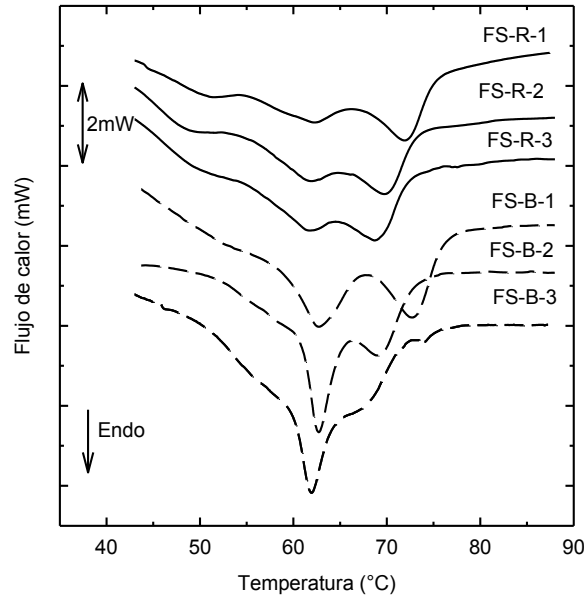


Figura 23. Efecto del EDTA sobre las endotermas de las fracciones sólidas. Velocidad de calentamiento 1.2°C/min.

El grupo de curvas con líneas continuas representan las fracciones sólidas obtenidas con la solución de Ringer que no contiene EDTA, mientras que, el grupo de curvas con líneas semicontinuas representan a las fracciones sólidas obtenidas con la solución amortiguadora de lavado que contiene EDTA, en ambos casos se usó la misma metodología. Se aprecia claramente que la presencia de EDTA provoca modificaciones drásticas en la actina durante el proceso de extracción. El EDTA posiblemente acompleje a los iones divalentes, e.g. Ca^{2+} , que participan en el proceso de contracción y relajación muscular, lo que provoque el debilitamiento de los filamentos delgados de la actina provocando que su desnaturalización ocurra a temperaturas más bajas.

Para descartar el efecto del pH de las soluciones extractoras sobre las transiciones de las fracciones líquidas y sólidas, se realizó un ensayo cambiando el pH de la solución de Ringer modificada llevándolo a un valor de 7.0, el mismo pH de la solución amortiguadora de lavado, y se comparó con el termograma obtenido con la solución de Ringer modificada para pH 5.7. La metodología fue la misma para las soluciones de Ringer modificada a pH 5.7 y 7.0 y se indica en el apartado III.3.2. Los termogramas para las fracciones sólidas y líquidas que resultaron de la extracción de proteínas sarcoplásmicas del filete se muestran en las Figuras 24 y 25.

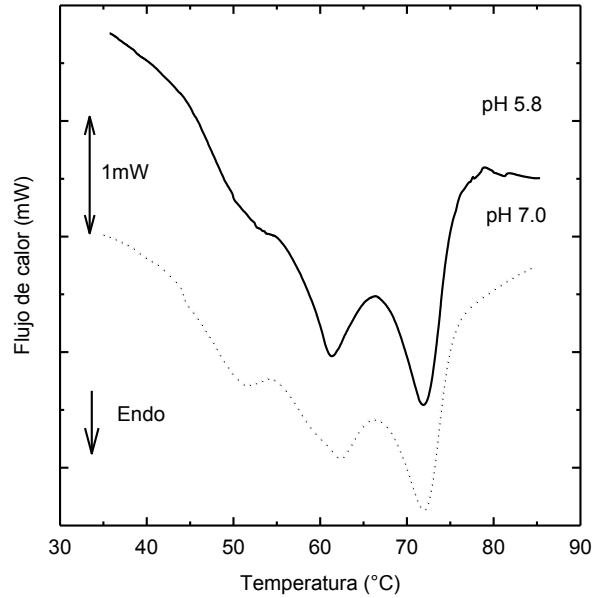


Figura 24. Efecto del pH de la solución de Ringer modificada sobre las transiciones de las fracciones sólidas. Velocidad de calentamiento 1.2 °C/min.

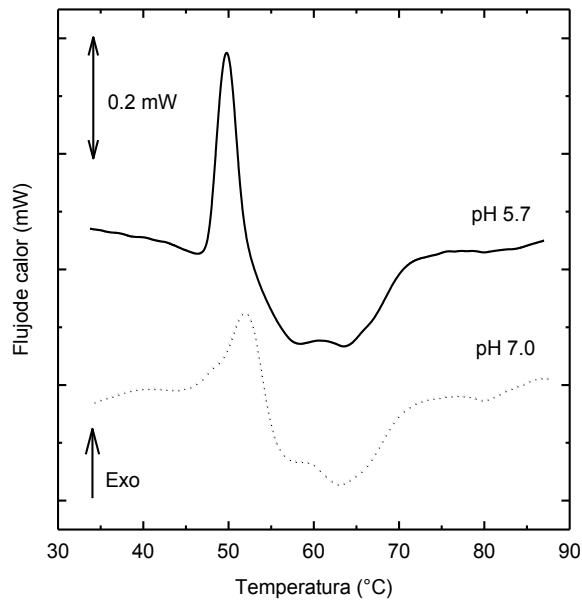


Figura 25. Efecto del pH de la solución de Ringer modificada sobre las transiciones de las fracciones líquidas. Velocidad de calentamiento 1.2 °C/min.

El pH de las dos soluciones de Ringer modificada (pH 5.7 y 7.0) preparadas para este experimento no afectó de manera significativa las temperaturas de las transiciones endotérmicas de las fracciones sólidas. Por ello el pH no es el factor que provoca la reducción drástica en la entalpía de la actina. Al comparar las transiciones de las fracciones

liquidadas, el ensanchamiento del pico exotérmico de la fracción líquida obtenida a pH 7 y la entalpía de esta transición disminuyó 8% en relación con la fracción obtenida a pH 5.7.

IV.5.2 Reversibilidad de la desnaturalización y la agregación de las proteínas sarcoplásmicas

Para la fracción líquida FL-R obtenida a con la solución de Ringer modificada a pH 7 se demostró que la agregación de las proteínas sarcoplásmicas fue irreversible. Cuando se calentó la muestra de 20 a 95 °C aparecieron las transiciones exo y endotérmicas esperadas, pero en el enfriamiento no se observó ninguna transición. Cuando la misma muestra se calentó y se enfrió nuevamente no se registró ninguna señal, como se muestra en la Figura 26. La irreversibilidad calorimétrica, sugiere que la transición puede ser cinéticamente distorsionada en extensiones significativas, es decir, que la transición térmica puede perder simetría debido a cambios en la velocidad de calentamiento o en la concentración de soluto (Ibarra-Molero y Sanchez-Ruiz, 2006). Para confirmar la afirmación anterior se examinaron muestras en el μ DSC a diferentes velocidades de calentamiento cuyos resultados se analizan más adelante. Es importante revisar la reversibilidad pues los análisis de equilibrio termodinámico no se pueden aplicar a muestras con transiciones irreversibles como es el p

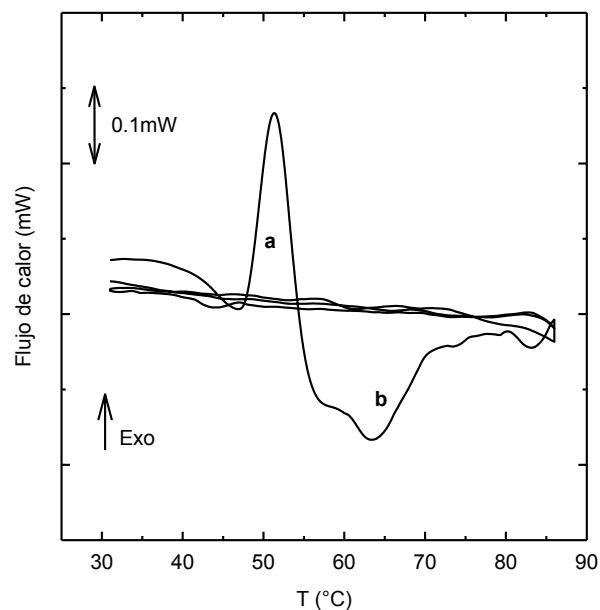


Figura 26. Termograma que muestra la irreversibilidad de las transiciones exotérmica y endotérmica de la fracción líquida FL-R, realizada con dos rampas de calentamiento-enfriamiento de 20 - 95 °C consecutivas. Velocidad de calentamiento 1.2 °C/min.

IV.5.3 Ensayos cinéticos

IV.5.1.1 Efecto de la velocidad de calentamiento

La velocidad máxima de calentamiento recomendada para el microcalorímetro que se usó en este trabajo es de 1.2 °C/min. Se analizaron muestras de FL-B-1 y FS-B-3 a 1.2, 0.9 y 0.6 °C/min en un intervalo de temperatura de 20 a 95 °C. Los termogramas que muestran el efecto de la velocidad de calentamiento sobre las temperaturas máximas y las entalpías de las transiciones exotérmicas y endotérmicas, para la fracción líquida FL-B-1 se muestran en la Figura 27 y los valores de temperaturas máximas y entalpías de las transiciones se muestran en el Anexo E. Cuando aumenta la velocidad de calentamiento, la T_m de la transición exotérmica también se incrementa, existiendo una relación proporcional entre ambas. Esta dependencia muestra que el cambio de conformación está gobernado cinéticamente, es decir, cuando se calienta a una velocidad baja, el cambio de conformación de las proteínas se produce a temperaturas más bajas. Lo mismo sucede con la T_m de la transición endotérmica. La reducción de la velocidad de calentamiento de 1.2 °C/min a 0.6 °C/min provocó la disminución en 80 y 25% de la entalpía de las transiciones **a** y **b** respectivamente. Posiblemente esta reducción, en ambos casos, se deba a que a velocidades de calentamiento mayores se incrementa la frecuencia de colisiones entre las moléculas de las proteínas sarcoplásmicas y con ello, se incrementa, la probabilidad de desnaturalización y agre

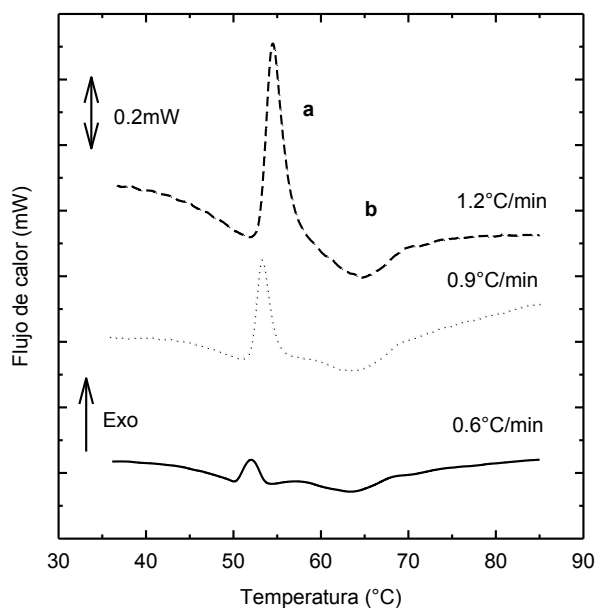


Figura 27. Efecto de la velocidad de calentamiento sobre la temperatura máxima y la entalpía de transiciones de la fracción FL-B-1.

Se realizó el cálculo del valor de la energía de activación del procesos de agregación (transición **a**) y de desnaturalización (transición **b**) por los cuatro métodos mencionados en el apartado I.8, los resultados se muestran en las Tablas 12 y 13.

Tabla 12. Energía de activación (E_a) de la transición exotérmica (**a**) de las proteínas sarcoplásmicas, calculada por cuatro métodos.

Método	E_a (kJ/mol)	%CV
1	1182.6 ± 147.2	12.5
2	1526.1 ± 102.2	6.7
3*	243.9	
4	871.5 ± 242.5	27.8

Los datos representan los promedios ± desviación estándar, considerando 3 velocidades de barrido. *El método 3 involucra las 3 velocidades de calentamiento para el cálculo de la E_a , por tal motivo únicamente aparece un solo valor.

Tabla 13. Energía de activación (E_a) de la transición endotérmica (**b**) de las proteínas sarcoplásmicas, calculada por cuatro métodos.

Método	E_a (kJ/mol)	%CV
1	360.6 ± 25.8	7.2
2	935.0 ± 113.3	12.1
3*	591.6	
4	288.6 ± 93.8	32.5

Los datos representan los promedios ± desviación estándar, considerando 3 velocidades de barrido. *El método 3 involucra las 3 velocidades de calentamiento para el cálculo de la E_a , por tal motivo únicamente aparece un solo valor.

