


# DESARROLLO DEL DIAGRAMA DE ESTADO DEL GEL-COLÁGENO PARA LA IMPRESIÓN DE ALIMENTOS 3D



**TRABAJO FIN DE GRADO:**  
CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE  
LOS ALIMENTOS

**Presentado por:** Eva M<sup>a</sup> Castelblanque Yuste

**Tutor:** Pedro José Fito Suñer

**Co-tutores:** Marta Castro Giráldez

Daniela Jaunarena González

# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA  
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



## *DESARROLLO DEL DIAGRAMA DE ESTADO DEL GEL-COLÁGENO PARA LA IMPRESIÓN DE ALIMENTOS 3D*

TRABAJO FIN DE GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

ALUMNA: EVA MARÍA CASTELBLANQUE YUSTE

TUTOR: PEDRO JOSÉ FITO SUÑER

CO-TUTORES: MARTA CASTRO GIRÁLDEZ

DANIELA JAUNARENA GONZÁLEZ



*Curso Académico: 2014/2015*

**VALENCIA, JULIO 2015**

## **RESUMEN**

La industria alimentaria es un pilar fundamental de la economía mundial. Debido a su importancia a nivel económico y a la competencia que encontramos dentro del sector, es necesario innovar en el desarrollo de nuevas tecnologías y productos para captar la atención del consumidor. De la búsqueda de nuevas tecnologías y de los avances de la ciencia surge la idea de la impresión 3D con el objetivo de construir y cocinar estructuras alimentarias complejas y de permitir al consumidor la obtención de un alimento de alta calidad sensorial listo para su consumo, sin la necesidad de entrar en contacto con las materias primas. Esta nueva tecnología permitirá al usuario la obtención de un alimento de alta calidad sensorial, de geometría compleja y listo para su consumo ("ready-to-eat"), todo ello sin entrar en contacto con las materias primas. Para ello, el primer paso será desarrollar los diagramas de transiciones de materias primas y adaptarlos al sistema de extrusión de esta tecnología de impresión 3D; este primer paso es el que se pretende abordar en este trabajo final de grado utilizando como materia prima un gel de colágeno debido a sus numerosas aplicaciones en la industria alimentaria y a su versatilidad, que la convierte en una valiosa herramienta para el desarrollo de nuevos y más atractivos productos.

Se formularon geles de colágeno con seis concentraciones diferentes de proteína. Para cada una de las concentraciones que se utilizaron se realizaron varias determinaciones. En primer lugar se obtuvo la curva de conductividad eléctrica versus temperatura durante la gelificación del colágeno, que iba desde una temperatura de 80° a unos 4°C. Las transiciones térmicas del colágeno se determinaron por calorimetría diferencial de barrido (DSC). Paralelamente se realizaron ensayos de doble compresión (TPA) a diferentes temperaturas para así caracterizar las propiedades viscoelásticas de cada estado de gelificación de las diferentes concentraciones de colágeno. A cada una de las muestras se les medía la humedad y la actividad de agua.

En este trabajo se ha desarrollado un sistema de medida de la difusividad térmica a partir de un modelo de Fourier capaz de modelizar el proceso de enfriamiento del colágeno. Además se ha obtenido la evolución de dicho parámetro pudiéndose determinar una transición de primer orden para cada una de las formulaciones. Además, se han obtenido las propiedades físicas necesarias (calor específico y densidad) para la obtención de la conductividad térmica del gel durante el proceso de enfriamiento. Se han obtenido las propiedades mecánicas por TPA de los distintos estados de agregación determinados por conductimetría eléctrica, determinando



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

**ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA  
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL**

como más importantes para la impresión 3D; la dureza, la adhesividad y la elasticidad. A partir de todas las medidas realizadas durante este trabajo ha sido posible completar un diagrama de estado del gel de colágeno con las propiedades mecánicas de cada una de los estados sólidos. Por último, mediante el análisis de todas las medidas térmicas y mecánicas se ha definido como óptimo, en el punto de deposición del gel, el estado de agregación VIII y en algunas geometrías específicas el IX.

*“Tanto si crees que puedes como si no, estás en lo cierto, todo depende de lo que tú creas”*

Henry Ford

## Dedicatorias y agradecimientos

A mis padres, que son mi modelo a seguir. Por su ejemplo de lucha y superación, su educación, sus valores, su apoyo incondicional, su cariño, por todo su esfuerzo y sacrificio que han hecho que haya podido llegar hasta aquí. A vosotros os debo todo lo que soy.

A mis hermanos, a mis dos pequeños a los que no cambio por nada.

A Fernando, por ser mi apoyo diario, el pilar fundamental en mi vida. Gracias por estar incondicionalmente en las buenas y, sobre todo, en las malas, por animarme y aguantarme en los peores momentos, por tu comprensión, por tu amor, por confiar en mí y por hacerme creer en mi misma.

A Daniela, que ha sido sin duda mi gran apoyo durante este trabajo y se ha convertido estos meses en alguien fundamental. Por su ayuda en todo momento, por compartir tan buenos ratos juntas, por lo bien que nos hemos compenetrado, por el gran equipo que hemos formado, por hacer que llegar a la cima de la pirámide haya sido un poco menos duro, por sus ánimos y por estar siempre ahí. No podría haber tenido mejor compañía en esta recta final.

A los directores de este trabajo, Pedro y Marta. A Pedro por su entusiasmo, sus ideas y su inteligencia. A Marta por su dulzura, su empatía, y su alegría. A los dos por ser tan buenos profesionales, por toda su ayuda, por su cercanía, por enseñarme y por guiarme. Estoy muy contenta de haber trabajado con vosotros y de haberos conocido.

A Victoria, que también ha sido una persona muy importante para mí estos meses, por ser tan buena, por toda su ayuda, por su paciencia, por saber escuchar y dar ánimos en los peores momentos, por estar siempre ahí dispuesta a ayudar en todo y por haber compartido con nosotras tantos ratos buenos. Eres un amor y no hace falta conocerte mucho para darse cuenta de eso.

A mis amigas. Gracias por estar ahí siempre, no solo durante estos cuatro años, sino durante toda una vida.

A todas las personas maravillosas que se han cruzado en mi camino durante estos cuatro años de carrera y sobre todo a mis chicas sin las cuales nada habría sido lo mismo. Sois sin duda lo mejor que me llevo.

## ÍNDICES

<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1,1</b>	<b>JUSTIFICACIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1,2</b>	<b>PROPIEDADES DEL COLÁGENO</b>	<b>2</b>
<b>1,3</b>	<b>PROCEDENCIA Y ESTRUCTURA DEL COLÁGENO</b>	<b>3</b>
<b>1,4</b>	<b>ESTRUCTURA DE SISTEMAS COLOIDALES</b>	<b>5</b>
<b>1,4,1</b>	<b>GELES DE COLÁGENO</b>	<b>7</b>
<b>1,5</b>	<b>TEXTURA</b>	<b>7</b>
<b>1,6</b>	<b>TRANSICIONES DE FASE</b>	<b>8</b>
<b>1,7</b>	<b>IMPRESIÓN 3D</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO</b>	<b>13</b>
	<b>OBJETIVOS</b>	<b>13</b>
	<b>PLAN DE TRABAJO</b>	<b>13</b>
<b>3</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>14</b>
<b>3,1</b>	<b>MATERIA PRIMA</b>	<b>14</b>
<b>3,2</b>	<b>PLAN DE TRABAJO</b>	<b>14</b>
<b>3,3</b>	<b>ENSAYO DE CURVA DE ENFRIAMIENTO.</b>	<b>15</b>
<b>3,4</b>	<b>CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO</b>	<b>16</b>
<b>3,5</b>	<b>ANÁLISIS DEL PERFIL DE TEXTURA (TPA)</b>	<b>16</b>
<b>3,6</b>	<b>DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL AGUA</b>	<b>17</b>
<b>3,7</b>	<b>DETERMINACIÓN DE LA HUMEDAD</b>	<b>18</b>
<b>3,8</b>	<b>DETERMINACIÓN DEL pH</b>	<b>19</b>
<b>3,9</b>	<b>DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD</b>	<b>19</b>
	<b>RESULTADOS</b>	<b>21</b>
	<b>CURVAS DE ENFRIAMIENTO, OBTENCIÓN DE TRANSICIONES DE FASE.</b>	<b>21</b>
	<b>OBTENCIÓN DE TRANSICIONES A PARTIR DE CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO; OBTENCIÓN DE PROPIEDADES TÉRMICAS.</b>	<b>25</b>
	<b>PROPIEDADES MECÁNICAS</b>	<b>30</b>
	<b>ANÁLISIS DEL pH.</b>	<b>35</b>
	<b>MODELO DE TRANSICIONES Y TRANSMISIÓN DE CALOR; ADAPTACIÓN A LA IMPRESIÓN 3D.</b>	<b>36</b>
	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>37</b>
	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>38</b>





# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. JUSTIFICACIÓN

La industria alimentaria es un pilar fundamental de la economía mundial y su importancia va creciendo año tras año. El volumen de ventas de este sector asciende a unos 900 mil millones de euros (más del 24% del total de la industria) y proporciona empleo a más de 4 millones de trabajadores, siendo el sector principal dentro del conjunto de la industria (FAO, 2012). Dado que la industria alimentaria es un sector tan importante a nivel económico y debido a la enorme competencia que encontramos dentro del mismo, es necesario innovar continuamente y desarrollar nuevas tecnologías y productos para destacar sobre el resto de industrias y así captar la atención del consumidor. La industria alimentaria debe continuar evolucionando para poder satisfacer las necesidades de la humanidad. De la búsqueda de nuevas tecnologías y de los avances de la ciencia surge la idea de la impresión 3D con el objetivo de construir y cocinar estructuras alimentarias complejas y de permitir al consumidor la obtención de un alimento de alta calidad sensorial listo para su consumo, sin la necesidad de entrar en contacto con las materias primas. Esta idea de impresión 3D también puede ser una herramienta muy útil para chefs gourmet, que están desarrollando continuamente nuevas técnicas innovadoras y buscando tecnologías de apoyo que les ayuden a empujar los límites del arte culinario.

Como se explicará posteriormente, la gelatina de colágeno se utiliza ampliamente en la industria alimentaria y tiene numerosas aplicaciones (postres, dulces, panadería, helados, productos cárnicos, productos lácteos, etc). Su versatilidad la convierte en una valiosa herramienta para el desarrollo de nuevos y más atractivos productos. Es por ello que la gelatina de colágeno es una de las materias primas a utilizar en el desarrollo de esta nueva tecnología de impresión en 3D.

Actualmente, existen en el mercado equipos como el Vorwerk Thermomix que realizan parcialmente algunas de las características que este sistema de impresión 3D ofrece y robots de cocina que permiten picar, remover, amasar y cocinar al vapor, facilitando el cocinado de platos elaborados. La gran diferencia de estos equipos con respecto a esta nueva tecnología, es que estos no permiten el diseño de estructuras alimentarias complejas, y no juegan con las distintas transiciones de fase que sufren los alimentos para alcanzar el producto final deseado.

La tecnología de impresión 3D en alimentos será, por tanto, fundamental para la forma de interactuar con la comida en el futuro prestando nuevas capacidades artísticas para el dominio de la cocina y ampliando las capacidades para el sector gastronómico industrial. Esta tecnología permitirá al usuario la obtención de un alimento de alta calidad sensorial, de geometría compleja y listo para su consumo ("ready-to-eat"), todo ello sin entrar en contacto con las materias primas. Para ello, el primer paso será desarrollar los diagramas de transiciones de materias primas y adaptarlos al sistema de extrusión de esta tecnología de impresión 3D; este primer paso es el que se pretende abordar en este trabajo final de grado utilizando como materia prima un gel de colágeno.

## **1.2. PROPIEDADES DEL COLÁGENO**

El uso de geles ha aumentado considerablemente dentro de la industria alimentaria, debido a su empleo en la formulación de alimentos. En los últimos años se han descubierto sustancias nuevas que pueden cumplir funciones útiles en los alimentos, entre las que destacan las gomas y geles debido a su poder gelificante y espesante en alimentos (Velázquez, 2014). La gelatina de colágeno es uno de los biopolímeros comerciales más abundantes y también uno de los más versátiles, con una producción mundial de más de 300.000 toneladas métricas por año. Tiene cientos de aplicaciones diferentes en varias industrias. La industria alimentaria utiliza gelatina ampliamente en la fabricación de postres, dulces, panadería, helados, productos cárnicos, productos lácteos, confitería, así como en productos específicos como mermelada, jalea y productos bajos en grasa. También se usa ampliamente para la modificación de la textura y la vida útil de lácteos espumas, geles, dispersiones y emulsiones (Hemar et al., 2010; Koh et al., 2002). Las características más notables de la gelatina de colágeno son su resistencia en estado de gel, su solubilidad en agua y la capacidad de formar geles termo-reversibles (Bell, 1989). Con el fin de estandarizar la gelatina, la medición de la resistencia del gel se determina usando el denominado ensayo de Bloom, que consiste en realizar un protocolo bien definido a una concentración dada de gelatina (6,67%), temperatura (10 °C) y tiempo de maduración (17 h), permitiendo así expresar la resistencia del gel en el "valor bloom" normalizado (Wainwright, 1977). La resistencia del gel depende en gran medida de las propiedades moleculares de gelatina, especialmente con respecto a dos factores principales: la composición de aminoácidos, que es específico de cada especie, y la distribución del peso molecular, lo que resulta principalmente de las condiciones de procesamiento (Gómez-Guillén, 2011; Turnay et al., 2002).

Su amplio uso se debe a sus propiedades gelificantes debido a su estructura nativa de triple hélice que determina sus funciones específicas. Es el principal agente gelificante utilizado en alimentos. Esto se debe a que la gelatina es capaz de formar geles en un amplio rango de concentraciones (Fonkwe et al, 2003). Los enlaces de hidrógeno intermoleculares hacen que los geles sean térmicamente reversibles. La temperatura de fusión y gelificación de los geles de colágeno está próxima a la temperatura fisiológica de los seres humanos lo que le aporta a la gelatina una agradable sensación de "fusión en boca", una propiedad característica que es difícil de imitar por otros biopolímeros alternativos (Djabourov, 1988). Estas propiedades hacen de la gelatina de colágeno un biopolímero muy importante y ampliamente utilizado en la industria alimentaria. La comprensión del comportamiento y la interacción del colágeno con otros elementos de su vecindad, constituye un factor muy importante a la hora de interpretar los fenómenos estructurales y bioquímicos que ocurren en ciertas etapas de procesamiento en la industria alimentaria.

## **1.3. PROCEDENCIA Y ESTRUCTURA DEL COLÁGENO**

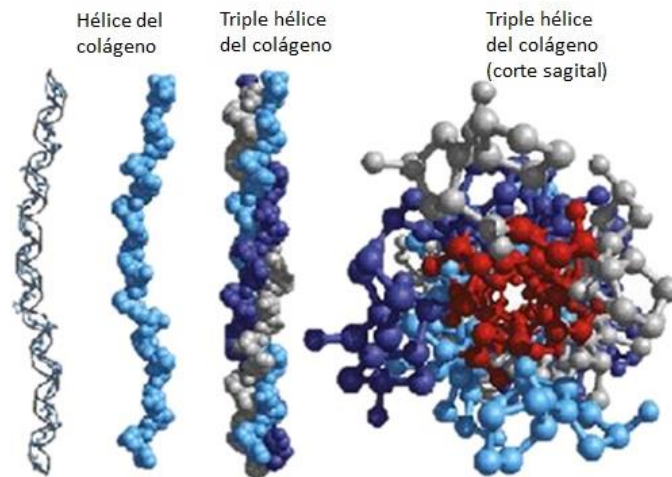
La gelatina de colágeno es un subproducto obtenido del colágeno, por lo que sus propiedades dependen de la fuente y del tipo de colágeno (Hinterwaldner, 1977; Ward and Courts, 1977). El colágeno está especialmente concentrado en los tejidos que soportan el peso del organismo, es decir, los cartílagos y los huesos. También el colágeno se encuentra en diversas partes del organismo que transmiten fuerza, como los tendones. Por otra parte, aparece en abundancia en lugares como la dermis o las fascias. Además, en una de las formas en las que se puede encontrar, constituye un almacén de microfibrillas que sostiene la estructura de todos los órganos y vísceras del organismo (Sánchez and Paúl., 2011). En general, el colágeno aparece como un material altamente ordenado. En lugares como los tendones, las fibras de colágeno se disponen de forma estrictamente paralela. En otros lugares como la dermis, las fibras aparecen entrelazadas en todos los planos del espacio de un modo muy apretado (Sánchez and Paúl., 2011).

