



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

FENÓMENOS DE COMPATIBILIDAD Y SEPARACIÓN DE FASES
EN MEZCLAS POLISACÁRIDO – PROTEÍNA

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q. A. JOSÉ ADAYA GONZÁLEZ

TUTOR

Dr. ALBERTO TECANTE CORONEL

FACULTAD DE QUÍMICA, DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA

CIUDAD DE MÉXICO, JUNIO DE 2016



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:	Dra. Amelia Guadalupe Farrés González-Sarabia	Facultad de Química, UNAM
Vocal:	Dra. Laura Patricia Martínez Padilla	FES Cuautitlán, UNAM
Vocal:	M. en C. María de los Ángeles Valdivia López	Facultad de Química, UNAM
Vocal:	Dr. Juan Alfredo Salazar Montoya	CINVESTAV, IPN
Secretario:	Dra. María Guadalupe Sosa Herrera	FES Cuautitlán, UNAM

Candidato al grado Q. A. José Adaya González

Tutor Dr. Alberto Tecante Coronel

Laboratorio 313. Departamento de Alimentos y Biotecnología.
Facultad de Química, Ciudad Universitaria.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de este proyecto, con CVU: 588661 y número de becario: 308015.

A la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, por el apoyo de laboratorio, reactivos y equipo.

Al Dr. Alberto Tecante Coronel, por la tutoría, asesoría y apoyo brindado durante la realización del trabajo.

A la I. A. Mariana Ramírez Gilly, Técnico Académico Asociado, por el apoyo técnico y disposición.

A los miembros del jurado, Dra. Amelia Guadalupe Farrés González-Sarabia (Facultad de Química, UNAM), Dra. Laura Patricia Martínez Padilla (FES Cuautitlán, UNAM), M. en C. María de los Ángeles Valdivia López (Facultad de Química, UNAM), Dr. Juan Alfredo Salazar Montoya (CINVESTAV, IPN) y Dra. María Guadalupe Sosa Herrera (FES Cuautitlán, UNAM) por el apoyo y observaciones del proyecto.

ÍNDICE

JURADO	i
AGRADECIMIENTOS	ii
LISTA DE CUADROS	v
LISTA DE FIGURAS	vi
RESUMEN	vii
1. ANTECEDENTES	1
1.1. Interacciones proteína-polisacárido	1
1.1.1. Factores que afectan las interacciones polisacárido-proteína	2
1.1.1.1. Fuerza iónica	2
1.1.1.2. pH	2
1.1.2. Incompatibilidad termodinámica entre proteínas y polisacáridos	2
1.1.2.1. Teoría de Flory-Huggins	3
1.1.2.1.1. Análisis termodinámico de Scott	6
1.1.2.2. Teoría de agotamiento	7
1.2. Diagrama de fases	8
1.3. Lambda-carragenina	9
1.4. Aislado de proteína de suero de leche	11
1.5. Estudios previos	13
2. JUSTIFICACIÓN	14
3. HIPÓTESIS	15
4. OBJETIVO	15
5. MATERIALES	15

6. METODOLOGÍA	15
6.1. Caracterización de APSL y λ -car	15
6.1.1. Determinación de humedad	15
6.1.2. Determinación de hidratos de carbono	16
6.1.3. Determinación de proteínas	16
6.1.4. Determinación de densidad	16
6.2. Preparación de soluciones stock	17
6.3. Diagrama de fases	17
6.3.1. Cálculo de composición de fases	17
6.4. Obtención de los parámetros de interacción	20
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
7.1. Caracterización de APSL y λ -car	20
7.2. Diagrama de fases	21
7.2.1. Cálculo de composición de fases	21
7.2.2. Análisis del diagrama de fases	23
7.3. Obtención de los parámetros de interacción	28
8. CONCLUSIONES	29
9. RECOMENDACIONES	29
10. BIBLIOGRAFÍA	30
ANEXOS	34

LISTA DE CUADROS

1	Resumen de propiedades de carragenina	10
2	Aplicaciones típicas de λ -car en alimentos	11
3	Proteínas del suero	11
4	Relación de las mezclas elaboradas para generar el diagrama de fases	17
5	Contenido de proteínas, hidratos de carbono y humedad en APSL y λ -car	20
6	Parámetros de las curvas tipo obtenidas	22
7	Datos de equilibrio de fases	25
8	Datos de equilibrio de fases en fracción volumen para experimento A	28

LISTA DE FIGURAS

1	Tendencias del comportamiento de mezclas proteína-polisacárido	1
2	Diagrama de fases del sistema Dx T500/PEG 8000	8
3	Principales tipos de carragenina	9
4	Unidad repetitiva de λ -car	10
5	Estructura dimérica de β -lactoglobulina	12
6	Diagrama de fases del sistema APSL / λ -car	14
7	Protocolo experimental para obtener el diagrama de fases	19
8	Curva tipo para determinación de concentración de APSL	21
9	Curva tipo para determinación de concentración de λ -car	22
10	Diagrama de fases del sistema APSL/ λ -car en medio acuoso, pH neutro y 0.1 mol/dm ³ de NaCl	23
11	Primer diagrama de fases obtenido por determinaciones visuales	26
12	Segundo diagrama de fases obtenido por determinaciones visuales	27

RESUMEN

Las proteínas y polisacáridos son en gran parte responsables por la estructura y propiedades fisicoquímicas de los alimentos, además de presentar características que les permiten actuar como espesantes, gelificantes, estabilizantes de emulsiones y espumas, por lo que son ampliamente utilizados como ingredientes alimenticios funcionales. Por lo anterior, es de vital importancia el estudio en las interacciones entre dichos biopolímeros para mejorar la calidad de los alimentos y generar nuevos con características estructurales, nutricionales y funcionales específicas.

En el presente trabajo se estudió el sistema formado por carragenina lambda (λ -car) y aislado de proteínas de suero (APSL) en medio acuoso, a una concentración de NaCl de 0.1 mol/dm^3 , pH neutro, temperatura ambiente y presión atmosférica. El sistema se eligió debido a que la λ -car se utiliza como aditivo alimentario principalmente en alimentos lácteos y pocas investigaciones de sus interacciones con APSL se han llevado a cabo. Además el hecho de que λ -car no forme geles facilita su estudio. Se construyó el diagrama de fases para dicho sistema por medio de mezclas de diferentes concentraciones de λ -car y APSL que se centrifugaron a 6000 rpm por 30 min para generar dos fases heterogéneas en equilibrio.

La concentración de los biopolímeros en la fase superior generada se determinó por medio de métodos espectrofotométricos y la composición de la fase inferior se calculó por diferencia. La fase superior fue rica en λ -car y la inferior en APSL, dicho fenómeno demostró que los biopolímeros son termodinámicamente incompatibles. Los resultados obtenidos se graficaron para generar el diagrama de fases, donde se observaron los límites de la zona de dos fases por encima de 0.15 % (m/m) de λ -car y de 1% (m/m) de APSL, se determinó el punto crítico, cuya composición es de 2.75 % (m/m) de APSL y 0.33 % (m/m) de λ -car.

Se calculó el parámetro de Flory de interacciones entre λ -car y APSL obteniendo un valor de 0.058, lo que indica que existen interacciones repulsivas entre dichos biopolímeros.

1. ANTECEDENTES

1.1. Interacciones proteína – polisacárido

Cuando se mezclan un polisacárido y una proteína en disolución se pueden establecer dos tipos de interacción; segregativa (también llamada incompatibilidad termodinámica), en la que los biopolímeros se repelen mutuamente y se denotan como incompatibles, o asociativa, los biopolímeros se atraen (de Kruif y Tuinier, 2001); **Figura 1**. En disoluciones muy diluidas el sistema es estable ya que domina la entropía de mezclado y las proteínas y polisacáridos son co-solubles. Al aumentar la concentración de los biopolímeros el sistema puede volverse inestable y las mezclas tienden a la segregación. (Tolstoguzov, 1991; Grinberg y Tolstoguzov, 1997).

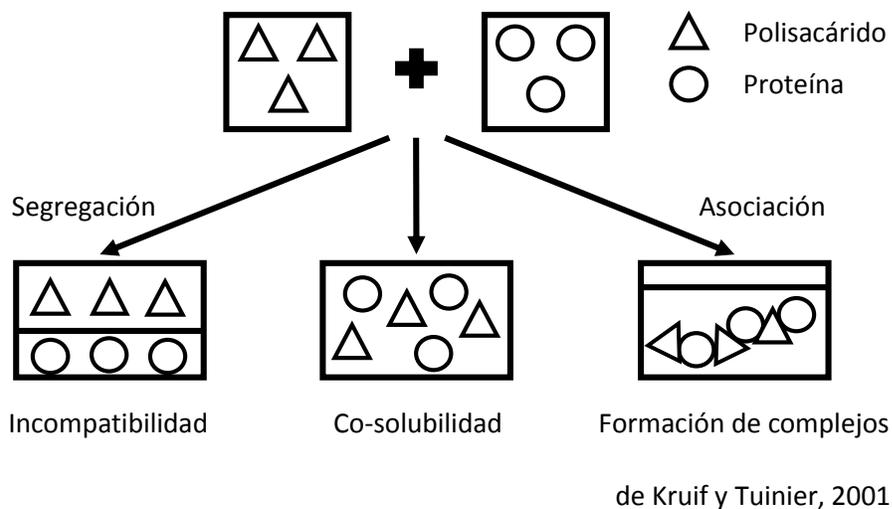


Figura 1. Tendencias del comportamiento de mezclas proteína-polisacárido.

Para biopolímeros de estructura similar y expandida (por ejemplo gelatina y almidón), la segregación se atribuye a la diferencia en la energía de interacción entre los segmentos de polímeros, fenómeno descrito por la Teoría de Flory. Para polímeros de estructura y forma disímil, la segregación conlleva una reducción de la concentración del polímero en la cercanía del otro componente. La reducción de la concentración del polímero se debe a la pérdida de entropía conformacional de los polímeros cerca de una interfase. Una reducción en la concentración del polímero cerca de una interfase se denomina agotamiento (depletion). Exceder cierta concentración de polímero conduce a la separación de fases, una fase rica en proteína y otra rica en polisacárido (de Kruif y Tuinier, 2001).

Una mezcla de proteínas y polisacáridos también puede ser inestable cuando se presentan interacciones asociativas, en este caso los polisacáridos se adsorben sobre la superficie de la proteína. Si la cantidad de polisacárido no es suficiente para cubrir completamente la proteína, el polisacárido puede adsorberse en más de una superficie ligando dos o más partículas proteínicas, este proceso es conocido como coacervación (de Kruif y Tuinier, 2001) y ocurre a menudo en mezclas de biopolímeros con carga opuesta. La atracción entre proteínas inducida por la adsorción de polisacáridos eventualmente conlleva a la separación de fases (**Figura 1**).

1.1.1. Factores que afectan las interacciones polisacárido-proteína

1.1.1.1. Fuerza iónica

Grinberg y Tolstoguzov (1997) postulan que la incompatibilidad entre proteínas y polisacáridos se vuelve más pronunciada con el incremento de la concentración de sal. La sal intensifica la auto-asociación en las proteínas debido al apantallamiento de la repulsión electrostática entre las moléculas de proteína y el aumento en sus interacciones hidrofóbicas, lo que significa que el agua se vuelve un mal disolvente para la proteína y un buen disolvente para el polisacárido favoreciendo la incompatibilidad de los biopolímeros en disolución (Hoskins *et al.*, 1998).

1.1.1.2. pH

El pH es un factor crucial en las interacciones polisacárido-proteína y determina si el mecanismo que se lleva a cabo es asociativo o segregativo. En presencia de polisacáridos aniónicos (pectina, goma arábica, carragenina), a un pH por debajo del punto isoeléctrico de la proteína (carga neta positiva) los biopolímeros interactúan uno con otro formando complejos, este mecanismo puede inhibirse si el pH se aumenta por encima del punto isoeléctrico, condiciones donde ambos biopolímeros presentan carga neta negativa y se repelen mutuamente favoreciendo la incompatibilidad termodinámica entre ellos. Un comportamiento similar se presenta entre proteínas y polisacáridos neutros (Antonov *et al.*, 1979).