La validez de las ecuaciones del apartado I.8 requiere la existencia de una relación lineal del

$\ln k$ y $\ln\left(\ln\left(\frac{\Delta H}{\Delta H - \langle \Delta H \rangle}\right)\right)$ con $1/T$ y $\ln \frac{v}{T_m^2}$ con $1/T_m$. Las relaciones de los métodos 1 y 2

no son lineales, únicamente la relación del método 3 cumple con el criterio de linealidad, para ambas transiciones **a** y **b**. Para continuar con los cálculos usando los métodos 1 y 2 se eliminó la parte no lineal y con el resto de datos se realizó la regresión lineal (Davoodi et al., 1998) como se muestra en el Anexo F. Las energías de activación estimadas para la transición **a**, con los cuatro métodos son distintas, sus valores están dentro del intervalo de 243.9 y 1526.1 kJ/mol. Se estima que el valor más adecuado es 243.9 kJ/mol, debido a que

fue calculado con un método que únicamente requiere de la velocidad de barrido y de la temperatura máxima de la transición T_m , es decir, con un método directo donde el grado de incertidumbre fue menor en comparación con los métodos 1, 2 y 4. En estos últimos se requiere calcular la entalpía acumulada o aparente y la capacidad calorífica a una temperatura T , para lo cual se realizaron integraciones acumuladas a una temperatura T , cuyo punto inicial lo estimó la investigadora. Otro factor que incrementó la incertidumbre en los cálculos con los métodos 1, 2 y 4 fue la ausencia de líneas base claras, horizontales, previas a la transición y posteriores a la transición, lo que dificultó la integración. La energía de activación para la transición **b** fue 591.6 kJ/mol, valor seleccionado haciendo el mismo análisis anterior. Las regresiones que se realizaron con los métodos 1, 2 y 3, para la transición **b** de las proteínas sarcoplásmicas se muestran en el Anexo G. Con el cálculo de la energía de activación se tiene la posibilidad de fundamentar cuantitativamente el hecho de que la transición de desnaturalización y agregación de una parte de las proteínas sarcoplásmicas (**a**) haya ocurrido a una temperatura menor en comparación con la desnaturalización y agregación del resto de ellas (**b**), pues la barrera energética que se sobrepasó para que ocurriera la transición **a** fue menor a la que se requirió para que sucediera la transición **b**.

El efecto de la velocidad de calentamiento sobre la temperatura y la entalpía de las transiciones endotérmicas de la fracción sólida FS-B-3, se muestra en la Figura 28 y sus valores se incluyen en el /

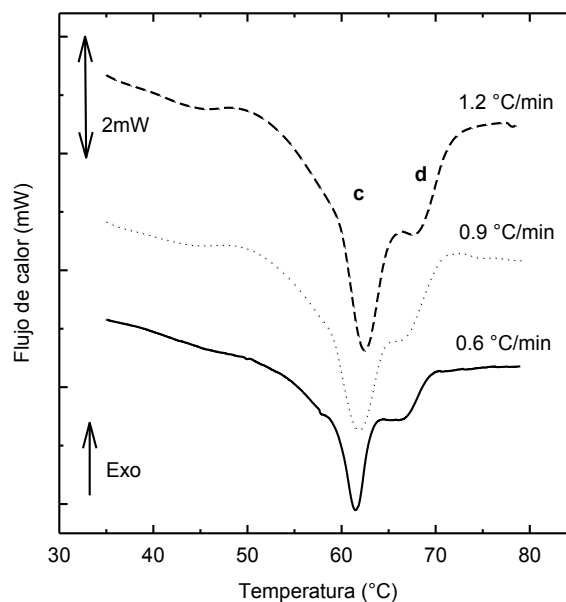


Figura 28. Efecto de la velocidad de calentamiento sobre la temperatura máxima y entalpía de las transiciones endotérmicas de la fracción FS-B-3.

La tendencia observada en las transiciones de la fracción líquida FL-B-1 con respecto a la entalpía se repite para la fracción sólida FS-B-3, es decir, al incrementar la velocidad de calentamiento de 0.6 °C/min a 1.2°C/min, las entalpías de las transiciones endotérmicas **c** y **d** aumentan en 7 y 11%, respectivamente. Cuando se calentó a bajas velocidades, la T_m de la transición **c** se desplazó hacia menores temperaturas. Por ello, la desnaturalización de las proteínas miofibrilares está gobernada también cinéticamente. Se realizó el cálculo de la energía de activación de la desnaturalización de la miosina (**c**) por los cuatro métodos mencionados en el apartado I.8, los resultados se muestran en las Tablas 14.

Tabla 14. Energía de activación de la miosina calculada por cuatro métodos

Método	E_a (kJ/mol)	%CV
1	1023.0 ± 276.3	27.0
2	1151.7 ± 176.2	15.3
3*	604.7	
4	672.4 ± 141.2	21.0

Los datos representan los promedios ± desviación estándar, considerando 3 velocidades de barrido. *El método 3 involucra las 3 velocidades de calentamiento para el cálculo de la E_a , por tal motivo únicamente aparece un solo valor.

Los valores de las energías de activación para la miosina calculados con los métodos 1, 2 y 4, cuyas regresiones se muestran en el Anexo I, tuvieron diferencias notables entre sí. Considerando el mismo criterio de selección que para las proteínas sarcoplásmicas, se estima que 604.7 kJ/mol es la energía de activación más adecuada, pues se aproxima al valor reportado de 483.5 kJ/mol por Wagner y Añón, 1985. Para el caso de la actina, debido a la forma de su transición, únicamente se pudo calcular la energía de activación por el método 3, el valor fue 359.0 kJ/mol, cercano al reportado de 379.3 kJ/mol por Wagner y Añón, 1985.

IV.5.1.2 Efecto de la concentración de proteína soluble sobre la temperatura y la entalpía de transición

La Figura 29 resume los termogramas de un conjunto de suspensiones de proteínas sarcoplásmicas preparadas en la solución amortiguadora de lavado con diferentes concentraciones expresadas en mg de proteína soluble por mL de suspensión. A medida que la concentración se redujo, la temperatura máxima de la transición exotérmica (T_m) aumentó al igual que la entalpía de transición. Esta evidencia nos confirma que la desnaturalización y

agregación de las proteínas sarcoplásmicas están gobernadas cinéticamente. Posiblemente la disminución de la concentración provoca el descenso de la velocidad de agregación, debido a que se reduce la frecuencia de las colisiones entre las moléculas de las proteínas, haciendo que la transi

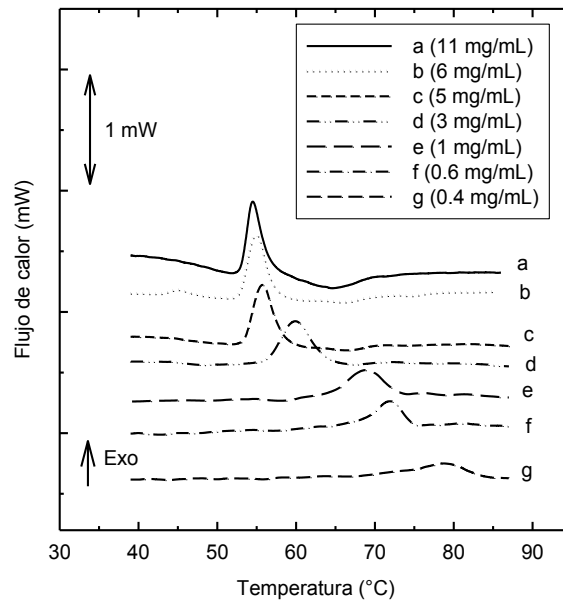


Figura 29. Efecto de la concentración de proteínas solubles en las suspensiones preparadas a partir de la FL-B sobre la T_m de la transición exotérmica y su entalpía. Velocidad de calentamiento 1.2 °C/min.

Las temperaturas y las entalpías de las transiciones de todas las suspensiones de proteínas sarcoplásmicas que se prepararon a partir de la fracción FL-B-1, en un intervalo de 0.4 a 11mg/mL, se muestran en el Anexo J. Considerando la transición exotérmica, cuando la concentración se redujo a la mitad (5.56 mg/mL) la entalpía aumentó 13% en relación con la suspensión más concentrada (11 mg/mL), mientras que la entalpía correspondiente a la concentración más baja (0.4 mg/mL) disminuyó 57% en comparación con la misma suspensión. La Figura 30 muestra la tendencia que tienen las diferencias T_1-T_2 en función de la concentración, T_1 es la T_m de la transición exotérmica correspondiente a las suspensiones con concentraciones dentro del intervalo de 0.45 a 10.04 mg/mL; es un valor variable, mientras que T_2 es la T_m de la transición exotérmica de la suspensión más concentrada (11 mg/mL); es un valor constante.

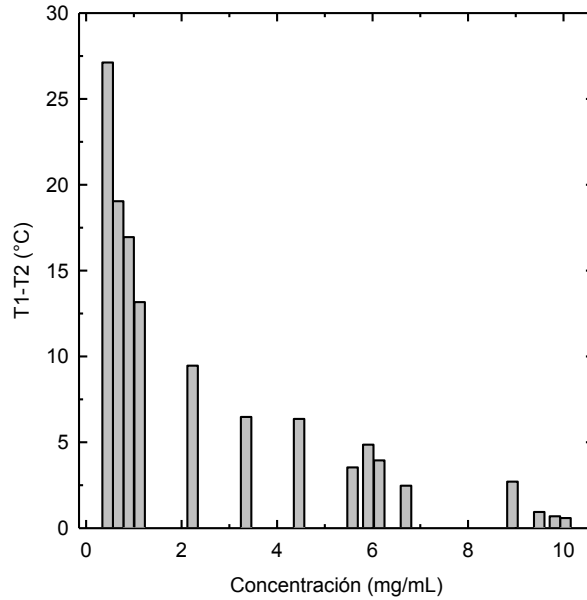


Figura 30. Relación entre las diferencias de las temperaturas de los picos exotérmicos T_1-T_2 y la concentración.

Dentro del intervalo de concentraciones de 5.58 a 10.04 mg/mL, las diferencias de las temperaturas no fueron mayores de 5 °C. Para las concentraciones de 3.35 a 4.46 mg/mL la diferencia fue de 6 °C para ambos casos y fue para el intervalo de 0.45 a 2.23 mg/mL que la diferencia se incrementó drásticamente llegando hasta un valor de 27 °C. Cuando las suspensiones se examinaron en el intervalo de concentraciones de 5 a 11 mg /mL, se detectó el posible traslape de señales de la transición **a** (señal negativa) con la transición **b** (señal positiva) que se muestra en la Figura 31. A juzgar por el aumento de las áreas bajo las transiciones **a**, a medida que se reduce la concentración, la energía de transición **b** se sumó a la energía de **a**.

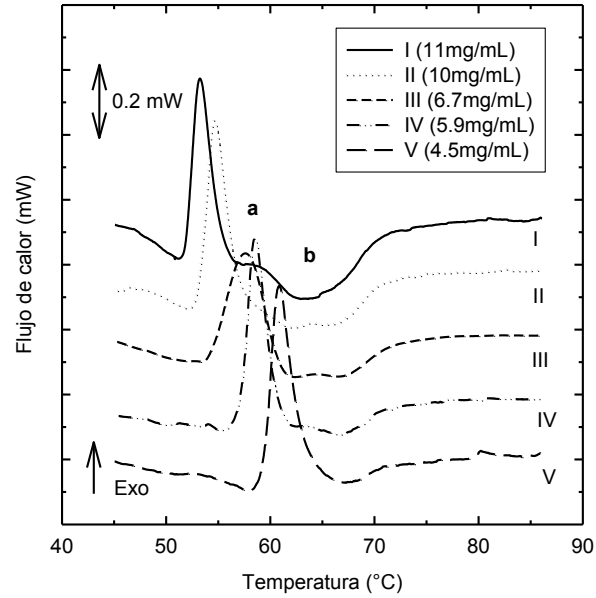


Figura 31. Efecto de la concentración de proteínas solubles en el traslape de la transición exotérmica con la endotérmica de las proteínas sarcoplásmicas del corte filete. Velocidad de calentamiento 1.2°C/min.

Con todos los resultados obtenidos de los ensayos con diferentes suspensiones de proteínas preparadas a partir de la fracción líquida FL-B-1 en solución amortiguadora de lavado, se trazaron gráficas que relacionan las temperaturas y entalpías de las transiciones exotérmicas con la concentración (mg/ml) y las tendencias se muestran en las Figuras 32 y 33.