Normalmente, la fuente principal de colágeno son los mamíferos. Éste se obtiene de la piel, los huesos y los tendones de bovinos y porcinos. La industria cárnica produce cantidades importantes de colágeno que pueden ser utilizadas en la fabricación de productos alimenticios debido a su capacidad de retención de agua y a la capacidad de formar geles (Correa and López., 2013; Mokrejš et al., 2009). La gelatina procedente de mamíferos tiene la composición de aminoácidos bastante idéntica, así como las propiedades físicas. Sin embargo, se encuentra en todo el reino animal y, por tanto, existen otras fuentes posibles. Los estudios sobre fuentes alternativas y nuevas funcionalidades de colágeno y gelatina ha experimentado un gran auge, en parte debido al creciente interés en la valoración económica de los subproductos industriales (desde la industria de la carne y el pescado), el cuidado del medio ambiente mediante una gestión responsable de residuos industriales, y la búsqueda de las condiciones de procesamiento innovadoras, así como aplicaciones novedosas potenciales (Gómez-Guillén et al., 2011). Debido a esto, hoy en día también se obtiene gelatina a partir de pescado (despojos, pieles, escamas), siendo éste un sustituto en potencia de la gelatina procedente de mamíferos (Pranoto et al., 2007).

El colágeno es una proteína estructural, organizada en redes fibrosas, que refuerza, sostiene y da forma y resistencia a todos los tejidos y órganos. Su estructura (Figura 1.1) está constituida por tres cadenas alfa de polipéptidos con un conjunto de enlaces de hidrógeno entre las cadenas individuales (Rich and Crick, 1955). Estas tres cadenas polipeptídicas de aproximadamente unos 1000 aminoácidos cada una, aparecen entrelazadas formando una triple hélice muy compacta de 300 nm de longitud y 1,5 nm de diámetro. El 30% de los residuos de aminoácidos que constituyen la triple hélice son de glicina y se ubican en posición axial. En cambio, los de hidroxiprolina y de hidroxilisina (25%) se ubican en el exterior. La importancia de los residuos de glicina consiste en que su grupo R, un átomo de hidrógeno, ocupa muy poco espacio y por ello permite que las tres cadenas polipeptídicas se aproximen (López et al, 2008).

La unidad básica estructural del colágeno es el tropocolágeno, constituido por tres cadenas polipeptídicas del mismo tamaño y de composición idéntica o no, según el tipo de colágeno. Las tres cadenas alfa tienen sus extremos alineados y, aunque la forma helicoidal se extiende a lo largo de la mayoría de la molécula, hay regiones en los extremos amino y carboxilo terminales, que implican a unos 15-20 aminoácidos, que no son helicoidales perdiéndose por tanto la estructura de triple hélice. Estas

regiones, conocidas como telopéptidos, son susceptibles de proteólisis, mientras que la triple hélice resiste al ataque de la mayoría de enzimas proteolíticas y en la forma nativa sólo es digerida por colagenasas específicas (de Paz, 2006).



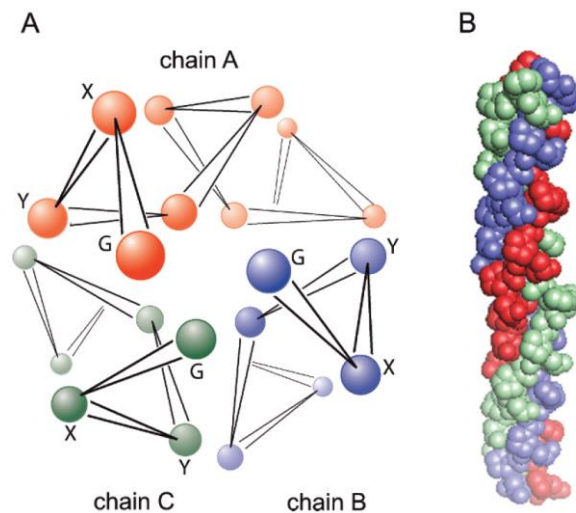
**Figura 1.1.** Estructura del colágeno, adaptado de López et al (2008).

Las cadenas de polipéptidos son muy largas (aproximadamente unos 1000 aminoácidos) y el peso molecular es de más de 100.000 Da. Las hélices de colágeno se disponen en grupos pequeños denominados fibrillas. Cada fibrilla de colágeno se dispone paralelamente y está constituida por miles de moléculas de tropocolágeno. Estas fibras de colágeno tienden a agruparse en conjuntos más grandes llamados haces. Los haces de fibras de colágeno miden habitualmente entre 15 y 30 micras, aunque los hay también más finos y más gruesos. Las fibras de colágeno se estabilizan por enlaces covalentes cruzados (Oakenfull et al., 1997). Durante la producción de gelatina, los enlaces cruzados se rompen. Cuando la gelatina se calienta, la triple hélice es en gran parte desenredada y la gelatina se disuelve (Fonkwe et al., 2003).

Existen, al menos, 29 tipos diferentes de colágeno. Entre los diversos tipos, el más abundante es el colágeno tipo I. Este colágeno se caracteriza porque la triple hélice está constituida por dos cadenas  $\alpha 1$  idénticas y una segunda cadena denominada  $\alpha 2$ , que tiene una secuencia de aminoácidos distinta (Shoulders and Raines, 2009). Sus fibras son las más gruesas de todas. Este tipo de colágeno predomina el hueso, en los cartílagos y en la dermis. Los tipos II, III y IV constan, al contrario que el colágeno de tipo I, de tres cadenas idénticas para cada uno de ellos (López et al., 2008).

Cada una de las tres cadenas alfa que componen el monómero de colágeno (tropocolágeno) tiene una secuencia de aminoácidos, la cual es un triplete que se repite. Esta estructura particular es una secuencia de Gly-X-Y, donde Gly es la

glicina, frecuentemente la posición “X” está ocupada por la prolina, y la posición “Y” por la hidroxiprolina (Asghar and Henrickson, 1982). Lo que caracteriza al colágeno es esa secuencia repetitiva y la gran proporción que tiene de glicina, prolina e hidroxiprolina (Figura 1.2). La estabilidad térmica del colágeno, así como las propiedades físicas de la gelatina dependen del contenido de los aminoácidos prolina e hidroxiprolina, que son cruciales para la estabilización de la estructura de triple hélice, y con la distribución del peso molecular, que se debe principalmente a las condiciones de procesamiento (Gómez-Guillén et al., 2002). El contenido de estos aminoácidos determina la temperatura de transición de la estructura helicoidal y está vinculada a la ruptura de los enlaces de hidrógeno inter e intramoleculares. Sin embargo, aunque la prolina es importante, la hidroxiprolina se cree que juega un papel singular en la estabilización de la hélice de triple del colágeno debido a su capacidad de formar enlaces de hidrógeno a través de su grupo OH (Burjandze, 1979; Ledward, 1986). Por otra parte, también se ha observado que la secuencia total de Gly-X-Y es uno de los factores que afectan a la estabilidad térmica del colágeno (Burjandze, 2000).



**Figura 1.2.** Estructura triple hélice del colágeno (A) Vista a lo largo del eje molecular que muestra las trayectorias de las cadenas polipeptídicas individuales y las ubicaciones de los residuos en el triplete de aminoácidos que se repiten frecuentemente en el colágeno donde G es glicina, normalmente X es prolina e Y hidroxiprolina, (B) Tres cadenas de aminoácidos se enrollan entre ellas formando esta molécula con estructura cuaternaria denominada tropocolágeno.

#### 1.4. ESTRUCTURA DE SISTEMAS COLOIDALES

Los sistemas coloidales son sistemas heterogéneos formados por una o varias sustancias dispersas en un medio dispersante con la existencia de una interfase muy extensa. Es decir, son sistemas de, al menos, dos fases inmiscibles en las que se reparten todos los componentes del sistema. Una de las dos fases se encuentra dividida en pequeñas partículas, generalmente sólidas (fase dispersa o

fase discontinua) a las que rodea completamente la otra sustancia, generalmente líquida (fase dispersante o fase continua).

Los sistemas coloidales se pueden clasificar en función del estado de agregación de la fase continua y de su inmiscibilidad con la fase dispersa, tal y como se puede observar en la tabla 1 (Trados, 2013).

**Tabla 1.1:** Sistemas coloidales adaptada de Trados (2013).

Fase continua	Fase dispersa	Estructura coloidal	Ejemplo
Líquido	Líquido	Emulsión	Leche, mayonesa
	Sólido	Dispersión	Pasta de dientes
	Gas	Dispersión Espuma	Cerveza Espuma de cerveza
Sólido	Líquido	Emulsión sólida Gel	Chocolate Queso, gel de colágeno
	Sólido	Suspensión	Helado
	Gas	Espumas sólidas	Miga de pan, merengue
Gas	Líquido	Aerosol	Nieblas, espray
	Sólido	Aerosol	Humos, polvo

En fases continuas líquidas se puede diferenciar entre, las que tienen la fase dispersa líquida e insoluble, denominada emulsión; normalmente estas fases son grasas o acuosas, un ejemplo alimentario es la mayonesa o la leche; las de fase dispersa sólida, denominada dispersión o suspensión, un ejemplo son las caseínas en la leche; y las que tienen una fase dispersa gaseosa, denominadas espumas, como por ejemplo la espuma de cerveza.

El coloide con fase continua sólida y con una fase dispersa líquida se denomina gel; como ejemplos alimentarios se puede nombrar el queso o el chocolate. Si la fase dispersa es también sólida, ésta debe de ser insoluble, denominándose suspensión, un ejemplo es el helado. Por último, si la fase dispersa es gaseosa el sistema se denomina espuma sólida y un ejemplo es el pan.

El sistema coloidal denominado aerosol es aquel cuya fase continua es gaseosa y cuya fase dispersa es líquida o sólida, siendo una estructura poco importante en los sistemas alimentarios (Dickinson, 1992).

#### 1.4.1 Geles de colágeno

Cuando se enfría una disolución de gelatina de colágeno por debajo de su temperatura de fusión, se forman geles físicos inducidos por un cambio

conformacional de moléculas individuales estiradas que intentan adquirir la estructura de triple hélice presente en el colágeno original. Estas hélices (hebras) interactúan para formar una red espacial, donde las hebras se mantienen unidas por enlaces de hidrógeno y en algunos casos por enlaces químicos (Gomez-Guillen et al, 2011). Cuando el colágeno forma geles, estos son capaces de agrupar agua dentro de su estructura. Son termorreversibles ya que están constituidos por enlaces débiles. Estos geles tienen un comportamiento viscoelástico y un moderado módulo de deformación. Contienen una fase sólida que representa la fase continua del gel (fase proteica), y una fase líquida (fase acuosa) que queda atrapada en la red tridimensional. Desde el punto de vista termodinámico, se puede considerar el estado gel como un estado amorfo, es decir, entre el sólido y el líquido (Aguilera and Stanley 1999).

## 1.5. TEXTURA

Los alimentos viscoelásticos, como estos geles, pueden ser estudiados mediante ensayos de textura. La textura de un producto proporciona información sobre parámetros descriptivos relacionados con sensaciones percibidas en el momento de la ingesta del alimento como: dureza, elasticidad, rigidez, firmeza, fragilidad, resistencia, jugosidad, etc. Se considera, por tanto, a la textura como uno de los parámetros más importantes de calidad en el procesado de alimentos consecuencia de un conjunto de sensaciones percibidas por los sentidos humanos. En la industria alimentaria es muy importante evaluar la textura de un alimento ya que es uno de los factores que más influye en la aceptación del producto por parte del consumidor. Uno de los ensayos de compresión más utilizado en alimentos para caracterizar sus propiedades viscoelásticas es el análisis de perfil de textura, TPA (Texture Profile Analysis). Durante este ensayo, un émbolo comprime dos veces consecutivas la de tres cadenas de aminoácidos muestra, simulando el movimiento de la mandíbula durante la masticación. El análisis de las curvas fuerza-distancia o fuerza-tiempo permite obtener diferentes parámetros texturales muy bien correlacionados con la evaluación sensorial. Además, son útiles para caracterizar estructuras de gel y obtener una visión de las interacciones microestructurales. Estos parámetros son (Duran et al., 2001):

-Fracturabilidad (F) fuerza del primer pico significativo que se obtiene tras la primera compresión.

-Dureza (D) o fuerza necesaria para alcanzar la deformación máxima preseleccionada.

-Cohesividad o relación de áreas originadas en los dos ciclos de compresión, excluyendo la zona bajo las áreas de descompresión de cada ciclo. Se calcularía como el cociente ( $A_2/A_1$ ).

-Adhesividad ( $A_3$ ) o área de fuerza negativa que se obtiene tras la primera compresión y que representa el trabajo necesario para separar el émbolo de compresión del alimento.

-Elasticidad o altura que el alimento tiene cuando se inicia la segunda compresión respecto a la que tenía inicialmente.

-Gomosidad definida por el producto de dureza por cohesividad. Representa la energía requerida para desintegrar un alimento semisólido de modo que esté listo para ser tragado.

-Masticabilidad, definida como el producto de dureza por cohesividad por elasticidad. Representa la energía requerida para masticar un alimento sólido hasta que esté listo para ser tragado.

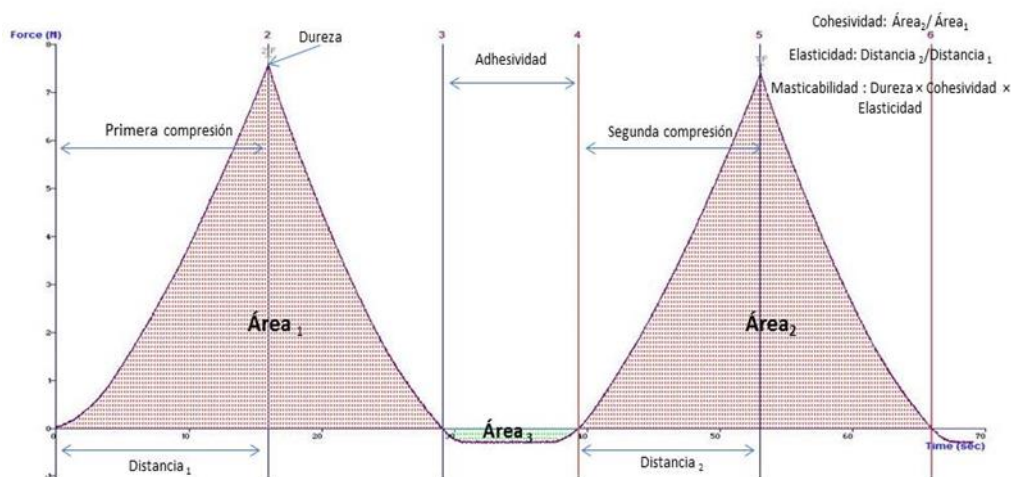


Figura 1.3. Curva típica obtenida tras un ensayo TPA

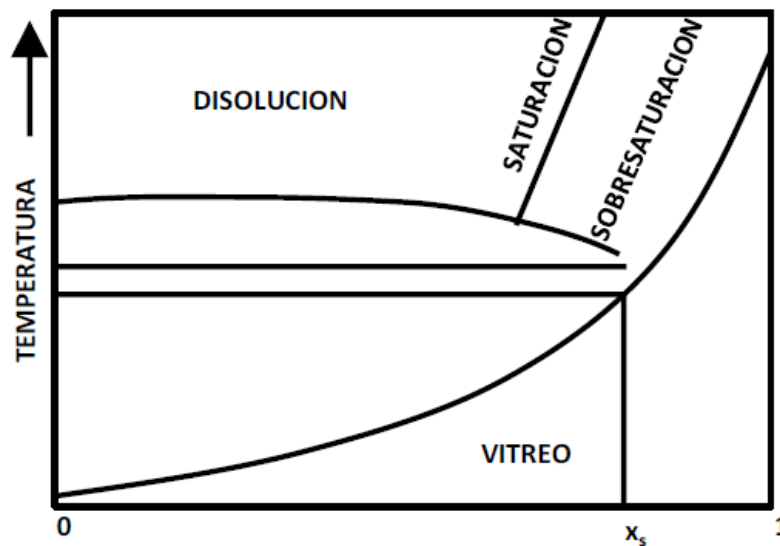
## 1.6. TRANSICIONES DE FASE

Como cualquier proteína, el colágeno es susceptible al calor, lo que puede inducir a colapsar la triple hélice, resultando en la desnaturalización térmica del colágeno y su transformación en gelatina. En consecuencia, el conocimiento de la desnaturalización térmica de colágeno es importante para entender su estabilidad térmica, que es fundamental para los manejos prácticos de este biomaterial (Liu and Li, 2010; Budrugaec and Cucos, 2013). Cuando esta proteína se somete a altas temperaturas, las interacciones no covalentes, tales como enlaces de hidrógeno se rompen y la triple hélice se colapsa, lo que resulta en la transformación de gelatina de colágeno (Flory and Weaver, 1960). Esta desnaturalización que sufre el colágeno es fuertemente dependiente de su contenido en agua. En calorimetría, donde el proceso de desnaturalización aparece como una transición de primer orden, tanto la intensidad como la temperatura cambian con la cantidad de agua absorbida (Luescher et al., 1974).