1.1.2. Incompatibilidad termodinámica entre proteínas y polisacáridos

Al menos 100 sistemas proteína-polisacárido en medio acuoso han sido descritos como incompatibles termodinámicamente (Grinberg y Tolstoguzov, 1997). Bajo ciertas condiciones, cualquier sistema proteína-polisacárido se separa espontáneamente en dos fases líquidas. Los

parámetros principales involucrados en el mecanismo son el pH y la fuerza iónica (Doublier *et al.*, 2000) y varían de acuerdo con los biopolímeros, dependen de sus características estructurales y composicionales, como su peso molecular y conformación (Grinberg y Tolstoguzov, 1997). Una condición necesaria para la incompatibilidad termodinámica puede describirse por la siguiente relación entre los coeficientes viriales molales:

$$(A_{pr-ps})^2 > A_{pr-pr} A_{ps-ps} \quad (1)$$

Donde, A_{pr-pr} , $APSL_{ps}$ y A_{pr-ps} se refieren a interacciones proteína-proteína, polisacárido-polisacárido y proteína-polisacárido respectivamente. Cuando esta desigualdad se cumple ocurre la separación de fases en el sistema. Esto es posible si el coeficiente A_{pr-ps} es suficientemente grande y los coeficientes A_{pr-pr} y $APSL_{ps}$ suficientemente pequeños (Doublier *et al.*, 2000), la interacción entre diferentes biopolímeros es enérgicamente menos favorable que la interacción promedio entre biopolímeros similares. La Teoría de Flory-Huggins y la Teoría de interacciones de agotamiento son dos aproximaciones que describen la separación de fases en mezclas de biopolímeros. Ambas se detallan a continuación.

1.1.2.1. Teoría de Flory-Huggins

El tratamiento mecánico estadístico que describe las características básicas de la separación de fases en disoluciones con solutos de una, dos o más especies de biopolímero fue derivado inicialmente por Flory y Huggins. El problema básico es obtener una expresión para el cambio en la energía libre asociado con la formación de una disolución de polímero partiendo de los componentes puros, la energía libre de mezclado (ΔG_m). Esta función se compone de la entalpía de mezclado (ΔH_m) y la entropía de mezclado (ΔS_m), de acuerdo con la siguiente expresión:

$$\Delta G_m = \Delta H_m - T\Delta S_m \quad (2)$$

Donde T es la temperatura absoluta. En la derivación de la teoría, la disolución de biopolímero se representa como un “enrejado” de sitios, cada uno ocupado por una molécula de disolvente o por un segmento de polímero. Cada sitio del “enrejado” tiene z caras de contacto con sitios adyacentes. Para el caso más simple, un polímero en un disolvente, ΔH_m viene dada por la suma de los cambios de entalpía individuales asociados con la formación de contactos de segmentos de polímero y el disolvente, menos la ruptura de contactos entre los componentes puros. Este cambio de energía por contacto, Δw_{12} , está determinado por:

$$\Delta w_{12} = w_{12} - \frac{1}{2}(w_{11} + w_{22}) \quad (3)$$

Donde w_{12} es la energía asociada con un contacto entre los componentes 1 y 2; w_{11} , la energía asociada con el contacto 1-1; y w_{22} , la energía asociada con el contacto 2-2. Estas energías individuales son positivas si el contacto es desfavorable (repulsivo) o negativas si existe atracción entre los componentes. Al contar el número promedio de contactos en la red para una composición particular y al multiplicar por Δw_{12} , para una mezcla de un disolvente (componente 1) y un biopolímero (componente 2) se tiene:

$$\Delta H_m = z\Delta w_{12}n_1\phi_2 \quad (4)$$

Donde z es el número de coordinación del “enrejado”; n_1 el número de moléculas de disolvente en el enrejado; ϕ_2 la fracción de sitios del enrejado ocupada por segmentos de biopolímero, es decir:

$$\phi_2 = n_2P_2/(n_1 + n_2P_2) \quad (5)$$

n_2 el número de moléculas de polímero en el enrejado; y P_2 el número de segmentos por molécula de polímero. Es más usual escribir el cambio de entalpía de mezclado de la siguiente forma:

$$\Delta H_m = kTx_{12}n_1\phi_2 \quad (6)$$

Donde k es la constante de Boltzman; T la temperatura absoluta; y

$$x_{12} = z\Delta w_{12}/kT \quad (7)$$

El parámetro x_{12} se conoce como parámetro de interacción de Flory y puede ser visto como la máxima energía de interacción que una molécula de disolvente podría tener en la mezcla; esto es, si estuviera completamente rodeada por z segmentos de polímero. La entropía de mezclado se calcula a partir de la relación fundamental:

$$\Delta S_m = k \ln W \quad (8)$$

Donde W es el número total de formas diferentes de arreglos de n_1 moléculas de disolvente y n_2 moléculas de biopolímero en el “enrejado”. El correcto recuento configuracional conduce a la expresión de Flory-Huggins para la entropía de mezclado de una sola especie de biopolímero en el “enrejado”:

$$\Delta S_m = -k(n_1 \ln \phi_1 + n_2 \ln \phi_2) \quad (9)$$

Donde ϕ_1 es la fracción de sitios del “enrejado” ocupada por el disolvente:

$$\phi_1 = n_1 / (n_1 + n_2 P_2) \quad (10)$$

Combinando las expresiones obtenidas para ΔH_m y ΔS_m ahora se puede calcular ΔG_m como sigue:

$$\Delta G_m = kT(n_1 \ln \phi_1 + n_2 \ln \phi_2 + x_{12} n_1 \phi_2) \quad (11)$$

Este modelo puede extenderse a mezclas de más de dos componentes; para una mezcla de dos biopolímeros diferentes en un disolvente, la energía libre de mezclado está dada por:

$$\Delta G_m = kT[n_1 \ln \phi_1 + n_2 \ln \phi_2 + n_3 \ln \phi_3 + (n_1 + n_2 P_2 + n_3 P_3)(\phi_1 \phi_2 x_{12} + \phi_1 \phi_3 x_{13} + \phi_2 \phi_3 x_{23})] \quad (12)$$

Donde el componente 1 es el disolvente y los componentes 2 y 3 son las dos especies de polímeros caracterizados por P_2 y P_3 , respectivamente. Los otros parámetros se definen como:

$$\phi_i = \frac{n_i P_i}{n_1 + n_2 P_2 + n_3 P_3} \quad (13)$$

Donde n_i es el número de moléculas del componente i en el “enrejado”, $i = 1, 2$ o 3 . El potencial químico de cualquiera de las tres especies se puede calcular a partir de:

$$(\mu_i - \mu_i^0) = N_A \left(\frac{\partial \Delta G_m}{\partial n_i} \right)_{T, P, n_j} \quad (14)$$

Donde μ_i es el potencial químico del componente i cuando su concentración es ϕ_i ; μ_i^0 es el potencial químico del componente i puro ($\phi_i = 1$); y N_A es el número de Avogadro.

Si dos fases están presentes, en el equilibrio, el potencial químico de cada componente debe ser el mismo en cada fase. Si por ejemplo, se considera el comportamiento de μ_1 en función de ϕ_2 , esto significa que debe haber dos valores de ϕ_2 en la curva de μ_1 contra ϕ_2 que correspondan a valores iguales de μ_1 . Como ϕ_2 varía de 0 a 1, μ_1 debe disminuir en última instancia ya que la concentración del disolvente se vuelve muy pequeña. Por lo tanto, si tiene que haber dos valores de ϕ_2 que dan el mismo valor de μ_1 , esto es, si hay dos fases presentes, el gráfico de μ_1 contra ϕ_2 debe pasar por un

mínimo y un máximo antes de volverse muy negativo. Entre el mínimo y el máximo de la curva debe ocurrir un punto de inflexión. Dependiendo de la miscibilidad de las dos especies de polímeros el mínimo y el máximo ocurren más o menos juntos. Las condiciones críticas para la aparición de dos fases serán aquéllas cuando el mínimo, el máximo y el punto de inflexión coinciden, analíticamente:

$$\frac{\partial \mu_1}{\partial \phi_2} = \frac{\partial^2 \mu_1}{\partial \phi_2^2} = 0 \quad (15)$$

Utilizando la expresión para ΔG_m la ecuación anterior puede resolverse para proveer las expresiones para los valores críticos de ϕ_i y x_{ij} , aquellos que producirán la separación de fases en un sistema de un disolvente y dos biopolímeros. Asumiendo por simplicidad que $P_2 = P_3$ y que ambos polímeros son igualmente solubles en el componente 1 ($x_{12} = x_{13}$), la solución de la ecuación de ΔG_m da para las condiciones críticas (Scott, 1949):

$$\phi_{2c} = \phi_{3c} = (1 - \phi_{1c})/2 \quad (16)$$

$$x_{23c} = 1/P_2 \phi_{2c} \quad (17)$$

Las implicaciones de estos resultados son las siguientes; ya que $P_2 \gg 1$ para los biopolímeros, la separación de fases resultará si la energía de interacción entre los dos tipos de segmentos de biopolímero es incluso ligeramente positiva (ligeramente desfavorable), y que la separación de fases se produce más fácilmente cuanto mayor es el peso molecular del biopolímero. Además, como x_{12} y x_{13} no aparecen en estas expresiones, las interacciones biopolímero – disolvente no pueden ser importantes en la separación de fases; sólo las interacciones biopolímero – biopolímero están involucradas. También es posible calcular la curva binodal a partir de la teoría y ésta se ajusta con la experimental, prediciendo la marcada asimetría de las dos fases.

1.1.2.1.1. Análisis termodinámico de Scott

Scott (1949) realizó un análisis teórico cuantitativo del problema de incompatibilidad entre biopolímeros utilizando la Teoría de Flory-Huggins como base, obtuvo las siguientes expresiones para calcular el potencial químico de cada componente:

$$\mu_1 - \mu_1^0 = RT[\ln \phi_1 + (1 - N_2^{-1})\phi_2 + (1 - N_3^{-1})\phi_3 + x_{12}\phi_2^2 + x_{13}\phi_3^2 + (x_{12} + x_{13} - x_{23})\phi_2\phi_3] \quad (18)$$

$$\mu_2 - \mu_2^0 = RT[\ln\phi_2 + (1 - N_2)\phi_1 + (1 - N_2/N_3)\phi_3 + N_2[x_{12}\phi_1^2 + x_{23}\phi_3^2 + (x_{12} + x_{23} - x_{13})\phi_1\phi_3]] \quad (19)$$

$$\mu_3 - \mu_3^0 = RT[\ln\phi_3 + (1 - N_3)\phi_1 + (1 - N_3/N_2)\phi_2 + N_3[x_{13}\phi_1^2 + x_{23}\phi_2^2 + (x_{13} + x_{23} - x_{12})\phi_1\phi_2]] \quad (20)$$

Donde ϕ_i es la fracción volumen de componente i , N_i el grado de polimerización de los biopolímeros; x_{12} , x_{13} y x_{23} son los parámetros de interacción disolvente-biopolímero 1, disolvente-biopolímero 2 y biopolímero 1-biopolímero 2 respectivamente. El potencial químico de cada componente debe ser el mismo en las dos fases en equilibrio, por lo que se debe cumplir la siguiente igualdad diferenciando las dos fases por una o dos comillas:

$$\mu'_0 = \mu''_0 \quad (21)$$

$$\mu'_1 = \mu''_1 \quad (22)$$

$$\mu'_2 = \mu''_2 \quad (23)$$

1.1.2.2. Teoría de agotamiento

Las interacciones microscópicas entre partículas coloidales en disoluciones de biopolímeros determinan la estabilidad de varias mezclas coloide-polímero, las cuales son de interés para la industria. Lubricantes y pinturas son ejemplos de mezclas coloide-polímero en las que se desea la estabilidad (Narayanan *et al.*, 1996).

La interacción entre partículas coloidales puede expresarse en términos de un potencial efectivo $U(r)$, que es el trabajo requerido para acercar dos partículas coloidales del infinito a una distancia r en una disolución de biopolímero dada (Asakura y Oosawa, 1954). En el estudio de las interacciones en mezclas coloide-polímero, es importante distinguir entre polímeros que se adsorben en la superficie coloidal y aquellos que se encuentran libres en la disolución, porque las dos situaciones usualmente conducen a efectos cualitativamente diferentes (Narayanan *et al.*, 1996).

En una mezcla de un coloide y un biopolímero que no se adsorbe, el potencial $U(r)$ puede desarrollar un efecto atractivo debido al efecto de agotamiento (Asakura y Oosawa, 1954; Vrij, 1976) por el que las cadenas de polímeros son expulsadas de la región entre dos partículas coloidales cuando su separación se vuelve más pequeña que el tamaño de las cadenas de biopolímeros. La exclusión de

moléculas de polímero del espacio entre las partículas coloidales conduce a una diferencia de presión osmótica juntando las partículas coloidales, lo que resulta en atracción efectiva entre las dos partículas coloidales (Narayanan *et al.*, 1996). Si la atracción es suficientemente fuerte ocurre separación de fases en la mezcla coloide-biopolímero.

1.2. Diagrama de fases

La dependencia de la composición de fases con respecto a las concentraciones de biopolímero, a una temperatura y presión dadas, a menudo se muestra gráficamente en un diagrama de fases (Albertsson, 1971). Por ejemplo, en la **Figura 2** la composición total del sistema es representada por el punto A, y la de las dos fases en equilibrio por B y C respectivamente.