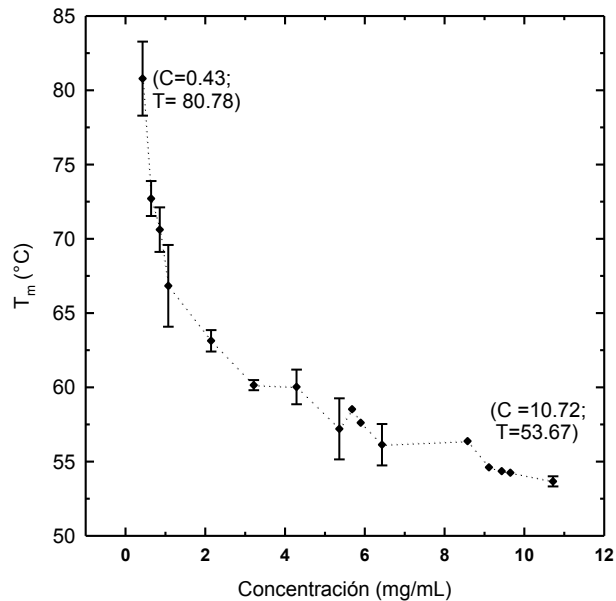


Figura 32. Relación de la temperatura máxima T_m de la transición exotérmica en función de la concentración de proteínas solubles (mg/mL) extraídas con solución amortiguadora de lavado.

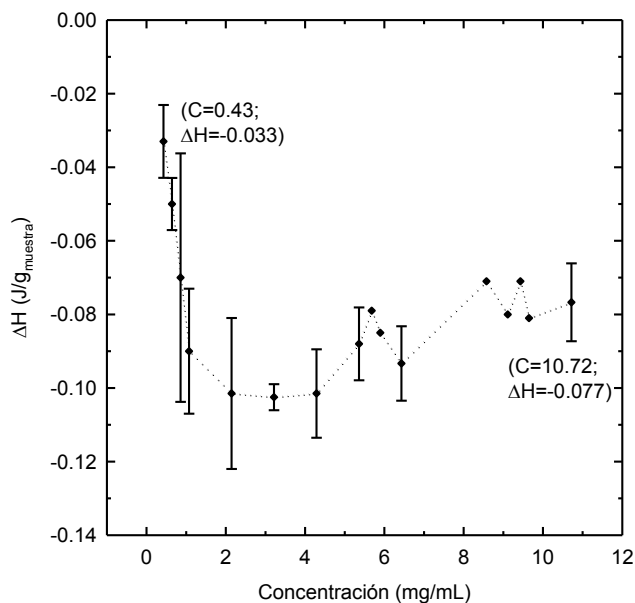


Figura 33. Relación de la entalpía (ΔH) de la transición exotérmica en función de concentración de proteínas solubles (mg/mL) extraídas con solución amortiguadora de lavado del corte filete.

La relación de la T_m de la transición exotérmica en función de la concentración de proteínas solubles no es lineal, sino que decae de manera exponencial pues a medida que disminuye la concentración se incrementa la T_m . Esta tendencia impide calcular los límites de detección y cuantificación para estas proteínas en el microcalorímetro, pues para ello se requiere una tendencia lineal entre las variables, pero observando los coeficientes de variación mayores de 20% en los valores de la entalpía de la transición exotérmica para concentraciones bajas, se recomienda no trabajar a concentraciones menores de 3 mg/mL.

La Figura 33 muestra que la relación de la entalpía con la concentración no sigue una tendencia clara, sobretodo en el intervalo de concentraciones de 11 a 5 mg/mL, en el cual los valores varían dentro de un intervalo de -0.071 a -0.093 J/g muestra.

En la Figura 34 se presentan los termogramas obtenidos al analizar un conjunto de suspensiones de proteínas preparadas a partir de la FL-R con la solución de Ringer modificada. Las concentraciones variaron dentro del intervalo de 0.4 a 10.7 mg/mL. Los valores de las temperaturas máximas y entalpías de las transiciones se muestran en el Anexo K. La tendencia que se observó es similar a la obtenida con las proteínas solubles extraídas con solución amortiguadora de lavado; a medida que la concentración se reduce, la temperatura máxima (T_m) de la transición exotérmica se incrementa. En la entalpía de las transiciones exotérmicas la tendencia no fue clara.

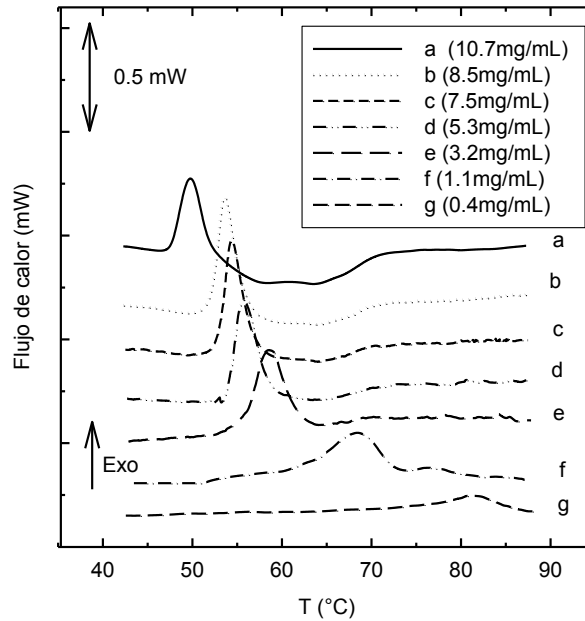


Figura 34. Efecto de la concentración de proteína soluble de las suspensiones preparadas a partir de la FL-R sobre la temperatura máxima (T_m) y la entalpía (ΔH) de transición exotérmica. Velocidad de calentamiento $1.2\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$.

Considerando la transición exotérmica, se observa que la entalpía aumenta 20% cuando la concentración se reduce a la mitad (5.3 mg/mL) y disminuye 72% con la concentración más baja (0.4 mg/mL) en comparación con la suspensión más concentrada (10.7 mg/mL). Con los resultados obtenidos de los ensayos con las diferentes suspensiones de proteínas preparadas a partir de la fracción líquida FL-R en solución de Ringer modificada, se graficaron las T_m y entalpías de los transiciones exotérmicas en función de la concentración de las suspensiones (mg/mL) y las tendencias se muestran en las Figuras 35 y 36. A medida que disminuye la concentración se incrementa la temperatura de la transición exotérmica. Esta tendencia es similar a la observada en las proteínas sarcoplásmicas extraídas con la solución amortiguadora de lavado. La relación entre la entalpía y la concentración no sigue una tendencia clara, sobretodo en el intervalo de concentraciones de 10.7 a 3.2 mg/mL , en el cual los valores varían dentro de un intervalo de -0.065 a -0.096 J/g muestra.

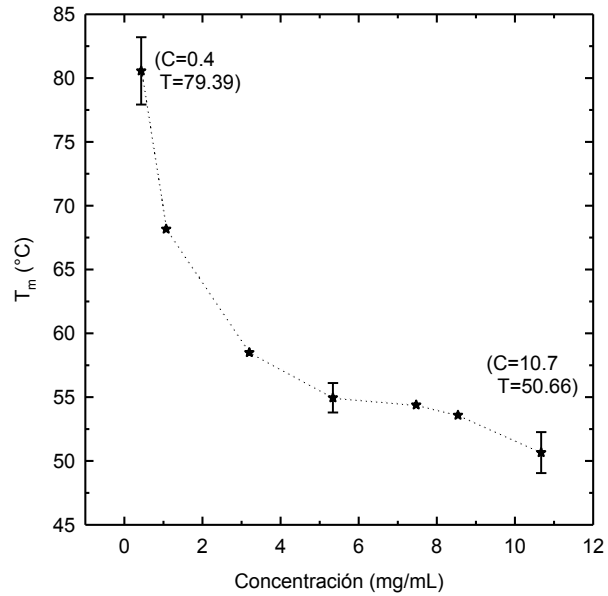


Figura 35. Relación de la temperatura máxima de la transición exotérmica en función de concentración de proteínas solubles (mg/mL) extraídas con solución de Ringer modificada.

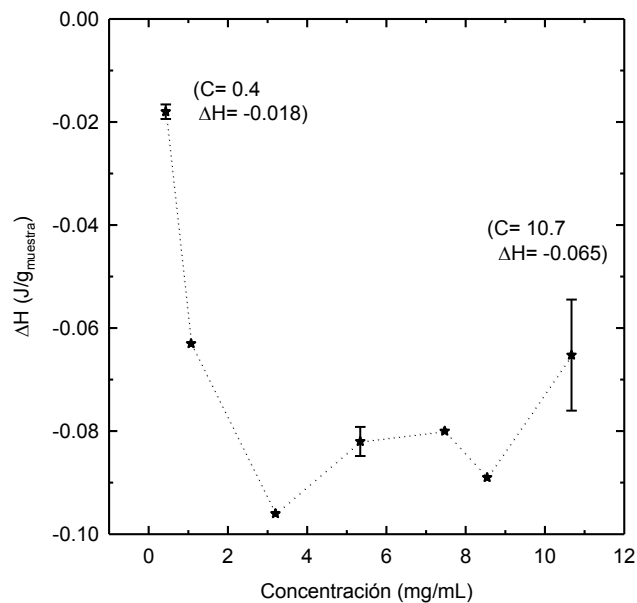


Figura 36. Relación de la entalpía (ΔH) de la transición exotérmica en función de concentración de proteínas solubles (mg/mL) extraídas con solución de Ringer modificada.

IV.6 Balance de masa en la extracción de las proteínas sarcoplásmicas del filete

Con los pesos de las fracciones líquidas FL-R, FL-B-1, FL-B-2 y FL-B-3 y de las fracciones sólidas FS-R, FS-B-1, FS-B-2 y FS-B-3, obtenidos al seguir los procedimientos III.3.1 y III.3.2, se construyeron los diagramas del balance de masa que se muestran en las Figuras 37 y 38.

La cantidad de proteínas miofibrilares que se obtuvo de 5 g de filete después de la extracción de las proteínas sarcoplásmicas con R, fue de 4.0 g, por tanto, por diferencia de pesos, la cantidad de proteínas solubles extraídas fue de 1.0 g. En el proceso de extracción se perdió un total de 2.7 g debido al secado de la fracción sólida para llevarla al calorímetro, mientras que, con la solución amortiguadora de lavado la cantidad total de proteínas sarcoplásmicas extraídas en los 3 lavados 1.3 g. Se observaron pérdidas de 2.6, 3.7 y 3.1 g en cada lavado. Estos resultados corroboran los obtenidos en la determinación de la concentración de proteínas solubles y en el cálculo de rendimientos de extracción, y muestran que con el solución amortiguadora de lavado se extraen más cantidad de proteínas solubles (11.16 mg/mL) que con la solución de Ringer modificada (10.67 mg/mL).

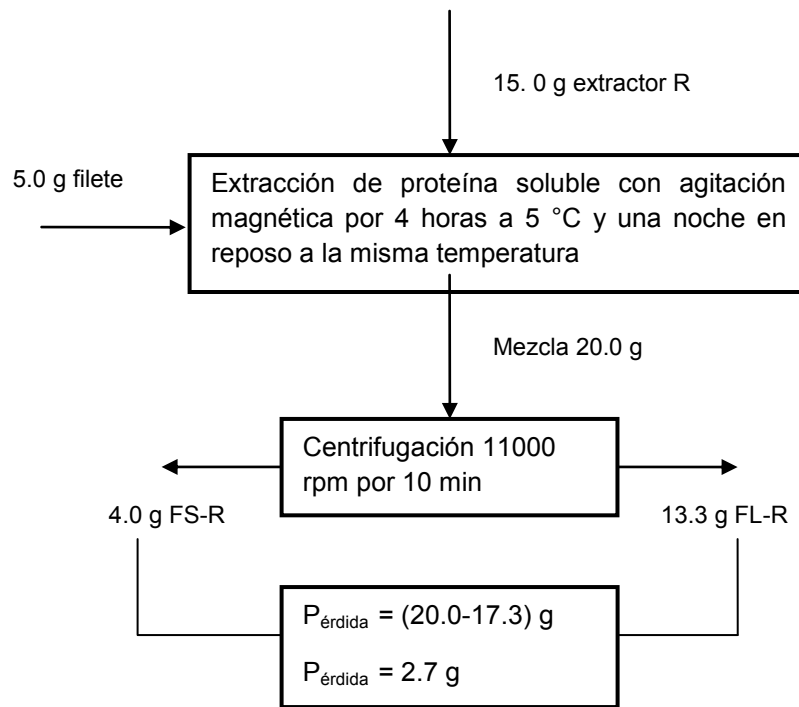


Figura 37. Extracción de las proteínas sarcoplásmicas del filete con la solución de Ringer modificada.