Es por tanto, necesario, el estudio de las transiciones de fase con el objetivo de obtener el diagrama de los distintos estados de gelificación de colágeno. Las transiciones de fase en los alimentos consisten en cambios conformacionales y conllevan variaciones importantes en las propiedades físicas del sistema, debido a los cambios en la movilidad molecular asociados a la transición. Estos cambios afectan de manera importante a la calidad y estabilidad de los alimentos y pueden ser



determinantes de las condiciones de procesado. Pueden ser de dos tipos, en función de la necesidad o no de variar la energía del sistema para producir una transformación. Los estudios de las transiciones de fase en alimentos son relativamente recientes, pero han demostrado la importancia de su control a la hora de mejorar productos y procesos. El control de varios procesos industriales como la deshidratación o la congelación son ejemplos en los que la aplicación de los conocimientos sobre transiciones de fase en alimentos ha resultado en importantes mejoras tecnológicas como la determinación de la evolución de las propiedades físicas de los alimentos (Roos, 1995). Una herramienta muy útil para caracterizar estas transiciones son los diagramas de fase (Figura 1.4).



**Figura 1.4:** Representación esquemática del diagrama de estado típico de los estados de fase. Adaptado de Martínez-Navarrete et al. (2000).

Las transiciones de fase en alimentos pueden clasificarse como transiciones de primer y segundo orden. Cuando ocurre una transición de fase de primer orden se produce un cambio estructural inducido por la variación de las variables de estado pero con la necesidad asociada de variar la energía del sistema. Ejemplos de transiciones de primer orden son las que se incluyen entre los estados fundamentales (sólido, líquido y gas). Esto es, la transición de sólido a líquido comprende los fenómenos de fusión y cristalización, la transición de líquido a gas incluye los fenómenos de evaporación y condensación y, por último, el cambio de estado sólido a gas es la sublimación (Roos, 1995). También se incluyen en este apartado algunas transiciones como la gelatinización del almidón y la desnaturalización de proteínas, que suponen cambios conformacionales de los biopolímeros.

Cuando ocurre una transición de primer orden a una determinada temperatura (T) o presión (P), se da una discontinuidad en la primera derivada, respecto a P o T, de la función energía libre (G). Esta derivada se corresponde, respectivamente, con la entropía (S) y el volumen (V) del sistema (ec. 1.1 y 1.2). Coherentemente con el

carácter isoterma de la transición, se da también un cambio neto en la entalpía del sistema (calor latente) (ec. 1.3).

$$\left(\frac{dG}{dT}\right)_P = -S \quad (\text{ecuación 1.1})$$

$$\left(\frac{dG}{dP}\right)_T = V \quad (\text{ecuación 1.2})$$

$$\Delta S = \frac{\Delta H_f}{T} \quad (\text{ecuación 1.3})$$

Las transiciones de fase de segundo orden, incluyen todos los cambios conformacionales inducidos por variaciones en las variables de estado que no requieren cambios en la energía interna del sistema. Estas transformaciones suelen ser cinéticas, por lo que la naturaleza de la transformación podrá variar en función de la velocidad a la que se produzca la misma. Son aquellas en las que la primera derivada de G no presenta discontinuidad en la transición, pero si la presenta la segunda derivada de G, respecto de T, P o TP. Estas derivadas están relacionadas respectivamente con la capacidad calorífica (C), la compresibilidad isotérmica ( $\beta$ ) y con el coeficiente de expansión térmica ( $\alpha$ ) del sistema (ec 1.4 a 1.6). Por consiguiente, estas transiciones no comportan cambios en el calor latente ni cambios netos en el volumen del sistema, pero conllevan una discontinuidad en los valores de C,  $\beta$  y  $\alpha$ .

$$\left(\frac{d^2G}{dT^2}\right)_P = -\frac{C_p}{T} \quad (\text{ecuación 1.4})$$

$$\left(\frac{d^2G}{dPdT}\right)_{TP} = V\alpha \quad (\text{ecuación 1.5})$$

$$\left(\frac{d^2G}{dP^2}\right)_T = -V\beta \quad (\text{ecuación 1.6})$$

Un ejemplo de este tipo de transición en alimentos es el cambio de estado de vítreo a gomoso, denominada como transición vítrea (Martínez-Navarrete et al., 2000). Esta transición no lleva al sistema a un estado de verdadero equilibrio termodinámico en las condiciones de P y T determinadas.

Las principales transiciones de fase que se producen en sistemas proteicos son la desnaturalización y la transición vítrea. La desnaturalización de proteínas se define como un proceso por el cual la ordenación espacial originaria de las cadenas de polipéptidos cambia hacia niveles de mayor desorden, pudiendo ser un proceso reversible o irreversible. Como se apunta anteriormente, la desnaturalización es una transición de primer orden y esta tiene lugar principalmente cuando existen cambios de temperatura y siempre en presencia de una cantidad importante de agua. La temperatura a la que se produce es característica de cada proteína, desnaturalizándose la mayoría a temperaturas entre 50 y 80°C. Además depende del

pH, la fuerza iónica y la velocidad de calentamiento, así como el procesado al que ha sido sometido el producto. Por otra parte, la transición vítrea ocurre normalmente en la fase líquida y tiene una gran influencia en la estabilidad del producto. Por debajo de esta temperatura de transición vítrea, todo el sistema queda en un estado vítreo (Roos, 1995).

Una de las herramientas más empleadas para estudiar las transiciones de fase es la calorimetría diferencial de barrido (DSC). Ha demostrado ser una de las mejores técnicas para estudiar la desnaturalización del colágeno, ya que ésta es consecuencia de una apreciable cantidad de energía absorbida en forma de calor (Vyazovkin, et al, 2007). La calorimetría diferencial de barrido consiste en proporcionar un flujo de calor, a velocidad constante, a la muestra y a un material de referencia conocido que no sufre cambios en el intervalo de temperaturas en el que se van a hacer las determinaciones. La transmisión de calor ha de ser instantánea, por lo que se trabaja con muestras muy pequeñas (entre 10 y 20 mg). Estas muestras se colocan en crisoles que se cierran herméticamente con el objetivo de que no se produzcan cambios de humedad. Esto es muy importante ya que como ya se ha explicado anteriormente la cantidad de agua tiene una gran influencia sobre la temperatura a la cual se produce la transición. Lo que se registra es la diferencia en el flujo de calor que hay que suministrar a la muestra y a la referencia para mantener la misma temperatura en ambas. Las transiciones de primer orden producen picos y las de segundo orden saltos. La integración de los picos, corregida teniendo en cuenta la velocidad de calentamiento y la cantidad de muestra analizada, proporciona información valiosa sobre la desnaturalización. Por ello es ampliamente utilizado para estudiar la desnaturalización del colágeno en fibras o soluciones.

## **1.7. IMPRESIÓN 3D**

La impresión de alimentos tridimensionales (3D), también conocido como Food Layered Manufacture (Wegrzyn et al., 2012) se trata de un proceso de construcción automatizada controlada digitalmente que puede acumular capa por capa de productos alimenticios 3D (Huang et al., 2013). Por depositar capas de cocción de los ingredientes y debido a las mezclas, se ha comenzado una auténtica revolución en la cocina. Gracias a esta tecnología, la comida puede ser diseñada y preparada controlando la cantidad de material a imprimir en 3D.

El proceso de impresión actual de alimentos comienza con el diseño de un modelo virtual en 3D. El software traduce este modelo en capas individuales una tras otra y finalmente genera códigos en la máquina para su impresión. Después de cargar los códigos en una impresora y elegir una receta de comida, la impresión de los alimentos tiene lugar.

La tecnología de impresión 3D en alimentos será fundamental para la forma de interactuar con la comida en el futuro. Además, este mercado se está desarrollando rápidamente ya que tiene un enorme potencial.



## **2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO**

### **2.1. OBJETIVOS**

El objetivo principal del presente trabajo es desarrollar los diagramas de transiciones del gel de colágeno y adaptarlos al sistema de deposición de la impresión 3D.

Para conseguir este objetivo principal, es necesario llevar a cabo los siguientes objetivos particulares:

- Obtener las cinéticas de gelificación del colágeno (curvas de enfriamiento).
- Obtener el diagrama de los distintos estados de gelificación del colágeno.
- Caracterizar las propiedades viscoelásticas de los distintos estados de gelificación del colágeno.

### **2.2. PLAN DE TRABAJO**

- Revisión bibliográfica de las diferentes transiciones de fase del gel-colágeno, de sus propiedades texturales y de sus características.
- Análisis de los cambios estructurales que sufren los distintos estados de gelificación del colágeno durante el calentamiento y el enfriamiento.
- Obtención del diagrama de fase de los diferentes estados de gelificación del colágeno mediante técnicas como la calorimetría diferencial de barrido asociados a cambios conductimétricos con termocuplas tipo K y conductímetros conectados a un sistema de adquisición de datos Agilent 34972A.
- Caracterización de las propiedades viscoelásticas de los distintos estados de gelificación del colágeno mediante ensayos de textura.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. MATERIA PRIMA**

Para realizar éste trabajo, se utilizó gelatina 100% de origen porcino (Tradissimo®), de 240° BLOOM.

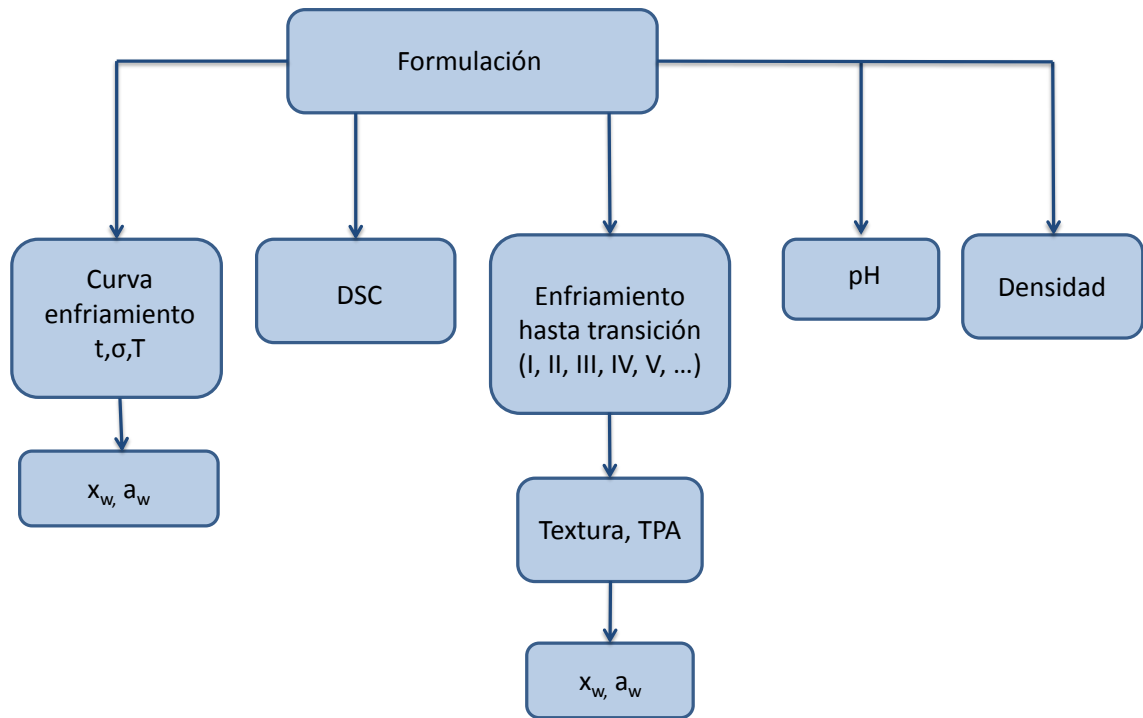
Para la preparación de las formulaciones se utilizó agua bidestilada.

#### **3.2. PLAN DE TRABAJO**

Los geles de colágeno fueron formulados con seis concentraciones diferentes de proteína.

La preparación que se llevó a cabo fue la siguiente: en primer lugar se pesó en una balanza analítica AB304-S METTLER TOLEDO la cantidad de colágeno necesario en función de las seis razones másicas ( $kg_p/kg_w$ ) que se utilizaron (0,04, 0,09, 0,13, 0,22, 0,32, 0,42). Por otra parte se calentó agua bidestilada hasta los 100°C. Posteriormente, en un vaso de precipitados, se pusieron la cantidad de agua y gel requeridos y se agitó con ayuda de un agitador magnético, hasta que el colágeno estuviese completamente disuelto. Con ayuda de una placa calefactora se facilitó la disolución del colágeno y se consiguió también mantener la formulación a una temperatura elevada (entre 85 °C).

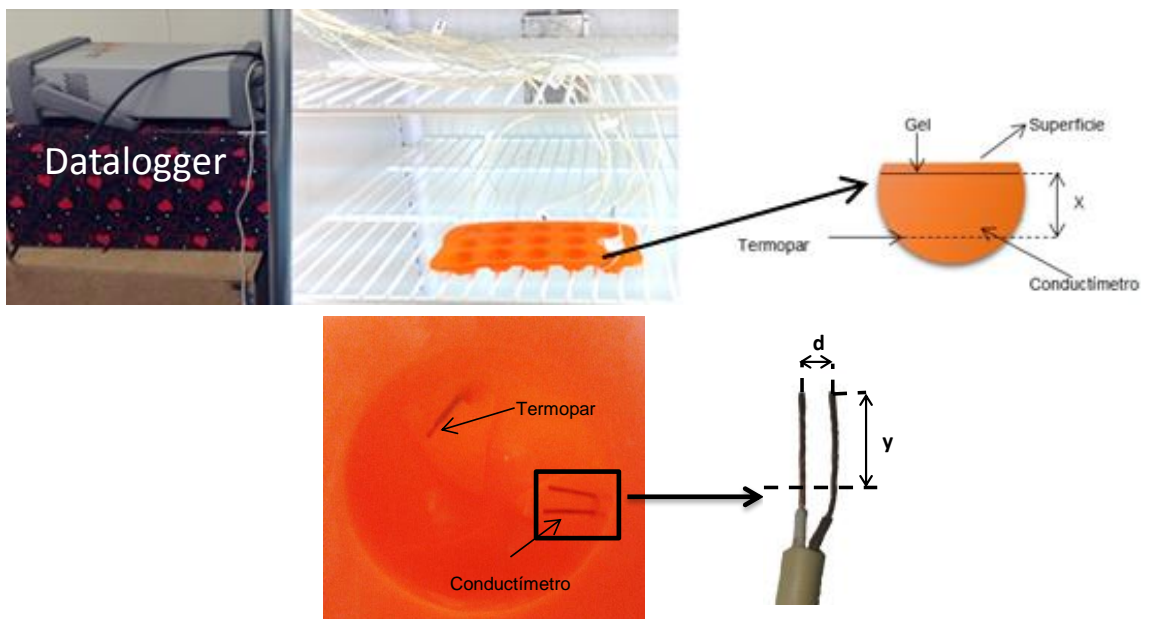
Para cada una de las concentraciones se realizaron las siguientes determinaciones (Figura 3.1). En primer lugar se colocó gel de colágeno en una cubitera de silicona en la que se acoplaron las termocuplas y los conductímetros para obtener la curva de enfriamiento. Tras la obtención de las curvas de enfriamiento, de cada gel se obtenía la humedad y la actividad de agua. Además se determinaron las transiciones térmicas del gel de colágeno mediante calorimetría diferencial de barrido. Paralelamente se vertió gel de colágeno en cubiteras y se fue midiendo la temperatura con un termopar con el objetivo de realizar el ensayo de doble compresión (TPA) a diferentes temperaturas y así caracterizar las propiedades viscoelásticas de cada estado de gelificación de las diferentes concentraciones de colágeno. A cada una de las muestras a las que se les realizaba el análisis de doble compresión se les medía la humedad y la actividad de agua.