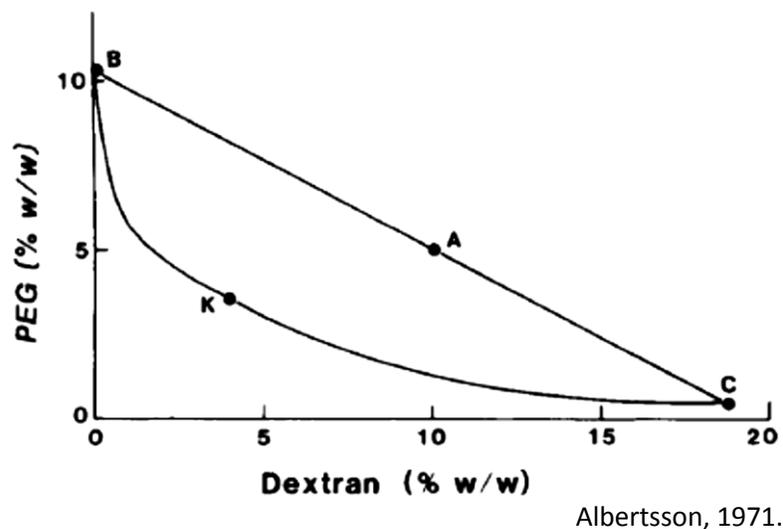


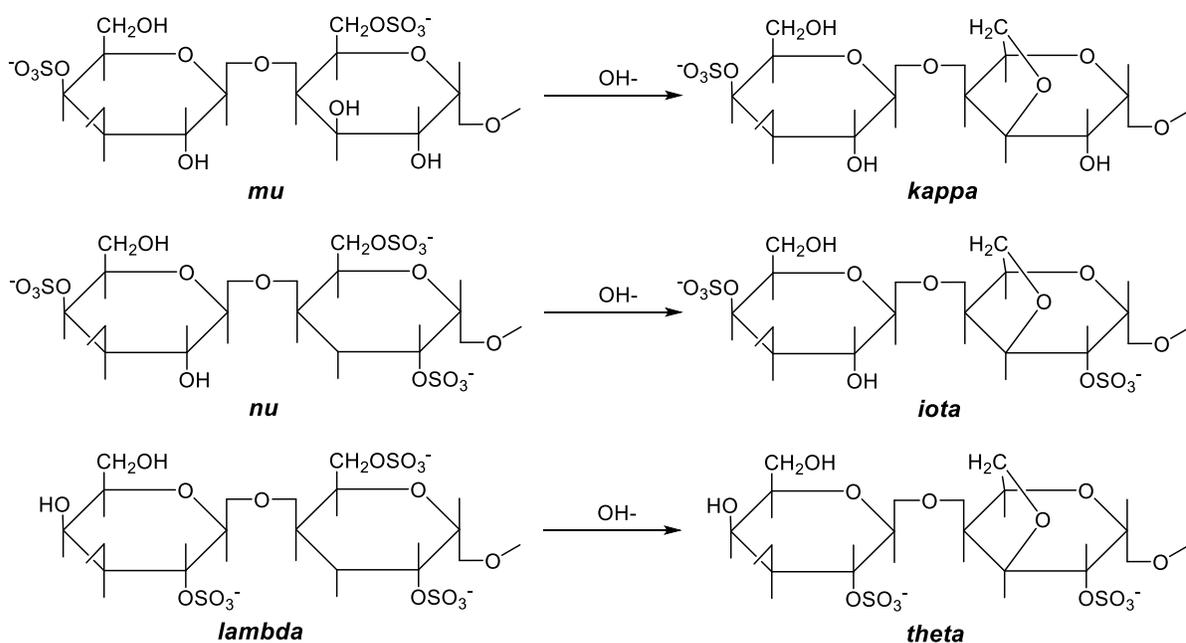
Figura 2. Diagrama de fases del sistema Dx T500/PEG 8000.

Los pares de puntos como A y B son llamados nodos y la línea recta que los conecta se conoce como línea de enlace. Las líneas de enlace de sistemas con concentraciones totales diferentes de A son a menudo paralelas. Con la disminución de la concentración de polímero disminuye la longitud de la línea de enlace y eventualmente se vuelve cero en el punto crítico, representado por el punto K en la figura anterior.

La curva que pasa a través de todos los puntos de composición de la fase superior, el punto crítico y todos los puntos de composición de la fase inferior es la binodal. Todos los sistemas con una concentración total de biopolímero en o por debajo de la binodal forman una sola fase. Los sistemas con composiciones totales sobre la binodal dan origen a dos fases (Tolstogusov, 2003).

1.3. Lambda-carragenina

Carragenina es el nombre genérico de una familia de polisacáridos lineales de alto peso molecular formados por unidades de galactosa y 3,6-anhidrogalactosa, sulfatadas o no, unidas por enlaces glicosídicos alternados α -(1,3) y β -(1,4), (Almutairi *et al.*, 2013). Rees y colaboradores (Imeson, 2009) asignaron estructuras químicas definidas a las variantes más importantes de la familia de carrageninas, que son lambda, kappa e iota. Los tipos *mu* y *nu* son precursores de kappa e iota respectivamente (**Figura 3**). La especie de algas rojas *Chondrus crispus* es la fuente principal de kappa y lambda, e iota y kappa son extraídas de *Eucheuma spinosum* y *cottonii* (Campo *et al.*, 2009).



Imeson, 2009.

Figura 3. Principales tipos de carragenina.

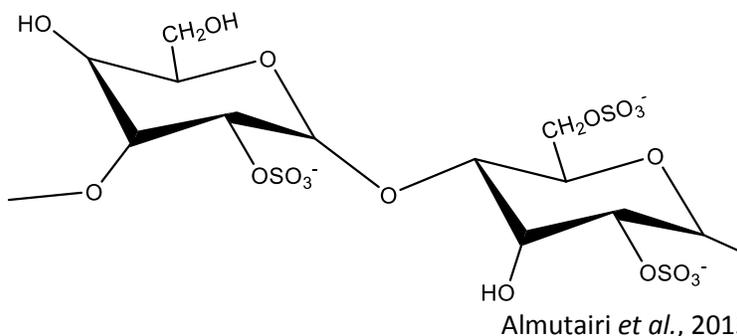
Las diferencias entre las carrageninas se deben a la proporción variable y la posición del enlace de las unidades 3,6-anhidrogalactosa y sustituyentes sulfato (Almutairi *et al.*, 2013). Estas variaciones estructurales son responsables de las características únicas de cada tipo de carragenina, incluyendo formación y fuerza de geles, viscosidad y solubilidad, entre otras (Tombs *et al.*, 1998). En el **Cuadro 1** se presenta un resumen de las propiedades de los tres tipos principales de carragenina.

Cuadro 1. Resumen de propiedades de carragenina.

Tipo	Lambda	Iota	Kappa
Solubilidad			
Agua caliente (80 °C)	Soluble	Soluble	Soluble
Agua fría (20 °C)	Soluble	Sal de sodio soluble	Sal de sodio soluble
Leche caliente (80 °C)	Espesante	Soluble	Soluble
Leche fría (20 °C)	Espesante	Insoluble	Insoluble
Solución 50% azúcar	Soluble	Insoluble	Soluble en caliente
Solución 10% sal	Soluble en caliente	Soluble en caliente	Insoluble
Gelificación			
Efecto de cationes	No gelifica	Geles más fuertes con calcio	Geles más fuertes con potasio
Textura del gel	No gelifica	Suave, elástico	Firme, quebradizo
Sinéresis	No gelifica	No	Si
Histéresis	No gelifica	5-10 °C	10-20 °C
Reversibilidad de cizalla	Si	Si	No
Estabilidad en medio ácido	Hidrólisis	Hidrólisis en solución; geles son estables	
Reactividad frente a proteínas	Interacción fuerte en medio ácido		Reacción específica con kappa-caseína

Imeson, 2009.

La carragenina lambda es la más soluble en agua, presenta tres grupos sulfato por disacárido repetido (aproximadamente 37% m/m), y ya que no contiene residuos 3,6-anhidrogalactosa (**Figura 4**) no puede formar geles. La λ -car forma disoluciones viscosas que presentan adelgazamiento a la cizalla cuando se agitan (Rivera, 2013).

**Figura 4.** Unidad repetitiva de λ -car, (1,3) D-galactosa-2-sulfato y (1,4) D-galactosa-2,6-disulfato.

La alta viscosidad de las disoluciones de λ -car (y su incapacidad para formar geles) no menor a 5 mPa s en solución al 1.5 % a 75 °C (Van de Velde y de Ruiter, 2005), la han hecho un agente espesante popular en productos alimenticios (**Cuadro 2**) y farmacéuticos (Bonferoni *et al.*, 1994; Therkelsen, 1995).

Cuadro 2. Aplicaciones típicas de λ -car en alimentos.

<i>Aplicación</i>	<i>Función</i>	<i>Concentración (%)</i>
Jarabes	Suspensión, espesante	0.3-0.5
Imitación de cremas para café	Estabilización de la emulsión	0.1-0.2
Natilla	Espesante	0.2-0.3
Crema batida	Estabiliza overrun	0.05-0.15
Batidos	Suspensión, sensación en la boca, estabiliza overrun	0.1-0.2
Leches con chocolate	Suspensión, sensación en la boca	0.015-0.030

Thomas, 1997.

1.4. Aislado de proteína de suero de leche

El suero es el líquido resultante después de separar la caseína de la leche durante la elaboración de queso, caseína ácida o cuajo de caseína (Zadow, 1994). El suero dulce (pH mínimo de 5.6) se obtiene de la elaboración de queso o cuajo de caseína, mientras que el suero ácido (pH máximo de 5.1) se obtiene de la elaboración de caseína ácida (Smithers, 2008).

Los productos que se denominan como aislado de proteína de suero de leche contienen de 90 a 95% de proteína (el resto de los ingredientes es una combinación de agua, grasa, lactosa y cenizas). Las proteínas se separan del suero por métodos cromatográficos de intercambio iónico y posteriormente se concentran por evaporación o filtración por membrana (O'Regan *et al.*, 2009).

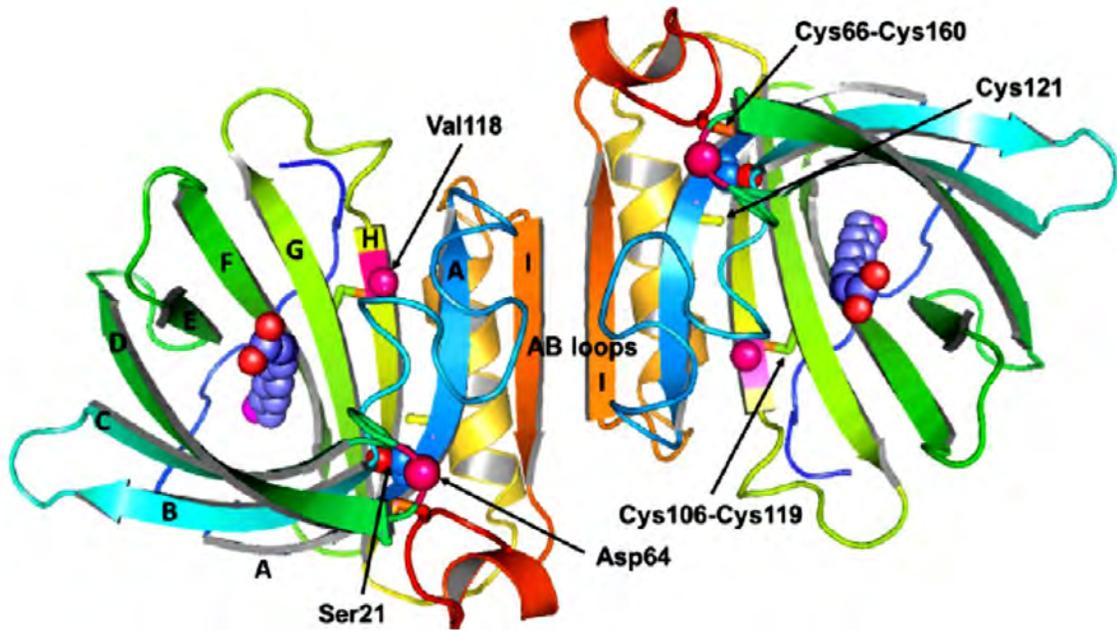
Las principales proteínas presentes en APSL son β -lactoglobulina, α -lactalbumina, glicomacropéptidos (GMP), seroalbumina bovina (BSA), inmunoglobulinas, lactoferrina y lactoperoxidasa (**Cuadro 3**). Para cada una de estas proteínas o grupo de proteínas se han demostrado propiedades funcionales, nutricionales o nutraceuticas únicas (Foegeding *et al.*, 2002).