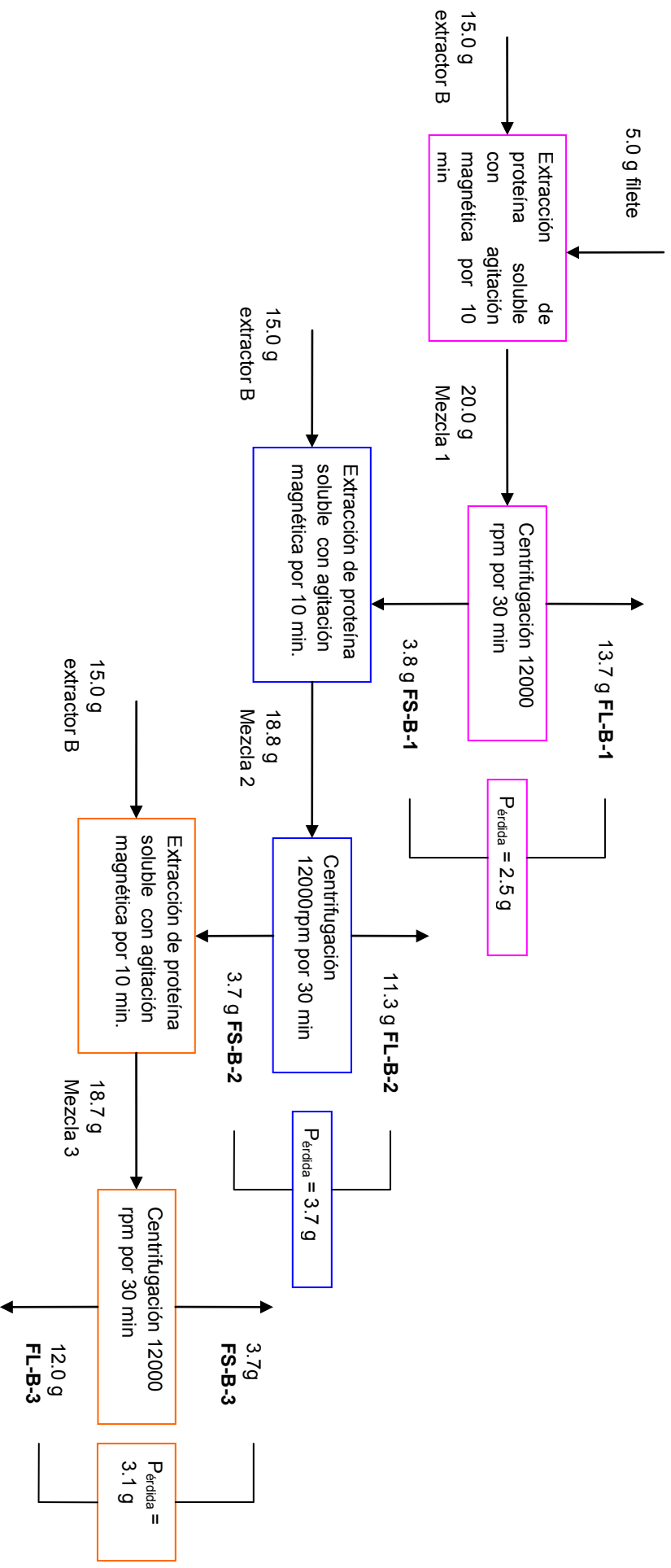


Figura 38. Extracción en tres etapas de las proteínas sarcoplásmicas del filete con la solución amortiguadora de lavado.

IV.7 Microscopía confocal de barrido láser

Se recolectó una secuencia de cortes ópticos de las fracciones líquidas FL-B-1 y FL-R, como lote de imágenes y su posterior procesamiento digital se realizó con el programa FV10-ASW 1.7 Viewer-Olympus. Se incrementó el contraste mediante valores umbral, extensión de contraste lineal y la corrección gama; curva del valor de intensidad de la imagen frente a la representación gráfica de la intensidad de la fuente. Las micrografías obtenidas se muestran en las Figuras 39.

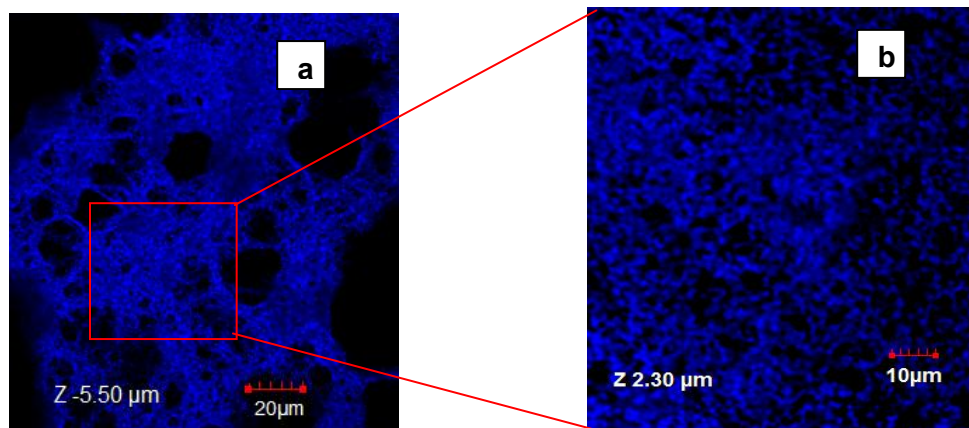


Figura 39. (a) Micrografía de la red de agregados Agr-B-1 formados por el tratamiento térmico que sufrió la fracción FL-B-1 marcada con ANS (objetivo 40X, zoom 1.8). (b) Micrografía de la morfología de los agregados de Agr-B-1 de las proteínas sarcoplásmicas (objetivo 40X, zoom 3.5).

Con la fracción FL-R se obtuvieron micrografías similares. El tipo de edición que se utilizó en las imágenes no incrementa su calidad, sin embargo, permite mejorarlas y facilitar su interpretación cualitativa. En la micrografía de la Figura 39 (a) se observó, la forma desordenada en que se agregan las proteínas sarcoplásmicas por el tratamiento térmico mostrando la formación de un coágulo. La Figura 39 (b) muestra una ampliación de los agregados los cuales formaron una fase densa y continua. En el caso de que, las proteínas sarcoplásmicas sean utilizadas como indicadores, del efecto de las altas presiones hidrostáticas sobre la integridad de las proteínas del filete, la microestructura de los agregados inducidos por calentamiento de las proteínas sarcoplásmicas, podría verse alterada, como lo reportado, para el caso de los agregados de las proteínas de la leche, inducidas por calentamiento, cuya microestructura fue mucho más densa y continua en comparación con agregados inducidos por presiones de 600 MPa, por 15 min (Needs et.al.,

2000). En la Figura 40 se muestra el efecto del ANS sobre las transiciones de las proteínas sarcoplásmicas extraída

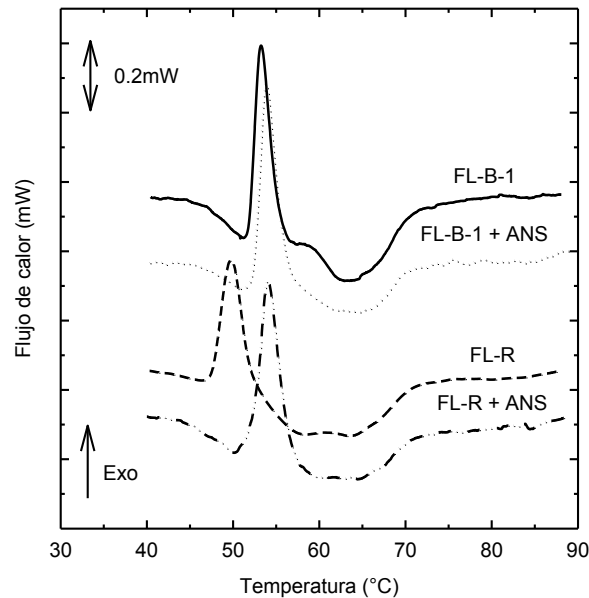


Figura 40. Efecto del ANS en la T_m de desnaturalización y agregación de las proteínas sarcoplásmicas extraídas con la solución amortiguadora de lavado y Ringer modificada. Velocidad de calentamiento 1.2 °C/min.

Los valores de las T_m y entalpías de los termogramas de la Figura 40 se muestran en el Anexo L. La presencia de ANS en la fracción líquida FL-B-1, durante el proceso de calentamiento, no muestra un efecto significativo en la T_m y en la entalpía la transición exotérmica, pero sí en la entalpía de la transición endotérmica, la cual disminuyó en un 71%. El efecto del ANS sobre la transición exotérmica de la fracción FL-R es más evidente, la T_m se desplaza a temperaturas mayores, el incremento fue de dos unidades aproximadamente. Douglas y Woody (2001) reportaron que el ANS no actúa como un “explorador hidrofóbico” para detectar especies parcialmente desdobladas de proteínas, más bien induce a tales especies. Estudios con dicroísmo circular (ultravioleta cercano) sugieren que el ANS se une a la proteína en una conformación específica, lo que posiblemente le proporcione cierta estabilidad a pH ligeramente ácidos.

Por otro lado, después de calentar las fracciones líquidas FL-B-1 y FL-R en el calorímetro, se separó el contenido de la celda de muestra en dos fracciones: una con los agregados formados Agr-B-1 y Agr-R y otra con la fracción líquida FL-B-1-D y FL-R-D, respectivamente. En las fracciones líquidas FL-B-1, FL-R, FL-B-1-D y FL-R-D se determinó el contenido de proteínas solubles y el grupo sulfhidrilo cuyos valores se muestran en las Tablas 15 y 16 respectivamente.

Tabla 15. Contenido de proteínas solubles (mg/mL) de las fracciones líquidas FL-B-1, FL-R, FL-B-1-D y FL-R-D.

Fracciones	mg/mL	%CV
FL-B-1	12.90 ± 0.32	2.48
FL-B-D	1.03 ± 0.18	17.20
FL.R	10.70 ± 0.11	1.07
FL-R-D	1.78 ± 0.39	22.00

Los datos representan los promedios ± desviación estándar de tres repeticiones.

Tabla 16. Contenido de grupo sulfhidrilo (μmol SH/mL) de las fracciones líquidas FL-B-1, FL-R, FL-B-1-D y FL-R-D.

Fracciones	μmol SH/mL	%CV
FL-B-1	7.92 ± 0.59	8.19
FL-B-D	No cuantificable	
FL.R	5.69 ± 0.24	3.96
FL-R-D	No cuantificable	

Los datos representan los promedios ± desviación estándar de tres repeticiones.

La concentración de proteínas solubles de la fracción FL-R-D se redujo un 83%, en comparación con la de la fracción FL-R, mientras que, la reducción fue de 92% comparando la concentración de proteínas solubles en las fracciones FL-B-1 y FL-B-1-D. El contenido de grupo sulfhidrilo en las fracciones líquidas FL-B-1 y FL-R fueron de 7.92 y 5.69 μmol SH/mL respectivamente, estos grupos reactivos de las proteínas participan en el proceso de agregación formando puentes disulfuro, motivo por el cual, después del tratamiento térmico, el contenido de grupo sulfhidrilo no es cuantificable.

Por otro lado, se estimó el peso en gramos de los agregados Agr-B-1 y Agr-R, los resultados se muestran en la Tabla 17.

Tabla 17. Peso de los agregados formados por las proteínas sarcoplásmicas extraídas con la solución amortiguadora de lavado y Ringer modificada.

Muestra	Agregados (mg)		CV (%)
Agr-B-1	77.8	± 9.40	12.1
Agr-R	63.4	± 7.14	10.9

Los datos representan los promedios ± desviación estándar de tres repeticiones.

La cantidad de agregados Agr-B-1 es mayor que los agregados Agr-R. Estos resultados concuerdan con el contenido de proteínas solubles y grupo sulfhidrilo, en sus correspondientes fracciones líquidas FL-B-1-D y FL-R-D.

IV.8 Perfil electroforético de las proteínas sarcoplásmicas del filete SDS-PAGE con el sistema Tris-tricina

Se determinó el perfil electroforético de las proteínas presentes en las fracciones líquidas FL-R, FL-B-1, FL-B-2 y FL-B-3, como se muestra en la Figura 41, comparando su movilidad electroforética con la de proteínas de peso molecular conocido.