**Figura 3.1.** Plan de trabajo

### 3.3. ENSAYO DE CURVA DE ENFRIAMIENTO.

Esta técnica se basó en las medidas asociadas a cambios conductimétricos, con termocuplas tipo K y un equipo de medida de resistividad eléctrica conectados a un sistema de adquisición de datos Agilent 34972A con el que se midió la conductividad eléctrica a 40 Hz y  $\pm 1V$  y la temperatura durante la gelificación del colágeno, que iba desde una temperatura de  $80^{\circ}$  a unos  $4^{\circ}C$ . Se prepararon las diferentes formulaciones de colágeno y se introdujeron en una cubitera de silicona en la que se acoplaron las termocuplas y el equipo de medida de resistividad (Figura 3.2).



**Figura 3.2.** Montaje para el ensayo de curva de enfriamiento

La conductividad eléctrica se calculó a partir de la resistividad mediante la ecuación:

$$\sigma = \frac{d}{R \cdot A} \quad (\text{Ecuación 3.1})$$

donde:

$\sigma$ : conductividad (S/m)

d: distancia entre puntas (m)

R: Resistencia al paso de corriente en  $\Omega$

A: Área de la muestra en  $m^2$  ( $2 \cdot \pi \cdot r \cdot y$ ), siendo r (1 mm)

### 3.4. CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO

La transición térmica del colágeno se determinó por calorimetría diferencial de barrido (DSC) utilizando el equipo Mettler Toledo DSC 1 (Mettler Toledo, Spain). Una vez formadas las disoluciones, se pesaron, con una balanza de precisión en crisoles de aluminio, entre 10 y 20 mg de muestra de cada una de las formulaciones y se sellaron herméticamente en caliente. Se utilizó como referencia un crisol vacío. A cada muestra se le aplicó dos barridos de temperatura diferentes. En primer lugar, se realizó un barrido de enfriamiento desde 60 a 4 °C y a continuación, se realizó un barrido de calentamiento de 4 a 90 °C, ambos a una velocidad de 3 °C/min.

El calor específico (J/g K) se calculó a partir de la siguiente ecuación:

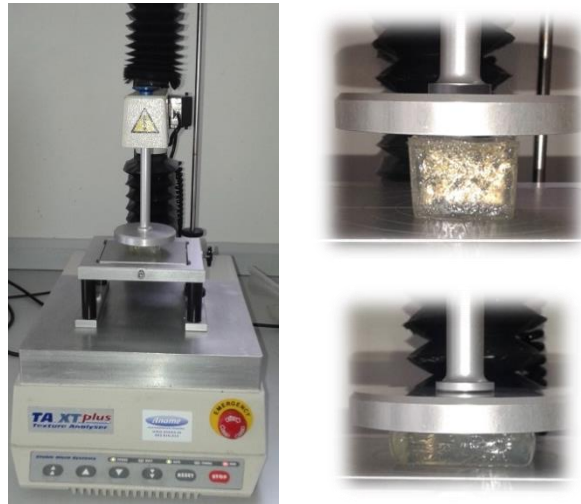
$$C_p = \frac{q}{m \cdot v} \quad (\text{ecuación 3.2})$$

Siendo q el calor aplicado (mW), m la masa de la muestra (mg) y v la velocidad de enfriamiento (K/s).

### 3.5. ANÁLISIS DEL PERFIL DE TEXTURA (TPA)

Se realizaron medidas de textura para caracterizar las propiedades viscoelásticas de los distintos estados de gelificación del colágeno utilizando el analizador de textura TA.XT Plus Texture Analyzer (Figura 3.3) equipado con el software Texture exponent 32. El ensayo seleccionado fue el test de doble compresión (TDC o TPA de "Texture Profile Analysis") en el que un émbolo comprime dos veces la muestra para simular el movimiento de la mandíbula durante la masticación.





**Figura 3.3.** La figura de la izquierda muestra el analizador de textura TA.XT Plus Texture Analyzer. A la derecha, se muestran dos figuras de los geles utilizados para realizar el análisis de perfil de textura. La primera, muestra el gel unos segundos antes de la compresión y, la segunda, muestra el gel durante la realización del ensayo.

Tras la formación de las diferentes disoluciones de colágeno, se vertieron cada una de ellas en cubiteras y se esperó a que se formase el gel. Se fue midiendo la temperatura con un termopar con el objetivo de realizar el ensayo de compresión a diferentes temperaturas y así caracterizar las propiedades viscoelásticas de cada estado de gelificación de las diferentes concentraciones de colágeno. Tras la obtención del gel, éstos se desmoldaron de la cubitera y se procedió a realizar las medidas. Para la realización del ensayo se empleó una plataforma de compresión de 75 mm de diámetro. Las muestras se comprimieron un 30% de su altura inicial a una velocidad de compresión de 0,5 mm/s. La pausa entre la primera y la segunda compresión fue de 5 segundos. Se realizaron 4 repeticiones de cada formulación de colágeno. A partir de las curvas fuerza-tiempo se obtuvieron los siguientes parámetros texturales: dureza, cohesividad, adhesividad, elasticidad y masticabilidad.

### 3.6. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL AGUA

La actividad del agua ( $a_w$ ) se determinó usando un higrómetro de punto de rocío (Figura 3.4), Decagón de la marca Aqualab®, modelo serie 3 TE a 25°C (Decagon Devices, Inc., Washington, E.E.U.U.). La precisión del equipo es de  $\pm 0.003$ . En primer lugar se procedió a la calibración del equipo para lo cual, a la hora de comprobar que esta fuese correcta, se emplearon disoluciones de referencia proporcionadas por la casa Aqualab®. A continuación, se sacaron los geles guardados en nevera en recipientes herméticamente cerrados y, además, sellados con parafilm y se esperó a que estos se atemperasen para proceder a la realización de las medidas. Se considera que los valores de la actividad de agua que se obtuvieron, corresponden a la actividad de agua superficial, ya que las medidas se realizaron sin desestructurar las muestras.



**Figura 3.4.** La figura de la izquierda muestra el equipo utilizado para la medición de la  $a_w$ . A la derecha se observa uno de los geles utilizados para la realización de las medidas.

### 3.7. DETERMINACIÓN DE LA HUMEDAD

Para determinar la humedad se empleó el método AOAC 935.46 (1997). Este método consiste en pesar aproximadamente 2 g de muestra y en el secado de la misma hasta peso constante en estufa a 100°C (Figura 3.5), con un vacío parcial de 25 mmHg. La fracción másica de agua ( $x_w$ ) se obtuvo a partir de la siguiente ecuación:

$$x_w = \frac{M_{p+mh} - M_{p+ms}}{M_{p+mh} - M_p} \quad (\text{Ecuación 3.3})$$

Dónde:

- $M_p$  = masa del recipiente de vidrio (g).
- $M_{p+mh}$  = masa del recipiente de vidrio y la muestra húmeda (g).
- $M_{p+ms}$  = masa del recipiente de vidrio y la muestra seca (g).



**Figura 3.5.** Estufa a vacío utilizada para las medidas de humedad

### **3.8. DETERMINACIÓN DEL pH**

La medida del pH de las muestras se realizó mediante un pH-metro Mettler Toledo, que posee un electrodo combinado compuesto de un electrodo de vidrio para el  $H^+$  y un electrodo de referencia portátil (Figura 3.6).



**Figura 3.6.** pH-metro Mettler Toledo

### **3.9. DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD**

En primer lugar, se realizaron las medidas de masa utilizando una balanza analítica de precisión de la marca Mettler Toledo, modelo AB304-S.

Las medidas de volumen se realizaron, mediante una técnica de análisis de imagen (Figura 3.7), usando el software Adobe Photoshop CS5 (Adobe Systems Inc., San José, CA, EEUU) con el que se obtuvieron las alturas laterales y centrales de la gelatina de colágeno dentro del bote. Además, se situó una cuadrícula de papel milimetrado al lado de las muestras para transformar la altura a milímetros.



**Figura 3.7.** Montaje para la determinación de volumen

Con el objetivo de determinar el volumen de las muestras, se utilizó la expresión matemática de volumen para un cilindro (ecuación 3.4).

Finalmente, del cociente entre la masa y el volumen se obtuvo la densidad (ecuación 3.5).

$$V = \pi * r^2 * h \quad \text{(ecuación 3.4)}$$

$$\rho = \frac{m}{V} \quad \text{(ecuación 3.5)}$$

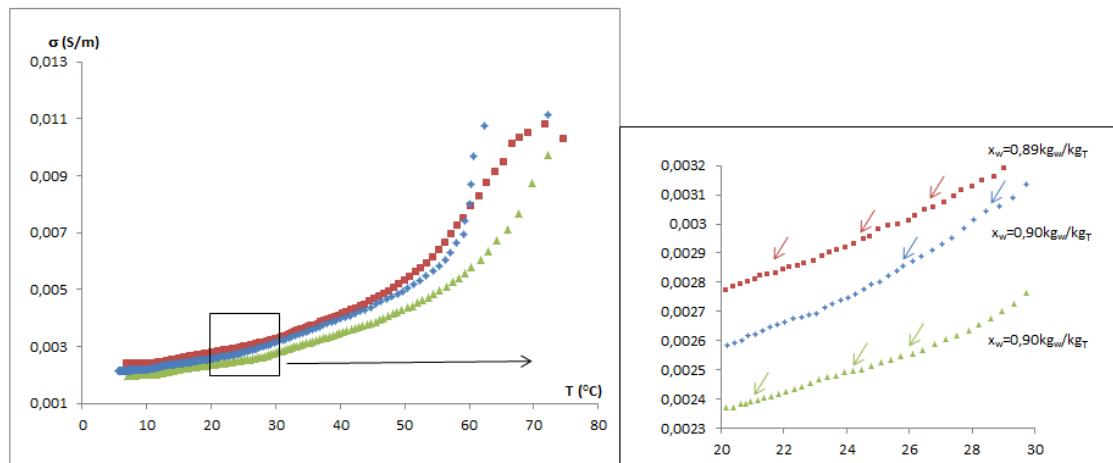
## 4. RESULTADOS

### 4.1. CURVAS DE ENFRIAMIENTO, OBTENCIÓN DE TRANSICIONES DE FASE.

Los geles proteicos muestran múltiples estados de agregación asociados al orden estructural del mismo. Los distintos niveles estructurales dependen de las variables de estado del sistema y de la velocidad de transformación de las mismas. En este trabajo se plantea la determinación de las transiciones del gel de colágeno así como la caracterización de cada una de ellas mediante la combinación de distintas propiedades termodinámicas.

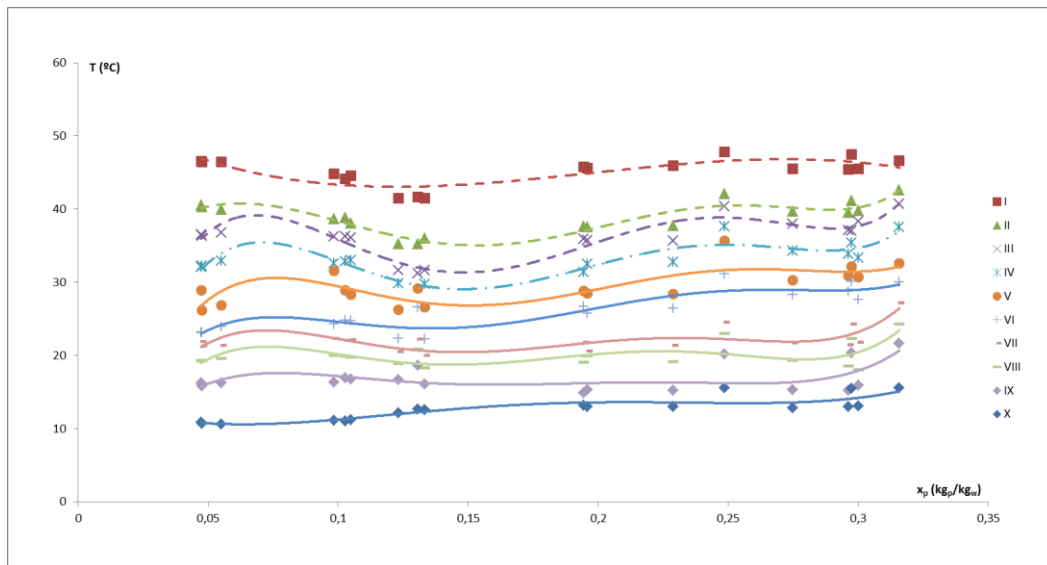
En primer lugar se ha diseñado un montaje para poder determinar la curva de enfriamiento y la variación de la conductividad eléctrica de cada una de las formulaciones descritas en el apartado Materiales y Métodos (0,04, 0,09, 0,13, 0,22, 0,32, 0,42  $\text{kg}_P/\text{kg}_W$ ).

La figura 4.1 muestra la evolución de la conductividad eléctrica a 40 Hz en función de la temperatura durante el proceso de enfriamiento realizado (de 80 °C a 4 °C) para la razón másica de proteína de 0,09  $\text{kg}_P/\text{kg}_W$  a modo de ejemplo. La evolución de la conductividad eléctrica en función de la temperatura para el resto de formulaciones se muestra en el anexo 7.1. En cada figura se muestran tres curvas ya que se realizaron tres repeticiones de la técnica para cada formulación. Además, se muestra un detalle de la curva en la que se puede apreciar que a distintas temperaturas se producen distintas transiciones (cada transición está marcada por flechas). Los cambios de ordenación de las proteínas (fase continua) provocan cambios en la conductividad eléctrica en un medio conductor como es el colágeno (Steinhardt and Reynolds, 1969).



**Figura 4.1.** Curva de enfriamiento obtenida para la formulación 0,09  $\text{kg}_P/\text{kg}_W$ .

Las curvas de enfriamiento son el primer paso para poder realizar el diagrama de estado del gel colágeno. Las transiciones que se han observado en la variación de la conductividad eléctrica con respecto a la temperatura se pueden observar en la figura 4.2.