Cuadro 3. Proteínas del suero.

<i>Proteína</i>	<i>Proporción en masa</i>	<i>Número de aminoácidos</i>	<i>Masa molar (Da)</i>	<i>Punto isoeléctrico</i>	<i>Puentes disulfuro/Tioles</i>
β -lactoglobulina	60%	162	18 363	5.35	2/1
α -lactalbumina	20%	123	14 178	4.80	3
Seroalbumina	5%	583	66 399		17/1
Inmunoglobulina G	10%	>500	161 000		
Lactoferrina	<0.1%	689	76 110	8.95	17

Edwadrs y Jameson, 2014.

La estructura primaria de β -lactoglobulina (**Figura 5**) consta de 162 residuos de aminoácidos, su estructura secundaria consiste en aproximadamente 15% α -hélice y 50% β -hoja, siendo el resto estructuras desordenadas (Creamer *et al.*, 1983), es una proteína globular pequeña doblada en forma de barril (o cáliz), con restos hidrofóbicos orientados al interior del barril y los restos hidrofílicos hacia el exterior (Dereck *et al.*, 2006). En soluciones acuosas a pH neutro forma dímeros (Creamer *et al.*, 2003).



Delano, 2002.

Figura 5. Estructura dimérica de β -lactoglobulina.

Debido a la pureza de las proteínas y la claridad de las disoluciones, el APSL es utilizado ampliamente en suplementos nutricionales, bebidas deportivas y fortificadas (Ha, E. y Zemel, M.B., 2003). Por su alto contenido proteínico el APSL es utilizado como ingrediente funcional de alimentos, para retención de agua, gelificación, emulsificación y como agente espumante (Foegeding *et al.*, 2002). Las proteínas de suero de leche son solubles en su conformación globular nativa en todo el intervalo de pH establecido en aplicaciones alimenticias (O'Regan *et al.*, 2009).

Las proteínas del suero de leche tienen un valor biológico (VB) que supera al de proteínas del huevo por 15% (Rankin y Darragh, 2006), además son una rica fuente de aminoácidos esenciales y aminoácidos de cadena ramificada, éstos últimos juegan un papel importante como reguladores metabólicos en la homeostasis de proteínas y glucosa y en el metabolismo de lípidos (Smilowitz *et al.*, 2005). Las proteínas del suero también son ricas en aminoácidos azufrados (metionina, cisteína), que funcionan como antioxidantes y como precursores del glutatión (antioxidante intracelular) (Shoveller *et al.*, 2005).

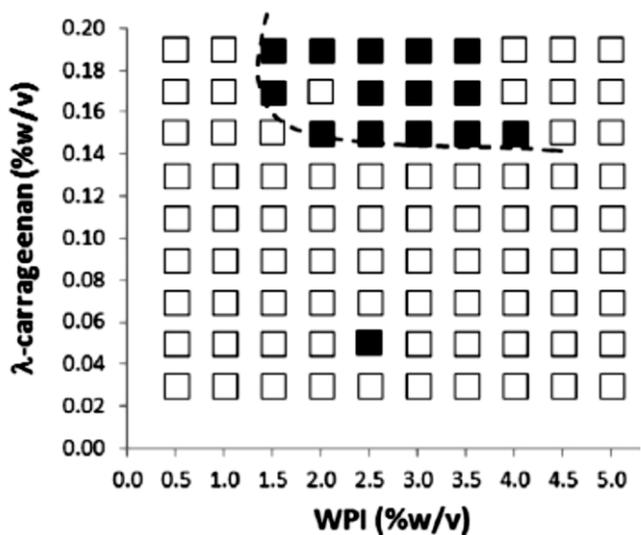
1.5. Estudios previos

Debido al extendido uso de APSL y λ -car como aditivos alimentarios, se han realizado múltiples investigaciones en sistemas con estos biopolímeros presentes. A continuación se mencionan brevemente algunas investigaciones de interés. Syrbe *et al.* (1998) reportaron separación de fases segregativa entre polisacáridos neutros (dextrana, maltodextrinas y metilcelulosa) y proteínas de suero de leche nativas en un intervalo de pH de 5 a 7. En relación con polisacáridos aniónicos (pectinas de alto metoxilo, alginato de sodio, carboximetilcelulosa) los mismos autores reportaron un comportamiento similar. En mezclas de APSL con xantana a pH neutro o más alto también predomina la separación de fases segregativa (Sánchez *et al.*, 1997).

Cuando se mezclan las variantes de carragenina que forman geles (*kappa* o *iota*) con micelas de caseína a una temperatura mayor a la temperatura de transición hebra – hélice del polisacárido, se observó separación de fases a través del proceso de agotamiento – floculación (Langendorff *et al.*, 2000). Mezclas de polisacáridos exocelulares con micelas de caseína (Tuinier *et al.*, 1999) y con agregados de APSL (de Kruif y Tuinier, 1999) han generado el mismo resultado.

Gaaloul *et al.* (2009) reportan el fenómeno de segregación para el sistema APSL / κ -carr, observándose la separación de fases a pH neutro y 22° C, además comparan el diagrama de fases obtenido para las mezclas en condiciones estáticas y en condiciones de cizalla. Encontraron que el proceso de cizalla afecta la separación de fases causando un cambio en la posición de la binodal hacia concentraciones menores de APSL.

Chun *et al.* (2014) han estudiado sistemas compuestos por APSL y diferentes polisacáridos. Obtuvieron un diagrama de fases (**Figura 6**) para el sistema APSL / λ -car, reportan la zona de incompatibilidad a partir de una concentración de 0.15% (m/v) de λ -car y de 1.5 a 4% (m/v) de APSL.



Chun *et al.*, 2014

Figura 6. Diagrama de fases del sistema APSL / λ -car.

En el mismo artículo también reportan formación de coacervados a pH de APSL de 4 y 5, cuando el pH es de 6 se inhibe la formación de coacervados y los biopolímeros se tornan incompatibles por las interacciones repulsivas entre ellos dando origen a la separación de fases segregativa.

2. JUSTIFICACIÓN

En alimentos y productos de consumo, la adición de macromoléculas en una formulación produce cambios en los atributos sensoriales y estabilidad física; la capacidad de predecir el comportamiento de los biopolímeros en alimentos es crítica en la búsqueda de la calidad óptima y, por esta razón, las interacciones entre dichos componentes en alimentos deben ser ampliamente investigadas.

El comportamiento de fases de mezclas proteína-polisacárido es clave para el desarrollo de alimentos formulados y para mejorar los procesos convencionales de alimentos. La separación de fases es un fenómeno generalmente no deseado y es indicativo de mala calidad en muchos alimentos.

Las aplicaciones de λ -car se presentan típicamente en productos lácteos por lo que es importante estudiar las interacciones con las proteínas de la leche, además el hecho de que λ -car no forme geles facilita su estudio. El motivo de agregar sal al sistema fue asegurar la completa disolución de las proteínas (*salting in*) y se seleccionó el pH neutro debido a que es el que predomina en las preparaciones alimentarias. La obtención del diagrama de fases para el sistema λ -car / APSL en medio acuoso es fundamental para predecir y suprimir la separación de fases en productos en cuya formulación estén presentes estos ingredientes.

3. HIPÓTESIS

El sistema λ -car / APSL en medio acuoso, a un pH neutro, presentará interacciones segregativas dando origen a dos fases inmiscibles en equilibrio, enriquecida cada una en un componente (λ -car y APSL). A dicho pH ambos biopolímeros están cargados negativamente por lo que son incompatibles termodinámicamente.

4. OBJETIVO

Obtener el diagrama de fases para el sistema λ -car / APSL en medio acuoso a pH neutro y una concentración salina de 0.1 mol/dm^3 , para determinar las interacciones entre dichas moléculas y cómo afectan las condiciones seleccionadas en el fenómeno estudiado.

5. MATERIALES

El APSL en polvo (Prolacta 90, Francia) utilizado se obtuvo de Lactalis Ingredients, el proveedor reporta un contenido mínimo de proteína de 90 %. La λ -car (Viscarin GP 109F, México) se compró a Ingredientes Alimenticios, de acuerdo con el fabricante dicho producto no contiene otras gomas, polisacáridos, sal o azúcares. No se realizaron procesos previos de purificación o térmicos en ninguno de los materiales utilizados.

6. METODOLOGÍA

6.1. Caracterización de APSL y λ -car.

6.1.1. Determinación de humedad.

La humedad del APSL y la λ -car se determinó utilizando una termobalanza (Ohaus MB 45, E.E.U.U.). Se colocó 1 g de muestra y se calentó a 100° C durante 10 min. La determinación se realizó por triplicado.

6.1.2. Determinación de hidratos de carbono.

Para cuantificar los hidratos de carbono presentes en el APSL y la λ -car se siguió el método espectrofotométrico descrito por Dubois *et al.* (1956) utilizando lactosa (J. K. Baker, México) como referencia para APSL y galactosa (J. K. Baker, México) para λ -car. Se prepararon 5 soluciones de cada referencia (0.02, 0.04, 0.06, 0.08 y 0.1 mg mL⁻¹) para realizar las curvas tipo, una solución de APSL (3 mg mL⁻¹) y una solución de λ -car (0.1 mg mL⁻¹).

Se colocó 1 mL de cada disolución en un tubo de ensayo, se adicionó 1 mL de fenol (Sigma, E.E.U.U.) al 5% (m/m) y 5 mL de ácido sulfúrico concentrado (J. K. Baker, México). Los tubos se dejaron reposar por 10 min, después se agitaron en un vortex (Cole-Parmer, E.E.U.U.) por 10 s y se colocaron en un baño de agua a 25° C durante 20 min. La absorbancia se determinó a 490 nm en un espectrofotómetro (Termo Genesys 10, E.E.U.U.). El blanco se preparó utilizando agua destilada. El contenido de hidratos de carbono en el APSL y la λ -car se determinó utilizando como referencia las curvas tipo.

6.1.3. Determinación de proteínas.

El contenido de nitrógeno total se determinó por análisis elemental llevado a cabo por la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI). El contenido de proteína se calculó multiplicando el contenido total de nitrógeno por el factor de Kjeldahl correspondiente (6.38 para el APSL y 6.25 para la λ -car). La determinación se realizó por duplicado.

6.1.4. Determinación de densidad.

La densidad del APSL y la λ -car se determinó utilizando un picnómetro para líquidos de 50 mL. Se utilizó aceite de parafina (Hycel, México) debido a que no reacciona con los reactivos ni los disuelve. Se siguió el método descrito por Barbosa-Cánovas *et al.* (2005). El picnómetro se pesó vacío (m_0), posteriormente se colocó la muestra a 1/3 de su capacidad (*ca.* 10 g) y se pesó nuevamente (m_s), se adicionó aceite de parafina hasta llenar el picnómetro y se pesó (m_{sl}). Posteriormente el picnómetro limpio y a peso constante se llenó de aceite de parafina y se pesó (m_l). La densidad del polvo se calcula por medio de la siguiente ecuación:

$$\rho_s = \frac{(m_s - m_0)\rho}{(m_l - m_0) - (m_{sl} - m_s)} \quad (24)$$

6.2. Preparación de disoluciones stock

Las disoluciones stock de APSL (0.2 – 20% m/m) se prepararon disolviendo el polvo en una solución de NaCl (Sigma-Aldrich, Brasil) 0.1 mol/dm³ (5.84 g de NaCl en un litro de agua desionizada). Se mezclaron durante 3 horas con un agitador magnético (Thernolyne, Malasia). Posteriormente se ajustaron a pH 7 con una disolución de NaOH (Sigma-Aldrich, México) 1 mol/dm³. Las disoluciones stock de λ -car (0.1 – 2% m/m) se prepararon agregando lentamente el polvo en una solución de NaCl 0.1 mol/dm³, después se calentaron a 80 °C y se agitaron a 900 rpm durante 30 min. Se ajustaron a pH 7 con una disolución de HCl (J. K. Baker, México) 1 mol/dm³. Las disoluciones se mantuvieron en refrigeración.

6.3. Diagrama de fases

Se mezclaron 5g de disolución stock de APSL con 5 g de disolución stock de λ -car en un tubo Falcon y se agitaron manualmente hasta que la mezcla se tornó homogénea. Se dejaron reposar por 30 min, posteriormente se centrifugaron a 6000 rpm (2817 G) durante 30 min en una centrifuga de rotor vertical (Hermle Z200 A, E.E.U.U.) para asegurar una completa separación de fases, la cual se determinó visualmente. Con una micro-pipeta de 1 mL (Biopette, E.E.U.U.) se separó la fase superior (fase a) de la inferior (fase b) y se registró su masa. En el **Cuadro 4** se muestran las mezclas preparadas para obtener los puntos que generaron el diagrama de fases, cada experimento se realizó por triplicado.