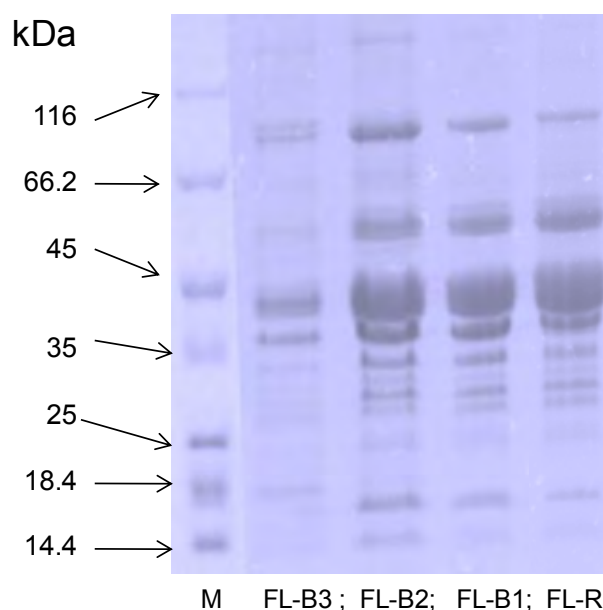


Figura 41. Perfil electroforético de las proteínas sarcoplásmicas solubles extraídas con la solución amortiguadora de lavado y Ringer modificada (M es el marcador, con bandas de pesos moleculares conocidos).

En forma general, con la solución amortiguadora de lavado y con la solución de Ringer modificada se extrajeron las mismas proteínas sarcoplásmicas pues las bandas que presentan son similares en intensidad. Para todas las muestras, las principales proteínas sarcoplásmicas solubles claramente exhiben pesos moleculares de 11, 17, 27k Da y en mayor intensidad se observan bandas dentro del intervalo de 35 a 45 kDa y las bandas en 97 kDa también son muy claras. La mioglobina de peso molecular 17 kDa tuvo una banda clara cuya intensidad disminuyó en la fracción líquida del tercer lavado FL-B-3 con la solución amortiguadora de lavado. Dentro del intervalo de 35 a 45 kDa se encuentran proteínas como

G-3-PD, aldolasa, enolasa, creatin-quinasa y LDH que tienen pesos moleculares de 35, 40, 41, 40 y 35, respectivamente (Findlay y Barbut, 1990). En un estudio de proteínas sarcoplásmicas de pescado se reportó que aquellas con pesos moleculares de 26, 40 y 94 kDa contribuyen a la formación de geles (Morioka y Shimizu, 1993 citado en Tadpitchayangkoon et al., 2010). El perfil electroforético de las fracciones líquidas también se usó para descartar la posibilidad de que las proteasas, tales como las catepsinas y calpaínas, que forman parte de las proteínas sarcoplásmicas, hayan degradado al resto de proteínas favoreciendo al proceso de agregación la cual se evidenció por la presencia de la transición exotérmica en los termogramas. Si las proteasas hubiesen degradado al resto de proteínas sarcoplásmicas, en el perfil electroforético hubiesen aparecido la mayoría de las bandas a bajos pesos moleculares, posiblemente a pesos menores a 45 kDa, lo que no ocurrió.

CONCLUSIONES

Se optimizaron las condiciones de extracción de las proteínas sarcoplásmicas del filete con dos soluciones extractoras: amortiguadora de lavado y Ringer modificada y se estableció que con ambas se extraen las mismas proteínas sarcoplásmicas, la mayor cantidad de ellas tuvo un peso molecular dentro del intervalo de 35 a 45 kDa.

Para obtener termogramas claros y definidos en μ DSC, la concentración de proteínas sarcoplásmicas debe estar en un intervalo de 3 a 10 mg/mL; concentraciones menores de 3 mg/mL no proporcionan resultados repetibles. La velocidad de calentamiento adecuada para los ensayos en μ DSC es de 1.2 °C/min.

Independientemente del método de extracción, las proteínas sarcoplásmicas exhibieron dos transiciones principales una exotérmica y otra endotérmica, atribuidas a los fenómenos de desnaturalización y agregación de estas proteínas.

La curva calorimétrica de desnaturalización y agregación de las proteínas sarcoplásmicas fue gobernada cinéticamente y el proceso global fue irreversible.

Los parámetros térmicos de desnaturalización y agregación de las proteínas sarcoplásmicas fueron sensibles al contenido de agua del sistema indicando que los grupos polares y apolares contribuyen a la estabilización de la estructuras de estas proteínas.

Los agregados de las proteínas sarcoplásmicas inducidos por calentamiento fueron desordenados, densos, continuos y de aspecto similar con ambos métodos de extracción.

Las transiciones endotérmicas de la fracción sólida empobrecida en proteínas sarcoplásmicas del filete, se atribuyen a la desnaturalización de las proteínas miofibrilares, miosina y actina principalmente, dependieron del método de extracción utilizado; con la solución de Ringer modificado se mantuvo la integridad estructural de las proteínas miofibrilares.

Se selecciona al método de Ringer modificado como el más adecuado para continuar con la separación sistemática del resto de componentes proteínicos del filete para su respectivo tratamiento con altas presiones hidrostáticas y su caracterización térmica.

RECOMENDACIONES

Para disminuir el número de variables en la investigación, y conocer el factor que está contribuyendo al comportamiento térmico que presentaron las proteínas miofibrilares del filete, se recomienda trabajar únicamente con una sola solución extractora e ir modificando los factores como pH, concentración de las sales y fuerza iónica.

Para conocer el efecto neto del EDTA sobre las transiciones de las proteínas miofibrilares, realizar un ensayo en el cual, se extraigan las proteínas sarcoplásmicas del filete únicamente con agua desionizada, usando la metodología de la solución amortiguadora de lavado y comparar los resultados.

Cuando se analice la imagen en el microscopio confocal, realizar cortes no sobremuestreados en el eje axial, para realizar la medición del área de fluorescencia y tener la posibilidad de medir la superficie hidrofóbica expuesta de las proteínas sarcoplásmicas desnaturalizadas por efecto térmico y realizar la reconstrucción en 3 dimensiones de los agregados formados.

Considerar para el reporte de los resultados, el alto grado de variación que presentaron las entalpías de las transiciones de la miosina, provocado por la ubicación de los puntos iniciales y finales de integración del área bajo la curva calorimétrica.

REFERENCIAS

Association of Official Analytical Chemists. (1995). Official Methods of Analysis. 16th edition. Editado por Patricia Cunniff. Vol. 2. Virgin, USA: Arlington.

Ali, V.; Prakash, K.; Kulkarni, S.; Ahmad, A.; Madhusudan, K. P.; Bhakuni, V. (2006). 8-anilino-1-naphthalene sulfonic acid (ANS) induces folding of acid unfolded cytochrome c to molten globule state as a result of electrostatic interactions. *Biopolymers* 83: 205-212.

Astruc, T.; Gatellier, P.; Labas, R.; Santé Lhoutellier, V.; Marinova, P. (2010). Microstructural changes in *M. Rectus Abdominis* bovine muscle after heating. *Meat Science* 85: 743-751.

Barbut, S.; Findlay, C.J. (1991). Influence of Sodium, Potassium and Magnesium Chloride on Thermal Properties of Beef Muscle. *Journal of Food Science* 56: 180-182.

Beldarraín, A. (2001). Aplicaciones de la calorimetría diferencial de barrido al estudio de la estabilidad de las proteínas. *Biotecnología Aplicada* 18:10-16.

Beltrán Apablaza, Marianela del Carmen. Biblioteca.Net. Universidad de Chile. Julio de 2010. http://biblioteca.universia.net/html_bura/ficha/params/id/20959.html (último acceso: Septiembre de 2010).

Bligh, E.; Dyer, J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Journal of Biochemical and Physiology* 37: 911-918.

Blonk, J. C.; van Aalst, H. (1993). Confocal Scanning Light Microscopy in Food Research. *Food Research International* 26: 297-311.

Damodaran, S.; Paraf, A. (1997) Food Proteins. A review. Food Proteins and their Application. Second edition. USA: Marcel Dekker Inc.

Davey, C. L.; Gilbert, K. V. (1974). Temperature-dependant toughness in beef. *Journal of Science Food and Agriculture* 25: 931-935.

Davoodi, J.W.; Warren, W.; Surewicz, W.K.; Carey, P. (1998). Scan-rate dependence in protein calorimetry: The reversible transitions of *Bacillus circulans* xylanase and a disulfide-bridge mutant. *Protein Science* 7: 1538-1544.

Di Bernardini, Roberta, et. al. (2011). Isolation, purification and characterization of antioxidant peptidic fractions from a bovine liver sarcoplasmic protein thermolysin hydrolyzate. *Peptides* 32: 388-400.

Dickerson, R.; Geis, I. (1969). *The structure and action of proteins*. New York: Harper and Row, Inc.

Douglas, Kamen E.; Woody, Robert W. (2001). A partially folded intermediate conformation is induced in pectate lyase C the addition of 8-anilino-1-naphthalenesulfonate. *Protein Science* 10: 2123-2130.

Dürrenberg, M. B.; Handschin, S.; Conde-Petit, B.; Escher, F. (2001). Visualization of Food Structure by Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM). *Lebensm-Wiss. U-Technology*, 11-17.

Fenema, R. (1993). *Química de alimentos*. Segunda edición. Zaragoza: Acribia S. A. de C. V.

Fernández, Carina L.; Romero, Ana M.; Judis, M. Alicia. (2006). Capacidad antioxidante de proteínas sarcoplásmicas adicionadas a emulsiones aceite-agua con agregados de Fe²⁺. Universidad Nacional del Nordeste. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. Chaco-Argentina: Facultad de Agroindustria, Universidad Nacional del Nordeste.

Findlay, C. J.; Barbut, S. (1990). Thermal Analysis of Meat. En *Thermal Analysis of Food*, de Harwalkar V. R.; Ma, C. Y. Elsevier Applied Science.

Hawe, A.; Sutter, M.; Jiskoot, W. (2007). Extrinsic Fluorescent Dyes as Tools for Protein Characterization. *Pharmaceutical Research* 25: 1487-1499.

Herrero, A.M.; Romero de Avila, M.D. (2006). Innovaciones en el procesado de alimentos: Tecnologías no térmicas. *Revista Médica Universidad de Navarra* 50: 71-74.

Hui, Y.H.; Guerrero Legarreta I.; Rosmini, M.R. (2006). *Ciencia y Tecnología de la Carne*. Primera Edición. México D.F.: Limusa, S.A. de C.V.

Ibarra-Molero, B.; Sanchez-Ruiz, J.M. Differential Scanning Calorimetry of Proteins: an Overview and Some Recent Developments. En *Advanced Techniques in Biophysics*, de Arrondo, J. L.; Alonso. A. 27-48. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.

Kim, N. K.; Hung, Y. C. (1994). Freeze-cracking in foods as affected by physical properties. *Journal Food Science* 59: 669-674.

Kreimer, D.I.; Shnyrov, V.L.; Villar, E.; Silman, I.; Weiner, L. (1995). Irreversible thermal denaturation of *Torpedocalifornica* acetylcholinesterase. *Protein Science* 4: 2349-2357.

Lomonte, B. (1985). Electroforesis en Gel de Poliacriamida. En *Inmunología General: Manual de Laboratorio*, de Lomonte, B. 92-100.

Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, .A. L.; Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275.

Lupano, C.E.; Añón, M. C. (1986). Denaturation of wheat germ proteins during drying. *Cereal Chemistry* 63: 259-262.

Marcos, B.; Kerry, J.; Mullen, A.M. (2010). High pressure induced changes on sarcoplasmic protein fraction and quality indicators. *Meat Science* 85: 115-125.

Matulis, D.; Baumann, C.G.; Bloomfield, C.V.; Lovrien, R.E. (1999). 1-Anilino-8-Naphtalene Sulfonato as a Protein Conformational Tightening Agent. *Biopolymers* 49: 451-458.

Ojeda, M.; Wagner, R.; Crupkin, M. (2001). Biochemical properties of Myofibrills from frozen *Longissimus Dorsi* muscle of three lamb genotypes. *Lebensmittel Wissenschaft and Technology* 34: 390-397.

Pérez-Juan, M.; Flores, M.; Toldrá, F. (2007). Simultaneous process to isolate actomyosin and actin from post-rigor porcine skeletal muscle. *Food Chemistry* 101: 1005-1011.

Ponce Alquicira, E. (2006) Cambios bioquímicos pre y postmortem. En *Ciencia y Tecnología de Carnes*, de Hui, Y. H.; Guerrero Lagarreta, I.; Rosmini, R.M. 111-123. México: Limusa, S.A. de C.V.