**Figura 4.2.** Primer paso de desarrollo del diagrama de transición de fases de la gelificación de colágeno.

La difusividad térmica es un parámetro que surge del desarrollo de la segunda ecuación de Fourier, a partir de la descomposición de la energía interna, y que engloba a las propiedades físicas, conductividad térmica, densidad y calor específico tal y como se muestra en la ecuación 4.1. Dicho parámetro facilita la parametrización de los procesos térmicos.

$$\alpha = \frac{k}{\rho \cdot C_p} \quad (\text{Ecuación 4.1})$$

donde:  $k$  es la conductividad térmica (W/m K)

$C_p$  es el calor específico (kJ/kg K)

$\rho$  es la densidad (kg/m<sup>3</sup>)

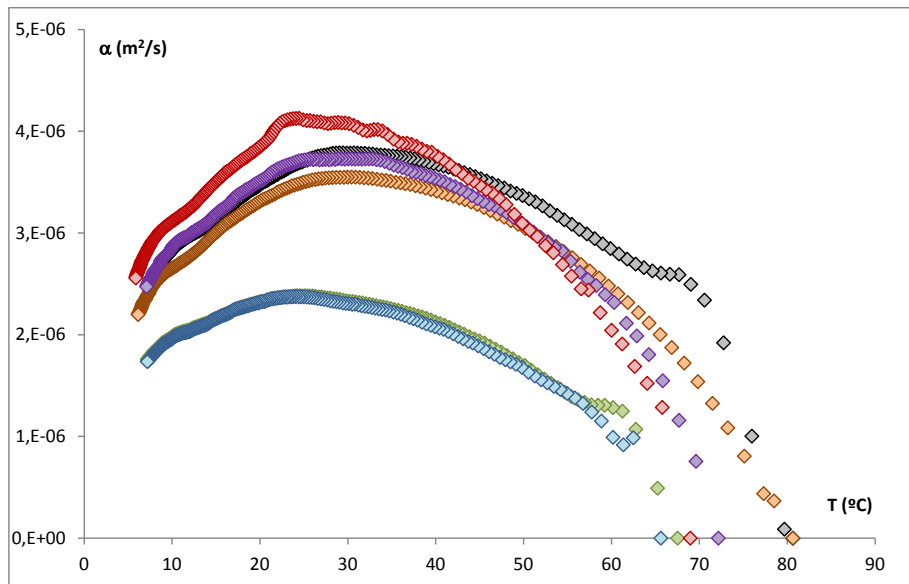
Para el cálculo de la difusividad térmica se ha utilizado el montaje mostrado en el apartado de Materiales y Métodos, figura 3.2. En dicha figura se puede observar que la muestra presentaba todas las caras aisladas salvo la superior, por lo que se ha considerado el transporte únicamente por esta cara, siendo la geometría una lámina infinita con un espesor igual al fondo del receptáculo y una distancia ( $x$ ) al termopar descrita en el esquema. El desarrollo del modelo de Fourier elegido ha sido la simplificación de Crank (1975) para geometrías planas con convergencia rápida (ecuación 4.2). Se ha considerado que no existe resistencia externa a la transmisión de calor.

$$1 - \left( \frac{T_{\text{ext}} - T_t}{T_{\text{ext}} - T_0} \right) = 2 \left( \frac{\alpha t}{\pi x^2} \right)^{1/2} \quad (\text{Ecuación 4.2})$$

Siendo:  $T$  la temperatura (°C),  $\alpha$  la difusividad térmica (m<sup>2</sup>/s),  $t$  el tiempo (s),  $x$  la distancia desde la superficie de la muestra al termopar (m), y los subíndices “ext” se

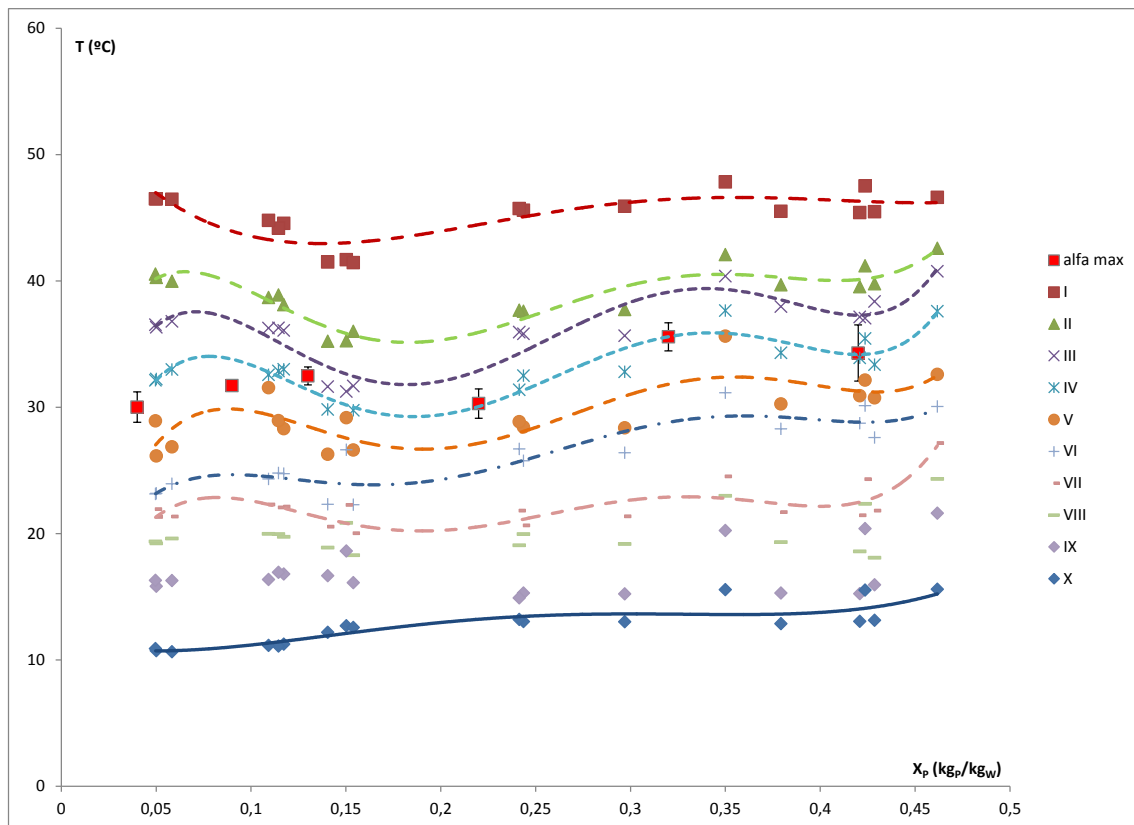
refiere al ambiente, “t” es cada tiempo al que se midió la temperatura y “0” es el tiempo inicial.

En la figura 4.3 se muestra la variación de la difusividad térmica en función de la temperatura, durante el proceso de enfriamiento, para cada una de las razones másicas estudiadas. La figura 4.3 muestra el promedio de la difusividad térmica, los tres triplicados realizados se muestran en el Anexo 7.2.



**Figura 4.3.** Variación de la difusividad térmica en función de la temperatura, donde:  $\blacklozenge$  0,04 kg<sub>P</sub>/kg<sub>w</sub>,  $\blacklozenge$  0,09 kg<sub>P</sub>/kg<sub>w</sub>,  $\blacklozenge$  0,13 kg<sub>P</sub>/kg<sub>w</sub>,  $\blacklozenge$  0,22 kg<sub>P</sub>/kg<sub>w</sub>,  $\blacklozenge$  0,32 kg<sub>P</sub>/kg<sub>w</sub>,  $\blacklozenge$  0,42 kg<sub>P</sub>/kg<sub>w</sub>.

Como se puede ver en la figura 4.3, la difusividad térmica aumenta en el proceso de enfriamiento hasta alcanzar un máximo a partir del cual disminuye, dicho máximo cambia el comportamiento del sistema frente a la acumulación de energía térmica, indicando un cambio conformacional de la estructura, pudiendo significar este valor el paso de líquido a sólido. Si se toma el valor de la temperatura del gel a la difusividad máxima de cada una de las formulaciones y se integra en el diagrama de transiciones de fase (figura 4.2.) se obtiene la figura 4.4, donde es posible observar como coincide totalmente con la transición marcada como IV, transición que mostraba un cambio brusco en la conductividad eléctrica del apartado anterior. La naturaleza de esta transición es difícil describirla a partir de la difusividad térmica, ya que como se ha explicado anteriormente es un parámetro de ajuste de Fourier que engloba tres propiedades físicas, por esta razón se hace necesario desglosar la difusividad en dichas propiedades para poder entender la naturaleza de esta transición.

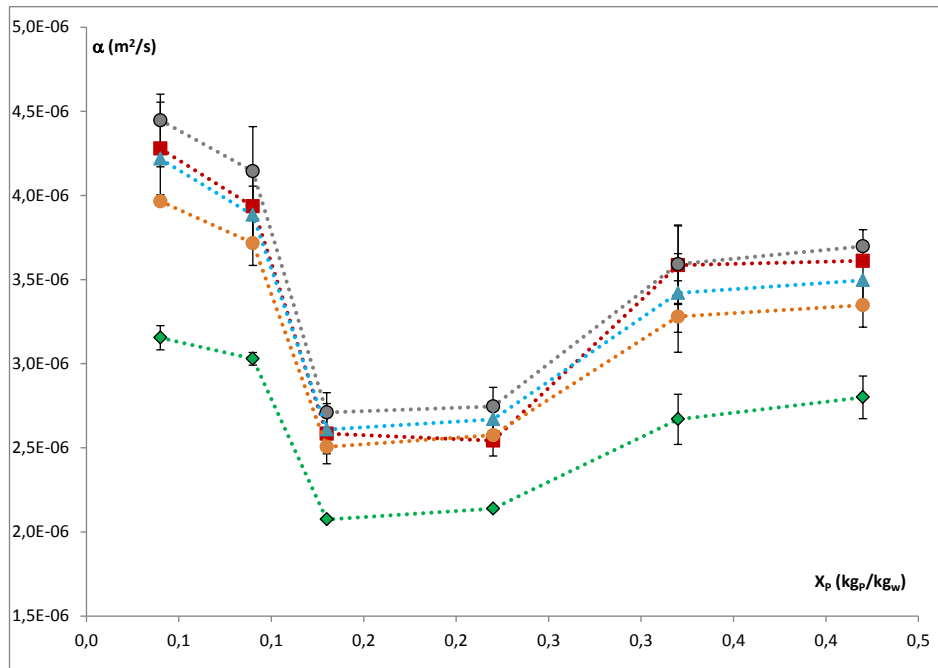


**Figura 4.4.** Segundo paso de desarrollo del diagrama de transición de fases de la gelificación de colágeno.

En la figura 4.5. se muestra la evolución de la difusividad térmica en función del contenido de proteína a distintas temperaturas. Como se puede observar en esta figura, las formulaciones acumulan mejor el calor con poco contenido o mucho contenido de proteínas, acumulando peor energía con contenidos intermedios de proteína. Al igual que en el caso de la transición descrita anteriormente, es necesario desglosar la difusividad térmica en las propiedades físicas que lo componen para poder entender correctamente el comportamiento de la misma.

Con el fin de explicar el sentido físico del comportamiento de la difusividad térmica, en el siguiente apartado, y mediante la utilización de la calorimetría diferencial de barrido y medida de la densidad, se obtiene las propiedades físicas que la componen.



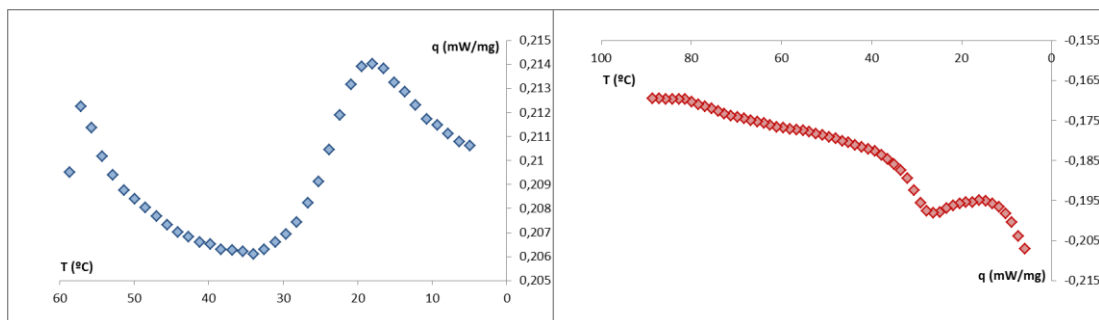


**Figura 4.5.** Variación de la difusividad térmica durante la formación del gel en función de la razón másica de proteína, donde:  $\blacklozenge$  12 °C,  $\bullet$  21°C,  $\blacktriangle$  24°C,  $\bullet$  30°C,  $\blacksquare$  42°C.

#### 4.2. OBTENCIÓN DE TRANSICIONES A PARTIR DE CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO; OBTENCIÓN DE PROPIEDADES TÉRMICAS.

Como se ha comentado en la introducción, una de las herramientas más empleadas para estudiar las transiciones de fase del colágeno es la calorimetría diferencial de barrido. En este trabajo de investigación se prepararon las distintas formulaciones de agua y colágeno calentando la disolución hasta 80°C. Tras esta preparación de la muestra se realizó un barrido de enfriamiento de 60 a 4 °C y a continuación, se realizó un barrido de calentamiento de 4 a 90 °C, ambos a una velocidad de 3°C/min.

La figura 4.6 muestra los termogramas de enfriamiento (color azul) y calentamiento (color rojo) para la formulación de colágeno de 0,09 kg<sub>P</sub>/kg<sub>w</sub> tras los dos barridos de temperatura realizados. En cada figura se puede observar que la transición que sufre el colágeno es una transición termorreversible ya que está constituido por enlaces débiles. El resto de formulaciones se muestran graficadas en el anexo 7.3.



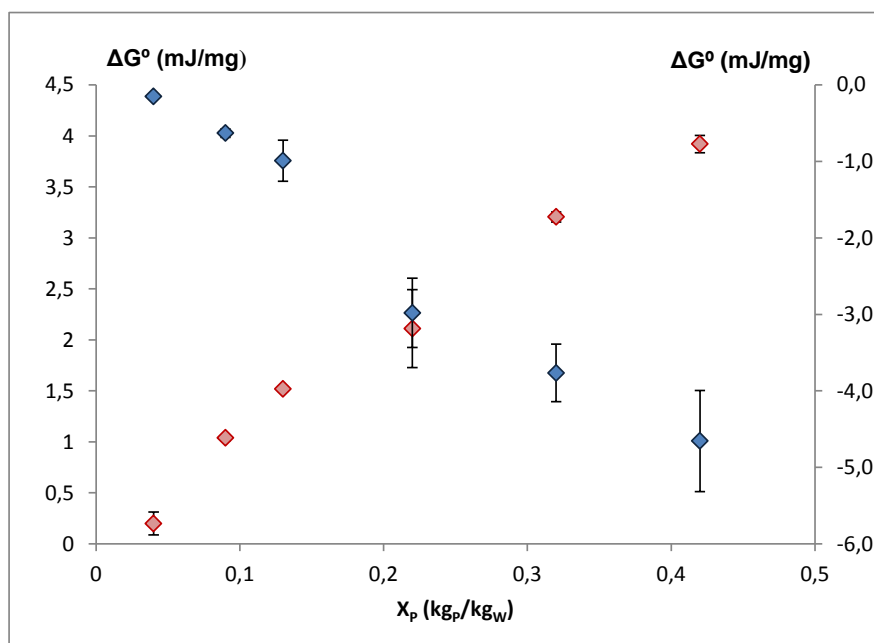
**Figura 4.6.** Curvas de enfriamiento y calentamiento para la formulación 0,09 kg<sub>P</sub>/kg<sub>w</sub>.

En la figura 4.6. Izquierda, se muestra el proceso de enfriamiento con un descenso del calor disipado hasta que a partir de aproximadamente 34°C el calor comienza a aumentar mostrando un proceso de transformación de la estructura del colágeno.

**Tabla 4.1.** Datos obtenidos de la calorimetría de enfriamiento (TRANS. 1) y calentamiento (TRANS. 2), donde se muestra la energía de cambio de estado ( $\Delta G^0$ ) y el punto donde empieza ( $T_1$ ) y acaba la transición ( $T_2$ ) para cada una de las formulaciones.