Cuadro 4. Relación de las mezclas elaboradas para generar el diagrama de fases.

		$C_{stock} APSL \% (m/m)$												
		1	2	4	5	6	8	10	12	14	15	16	18	20
$C_{stock} \lambda\text{-car} \% (m/m)$	2.0	x	x		x			x			x			x
	1.5				x			x			x			x
	1.2			x	x	x								
	1.0	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
	0.8			x	x	x		x						
	0.6				x			x						
	0.5				x			x			x			x
	0.4							x						

6.3.1. Cálculo de composición de fases

Se tomaron 0.2 g de la fase a y se diluyeron en 25 mL de agua, posteriormente se usó el método de Dubois (descrito anteriormente en la sección 5.1.2) utilizando λ -car como referencia para determinar su concentración en la fase a.

Para determinar la concentración de APSL, se realizó la misma dilución, 0.2 g de fase a diluidos en 25 mL de agua, en un tubo de ensayo, a 1 mL de la disolución resultante se le agregaron 5 mL de reactivo de Lowry. El reactivo de Lowry consiste en 100 partes de una disolución de carbonato de sodio (J. K. Baker, E.E.U.U.) al 2% (m/v) y 0.1 mol/dm³ de NaOH, por una parte de sulfato cúprico (J. K. Baker, México) al 1% (m/v) y otra parte de tartrato sódico potásico (Mallinckrodt, Francia) al 2% (m/v). Posteriormente se agitó en un vortex (Cole-Parmer, E.E.U.U.) durante 5 s y se dejó reposar por 15 min, se adicionaron 0.5 mL de reactivo de Folin y Ciocalteu (Sigma-Aldrich, E.E.U.U.) 1N, se agitó en el vortex por 5 seg y se dejó reposar en oscuridad durante 50 min. Pasado el tiempo se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 550 nm. Se utilizó agua destilada para el blanco y se realizó una curva tipo de APSL como referencia. La composición de la fase b se calculó por diferencia de la siguiente forma. Se conoce la masa inicial de cada componente, que está dada por:

$$m_0^{APSL} = (C_0^{APSL} \times m_{mezcla}) \quad (25)$$

$$m_0^{\lambda-car} = (C_0^{\lambda-car} \times m_{mezcla}) \quad (26)$$

La masa de cada componente en la fase a se calcula a partir de las curvas de referencia:

$$m_a^{APSL} = \left(\frac{Abs\ 550nm - b}{m} \right) \left(\frac{25\ mL}{0.2\ g\ fase\ a} \right) (m_a) \quad (27)$$

$$m_a^{\lambda-car} = \left(\frac{Abs\ 490nm - b}{m} \right) \left(\frac{25\ mL}{0.2\ g\ fase\ a} \right) (m_a) \quad (28)$$

Donde m y b corresponden a la pendiente y ordenada al origen de la curva tipo respectiva, y m_a es la masa de la fase a. Conociendo la masa inicial y la que está presente en la fase a se puede calcular la masa de cada componente en la fase b.

$$m_b^{APSL} = m_0^{APSL} - m_a^{APSL} \quad (29)$$

$$m_b^{\lambda-car} = m_0^{\lambda-car} - m_a^{\lambda-car} \quad (30)$$

Con los datos de masa se calcula la composición de cada fase:

$$C_a^{APSL} = \frac{m_a^{APSL}}{m_a} \times 100 \quad (31) \quad C_a^{\lambda-car} = \frac{m_a^{\lambda-car}}{m_a} \times 100 \quad (32)$$

$$C_b^{APSL} = \frac{m_b^{APSL}}{m_b} \times 100 \quad (33) \quad C_b^{\lambda-car} = \frac{m_b^{\lambda-car}}{m_b} \times 100 \quad (34)$$

Los datos obtenidos se representan gráficamente en el diagrama de fases (**Figura 10**) descrito en la sección 7.2.2. En la **Figura 7** se presenta de forma esquemática el proceso descrito en la sección 6.3.

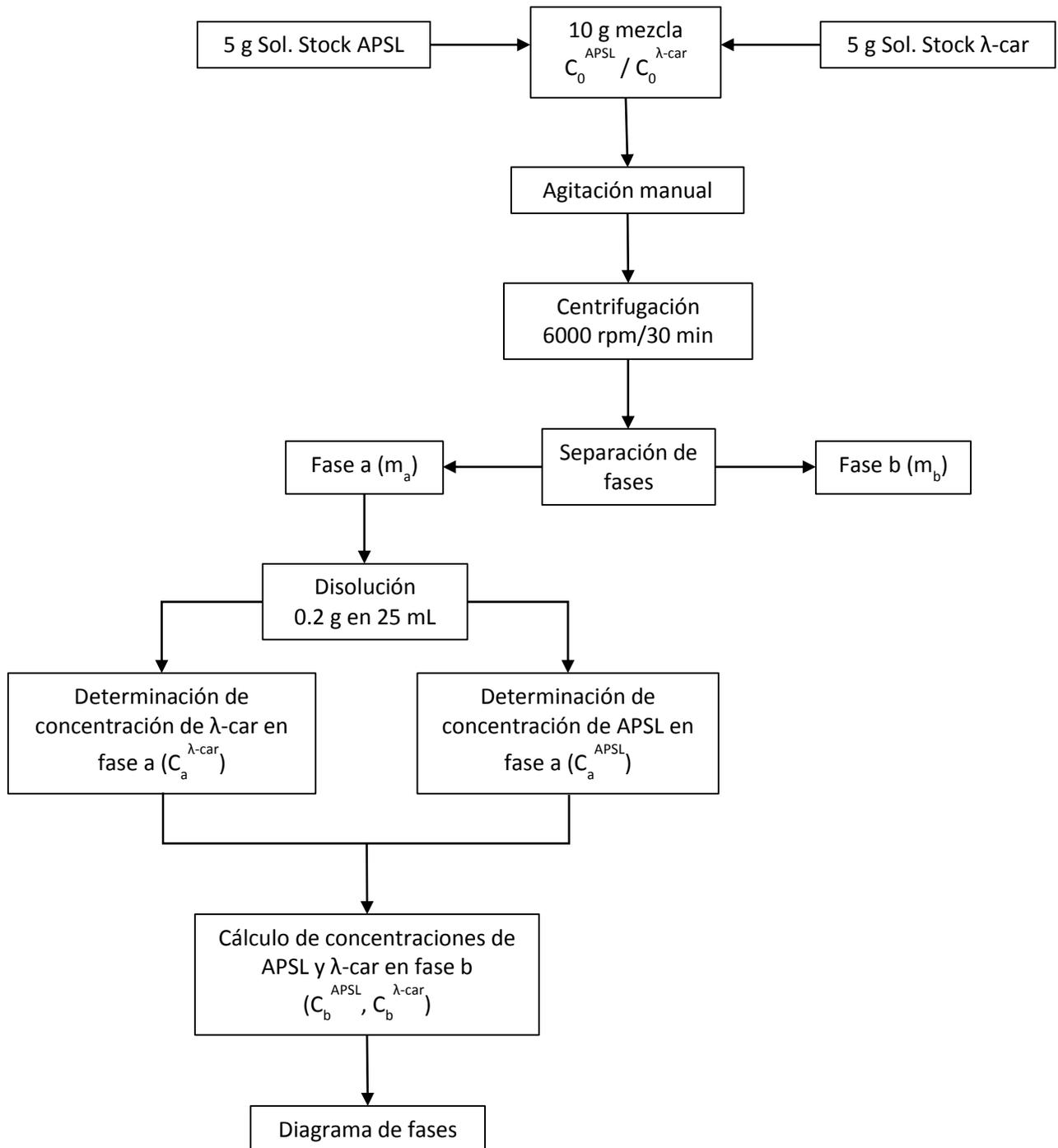


Figura 7. Protocolo experimental para obtener el diagrama de fases.

6.4. Obtención de los parámetros de interacción

Con base al desarrollo de Scott, se obtuvieron los parámetros de interacción del sistema estudiado siguiendo el proceso descrito a continuación. Los datos de composición en porcentaje se convirtieron en fracción volumen por medio de las siguientes ecuaciones:

$$\phi_{\lambda-car} = \frac{C_{\lambda-car}/\rho_{\lambda-car}}{C_{\lambda-car}/\rho_{\lambda-car} + C_{APSL}/\rho_{APSL} + (100 - C_{\lambda-car} - C_{APSL})} \quad (35)$$

$$\phi_{APSL} = \frac{C_{APSL}/\rho_{APSL}}{C_{\lambda-car}/\rho_{\lambda-car} + C_{APSL}/\rho_{APSL} + (100 - C_{\lambda-car} - C_{APSL})} \quad (36)$$

$$\phi_{agua} = 1 - \phi_{\lambda-car} - \phi_{APSL} \quad (37)$$

Donde C_i es la concentración del componente en porcentaje y ρ_i es la densidad. Sustituyendo los datos obtenidos experimentalmente de composición de fases en las ecuaciones 21 - 23 se obtuvo un sistema de tres ecuaciones con tres incógnitas que se resolvió con la herramienta *Find* del programa *Mathcad 14*.

Para poder aplicar dicha función se tomó el número de restos de aminoácidos de la β -lactoglobulina (162) como el grado de polimerización del APSL debido a que es la proteína en mayor proporción. Para el grado de polimerización de λ -car se supuso una masa molar de 600,000 g/mol y se dividió entre la masa molar de la unidad repetitiva (561.11 g/mol) para obtener un grado de polimerización de 1069.31 para λ -car.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Caracterización de APSL y λ -car

El **Cuadro 5** presenta el contenido de agua, proteínas e hidratos de carbono en el APSL y la λ -car.

Cuadro 5. Contenido de proteínas, hidratos de carbono y humedad en APSL y λ -car.

<i>Ingrediente</i>	<i>Fabricante</i>	<i>Proteína (%)</i>	<i>Hidratos de carbono (%)</i>	<i>Humedad (%)</i>
APSL (Prolacta 90)	Lactalis Ingredientes	91.88 ± 0.445	1.56 ± 0.003	8.20 ± 0.146
λ -car (Viscarin GP 109F)	Ingredientes Alimenticios	5.06 ± 0.265	58.45 ± 1.372	12.55 ± 0.201

Los hidratos de carbono presentes en APSL (lactosa) no son polisacáridos, por lo que no interfieren en el proceso de incompatibilidad termodinámica; el contenido de proteína en λ -car se evaluó por el método de nitrógeno total, por lo que la determinación podría presentar sobreestimación causada por la presencia de compuestos nitrogenados que no sean proteína. Además, suponiendo que realmente fuese proteína, la concentración máxima de λ -car utilizada fue de 2% (m/m) y el exceso de proteína adicionado por este medio no sobrepasaría 0.1 g, que es despreciable cuando se compara con la cantidad de proteína proveniente del APSL.

7.2. Diagrama de fases

7.2.1. Cálculo de composición de fases

Las curvas tipo utilizadas para determinar la concentración de APSL y λ -car se muestran a continuación.

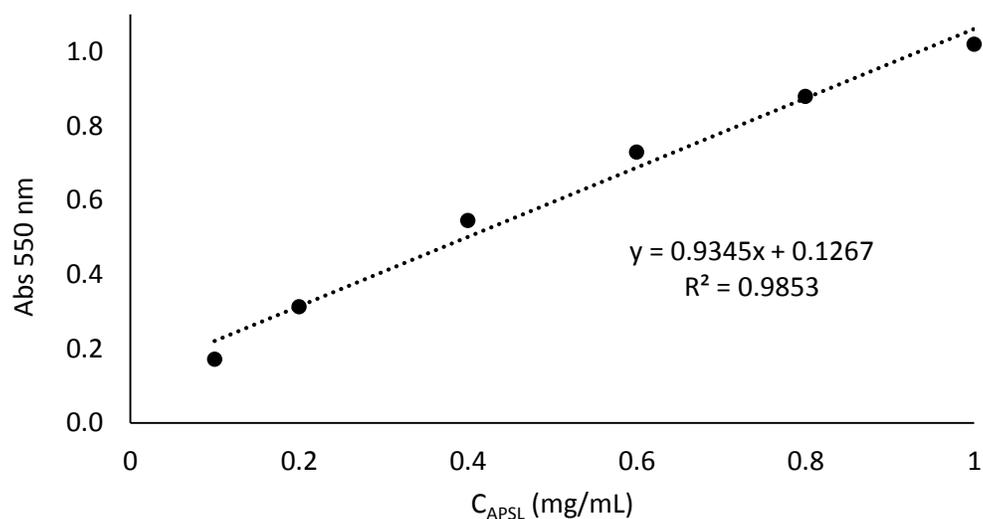


Figura 8. Curva tipo para determinación de concentración de APSL.