Privalov, P. L. (1980). Scanning microcalorimeters for studying macromolecules. *Pure and Applied Chemistry* 52: 479-497.

Quinn, J. R.; Raymond, D. P.; Harwelkar, V. R. (1980). Differential Scanning Calorimetry of Meat Proteins as affected by Processing Treatment. *Journal of Food Science*, 45: 1145-1149.

Ramírez Orejel, Juan. (2009). Estudio para evaluar el efecto de la congelación sobre la reactividad y conformación de las fracciones proteicas de diferentes músculos de bovino a

través de Calorimetría de Barrido Diferencial. Tesis de Maestría, UNAM, México D.F.: Facultad de Ciencias Químicas.

Robson, R. M. et. al. (1997). Postmortem changes in myofibrillar and other cytoskeletal proteins in muscle. *Annual Reciprocal Meat Conference Proceedings* 50: 43-52.

Sanchez-Ruiz, J.M.; Lopez-Lacomba, J.L.; Cortijo, M.; Mateo, P.L. (1988). Differential scanning calorimetry of the irreversible thermal denaturation of thermolysin. *Biochemistry* 27: 1648-1652.

Schägger, H.; von Jagow, G. (1987). Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry* 166: 368-379.

Setaram. (2010). μ DSC7 Evo - Commissioning / Uses. Setaram Instrumentation. Kep Technologies.

Skipnes, D.; van der Plancken, I.; van Loey, A.; Hendrick, M.E. (2007). Kinetics of heat denaturation of proteins from farmed Atlantic cod (*Gordus morhua*). *Journal of Food Engineering* 85: 81-89.

Sootawat, B.; Morrisey, M.; Haejung, A. (1997). Physicochemical changes in *Pacific Whiting* muscle proteins during iced storage. *Journal of Food Science* 62: 729-733.

Stryer, Lubert. (1995). *Bioquímica*. Cuarta edición. España: Reverté, S.A.

Tadpitchayangkoon, P.; Park, J.W.; Yongsawatdigul, J. (2010). Conformational changes and dynamic rheological properties of fish sarcoplasmic proteins treated at various pHs. *Food Chemistry* 121: 1046-1052.

Tello-Solís, S.; Arroyo-Reyna, A. (2002). Estudio por dicroísmo circular de la desnaturalización térmica de la subtilisina BPN. Modelo irreversible de dos estados. *Revista de la Sociedad Química de México* 46: 105-108.

Tornberg, E. (2005). Effects of heat on meat proteins-Implications on structure and quality of meat product. *Meat Science* 70: 493-508.

Tornberg, E.; Andersson, K.; Josell, A. (1997). The rheological properties of whole and minced meat during cooking as related to sensory and structure characteristics. Proceeding of the 1st international symposium on food rheology and structure. Zurich 16-2013-2018.

Totosaus, A.; Guerrero, I. (2006). Propiedades funcionales y textura. En Ciencias y Tecnología de Carnes, de Hui, Y. H.; Guerrero Legarreta, I.; Rosmini, M.R. 231-236. México: Limusa, S.A. de C.V.

Varnam, A. H.; Sutherland, J. P. (1995). Meat and meat products. Technology, chemistry and microbiology. Londres: Chapman and Hall.

Wagner, J. R.; Añon, M. C. (1985). Denaturation Kinetics of Myofibrillar Proteins in Bovine Muscle. *Journal of Food Science* 50: 1547-1550.

Wright, D. J.; Wilding, P. Differential Scanning Calorimetric Study of Muscle and its Proteins: Myosin and its Subfragments. *Journal Science of Food and Agriculture*, 35: 357-372.

Yongsawatdigul, J.; Park, J. W. (2003). Thermal denaturation and aggregation of threadfin bream actomyosin. *Food Chemistry* 83: 409-416.

Yuri, K.; Wakayama, J.; Yamada, T. (1998). Isomeric contractile properties of single myofibrils of rabbits skeletal muscle. *Journal of Biochemistry* 124: 565-571.

ANEXO A

pH de las soluciones extractoras B y R y de las fracciones líquidas FL-R, FL-B-1, FL-B-2 y FL-B-3

Antes de realizar el ANOVA se verifica la homogeneidad de los datos a través del ensayo de Barlett.

Estadístico de Barlett	Valor-P
1.74	0.00108

El estadístico de Barlett para series normales permite contrastar la hipótesis de que las varianzas son iguales. Junto al valor del estadístico aparece el nivel crítico o probabilidad de obtener valores como el obtenido o mayores. Puesto que el nivel crítico (Valor-P) es menor que 0.05 se rechaza la hipótesis de igualdad de varianzas. Para realizar el análisis estadístico de los resultados se utilizó el programa STATGRAPHICS PLUS. El análisis de varianza ANOVA sirve para comparar las medias de varios grupos en una variable cuantitativa. Para utilizar el ANOVA de forma satisfactoria deben cumplirse dos hipótesis, aunque se aceptan ligeras desviaciones de las condiciones ideales: (a) Los resultados obtenidos para cada conjunto deben seguir una distribución normal y (b) Las varianzas de cada conjunto de datos no deben diferir de forma significativa. El ANOVA nos proporciona el valor del estadístico F que es el cociente entre dos estimadores diferentes de la varianza poblacional. Uno de los estimadores se obtiene a partir de la variación existente entre las medias de los grupos (variación inter-grupos). El otro estimador se obtiene a partir de la variación dentro de cada grupo (variación intra-grupos). La tabla de ANOVA recoge una cuantificación de ambas fuentes de variación (suma de cuadrados), los grados de libertad asociados a cada suma de cuadrados (gl) y el valor concreto adoptado por cada estimador de varianza poblacional (medias de los cuadrados). El cociente entre las dos medias de cuadrados nos proporciona el valor del estadístico F, el cual aparece acompañado de su correspondiente nivel crítico o nivel de significación observado (Valor-P), es decir, de la probabilidad de obtener valores iguales o mayores bajo la hipótesis de igualdad de medias. Si el valor del crítico es menor que 0.05, rechazamos la hipótesis de igualdad de medias y concluimos que las poblaciones son diferentes estadísticamente. Asumiendo varianzas

iguales, se procede a calcular el ANOVA y la Prueba de Múltiples Rangos de Tukey con un $\alpha = 0.05$ (Tabla A.1).

Tabla A.1. Análisis de Varianza (ANOVA) de las mediciones de pH

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F-calculada	Valor-P
Entre muestras	16.7	6	2.77	298.1	0.0000
Dentro de muestras	0.04	43	9×10^{-4}		
Total	16.7	49			

Puesto que el valor del nivel crítico Valor-P es menor que 0.05 se rechaza la hipótesis de igualdad de las medias y se concluye que las muestras tienen diferencia significativa estadísticamente.

ANEXO B

Pruebas estadísticas de los resultados de la cuantificación de proteínas solubles en las fracciones líquidas obtenidas en la extracción de proteínas sarcoplásmicas del filete

Tabla B.1. Prueba t-student para comparar las medias de las fracciones líquidas FL-R y FL-B-1.

Hipótesis sobre las medias, comparación entre dos medias				
media estimada de	FL-R	10.6666667		
media estimada de	FL-B-1	11.15625		
Ho: $\mu_1 = \mu_2$, riesgo $\alpha = 0.05$		
Posibles hipótesis alternas:	t de Student	t de tablas	Resultado:	Decisión:
$H_1: \mu_1 < \mu_2$	-2.60709092	-2.13184678	inferior	Rechazar Ho, con riesgo $\alpha = 0.02980097$

Tabla B.2. Prueba F de Snedecor para comparar las varianzas de las fracciones líquidas FL-R y FL-B-1.

Hipótesis sobre las varianzas, comparación entre dos varianzas				
variancia estimada de	FL-R	0.09016927		
variancia estimada de	FL-B-1	0.015625		
Ho: $\sigma_1^2 = \sigma_2^2$, riesgo $\alpha = 0.05$		
Posibles hipótesis alternas:	F de Snedecor	F de tablas	Resultado:	Decisión:
$H_1: \sigma_1^2 < \sigma_2^2$				
$H_1: \sigma_1^2 > \sigma_2^2$	5.770833333	19	igual	Aceptar Ho
$H_1: \sigma_1^2 \neq \sigma_2^2$	5.770833333	39	igual	Aceptar Ho

Tabla B.3. Prueba t-student para comparar las medias de las fracciones líquidas FL-B-2 y FL-B-3.

Hipótesis sobre las medias, comparación entre dos medias				
media estimada de	FL-B-2	0.79340278		
media estimada de	FL-B-3	0.47847222		
Ho: $\mu_1 = \mu_2$, riesgo $\alpha = 0.05$		
Posibles hipótesis alternas:	t de Student	t de tablas	Resultado:	Decisión:
$H_1: \mu_1 < \mu_2$				
$H_1: \mu_1 > \mu_2$	12.9202804	2.13184678	mayor	Rechazar Ho, con riesgo $\alpha = 0.00010349$

Tabla B.4. Prueba F de Snedecor para comparar las varianzas de las fracciones líquidas FL-B-2 y FL-B-3.

Hipótesis sobre las varianzas, comparación entre dos varianzas				
variancia estimada de	FL-B-2	0.00101273		
variancia estimada de	FL-B-3	0.00076968		
Ho: $\sigma_1^2 = \sigma_2^2$, riesgo $\alpha = 0.05$		
Posibles hipótesis alternas:	F de Snedecor	F de tablas	Resultado:	Decisión:
$H_1: \sigma_1^2 < \sigma_2^2$				
$H_1: \sigma_1^2 > \sigma_2^2$	1.315789474	19	igual	Aceptar Ho
$H_1: \sigma_1^2 \neq \sigma_2^2$	1.315789474	39	igual	Aceptar Ho

ANEXO C

Parámetros de calorimetría de las transiciones térmicas de las proteínas del filete

Tabla C.1. Temperatura inicial (T_i), final (T_f), máxima (T_m), y entalpía (ΔH) de las transiciones endotérmicas correspondientes a la desnaturalización de las proteínas del filete.

Parámetro	Transición	Promedio \pm Desviación estándar			CV (%)
T_i (°C)	A	46.4	\pm	1.4	2.9
	B	57.0	\pm	1.2	2.0
	C	71.2	\pm	0.5	0.7
T_f (°C)	A	54.0	\pm	1.2	2.2
	B	68.0	\pm	0.6	0.9
	C	78.0	\pm	0.6	0.7
T_m (°C)	A	50.7	\pm	0.9	1.8
	B	61.8	\pm	0.8	1.4
	C	75.1	\pm	0.6	0.8
ΔH (J/g muestra)	A	0.065	\pm	0.025	39.09
	B	0.417	\pm	0.047	11.39
	C	0.393	\pm	0.040	10.19

Los datos representan los promedios \pm desviación estándar de resultados de 7 repeticiones.

ANEXO D

Parámetros de calorimetría de las transiciones térmicas de las fracciones sólidas y líquidas extraídas del filete usando la solución amortiguadora de lavado

Tabla D.1. Temperatura inicial (T_i), final (T_f), máxima (T_m), y entalpía (ΔH) de las transiciones endotérmicas correspondientes a la desnaturalización de las proteínas miofibrilares (FS-B-1, FS-B-2 y FS-B-3) y de las proteínas sarcoplásmicas (FL-B-1, FL-B-2 y FL-B-3) obtenidas en los tres lavados del filete con solución amortiguadora de lavado.

Fracción	Transición	T_m (°C)			CV (%)	ΔH (J/g _{muestra})			CV (%)	n
FS-B-1	c	62.7				0.438				1
	d	72.9				0.385				
FS-B-2	c	62.7	±	0.0	0.1	0.390	±	0.04	11.2	3
	d	69.7	±	0.2	0.3	0.174	±	0.01	7.38	
FS-B-3	c	62.1	±	0.2	0.3	0.372	±	0.01	2.47	2
	d	68.6	±	0.2	0.4	0.040	±	0.01	21.2	
FL-B-1	a	54.0				-0.078				1
	b	66.0				0.050				
FL-B-2	a	64.5	±	2.7	4.2	-0.107	±	0.01	-7.30	2
FL-B-3	a	76.9	±	0.0	0.0	-0.045	±	0.01	-14.3	2

Los datos representan los promedios ± desviación estándar de resultados de n repeticiones.

ANEXO E

Parámetros de calorimetría de las transiciones térmicas de las proteínas sarcoplásmicas, variando la velocidad de calentamiento

Tabla E.1. Temperatura inicial (T_i), final (T_f), máxima (T_m), y entalpía (ΔH) de las transiciones de la fracción líquida FL-B-1 barrida a velocidades de calentamiento de 0.6, 0.9 y 1.2 °C/min.