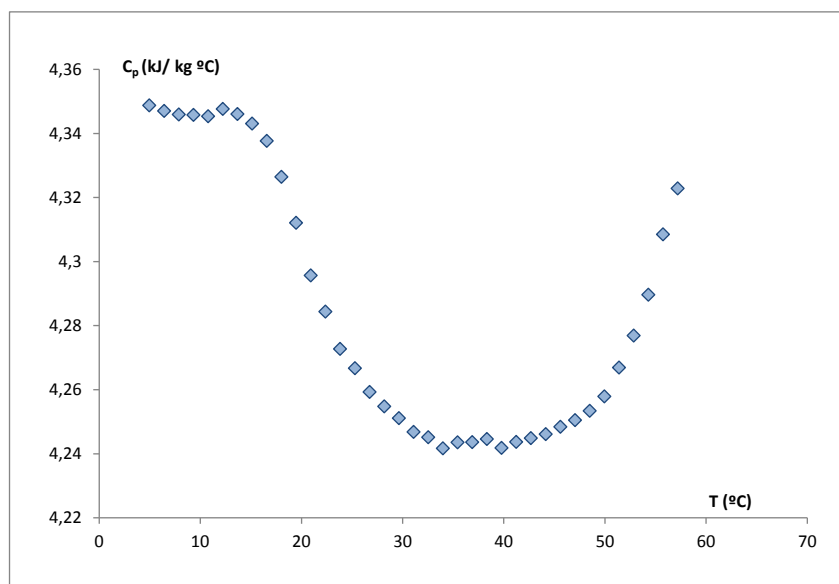
$X_p$ (P/W)	$T_1$ (°C)		$T_2$ (°C)		$\Delta G^0$ (mJ/mg)	
	TRANS. 1	TRANS. 2	TRANS. 1	TRANS. 2	TRANS. 1	TRANS. 2
0,04	22,1 ± 0,4	23,19 ± 0,14	10,9 ± 0,13	31,73 ± 0,16	0,2 ± 0,113	-0,150 ± 0,014
0,09	25,7 ± 0,6	25 ± 3	14 ± 6	32,5 ± 0,3	1,04 ± 0,03	-0,63 ± 0,06
0,13	26,6 ± 0,4	24 ± 4	9,7 ± 1,7	35 ± 4	1,52 ± 0,03	-1,0 ± 0,3
0,22	28,3 ± 0,3	18,8 ± 0,7	16 ± 7	34,3 ± 0,3	2,1 ± 0,4	-3,0 ± 0,5
0,32	29,5 ± 0,5	18,9 ± 0,6	10,5 ± 0,5	35,0 ± 0,2	3,21 ± 0,05	-3,8 ± 0,4
0,42	30,59 ± 0,18	18,62 ± 0,15	10,9 ± 0,2	35,3 ± 0,8	3,92 ± 0,08	-4,7 ± 0,7

En la tabla 4.1 se observan los valores obtenidos de los ensayos de calorimetría, tanto de enfriamiento como de calentamiento, donde aparece una transición única en cada uno de los barridos. Para explicar correctamente los datos que calorimetría se muestra en la figura 4.7 la evolución de la energía de cambio de estado de cada uno de los barridos frente a la concentración proteica. En esta figura se observa como las transiciones son función del contenido en proteína del gel, siendo la transformación líquido-sólido (gel) la predominante, capaz de enmascarar el resto de transiciones de segundo orden.



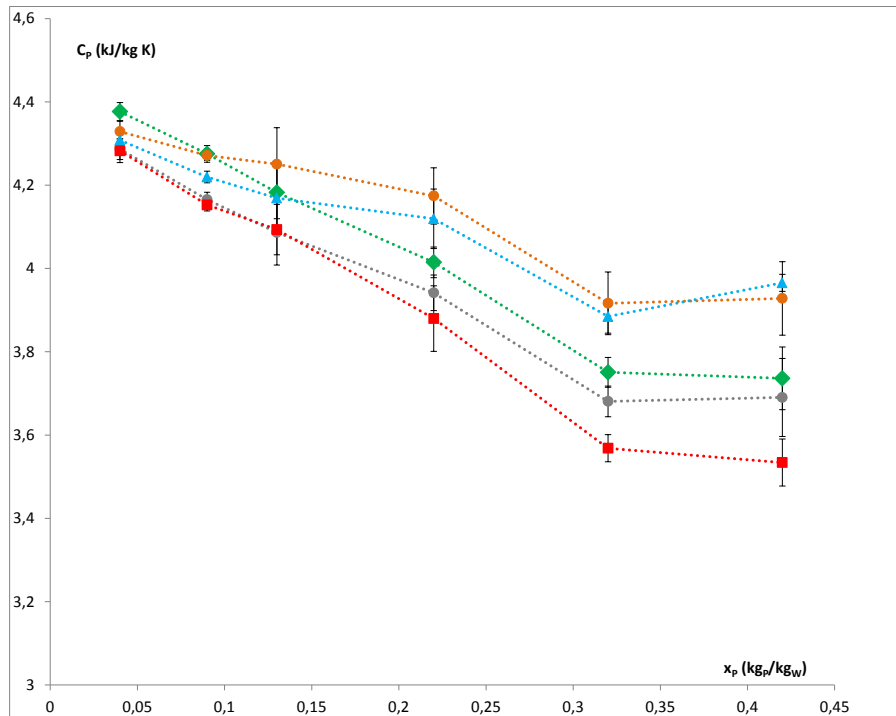
**Figura 4.7.** Variación de la energía de cambio de estado respecto a la formulación del gel de colágeno, donde: ◆ TRANS. 1 (eje principal) y ◆ TRANS. 2 (eje secundario)

La figura 4.8 muestra la variación del calor específico con la temperatura de la formulación de colágeno de 0,04 kg<sub>p</sub>/kg<sub>w</sub> tras el barrido de enfriamiento. El resto de graficas que muestran la variación del calor específico con la temperatura para cada una de las formulaciones se muestran en el anexo 7.4.



**Figura 4.8.** Variación del calor específico con la temperatura para la formulación 0,04 kg<sub>p</sub>/kg<sub>w</sub>.

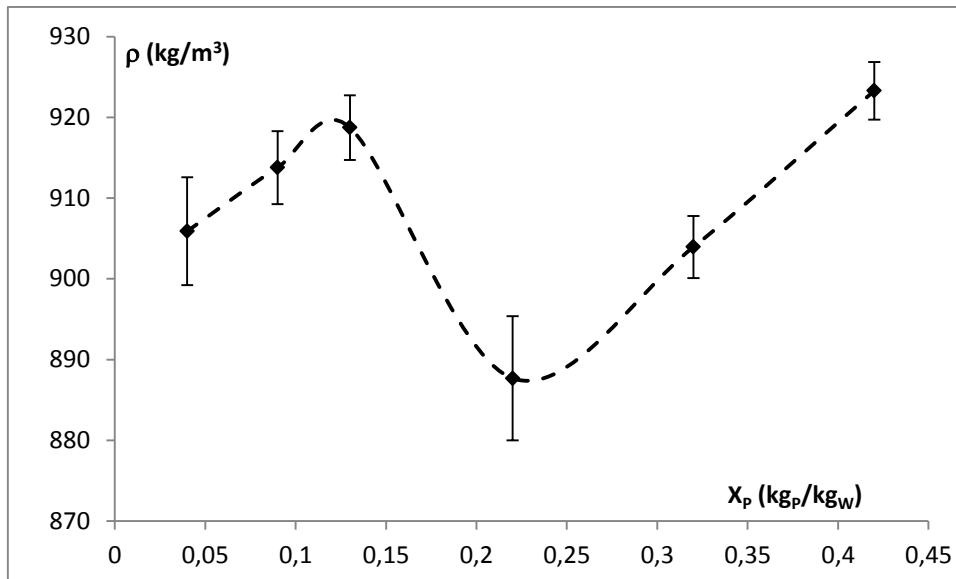
En la figura 4.9 se muestra la variación del calor específico respecto al contenido de proteína de los geles a distintas temperaturas dentro del rango de transiciones expuesto anteriormente. En esta figura se observa como los calores específicos más bajos, y por ende con menor energía por variación de temperatura, son los geles a temperaturas altas (42 a 30 °C, estando 30°C en la transición mostrada por la difusividad térmica) mientras que los más altos se encuentran a temperaturas intermedias (de 21 a 24 °C), encontrándose las temperaturas más bajas, es decir los geles más estables a valores intermedios. El comportamiento del calor específico es diferente al que sigue la difusividad térmica, así que no es posible describir el comportamiento de la difusividad térmica con la evolución de la capacidad calorífica del medio.



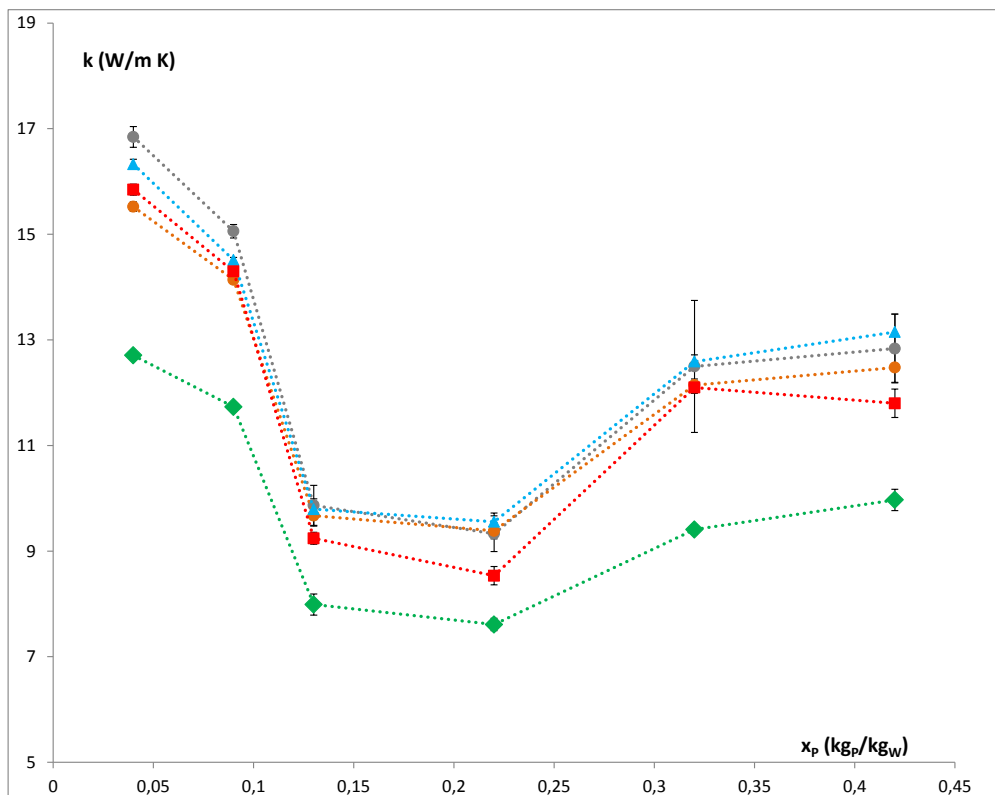
**Figura 4.9.** Variación del calor específico durante la formación del gel en función de la razón másica de proteína, donde: ◆ 12 °C, ● 21°C, ▲ 24°C, ● 30°C, ■ 42°C.

En la figura 4.10 se muestra la variación de la densidad media de colágeno a temperaturas comprendidas entre 18 y 4 °C a intervalos de 2°C, donde se observa un comportamiento dispar entre las distintas formulaciones, siendo la más baja la correspondiente al 22% de proteína respecto al agua.

A partir del valor de la difusividad (figura 4.5) del calor específico (figura 4.9) y de la densidad (figura 4.10) es posible calcular la conductividad térmica siguiendo la ecuación 4.1. En la figura 4.11 se muestra la variación de la conductividad térmica respecto a la formulación de los geles a distintas temperaturas correspondientes con transiciones de fases.



**Figura 4.10.** Variación de la densidad media del colágeno en estado sólido gel, en función de la razón másica de proteína.



**Figura 4.11.** Variación de la conductividad térmica durante la formación del gel en función de la razón másica de proteína, donde:  $\blacklozenge$  12 °C,  $\bullet$  21°C,  $\blacktriangle$  24°C,  $\bullet$  30°C,  $\blacksquare$  42°C.

La conductividad térmica muestra valores más bajos a concentraciones intermedias, de 13 y 22% de proteína y valores más altos a concentraciones bajas y altas. Al mismo tiempo, la menor conductividad se produce en la transición final del gel a 12 °C

(temperatura de transición X o última transición) , mientras que el comportamiento a temperaturas superiores es desigual siendo mayor a 30°C (transición L-G o IV) y 24°C (transición VI) y menores a 21 (transición VII) y 42°C (Líquido no newtoniano).

### 4.3. PROPIEDADES MECÁNICAS

Se ha realizado un análisis de textura TPA, descrito en Materiales y Métodos. Las tablas 4.2 a 4.7 muestran los valores de los distintos parámetros obtenidos en el ensayo de textura para cada una de las formulaciones ensayadas y en función de los distintos estados del gel descritos en la figura 4.2.

Durante todo el proceso de gelificación se observó que la transición IV, tal y como mostraba la variación de difusividad térmica representaba el cambio de líquido a gel. Sin embargo, dicha formación no pudo ser medida mediante ensayo TPA debido a que las propiedades reológicas del medio no permitía el desmoldado de las muestras.

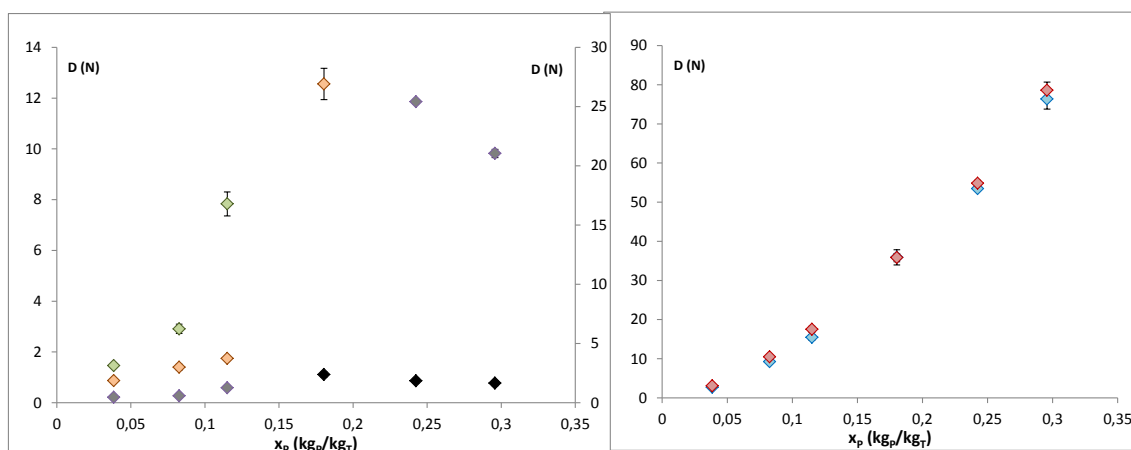
Como se observa en las tablas las repeticiones de TPA mostraron una elevada repetitividad que condujo desviaciones bajas.

Debido a que el objetivo primordial de este trabajo es la adaptación de las transiciones del colágeno a la impresión 3D, se han elegido 3 parámetros para caracterizar el comportamiento del mismo durante el proceso de deposición y enfriamiento. El primer parámetro elegido ha sido la dureza por la necesidad de una baja dureza durante el proceso de deposición pero una elevada dureza para el producto terminado. El segundo parámetro estudiado ha sido la adhesividad ya que el proceso de impresión 3D requiere la deposición por capas que requiere de una cierta capacidad del gel para fusionarse hasta conseguir la geometría deseada. Por último se ha seleccionado la elasticidad por diversos motivos; primero por la necesidad de un medio elástico en deposición y en segundo lugar por la necesidad de cierta elasticidad en el medio depositado cuando la impresión 3D requiere de la combinación de diversos materiales.

Para analizar más fácilmente estos parámetros se han representado respecto a la concentración de proteína. La figura 4.12 muestra la variación del parámetro dureza para cada uno de los geles estudiados en distintas transiciones. Se puede observar que transición IX-X y la transición X-G es el gel que presenta mayor dureza, aumentando la misma con la cantidad de colágeno. Además se puede observar que los otros estados de gel colágeno presentan fuerzas muy inferiores,

**Tabla 4.2.** Parámetro de textura Dureza (N) con respecto a la fracción másica de proteína para cada una de las transiciones descritas en la figura 4.2, donde "L" se refiere a estado Líquido, "G" se refiere a estado sólido Gel.