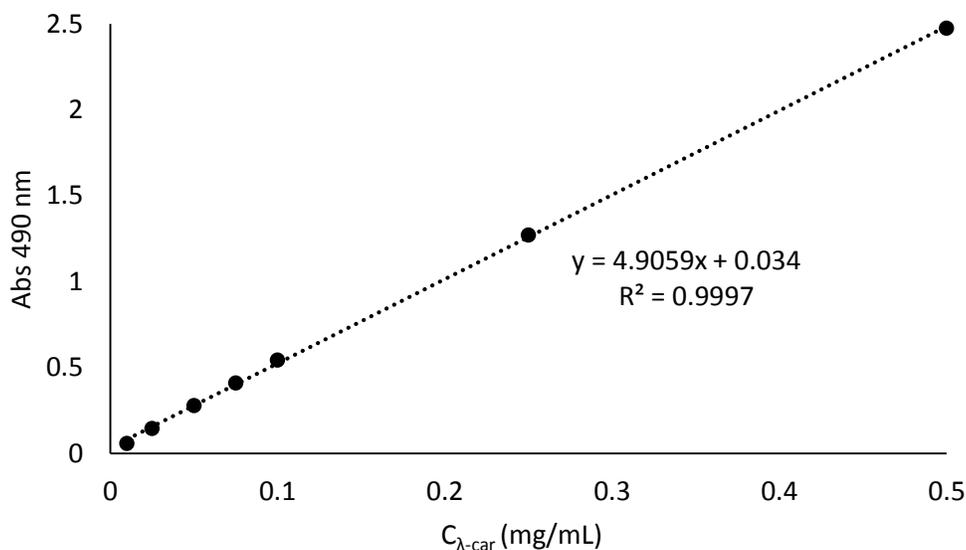


Figura 9. Curva tipo para determinación de concentración de λ -car.

Los coeficientes de correlación múltiple obtenidos (**Cuadro 6**) indican un alto grado de relación entre la concentración de cada componente y la respuesta determinada; R^2 indica que el 98% (para APSL) y el 99% (para λ -car) de la variación de la respuesta está explicada por la concentración del componente estudiado. Se calculó además el riesgo de que la curva de referencia no sea una recta a través de la función de regresión del programa estadístico *Statgraphics Centurión XVI*, obteniéndose valores que comprueban que efectivamente las curvas tipo son rectas.

Cuadro 6. Parámetros de las curvas tipo obtenidas.

<i>Parámetro</i>	<i>Curva tipo para determinación de APSL</i>	<i>Curva tipo para determinación de λ-car</i>
Pendiente	0.9345 mL/mg	4.9059 mL/mg
Ordenada al origen	0.1267	0.034
Coefficiente de correlación múltiple	0.9853	0.9997
Riesgo de que no sea una recta	$7.19 \times 10^{-75} \%$	$1.03 \times 10^{-125} \%$

A partir de las Figuras 8 y 9 se logró determinar la composición de APSL y λ -car en cada una de las fases y a partir de los datos obtenidos se construyó el diagrama de fases que se muestra a continuación.

7.2.2. Análisis del diagrama de fases

La **Figura 10** muestra el diagrama de fases experimental. Se presentan los datos obtenidos para tres experimentos, A, B y C (**Cuadro 7**). El punto marcado con un triángulo corresponde a la composición inicial del sistema, después de centrifugar se originan dos fases en equilibrio, los cuadros corresponden a la composición de cada fase y se conocen como nodos, la línea que los conecta (línea punteada) se conoce como línea de enlace (tie line).

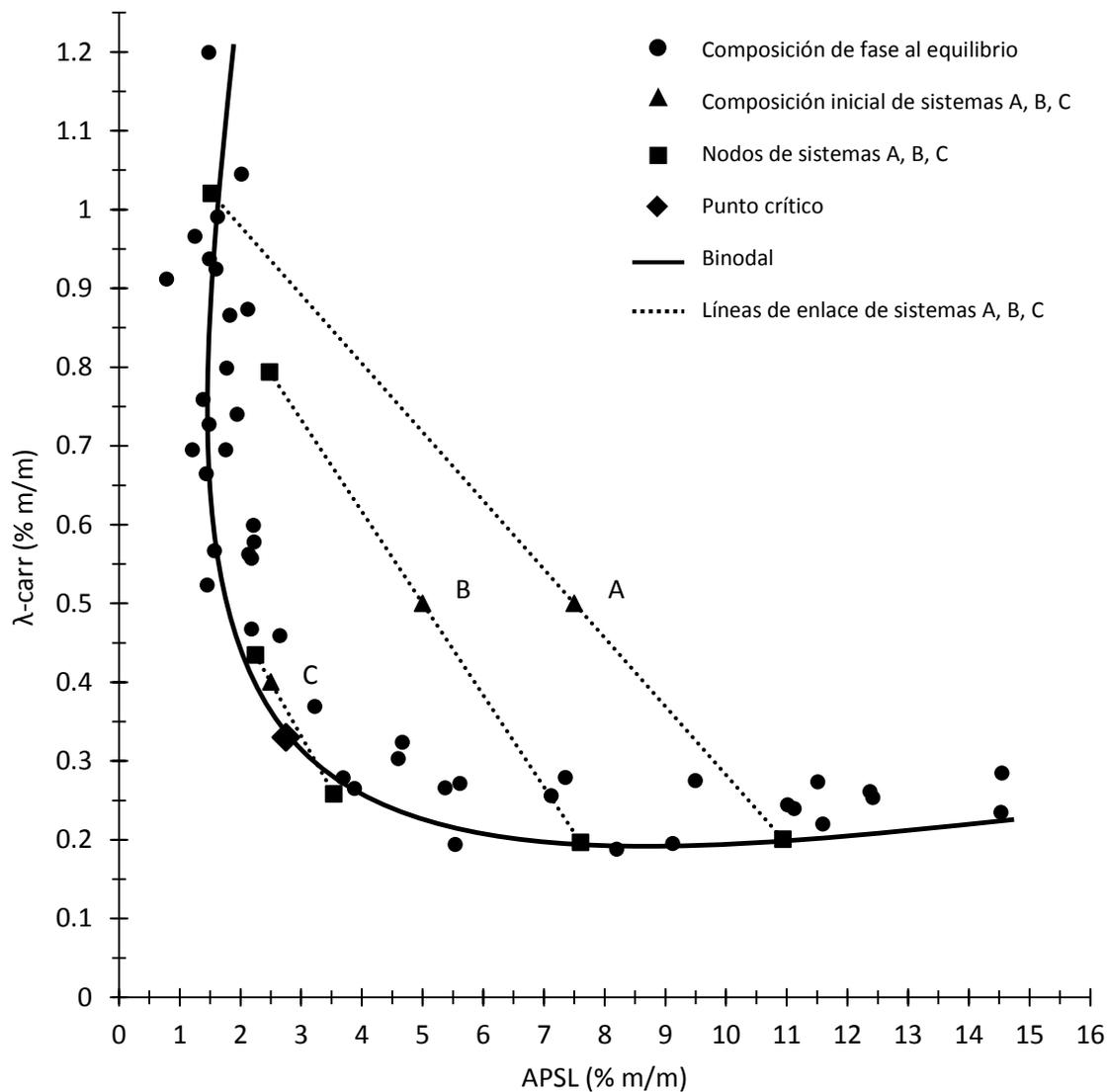


Figura 10. Diagrama de fases obtenido para el sistema APSL/λ-car en medio acuoso, pH neutro y 0.1 mol/dm³ de NaCl.

Cada círculo corresponde a la composición de una fase en equilibrio que se originó a partir de un sistema inicial, la curva que pasa a través de todos los círculos de composición de la fase superior y todos los círculos de composición de la fase inferior es la línea binodal. La binodal corresponde al límite de co-solubilidad de los biopolímeros; en la región debajo de esta, los biopolímeros son miscibles a nivel molecular y forman mezclas de una sola fase. En la región sobre la binodal la co-solubilidad es limitada dando origen a dos fases (Tolstogusov, 2003). En éste caso la línea binodal se sitúa por encima de concentraciones de APSL de 1% (m/m), y a partir de 0.2% (m/m) de λ -car, límites parecidos a los reportados por Chun *et al* (2014) para el mismo sistema (**Figura 6**).

El punto representado con un rombo es el punto crítico (punto en el que la pendiente de la línea de enlace es 0, determinado gráficamente), cuya composición es 2.75 % (m/m) APSL y 0.33 % (m/m) λ -car. De acuerdo con Kontogiorgos *et al.*, (2009), cuando existe incompatibilidad termodinámica entre los biopolímeros, la separación de fases se lleva a cabo a partir de una concentración total de biopolímero de 3 %. Por lo tanto la composición del punto crítico obtenido sugiere que existe incompatibilidad termodinámica en el sistema λ -car / APSL. Para las condiciones experimentales seleccionadas la estructura de β -lactoglobulina favorece la incompatibilidad termodinámica con la λ -car de dos formas; 1) los grupos polares expuestos, cargados negativamente a pH neutro, se repelen con los grupos aniónicos de λ -car y; 2) el hecho de que se encuentre formando dímeros a pH 7 (Creamer *et al.*, 2003) aumenta su tamaño como polímero de 18.3 kDa a 37.2 kDa y la separación de fases se produce más fácilmente cuanto mayor es el peso molecular del biopolímero (Scott, 1949).

La pendiente de la línea de enlace (PLE) es un parámetro importante que caracteriza el comportamiento de fases de la mezcla (Zaslavsky *et al.*, 1989), se puede calcular a partir de la siguiente ecuación:

$$PLE = \frac{\Delta(\lambda - car \%)}{\Delta(WPI \%)} \quad (29)$$

En el **Cuadro 7** se observa que la fase a se enriqueció en λ -car y la fase b en APSL lo que resulta en valores negativos para la PLE. Lo anterior demuestra que los biopolímeros estudiados son incompatibles termodinámicamente en las condiciones experimentales seleccionadas. Por otro

lado, una PLE positiva indicaría que ambos biopolímeros se concentraron en la misma fase, lo que sugeriría interacciones asociativas.

Cuadro 7. Datos de equilibrio de fases.

Experimento	Condiciones iniciales (%)		Fase a (%)		Fase b (%)		PLE
	C _{APSL}	C _{λ-car}	C _{APSL}	C _{λ-car}	C _{APSL}	C _{λ-car}	
A	7.5	0.5	1.52±0.066	1.02±0.155	10.94±0.224	0.20±0.065	-0.087
B	5	0.5	2.48±2.105	0.79±0.166	7.61±0.042	0.20±0.042	-0.117
C	2.5	0.4	2.25±0.020	0.43±0.011	3.54±0.12	0.26±0.045	-0.137

Se realizó un análisis de varianza de una vía con el programa *Statgraphics Centurion XVI* (**Anexo 1**) sobre los valores de PLE. Se determinó que no existe diferencia significativa entre dichos valores (para 95% de confianza). Lo anterior coincide con la observación de que en un diagrama de fases, las líneas de enlace tienen la misma pendiente.

Los diagramas de fases que se presentan a continuación (**Figura 11** y **Figura 12**) se construyeron con el objetivo de comprobar los límites de la línea binoidal obtenida en el diagrama de fases anterior (**Figura 10**).

Se prepararon mezclas de disoluciones de λ-car y APSL de diferentes concentraciones en una relación 1:1. Posteriormente se centrifugaron a 6000 (2817 G) rpm durante 30 min y todos los experimentos se realizaron por triplicado. Cada cuadro representa una mezcla con composición inicial diferente, un cuadro negro indica que dicha mezcla después de ser centrifugada generó dos fases. Por el contrario un cuadro blanco señala que no ocurrió separación de fases. En la **Figura 10** se observa que por debajo de una concentración de 0.1 % (m/m) de λ-car el sistema es estable, a partir de 0.15 % de λ-car el sistema se vuelve inestable dando origen a dos fases, por lo anterior se puede situar el límite de co-solubilidad por debajo de una concentración de λ-car de 0.15% (m/m).