V calentamiento (°C/min)	Transición	T_i (°C)	T_f (°C)	T_m (°C)	ΔH (J/g muestra)
0.6	a	50.4	53.6	52.0	-0.016
0.9	a	52.1	54.8	53.2	-0.041
1.2	a	53.1	56.6	54.5	-0.083
0.6	b	58.1	67.4	63.6	0.029
0.9	b	57.8	68.6	64.3	0.036
1.2	b	61.9	69.1	64.5	0.039

ANEXO F

Métodos propuestos para el cálculo de la E_a para un proceso de no equilibrio, aplicados a transiciones de fase de polímeros plásmicos

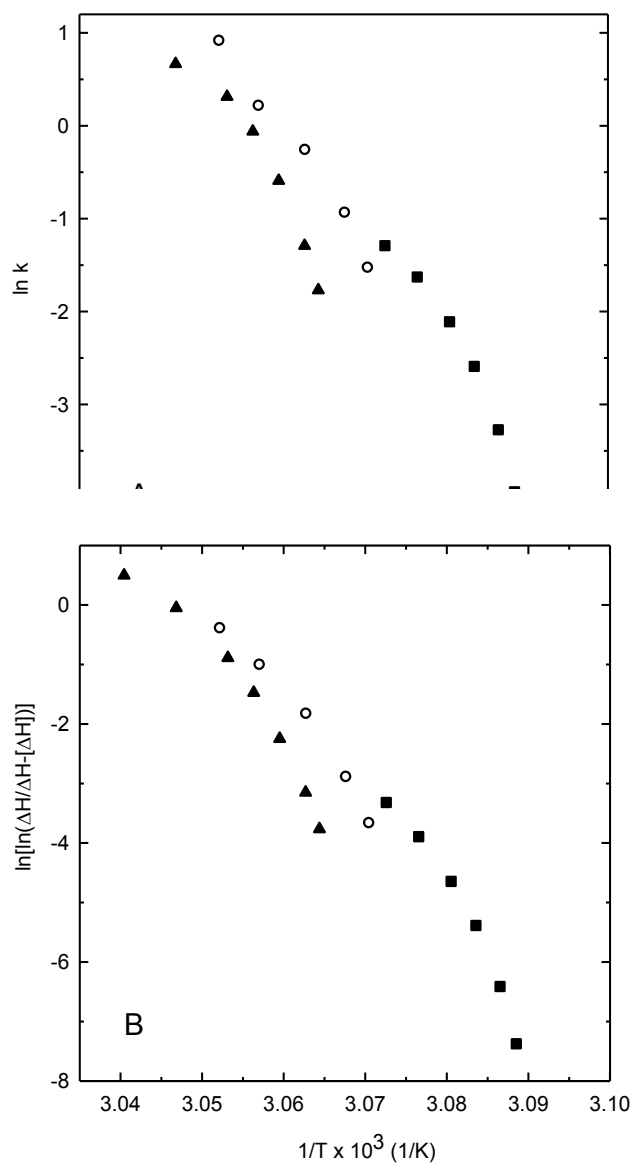


Figura F.1. A: Regresiones lineales del $\ln k$ vs $1/T$. B: Regresiones lineales del $\ln\left(\ln\left(\frac{\Delta H}{\Delta H - (\Delta H)}\right)\right)$ vs $1/T$. Ambas gráficas se obtuvieron con las transiciones a diferentes velocidades de calentamiento, los símbolos ▲, ○ y ■ corresponden a 1.2, 0.9 y 0.6 °C/min.

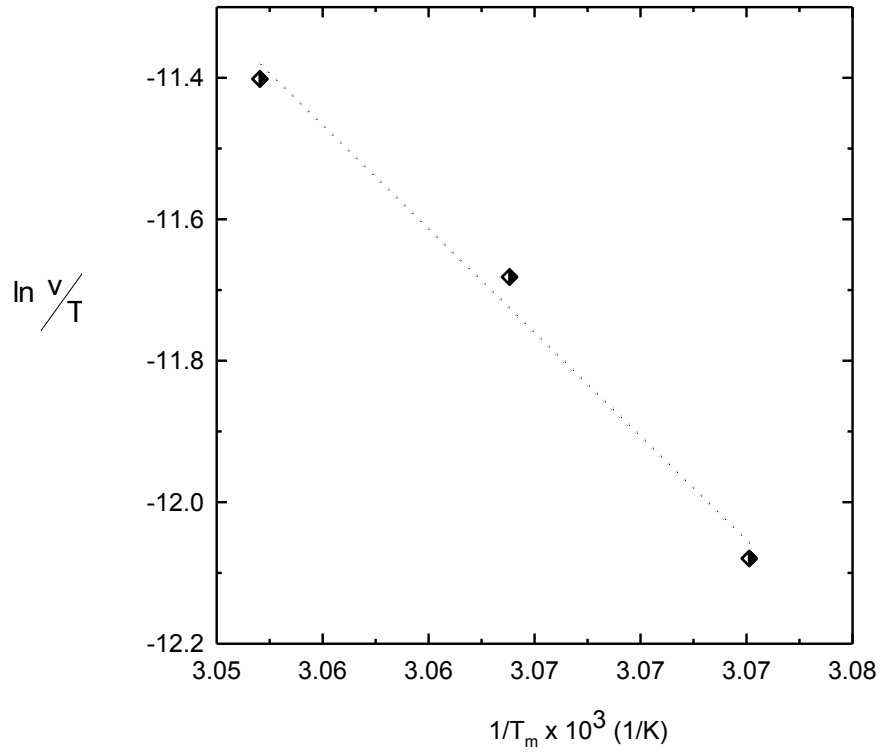


Figura F.2. Regresión lineal $\ln \frac{v}{T_m^2}$ vs $1/T_m$ obtenida de las transiciones a diferentes velocidades de calentamiento, 1.2, 0.9 y 0.6 °C/min. La línea punteada corresponde a la regresión lineal.

ANEXO G

Métodos propuestos para el cálculo de la E_a para un proceso de no equilibrio, aplicados a la transición endotérmica (b) de proteínas sarcoplásmicas

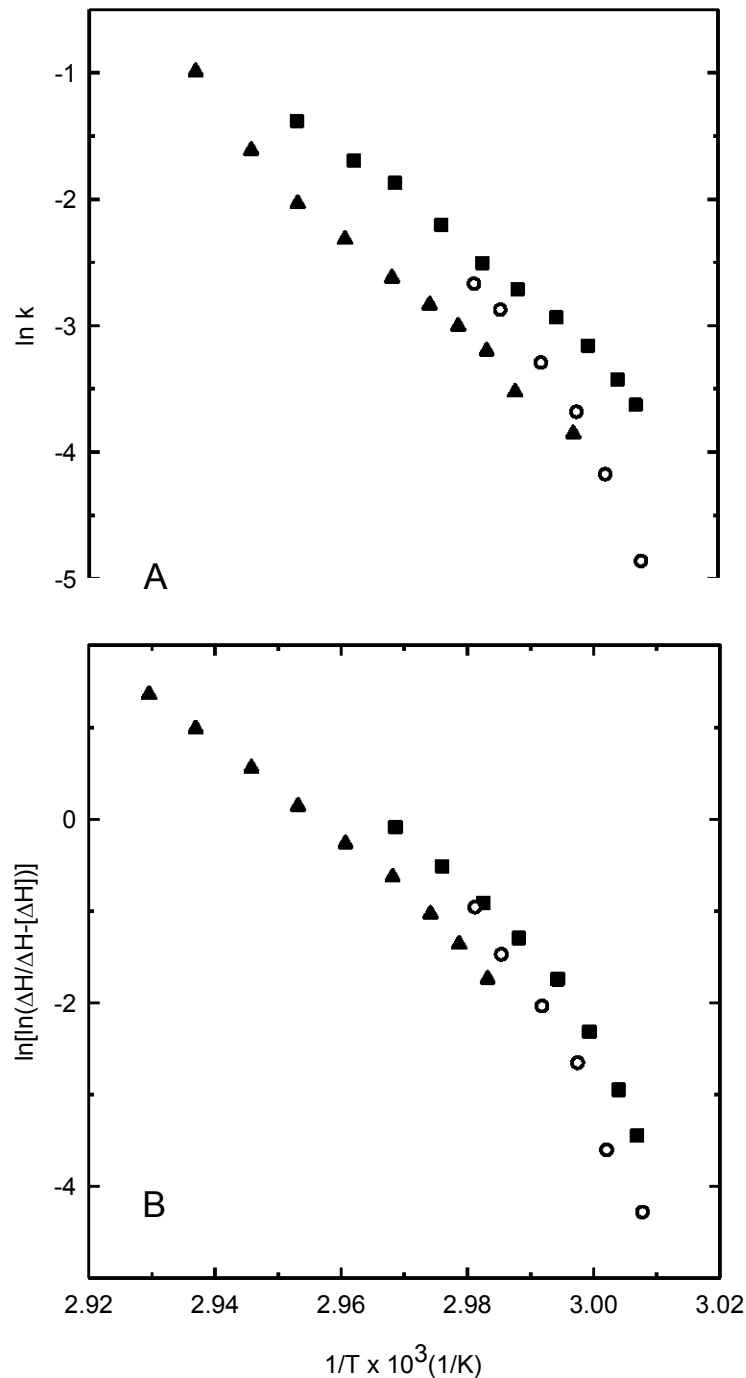


Figura G.1. A: Regresiones lineales del $\ln k$ vs $1/T$. B: Regresiones lineales del $\ln\left(\ln\left(\frac{\Delta H}{\Delta H - \langle \Delta H \rangle}\right)\right)$ vs $1/T$. Ambas gráficas se obtuvieron con las transiciones a diferentes velocidades de calentamiento, los símbolos ▲, ○ y ■ corresponden a 1.2, 0.9 y 0.6 °C/min.

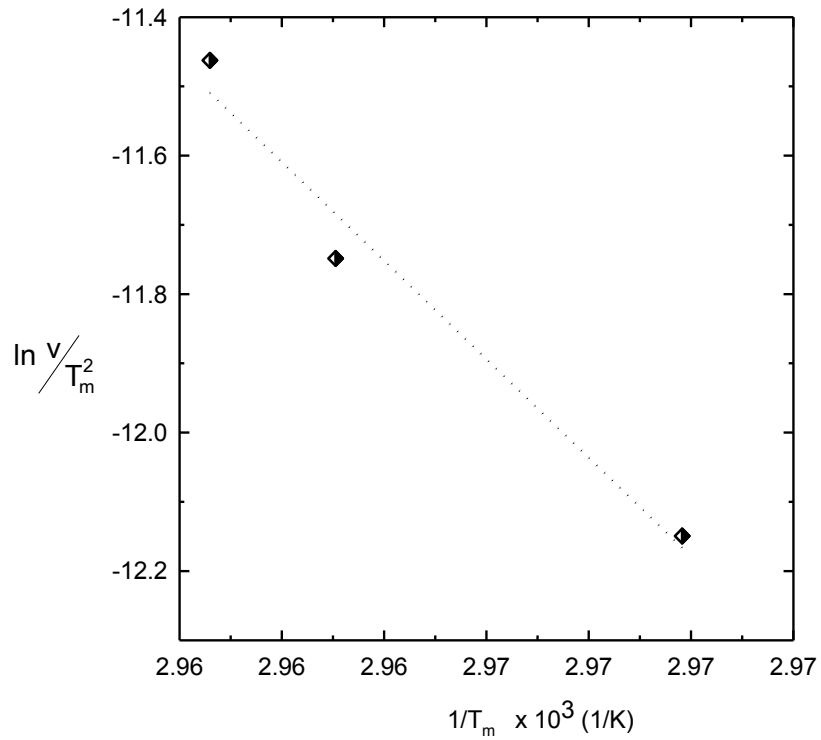


Figura G.2. Regresión lineal $\ln \frac{v}{T_m^2}$ vs $1/T_m$ obtenida de las transiciones a diferentes velocidades de calentamiento, 1.2, 0.9 y 0.6 °C/min. La línea punteada corresponde a la regresión lineal.

ANEXO H

Parámetros de calorimetría de las transiciones térmicas de las proteínas miofibrilares del filete, variando la velocidad de calentamiento

Tabla H.1. Temperatura inicial (T_i), final (T_f), máxima (T_m) y entalpías (ΔH) de las transiciones de la fracción sólida FS-B-3 barrida a velocidades de calentamiento de 0.6, 0.9 y 1.2 °C/min.