$x_p$ (kg <sub>p</sub> /kg <sub>T</sub> )	0,038	0,083	0,115	0,180	0,242	0,296
<b>0-I</b>	L	L	L	L	L	L
<b>I-II</b>	L	L	L	L	L	L
<b>II-III</b>	L	L	L	L	L	L
<b>III-IV</b>	L	L	L	L	L	L
<b>IV-V</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>G</b>
<b>V-VI</b>				1,11 ± 0,13	0,86 ± 0,07	0,77 ± 0,10
<b>VI-VII</b>	0,46 ± 0,04	0,59 ± 0,04	1,27 ± 0,17		25,41 ± 0,16	21,0 ± 0,3
<b>VII-VIII</b>	0,87 ± 0,04	1,40 ± 0,11	1,74 ± 0,05	12,6 ± 0,6		
<b>VIII-IX</b>	1,46 ± 0,05	2,91 ± 0,18	7,8 ± 0,5			
<b>IX-X</b>	2,73 ± 0,05	9,25 ± 0,20	15,4 ± 0,7	35,90 ± 1,96	53,5 ± 0,3	76,4 ± 2,6
<b>X-G</b>	3,1 ± 0,2	10,5 ± 0,2	17,5 ± 0,8	35,85 ± 1,06	54,8 ± 0,8	78,60 ± 2,10

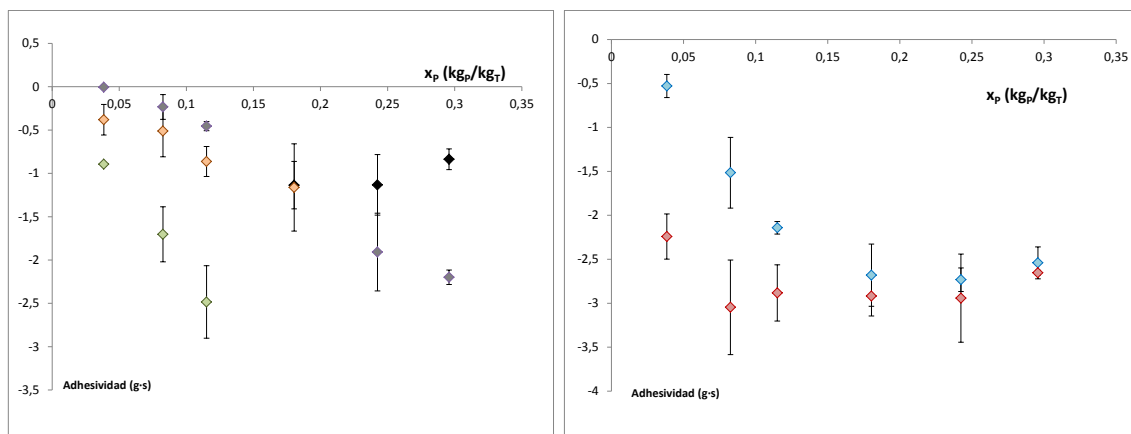


**Figura 4.12.** Parámetro de textura Dureza (N) con respecto a las distintas formulaciones ensayadas, donde: ♦ transición V-VI, ♦ transición VI-VII (eje secundario), ♦ transición VII-VIII, ♦ transición VIII-IX, ♦ transición IX-X, ♦ transición X-G.

En la figura 4.13 se muestra la variación de la adhesividad respecto a la concentración del gel, observándose una elevada adhesividad para las últimas transiciones en refrigeración (VIII-IX, IX-X y X-G), siendo creciente en los geles VIII-IX y IX-X respecto a la proporción de proteína, y constante en el estado X-G. La adhesividad es un parámetro fundamental en la deposición 3D por lo que estos tres estados del gel se hacen idóneos para la misma.

**Tabla 4.3.** Parámetro de textura Adhesividad (g-s) con respecto a la fracción másica de proteína para cada una de las transiciones descritas en la figura 4.2, donde “L” se refiere a estado Líquido, “G” se refiere a estado sólido Gel.

$x_p$ (kg <sub>p</sub> /kg <sub>T</sub> )	0,038	0,083	0,115	0,180	0,242	0,296
<b>0-I</b>	L	L	L	L	L	L
<b>I-II</b>	L	L	L	L	L	L
<b>II-III</b>	L	L	L	L	L	L
<b>III-IV</b>	L	L	L	L	L	L
<b>IV-V</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>G</b>
<b>V-VI</b>				-1,1 ± 0,3	-1,1 ± 0,3	-0,84 ± 0,12
<b>VI-VII</b>	-0,005 ± 0,005	-0,23 ± 0,14	-0,46 ± 0,05		-1,9 ± 0,4	-2,20 ± 0,08
<b>VII-VIII</b>	-0,38 ± 0,18	-0,5 ± 0,3	-0,86 ± 0,17	-1,2 ± 0,5		
<b>VIII-IX</b>	-0,89 ± 0,02	-1,7 ± 0,3	-2,5 ± 0,4			
<b>IX-X</b>	-0,53 ± 0,13	-1,5 ± 0,4	-2,14 ± 0,07	-2,7 ± 0,4	-2,73 ± 0,13	-2,54 ± 0,18
<b>X-G</b>	-2,2 ± 0,3	-3,0 ± 0,5	-2,9 ± 0,3	-2,9 ± 0,2	-2,9 ± 0,5	-2,65 ± 0,03



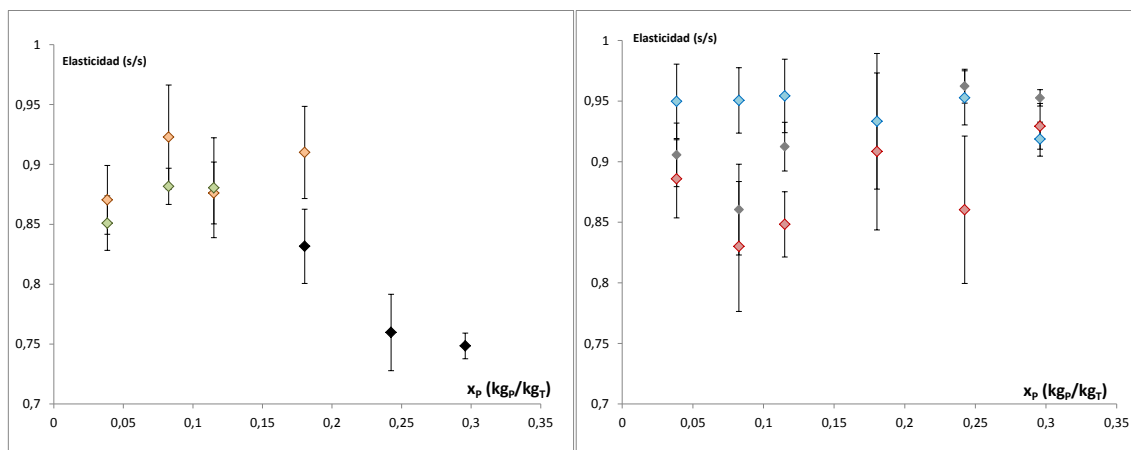
**Figura 4.13.** Parámetro de textura Adhesividad (g-s) con respecto a las distintas formulaciones ensayadas, donde: ♦ transición V-VI, ◆ transición VI-VII, ◆ transición VII-VIII, ◆ transición VIII-IX, ◆ transición IX-X, ◆ transición X-G.

En la figura 4.14 se muestra la variación de la elasticidad respecto a la concentración del gel, observándose la mayor elasticidad en el estado IX-X, sin embargo el estado X-G sufre una fuerte disminución que confiere una rigidez al gel que lo hace poco apto para la deposición pero óptimo para el estado final del producto impreso.

**Tabla 4.4.** Parámetro de textura Elasticidad (s/s) con respecto a la fracción másica de proteína para cada una de las transiciones descritas en la figura 4.2, donde “L” se refiere a estado Líquido, “G” se refiere a estado sólido Gel.

$x_p$ (kg <sub>p</sub> /kg <sub>T</sub> )	0,038	0,083	0,115	0,180	0,242	0,296
<b>0-I</b>	L	L	L	L	L	L
<b>I-II</b>	L	L	L	L	L	L
<b>II-III</b>	L	L	L	L	L	L
<b>III-IV</b>	L	L	L	L	L	L
<b>IV-V</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>G</b>
<b>V-VI</b>				0,83 ± 0,03	0,760 ± 0,03	0,748 ± 0,011
<b>VI-VII</b>	0,91 ± 0,03	0,86 ± 0,04	0,91 ± 0,02		0,962 ± 0,014	0,953 ± 0,007
<b>VII-VIII</b>	0,87 ± 0,03	0,92 ± 0,04	0,88 ± 0,03	0,91 ± 0,04		
<b>VIII-IX</b>	0,85 ± 0,02	0,882 ± 0,015	0,88 ± 0,04			
<b>IX-X</b>	0,95 ± 0,03	0,95 ± 0,03	0,95 ± 0,03	0,93 ± 0,06	0,95 ± 0,02	0,919 ± 0,014
<b>X-G</b>	0,89 ± 0,03	0,83 ± 0,05	0,85 ± 0,03	0,91 ± 0,06	0,86 ± 0,06	0,929 ± 0,019





**Figura 4.14.** Parámetro de textura Elasticidad (s/s) con respecto a las distintas formulaciones ensayadas, donde: ♦ transición V-VI, ◆ transición VI-VII, ◆ transición VII-VIII, ◆ transición VIII-IX, ◆ transición IX-X, ◆ transición X-G.

**Tabla 4.5.** Parámetro de textura Masticabilidad (N) con respecto a la fracción másica de proteína para cada una de las transiciones descritas en la figura 4.2, donde “L” se refiere a estado Líquido, “G” se refiere a estado sólido Gel.

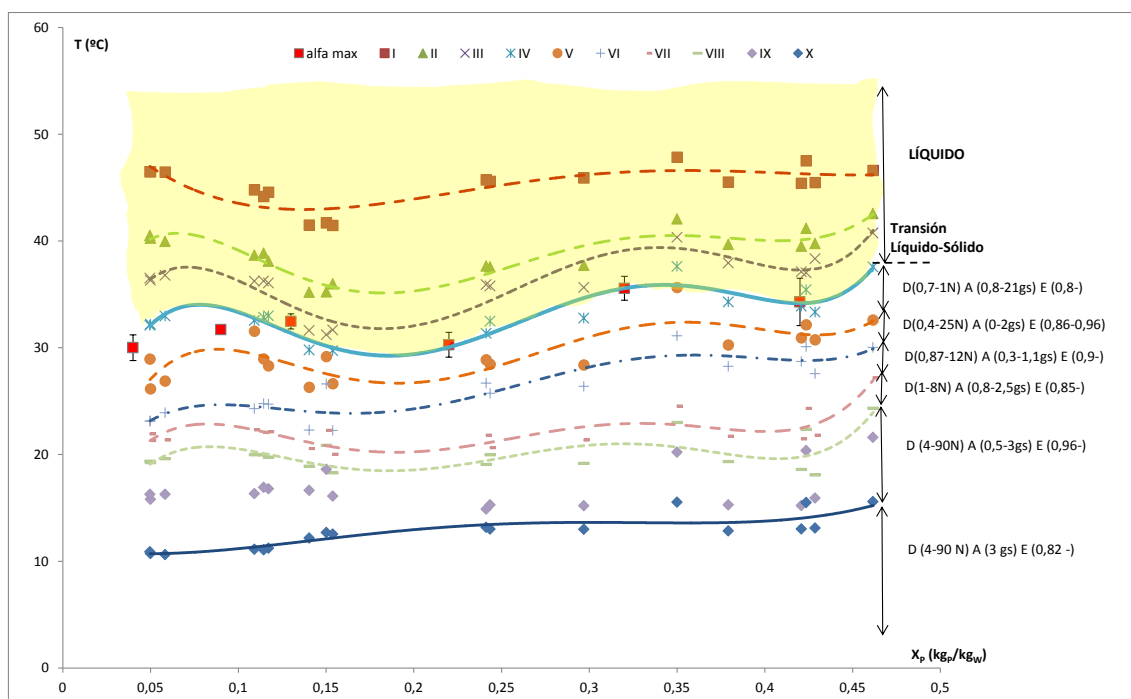
$x_p$ (kg <sub>p</sub> /kg <sub>T</sub> )	0,038	0,083	0,115	0,180	0,242	0,296
<b>0-I</b>	L	L	L	L	L	L
<b>I-II</b>	L	L	L	L	L	L
<b>II-III</b>	L	L	L	L	L	L
<b>III-IV</b>	L	L	L	L	L	L
<b>IV-V</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>G</b>
<b>V-VI</b>				0,83 ± 0,13	0,60 ± 0,05	0,48 ± 0,05
<b>VI-VII</b>	0,37 ± 0,02	0,464 ± 0,018	1,08 ± 0,16		23,2 ± 0,5	19,2 ± 0,5
<b>VII-VIII</b>	0,87 ± 0,03	1,21 ± 0,14	1,42 ± 0,10	10,61 ± 0,10		
<b>VIII-IX</b>	1,14 ± 0,04	2,44 ± 0,18	6,5 ± 0,8			
<b>IX-X</b>	2,37 ± 0,12	8,6 ± 0,4	14,0 ± 0,9	31,1 ± 1,2	46,9 ± 1,3	64,6 ± 1,3
<b>X-G</b>	2,5 ± 0,2	8,0 ± 0,7	13,8 ± 0,9	30 ± 3	43 ± 3	67 ± 3

**Tabla 4.6.** Parámetro de textura Cohesividad (adimensional) con respecto a la fracción másica de proteína para cada una de las transiciones descritas en la figura 4.2, donde “L” se refiere a estado Líquido, “G” se refiere a estado sólido Gel.

$x_p$ (kg <sub>p</sub> /kg <sub>T</sub> )	0,038	0,083	0,115	0,180	0,242	0,296
<b>0-I</b>	L	L	L	L	L	L
<b>I-II</b>	L	L	L	L	L	L
<b>II-III</b>	L	L	L	L	L	L
<b>III-IV</b>	L	L	L	L	L	L
<b>IV-V</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>G</b>
<b>V-VI</b>				0,897 ± 0,007	0,91 ± 0,03	0,8389 ± 0,0197
<b>VI-VII</b>	0,882 ± 0,019	0,919 ± 0,006	0,930 ± 0,006		0,949 ± 0,011	0,957 ± 0,006
<b>VII-VIII</b>	0,871 ± 0,018	0,938 ± 0,007	0,930 ± 0,013	0,930 ± 0,017		
<b>VIII-IX</b>	0,92 ± 0,02	0,948 ± 0,006	0,941 ± 0,013			
<b>IX-X</b>	0,91 ± 0,03	0,973 ± 0,004	0,951 ± 0,013	0,9305 ± 0,0094	0,921 ± 0,003	0,921 ± 0,005
<b>X-G</b>	0,924 ± 0,007	0,924 ± 0,015	0,926 ± 0,011	0,9227 ± 0,0091	0,904 ± 0,011	0,919 ± 0,005

**Tabla 4.7.** Parámetro de textura Resistencia (Adimensional) con respecto a la fracción másica de proteína para cada una de las transiciones descritas en la figura 4.2, donde “L” se refiere a estado Líquido, “G” se refiere a estado sólido Gel.

$x_p$ (kg <sub>p</sub> /kg <sub>T</sub> )	0,038	0,083	0,115	0,180	0,242	0,296
0-I	L	L	L	L	L	L
I-II	L	L	L	L	L	L
II-III	L	L	L	L	L	L
III-IV	L	L	L	L	L	L
IV-V	G	G	G	G	G	G
V-VI				0,73 ± 0,03	0,566 ± 0,019	0,482 ± 0,018
VI-VII	0,81 ± 0,04	0,82 ± 0,02	0,824 ± 0,018		0,867 ± 0,015	0,853 ± 0,004
VII-VIII	0,78 ± 0,04	0,883 ± 0,004	0,875 ± 0,013	0,84 ± 0,03		
VIII-IX	0,81 ± 0,05	0,868 ± 0,011	0,869 ± 0,015			
IX-X	0,818 ± 0,015	0,891 ± 0,007	0,886 ± 0,016	0,873 ± 0,018	0,863 ± 0,011	0,8430 ± 0,0093
X-G	0,83 ± 0,03	0,85 ± 0,04	0,859 ± 0,013	0,848 ± 0,010	0,84 ± 0,03	0,866 ± 0,013

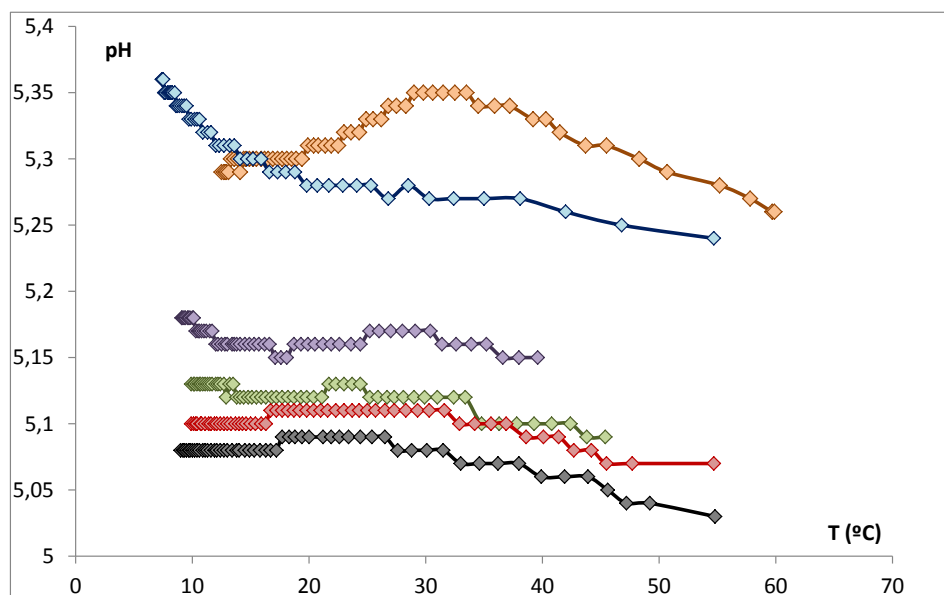


**Figura 4.15.** Tercer paso de desarrollo del diagrama de transición de fases de la gelificación de colágeno. Donde D representa la dureza, E la elasticidad y A la adhesividad.