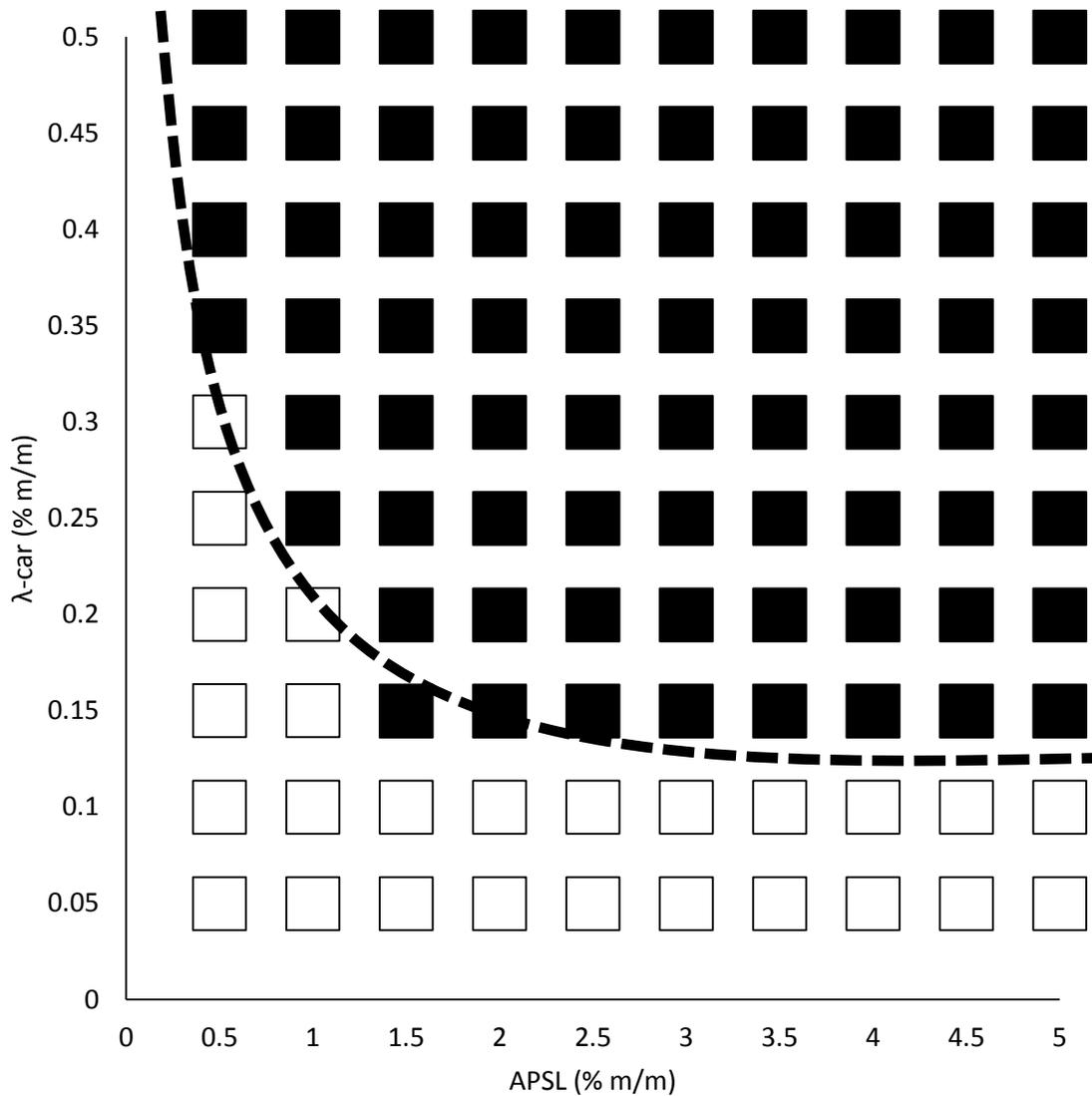


Figura 11. Primer diagrama de fases obtenido por determinaciones visuales.

□: una fase; ■: dos fases; ----: binodal

La concentración límite de APSL no se puede observar en el intervalo de concentraciones seleccionado. Para encontrarla se construyó un segundo diagrama de fases en el intervalo de concentraciones de APSL de 0.1 a 1% (m/m). En la **Figura 12** se observa que mientras aumenta la concentración de λ -car se requiere menos cantidad de APSL para generar un sistema inestable, pero se llega a una concentración límite cuando la concentración de APSL es 0.3 % (m/m). Con base a estos resultados se puede situar la línea binodal a partir de 0.3 % (m/m) de APSL y 0.15 % (m/m) de λ -car.

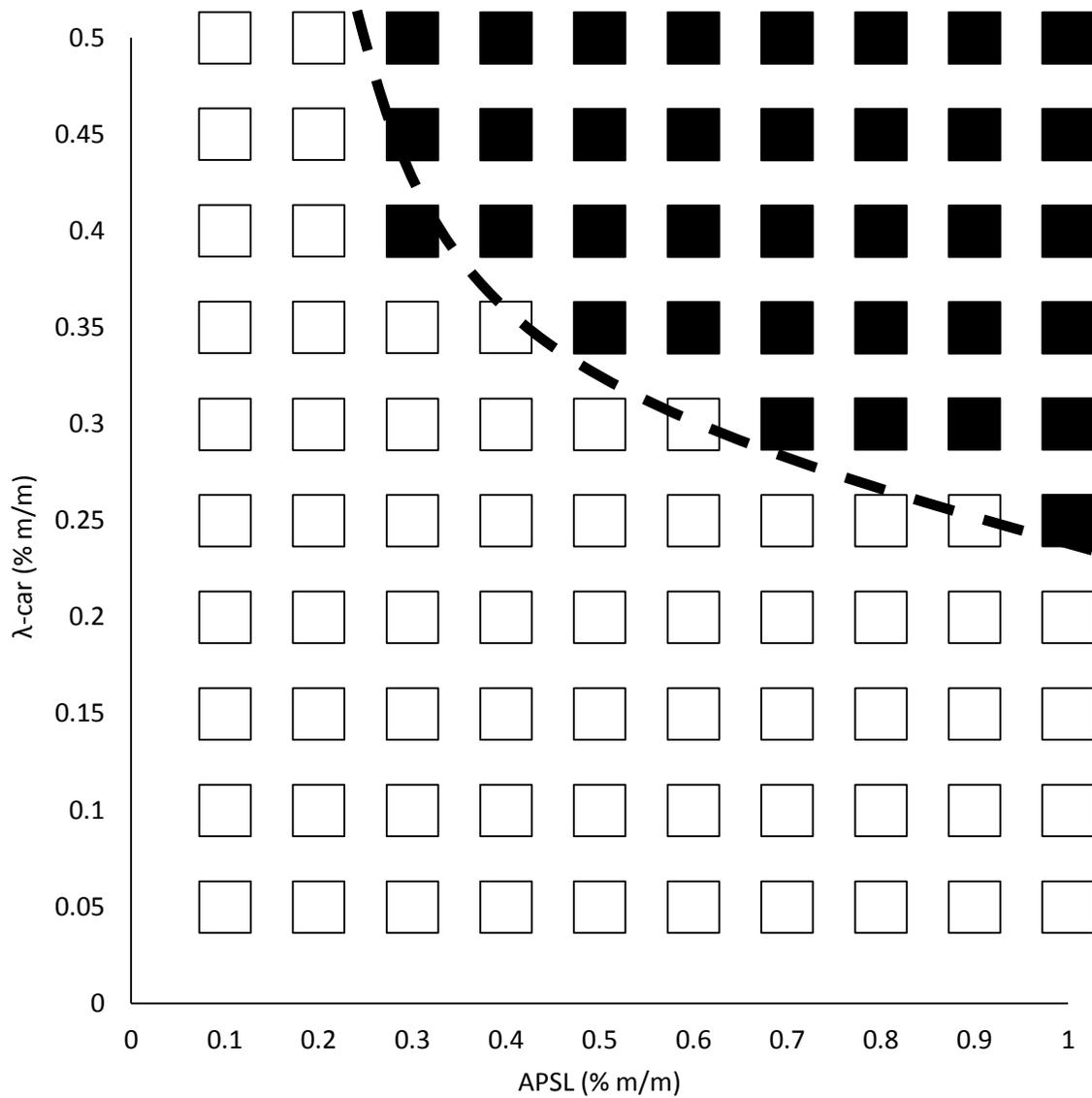


Figura 12. Segundo diagrama de fases obtenido por determinaciones visuales.

□: una fase; ■: dos fases; ----: binodal

Al comparar los límites de co-solubilidad encontrados en las **Figuras 11 y 12** (a partir de 0.3% (m/m) de APSL y 0.15% (m/m) de λ -car) con los obtenidos en el diagrama de la **Figura 10** (1% (m/m) de APSL y 0.2% (m/m) de λ -car) se puede observar que la concentración límite de λ -car es parecida en ambos casos (error relativo de 0.33), pero la concentración límite de APSL no coincide (error relativo de 2.33). Dicha diferencia podría ser consecuencia de un error al momento de determinar la separación de fases, o de la sensibilidad de los métodos espectrofotométricos utilizados para calcular la concentración de las fases en equilibrio.

7.3. Obtención de los parámetros de interacción

La densidad del APSL y la λ -car obtenida es de 0.959 ± 0.0004 y 1.596 ± 0.0124 g/mL respectivamente. Con estos valores se calcularon los datos de las fases al equilibrio en fracción volumen para el experimento A y se presentan en el **Cuadro 8**.

Cuadro 8. Datos de equilibrio de fases en fracción volumen para experimento A.

Fase a			Fase b		
ϕ_{APSL}	$\phi_{\lambda\text{-car}}$	ϕ_{agua}	ϕ_{APSL}	$\phi_{\lambda\text{-car}}$	ϕ_{agua}
0.0159	0.0064	0.9777	0.1136	0.0012	0.8851

Después de sustituir los datos anteriores en las ecuaciones 18 a 23 (sección 1.1.2.1.1, págs. 11 y 12) y resolverlas por medio de la función *Find* de *Mathcad 14* (**Anexo 2**) se obtuvieron los siguientes parámetros de interacción:

$$x_{12} = 0.516$$

$$x_{13} = 0.599$$

$$x_{23} = 0.058$$

El parámetro x_{23} corresponde a la interacción entre λ -car y APSL. El que dicho parámetro sea positivo indica interacciones repulsivas entre los biopolímeros presentes en la disolución de acuerdo con la Teoría de Flory-Huggins (Doublier *et al.*, 2000). El principal efecto del parámetro de interacción entre biopolímeros es sobre la entalpía de mezclado ΔH_m como se puede observar en la ecuación 6 (sección 1.1.2.1, pág. 8); si x_{23} es positivo también lo será ΔH_m contribuyendo desfavorablemente a la energía libre de mezclado ΔG_m y propiciado así la separación de fases.

Los parámetros de interacción x_{12} y x_{13} que corresponden con las interacciones agua - λ -car y agua - APSL, respectivamente, contribuyen a la entropía de mezclado ΔS_m (Scott, 1949).

8. CONCLUSIONES

Se logró obtener el diagrama de fases del sistema λ -car/APSL en medio acuoso, con 0.1 mol/dm^3 de NaCl y pH neutro. Dicho diagrama presenta una zona de dos fases por encima de una concentración de 0.2% (m/m) de λ -car y a partir de 1% (m/m) de APSL, con un punto crítico a 2.75% (m/m) de APSL y 0.33% (m/m) de λ -car.

La concentración total de biopolímero en el punto crítico ($\approx 3 \%$) y el valor negativo de la pendiente de la línea de enlace (-0.111 ± 0.0394) sugieren que el proceso de separación de fases se debe a la incompatibilidad termodinámica entre el APSL y la λ -car.

El valor obtenido del parámetro de interacción entre APSL y λ -car (0.058) indica que existen interacciones repulsivas entre dichos biopolímeros.

9. RECOMENDACIONES

El uso de métodos como conductividad eléctrica, dispersión de luz o microscopía para determinar la separación de fases podría mejorar los resultados presentados en las Figuras 11 y 12.

Comprobar si la Teoría de Flory-Huggins puede describir el sistema estudiado, es decir tratar de ajustar los datos experimentales obtenidos al modelo teórico.

10. BIBLIOGRAFÍA

Albertsson, P. A. 1971. *Partition of Cell Particles and Macromolecules*, 2nd ed. New York: Wiley.

Almutairi, F.M., Adams, G.G., Kök, M.S., Lawson, C.J., Gahler, R., Wood, S., Foster T.J., Rowe, A.J., Harding, S.E. 2013. An analytical ultracentrifugation based study on the conformation of lambda carrageenan in aqueous solution. *Carbohydrate Polymer*, 97(1): 203-209.

Anderson, N.S., Dolan, T.C.S., Rees, D.A. 1965. Evidence for a common structural pattern in the polysaccharide sulphates of the *Rhodphyceae*. *Nature*, 205: 1060-1062.

Antonov, Y.A., Losinskaya, N.V., Grinberg, V.Y., Dianova, V.T., Tolstoguzov, V.B. 1979. Phase equilibria in water-protein-polysaccharide systems - III. Water-soy bean globulins-polysaccharide systems. *Colloid and Polymer Science Kolloid-Zeitschrift & Zeitschrift für Polymere*, 257 (11): 1159-1171.