V calentamiento (°C/min)	Transición	T_i (°C)	T_f (°C)	T_m (°C)	ΔH (J/g muestra)
0.6	c	59.7	63.0	61.5	0.411
0.9	c	58.8	64.3	61.7	0.477
1.2	c	59.7	64.9	62.4	0.443
0.6	d	65.1	68.8	66.9	0.084
0.9	d	65.1	69.3	67.1	0.074
1.2	d	66.3	70.8	68.5	0.094

ANEXO I

Métodos propuestos para el cálculo de la E_a para un proceso de no equilibrio, aplicados a la transición endotérmica (c) de la miosina (fracción sólida)

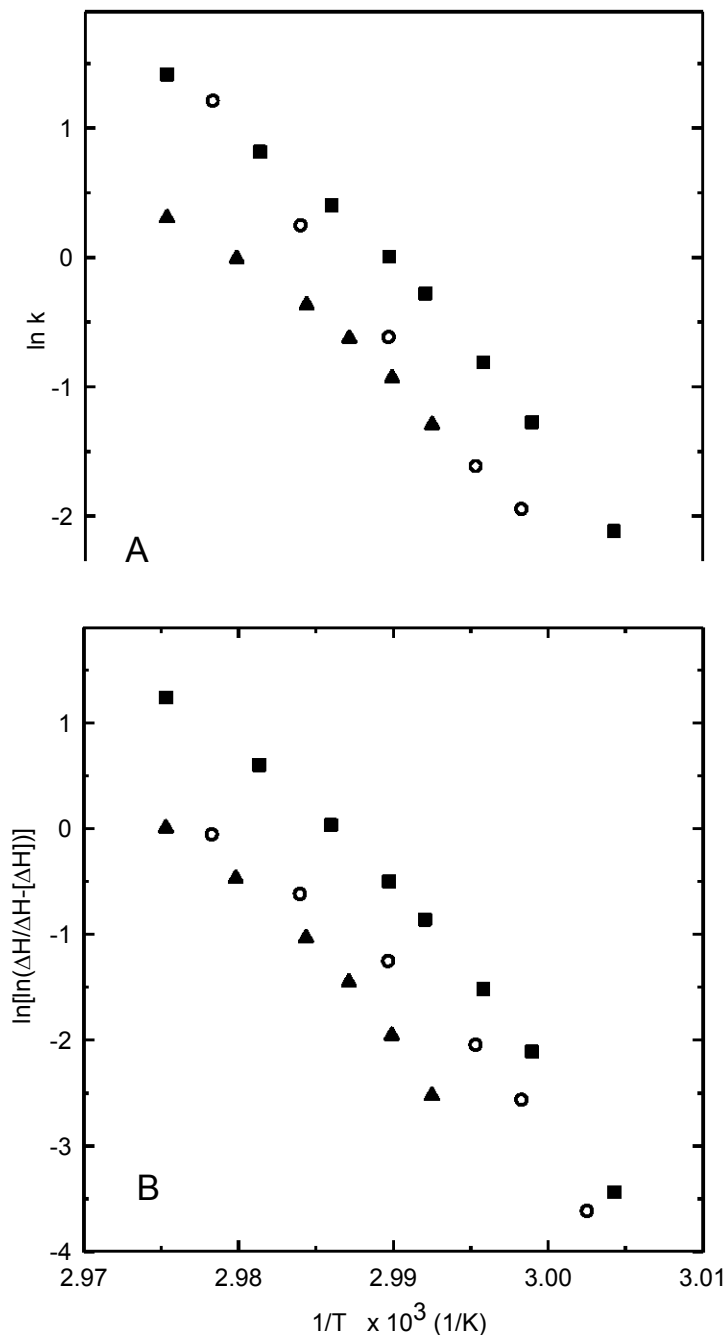


Figura I.1. A: Regresiones lineales del $\ln k$ vs $1/T$. B: Regresiones lineales del $\ln\left(\ln\left(\frac{\Delta H}{\Delta H - \langle \Delta H \rangle}\right)\right)$ vs $1/T$. Ambas gráficas se obtuvieron con las transiciones a diferentes velocidades de calentamiento, los símbolos \blacktriangle , \circ y \blacksquare corresponden a 1.2, 0.9 y 0.6 °C/min.

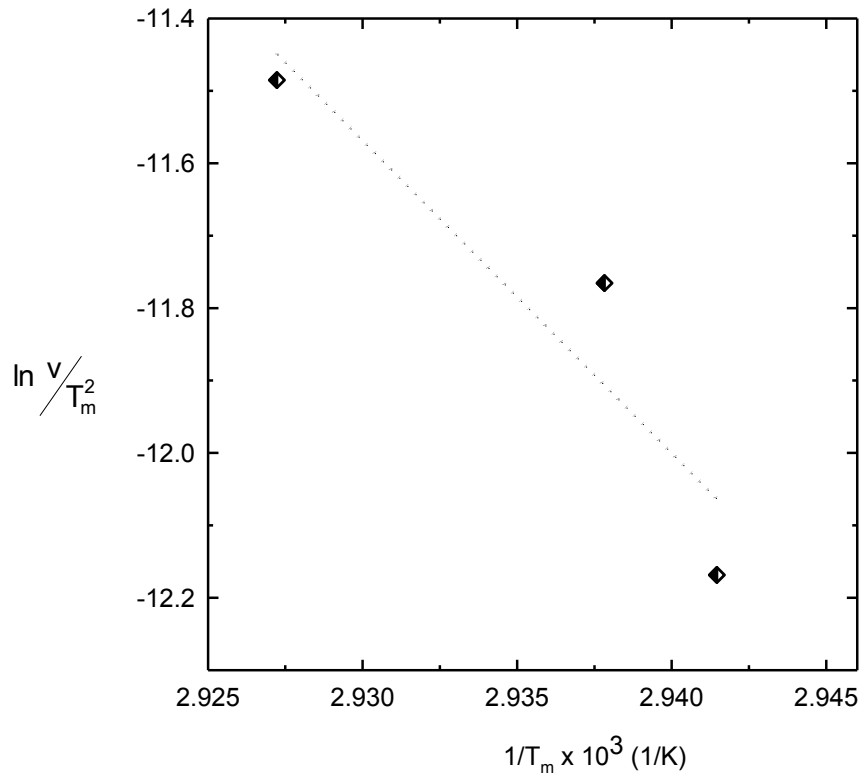


Figura I.2. Regresión lineal $\ln \frac{v}{T_m^2}$ vs $1/T_m$ obtenida de las transiciones a diferentes velocidades de calentamiento, 1.2, 0.9 y 0.6 °C/min. La línea punteada corresponde a la regresión lineal.

ANEXO J

Tabla J.1. Temperatura inicial (T_i), final (T_f), máxima (T_m) y entalpía (ΔH) de las suspensiones preparadas a partir de la fracción líquida FL-B-1 con el solución amortiguadora de lavado.

Transición	T_i (°C)	CV (%)	T_f (°C)	CV (%)	T_m (°C)	ΔH (J/g muestra)	CV (%)	n	mg/mL
a	52.2 ± 0.2	0.4	55.8 ± 0.4	0.7	53.7 ± 0.3	-0.077 ± 0.011	0.6	7	11.16
b	59.4 ± 0.7	1.2	69.3 ± 2.1	3.0	64.6 ± 0.6	0.051 ± 0.011	1.0	7	21.381
a	52.8		56.3		54.3	-0.081		1	10.04
b	65.6		71.0		65.6	0.045			
a	52.9		56.0		54.4	-0.071		1	9.82
b	59.5		70.1		65.8	0.063			
a	53.2		56.7		54.6	-0.080		1	9.49
b	64.6		69.1		66.8	0.009			
a	55.1		58.4		56.4	-0.071		1	8.93
b	65.2		69.1		67.3	0.009			
a	53.3 ± 0.9	1.7	59.0 ± 1.8	3.1	56.1 ± 1.4	-0.093 ± 0.010	2.5	3	6.70
b	63.3 ± 1.0	1.6	69.9 ± 0.6	0.9	66.7 ± 0.6	0.009 ± 0.002	0.9	3	20.661
a	56.3		59.6		57.6	-0.085		1	6.14
b	65.1		70.0		67.3	0.007			
a	57.2		60.5		58.5	-0.079		1	5.91
b	64.2		70.1		67.2	0.010			
a	55.4 ± 2.8	5.0	59.5 ± 1.7	2.9	57.2 ± 2.1	-0.088 ± 0.010	3.6	2	5.58
b	64.7 ± 2.4	3.7	68.7 ± 1.6	2.4	66.8 ± 0.1	0.008 ± 0.000	0.2	2	4.136
a	58.2 ± 1.7	3.0	62.9 ± 0.1	0.1	60.0 ± 1.2	-0.102 ± 0.012	1.9	2	4.46
b	66.5 ± 1.6	2.4	71.0 ± 0.2	0.4	68.1 ± 0.3	0.004 ± 0.001	0.4	2	13.004
a	57.1 ± 0.9	1.6	63.8 ± 0.2	0.3	60.2 ± 0.3	-0.103 ± 0.004	0.6	2	3.35
a	60.3 ± 1.1	1.9	66.7 ± 1.7	2.5	63.1 ± 0.7	-0.102 ± 0.021	1.1	2	2.23
a	62.9 ± 2.0	3.2	70.3 ± 3.4	4.9	66.8 ± 2.8	-0.090 ± 0.017	4.1	2	1.12
a	68.6 ± 2.3	3.3	72.8 ± 1.7	2.4	70.6 ± 1.5	-0.070 ± 0.034	2.1	3	0.89
a	68.8 ± 1.1	1.7	75.9 ± 1.8	2.4	72.7 ± 1.2	-0.050 ± 0.007	1.6	2	0.67
a	76.2 ± 1.6	2.1	84.7 ± 2.5	2.9	80.8 ± 2.5	-0.033 ± 0.010	3.1	2	0.45

Los datos representan los promedios ± desviación estándar de resultados de n repeticiones.

ANEXO K

Tabla K.1. Temperatura inicial (T_i), final (T_f), máxima (T_m) y entalpia (ΔH) de las suspensiones preparadas a partir del FL-R con solución de Ringer modificada.

Transición	T_i (°C)	CV (%)	T_f (°C)	CV (%)	T_m (°C)	CV (%)	ΔH (J/g muestra)	CV (%)	n	mg/mL
a	48.8 ± 2.0	4.1	52.8 ± 1.6	3.0	50.7 ± 1.6	3.2	-0.065 ± 0.011	-16.52	4	10.67
b	64.0 ± 1.6	2.5	68.4 ± 1.5	2.2	64.8 ± 0.1	0.2	0.014 ± 0.001	9.15		
a	52.1		55.8		53.6		-0.089		1	8.54
b	62.9		68.5		64.8		0.008			
a	52.9		56.7		54.4		-0.080		1	7.47
b	61.0		67.7		64.2		0.011			
a	53.3 ± 1.0	1.8	56.1 ± 0.5	0.8	55.0 ± 1.2	2.1	-0.082 ± 0.003	-3.45	2	5.34
b	63.7 ± 2.6	4.0	65.8 ± 0.4	0.7	65.1 ± 0.6	0.9	0.005 ± 0.002	44.10		
a	56.0		61.5		58.5		-0.096		1	3.20
a	63.1		70.9		68.2		-0.063		1	1.07
a	79.4 ± 4.3	5.4	81.5 ± 1.9	2.4	80.6 ± 2.6	3.3	-0.018 ± 0.001	-7.86	2	0.43

Los datos representan los promedios ± desviación estándar de resultados de n repeticiones.

ANEXO L

Tabla L.1. Temperatura máxima (T_m) y entalpía (ΔH) de las fracciones líquidas FL-B-1, FL-B-1 + ANS, FL-R y FL-R + ANS.

Fracciones	Transición	T_m (°C)	%CV	ΔH (J/g muestra)	%CV	n
FL-B-1	a	53.7 ± 0.3	0.6	-0.077 ± 0.011	-13.810	7
	b	64.6 ± 0.6	1.0	0.051 ± 0.011	21.381	
FL-B-1 + ANS	a	53.6 ± 0.4	0.7	-0.079 ± 0.001	-0.901	2
	b	66.1 ± 0.5	0.7	0.015 ± 0.002	14.630	
FL-R	a	50.7 ± 1.6	3.2	-0.065 ± 0.011	-16.520	4
	b	64.8 ± 0.1	0.2	0.014 ± 0.001	9.150	
FL-R + ANS	a	53.4 ± 0.9	1.7	-0.096 ± 0.008	-8.839	2
	b	64.8 ± 0.5	0.8	0.011 ± 0.001	12.856	

Los datos representan los promedios ± desviación estándar de resultados de n repeticiones.