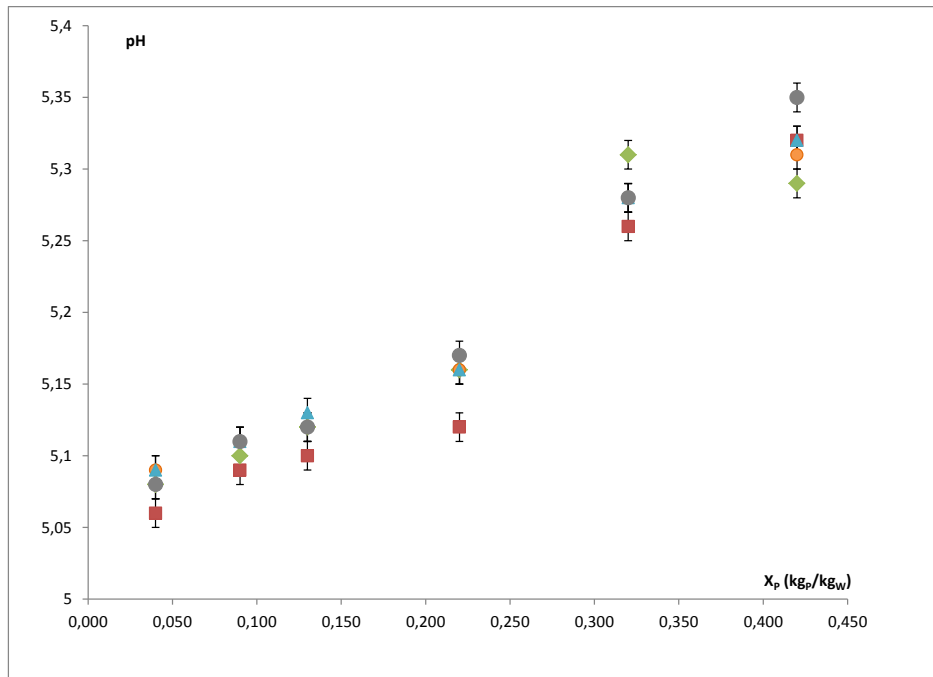
En la figura 4.15 se muestra el diagrama de transición de fases del gel de colágeno con las propiedades mecánicas más importantes para caracterizar la deposición del gel en una impresión 3D. La deposición debe de tener baja dureza, alta adhesividad y dependiendo de la combinación de materiales en impresión más o menos elasticidad. Sin embargo, el elemento final impreso debe de mantener una elevada dureza.

#### 4.4. ANÁLISIS DEL pH.

Se ha estudiado la variación del pH durante la formación de los geles en el proceso de enfriamiento (Figura 4.16). Se puede observar en la figura 4.16 que para las concentraciones de 0,22 kg<sub>P</sub>/kg<sub>w</sub>, 0,13 kg<sub>P</sub>/kg<sub>w</sub>, 0,09 kg<sub>P</sub>/kg<sub>w</sub>, 0,04 kg<sub>P</sub>/kg<sub>w</sub> el pH crece ligeramente durante la formación del gel en el proceso de enfriamiento. Las concentraciones de 0,42 kg<sub>P</sub>/kg<sub>w</sub> y 0,32 kg<sub>P</sub>/kg<sub>w</sub> presentan los pH más altos de todas las concentraciones estudiadas oscilando su valor de 5.25 a 5.35. Para observar más claramente la evolución del pH en función de la razón másica de proteína se ha representado el pH a temperaturas de transiciones del gel de colágeno (Figura 4.17); en la figura se observa que a medida que aumenta el contenido en proteína de colágeno de las formulaciones, el pH aumenta también, siendo significativamente superior en las concentraciones de 0,42 kg<sub>P</sub>/kg<sub>w</sub> y 0,32 kg<sub>P</sub>/kg<sub>w</sub>. Es decir que la variación del pH en el gel es función de la relación proteína agua y en menor medida del estado de agregación del mismo.



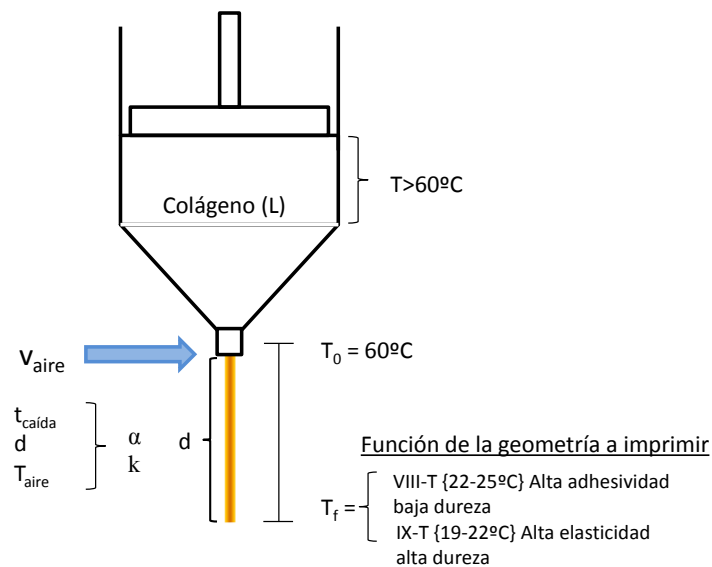
**Figura 4.16.** Variación del pH durante la formación del gel en el proceso de enfriamiento, donde:  $\blacklozenge$  0,42 kg<sub>P</sub>/kg<sub>w</sub>,  $\blacklozenge$  0,32 kg<sub>P</sub>/kg<sub>w</sub>,  $\blacklozenge$  0,22 kg<sub>P</sub>/kg<sub>w</sub>,  $\blacklozenge$  0,13 kg<sub>P</sub>/kg<sub>w</sub>,  $\blacklozenge$  0,09 kg<sub>P</sub>/kg<sub>w</sub>,  $\blacklozenge$  0,04 kg<sub>P</sub>/kg<sub>w</sub>.



**Figura 4.17.** Variación del pH durante la formación del gel en función de la razón másica de proteína, donde:  $\blacklozenge$  12 °C,  $\bullet$  21°C,  $\blacktriangle$  24°C,  $\bullet$  30°C,  $\blacksquare$  42°C.

#### 4.4. MODELO DE TRANSICIONES Y TRANSMISIÓN DE CALOR; ADAPTACIÓN A LA IMPRESIÓN 3D.

En la figura 4.18 se muestra un esquema de la impresión con la elección de los estados más adecuados de gel a imprimir así como las propiedades térmicas necesarias para calcular la altura de deposición.



**Figura 4.18.** Esquema del funcionamiento del extrusor y el efecto de los parámetros estudiados en este estudio.

## 5. CONCLUSIONES

Se ha desarrollado un sistema de obtención de conductividades eléctricas en procesos de enfriamiento de colágeno líquido para determinar los cambios de comportamiento eléctrico en la formación de gel de colágeno.

Se ha desarrollado un sistema de medida de la difusividad térmica a partir de un modelo de Fourier capaz de modelizar el proceso de enfriamiento del colágeno. Además se ha obtenido la evolución de dicho parámetro pudiéndose determinar una transición de primer orden para cada una de las formulaciones.

Se han obtenido las propiedades físicas necesarias (calor específico y densidad) para la obtención de la conductividad térmica del gel durante el proceso de enfriamiento.

Se han obtenido las propiedades mecánicas por TPA de los distintos estados de agregación determinados por conductimetría eléctrica, determinando como más importantes para la impresión 3D; la dureza, la adhesividad y la elasticidad.

A partir de todas las medidas realizadas durante este trabajo ha sido posible completar un diagrama de estado del gel de colágeno con las propiedades mecánicas de cada una de los estados sólidos.

Mediante el análisis de todas las medidas térmicas y mecánicas se ha definido como óptimo, en el punto de deposición del gel, el estado de agregación VIII y en algunas geometrías específicas el IX.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilera, J.M., & Stanley, D.W.** (1999). Food Structuring. In J. M. Aguilera & D.W. Stanley (Eds.), *Microstructural principles of food processing and engineering* (pp. 190-230). Ed. Aspen Publication, Gaithesburg, Maryland.
- Asghar, A., & Henrickson, R.L.** (1982). *Chemical, biochemical, functional, and nutritional characteristics of collagen in food systems. In Advances in food research* (Vol. 28) (pp. 232-372) London: Academic Press.
- Bell, A.E.** (1989). *Gel structure and food biopolymers. In T.M.Hardman, Water and food quality* (pp. 251-275). London: Elsevier Applied Science.
- Budrugaec, P., & Cucos, A.** (2013). *Application of Kissinger, isoconversional and multivariate non-linear regression methods for evaluation of the mechanism and kinetic parameters of phase transitions of type I collagen. Thermochimica Acta*, 565, 241-252
- Burjandze, T.V.** (1979). *Hydroxy-proline content and location in relation to collagen thermal stability. Biopolymers*, 18, 931-936
- Burjandze, T.V.** (2000). *New analysis of the phylogenetic change of collagen thermostability. Biopolymers*, 53, 523-528
- Chiralt, A.; Martínez, N.; González, C.; Talens, P.; Moraga, G.** (2007). *Propiedades físicas de los alimentos*. Editorial Universitat Politècnica de València. pp.
- Correa, M., & Lopes C. R.** (2013). *Gelation property and water holding capacity of heat-treated collagen at different temperature and pH values. Food Research International*, 50 (1), 213-223.
- Crank, J. (1975).** The mathematics of diffusion. Ed. Lorendon Press, Oxford, U.K.
- De Paz, P.** (2006). *Estimulación de la síntesis de colágeno en cultivos celulares*. Tesis doctoral, Universidad de Granada, España
- Dickinson, E., & Miller, R.** (2001). *Food Colloids: Fundamentals of Formulation*. The Royal Society of Chemistry, UK.
- Djabourov, M.** (1988). *Architecture of gelatin gels. Contemporary Physics*, 29(3), 273-297.
- Durán, L., Flszman, S.M., & Benedito, C.** (2001). Propiedades mecánicas empíricas. En: Métodos para medir Propiedades Físicas en Industrias de Alimentos. Alvarado, J.D. y Aguilera, J.M. (Eds.). Acibia, S.A. Zaragoza (España). 147-187
- Flory, P. J., & Weaver, E. S.** (1960). *Helix-coil transitions in dilute aqueous collagen solutions. Journal of the American Chemical Society*, 82, 4518-4525
- Fonkwe, L.G., Ganesan, N., & Cha, A.S.** (2003). *Characterization of gelation time and texture of gelatin and gelatin-polysaccharide mixed gels. Food Hydrocolloids*, 17(6), 871-883
- Gomez-Guillen, M. C., Gimenez, B., Lopez-Caballero, M. E., & Montero, M. P.** (2011). *Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources. Food Hydrocolloids*, 25, 1813-1827.

**Gomez-Guillen, M. C., Turnay, J., Fernandez-Díaz, M. D., Ulmo, N., Lizarbe, M. A., & Montero, P.** (2002). *Physical and structural properties of gelatins extracted from different marine species; a comparative study*. *Food Hydrocolloids*, 16, 25-34.

**Hinterwaldner, R., Ward, A. G., & Courts, A.** (1977). *The science and technology of gelatin* (pp. 295–314) by AG Ward and A. Courts, Academic Press Inc., New York, 315.

**Hinterwaldner, R.** (1977). Raw materials. In Ward A. G., & Courts A. (Eds.), *The science and technology of gelatins* (pp. 295–314). New York: Academic Press.

**Huang, S. H., Liu, P., & Mokasdar, A.** (2013) *Additive manufacturing and its societal impact: a literature review*. *The International Journal of Advanced Manufacturing Technology*, 67, 1191-1203.

**Koh, M. W. W., Merino, L. M., & Dickinson, E.** (2002). *Rheology of acid-induced sodium caseinate gels containing added gelatin*. *Food Hydrocolloids*, 16(6), 619-623.

**Ledward, D.A.** (1986). *Gelation of gelatin*. In J.R. Mitchell & D.A. Ledward, *Functional properties of food macromolecules* (pp. 171-201). London: Elsevier Applied Science Publishers.

**Liu, W., & Li, G.** (2010) Non-isothermal kinetic analysis of the thermal denaturation of type I collagen in solution using isoconversional and multivariate non-linear regression methods *Polym. Degrad. Stab.*, 95, pp. 2233–2240

**López, M.C., Amaral, R., & Kalil, S.** (2008). *Proteólisis enzimática del colágeno dentinario*. *Consientiae Saúde.*, 7(4): 477-486

**Luescher, M., Ruege, M., & P Schindler.** (1974). *Effect of hydration upon the thermal stability of tropocollagen and its dependence on the presece of neutral salts* *Biopolymers*, 13 pp. 2489–2492

**Martínez-Navarrete, N., Andrés-Grau, A.M., Chiralt-Boix, A.; Fito-Maupoe, P.** (1998). *Termodinámica y Cinética de Sistemas Alimento entorno*. Editorial: Servicio de publicaciones Universitat Politècnica de València, España

**Morán Sánchez, W.P.** (2011). *Elaboración de Queso de Cerdo con tres Niveles de Harina de Algas (0, 2, 4 y 6%)*. Tesis doctoral, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Ecuador

**Oakenfull, D., Pearce, J. & Burley, R.W.** (1997). Protein gelation. In: *Food Proteins and Their Applications* (edited by S. Damodaran & A.Paraf). pp. 111-142. New York: Marcel Dekker

**Pranoto, Y., Lee, C. M., & Park, H. J.** (2007). *Characterizations of fish gelatin films added with gellan and  $\kappa$ -carrageenan*. *LWT-Food Science and Technology*, 40(5), 766-774.

**Rich, A., & Crick, F.H.C.** (1995). *The structure of collagen*. *Medical Research Council Unit for the Study of the Molecular Structure of Biological Systems, Cavendish Laboratory, Cambridge*

**Roos, Y. H.** (1995). *Phase transitions in foods*. Academic Press.

- Shoulders, M.D. & Raines, R.T.(2009).** *Collagen structure and stability*, *Annu. Rev.Biochem.* 78, 929–958.
- Steinhardt, J., Reynolds, J.A. (1969).** *The measurement of complex formation*. En "Multiple Equilibria in Proteins". Academic Press, Inc, Nueva York.
- Talens, P., Hartong, S., Martinez-Navarrete, N., Chiralt, A., & Fito, P. (2000)** *Kinetics and equilibrium status in osmotic dehydration of strawberry*. In Proc 12th Int Drying Symp (IDS).
- Trados, T. (2013).** *Encyclopedia of Colloid and Interface Science*. Springer Heidelberg New York Dordrecht London.
- Velázquez, J. (2014).** *Estudio de los espectros dieléctricos en alimentos con estructura coloidal*. Tesis doctoral, Universitat Politècnica de València, España
- Vyazovkin, S., Vincent, Luc., & Sbirrazzuoli, N. (2007).** *Thermal Denaturation of Collagen Analyzed by Isoconversional Method*. *Macromol.Biosci*, 1, 1181-1186
- Wainwright, F.W. (1997).** Physical tests for gelatin and gelatin products. Ch.16, in *The Science and Technology of Gelatins*, A.G. Ward and A. Courts (Ed.), p. 507-554. Academic Press, New York
- Wegrzyn, T.F., Golding, M., & Archer, R.H. (2012)** *Food Layered Manufacture: A new process for constructing solid foods*. *Trends in Food Science & Technology*, 27, 66-72