Asakura, S., Osawa, F. 1954. On interaction between two bodies immersed in a solution of macromolecules. *The Journal of Chemical Physics*, 22(7): 1255-1256.

Barbosa-Cánovas, G.V., Ortega-Rivas, E., Juliano, P., Yan, H. 2005. *Food Powders: Physical Properties, Processing, and Functionality* (pp. 221–244). New York: Kluwer Academic.

Bonferoni, M.C., Rossi, O., Tamayo, M., Pedraz, J.L., Dominguez-Gil, A., Caramella, C. 1994. On the employment of λ -carrageenan in a matrix system. II. λ -Carrageenan and hydroxypropylmethylcellulose mixtures. *Controlled Release*, 30: 175-182.

Campo, V., Kawano, D.F., Silva, D.B.Jr., Carvalho, I. 2009. Carrageenan: Biological properties, chemical modification and structure analysis: A review. *Carbohydrate Polymers*, 77:167-180.

Chun, J.-Y., Hong, G.-P., Surassmo, S., Weiss, J., Min, S.-G., Choi, M.-J. 2014. Study of the phase separation behaviour of native or preheated APSL with polysaccharides. *Polymer*, 55(16): 4379-4384.

Creamer, L.K., Parry, D.A.D., Malcolm, G.N. 1983. Secondary structure of bovine β -lactoglobulin B. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 227(1): 98-105.

Creamer, L.K., Sawyer, L. 2003. β -Lactoglobulin. En *Encyclopedia of Dairy Sciences*, H. Roginski, J.W. Fuquay & P.F. Fox (Eds.). New York: Academic Press.

De Gennes, P.G. 1979. *Scaling Concepts in Polymer Physics* (pp. 98-127). New York: Cornell University Press.

De Kruif, C. G., Tuinier, R. 1999. Whey protein aggregates and their interaction with exopolysaccharides. *International Journal of Food Science and Technology*, 34: 487-492.

De Kruif, C. G., Tuinier, R. 2001. Polysaccharide protein interactions. *Food Hydrocolloids*, 15: 555-563.

- Delano, W.L. 2002. PyMOL. Delano Scientific, Palo Alto, USA.
- Dereck, E.W.C., Geoffrey, S., Peter, R., André, B. 2006. Bioactivity of β -lactoglobulin and α -lactalbumin-technological implications for processing. *International Dairy Journal*, 16: 1229-1240.
- Doublier, J.L., Garnier, C., Renard, D., Sanchez, C. 2000. Protein-polysaccharide interactions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 5: 202-214.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3): 350-356.
- Edwards, P.J.B., Jameson, G.B. 2014. Structure and stability of whey proteins. En *Milk Proteins from Expression to Food* (pp. 201-243). 2nd edn. H. Singh, M. Boland, A. Thompson (Eds.) New Zealand: Elsevier Inc.
- Foegeding, E.A., Davis, J.P., Doucet, D., McGuffey, M.K. 2002. Advances in modifying and understanding whey protein functionality. *Trends in Food Science and Technology*, 13(5): 151-159.
- Gaaloul, S., Turgeon, S.L., Corredig, M. 2009. Influence of shearing on the physical characteristics and rheological behavior of an aqueous whey protein isolate – kappa- carrageenan mixture. *Food Hydrocolloids*, 23: 1243-1252.
- Goh, K.K.T., Sarkar, A., Singh, H. 2014. Milk protein-polysaccharide interactions. En *Milk Proteins from Expression to Food* (pp. 387-419). 2nd edn. H. Singh, M. Boland, A. Thompson (Eds.) New Zealand: Elsevier Inc.
- Grinberg, V. Ya., Tolstoguzov, V. B. 1997. Thermodynamic incompatibility of proteins and polysaccharides in solutions. *Food Hydrocolloids*, 11: 145-158.
- Ha, E., Zemel, M.B. 2003. Functional properties of whey, whey components, and essential amino acids: mechanisms underlying health benefits for active people (Review). *Journal of Nutritional Biochemistry*, 14: 251-258.
- Hoskins, A.R., Robb, I.D., Williams, P.A. 1998. Selective separation of proteins from mixtures using polysaccharides. *Biopolymers*, 45: 97-104.
- Imeson, A.P. 2009. Carrageenan and furcellaran. En *Handbook of Hydrocolloids* (pp. 164-185). 2nd ed. G.O. Phillips, P.A. Williams (Eds.) Boca Raton: CRC Press.
- Langendorff, V., Cuvelier, G., Michon C., Launary, B., Parker, A., de Kruif, C.G. 2000. Effects of carrageenan type on the behaviour of carrageenan / milk mixtures. *Food Hydrocolloids*, 14: 273-280.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry*, 193(1): 265-275.

Narayanan, X.Y.T., Tong, P., Huang, J.S., Lin, M.Y., Carvalho, B.L., Fetters, L.J. 1996. Depletion interactions in colloid-polymer mixtures. *Physical Review E*, 54(6): 6500-6510.

O'Regan, J., Ennis, M.P. & Mulvihill, D.M. 2009. Milk proteins. En *Handbook of Hydrocolloids* (pp. 298-358). 2nd edn. G.O. Phillips, P.A. Williams (Eds.) Boca Raton: CRC Press.

Patterson, D. 1982. Polymer compatibility with and without a solvent. *Polymer Engineering and Science*, 22(2): 64-73.

Rankin, D., Darragh, A. 2006. Dietary protein in an endurance exercise recovery beverage-What is the value of whey? En *Proceedings of the Fourth International Whey Conference* (pp. 13-24). Chicago: American Dairy Products Institute.

Rivera, A. 2013. *Influencia del ion sodio en las propiedades reológicas en solución acuosa de lambda carragenina*. México: UNAM, Facultad de Química. Tesis de Licenciatura en Química de Alimentos.

Sanchez, C., Schmitt, C., Babak, V.G., Hardy, J. 1997. Rheology of whey protein isolate xanthan mixed solutions and gels. Effect of pH and xanthan concentration. *Nahrung*, 41: 336-343.

Scott, R. L. 1949. The thermodynamics of high polymer solutions. V. Phase equilibria in the ternary system: polymer 1-polymer 2-solvent. *Journal of Chemical Physics*, 17: 279-284.

Schmitt, C., Sanchez, C., Desobry-Banon, S., Hardy, J. 1998. Structure and technofunctional properties of protein-polysaccharide complexes: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38(8): 689-753.

Shoveller, A.K., Stoll, B., Ball, R.O., Burrin, D.G. 2005. Nutritional and functional importance of intestinal Sulphur amino acid metabolism. *Journal of Nutrition*, 135: 1609-1612.

Smilowitz, J.T., Dillard, C.J., German, J.B. 2005. Milk beyond essential nutrients: The metabolic food. *Australian Journal of Dairy Technology*, 60: 77-83.

Smithers, G.W. 2008. Whey and whey proteins-From "gutter to gold". *International Dairy Journal*, 18: 695-704.

Syrbe, A., Bauer, W.J., Klostermeyer, H. 1998. Polymer science concepts in dairy systems - an overview of milk protein and food hydrocolloid interaction. *International Dairy Journal*, 8: 179-193.

Therkelsen, G.H. 1995. Carrageenan. En *Industrial Gum. Polysaccharides and their Derivatives* (pp. 145-180). R.L. Whistler & J.N. BeMiller (Eds.), San Diego: Academic Press. Inc.

Thomas, W.R. 1997. Carrageenan. En: *Thickening and Gelling Agents for Food* (pp. 45-59). 2nd ed. A.P. Imeson (Ed.), London: Academic Press Inc.

Tombs, M., Harding, S.E. 1998. *An Introduction to Polysaccharide Biotechnology*. London: Taylor and Francis Ltd.

Tolstoguzov, V. B. 1991. Functional properties of food proteins and role of protein-polysaccharide interaction. *Food Hydrocolloids*, 4: 429-468.

Tuinier, R., ten Grotenhuis, E., Holt, C., Timmins, P.A., de Kruif C.G. 1999. Depletion interaction of casein micelles and an exocellular polysaccharide. *Physical Review E*, 60: 848-856.

Walter, H., Brooks, D. E., Fisher, D. 1985. *Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems*. New York: Academic Press.

Zadow, J. G. 1994. Utilization of milk components: whey. En *Modern Dairy Technology, Advances in Milk Processing* (pp. 313-373). 2nd ed. R.K. Robinson (Ed.), London: Chapman & Hall.

Zaslavsky, B. Y., Bagirov, T. O., Borovskaya, A. A., Gulaeva, N. D., Miheeva, L. M., Mahmudov, A. U. 1989. Structure of water as a key factor of phase separation in aqueous mixtures of two nonionic polymers. *Polymer*, 30: 2104-2111.

ANEXOS

Anexo 1. Análisis estadístico de PLE

Se analizaron los datos de PLE de los experimentos A, B y C.

Cuadro A1. PLE obtenidos para tres sistemas iniciales

<i>Experimento</i>	<i>PLE</i>		
A	-0.0727	-0.0719	-0.1162
B	-0.1152	-0.0976	-----
C	-0.0909	-0.1286	-0.1943

Se determinó si los datos se ajustan a una distribución normal. Por medio de la función *Análisis de una variable* del programa *Statgraphics Centurion XVI* se obtuvieron los valores de sesgo estandarizado (-1.65) y curtosis estandarizada (1.52), dichos valores están dentro del intervalo esperado para datos provenientes de una distribución normal (-2 a +2). Una vez que se comprobó que los datos provienen de una distribución normal se realizó el análisis de varianza. Los resultados se presentan en el siguiente cuadro.

Cuadro A2. ANOVA para PLE

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>P</i>
Entre grupos	0.0039561	2	0.00197805	1.43	0.3228
Intra grupos	0.0069165	5	0.00138329		
Total	0.0108726	7			

Como $P > 0.05$ se comprueba que no existe diferencia estadísticamente significativa entre la media de PLE entre un experimento y otro con un nivel del 95% de confianza.

Anexo 2. Obtención de parámetros de interacción en *Mathcad 14*

Se definieron las variables de composición de fases y grados de polimerización, se dieron valores arbitrarios a las variables que se querían hallar:

$$\begin{aligned}
 l_u &:= 0.0064 & w_u &:= 0.0159 & a_u &:= 0.9777 \\
 l_d &:= 0.0012 & w_d &:= 0.1136 & a_d &:= 0.8851 \\
 N_l &:= 1069.31 \\
 N_w &:= 162 \\
 x &:= 1 & y &:= 1 & z &:= 1
 \end{aligned}$$

Se inició el bloque de solución con el código “Given” y se escribieron las ecuaciones 21 – 23.

Given

$$\ln(\text{au}) + (1 - \text{NI}^{-1}) \cdot \text{lu} + (1 - \text{Nw}^{-1}) \cdot \text{wu} + x \cdot \text{lu}^2 + y \cdot \text{wu}^2 + (x + y - z) \cdot \text{lu} \cdot \text{wu} = \ln(\text{ad}) + (1 - \text{NI}^{-1}) \cdot \text{ld} + (1 - \text{Nw}^{-1}) \cdot \text{wd} + x \cdot \text{ld}^2 + y \cdot \text{wd}^2 + (x + y - z) \cdot \text{ld} \cdot \text{wd}$$

$$\ln(\text{lu}) + (1 - \text{NI}) \cdot \text{au} + \left(1 - \frac{\text{NI}}{\text{Nw}}\right) \cdot \text{wu} + \text{NI} \cdot [x \cdot \text{au}^2 + z \cdot \text{wu}^2 + (x + z - y) \cdot \text{au} \cdot \text{wu}] = \ln(\text{ld}) + (1 - \text{NI}) \cdot \text{ad} + \left(1 - \frac{\text{NI}}{\text{Nw}}\right) \cdot \text{wd} + \text{NI} \cdot [x \cdot \text{ad}^2 + z \cdot \text{wd}^2 + (x + z - y) \cdot \text{ad} \cdot \text{wd}]$$

$$\ln(\text{wu}) + (1 - \text{Nw}) \cdot \text{au} + \left(1 - \frac{\text{Nw}}{\text{NI}}\right) \cdot \text{lu} + \text{Nw} \cdot [y \cdot \text{au}^2 + z \cdot \text{lu}^2 + (y + z - x) \cdot \text{au} \cdot \text{lu}] = \ln(\text{wd}) + (1 - \text{Nw}) \cdot \text{ad} + \left(1 - \frac{\text{Nw}}{\text{NI}}\right) \cdot \text{ld} + \text{Nw} \cdot [y \cdot \text{ad}^2 + z \cdot \text{ld}^2 + (y + z - x) \cdot \text{ad} \cdot \text{ld}]$$

Finalmente, se aplica la función *Find*

$$\text{Find}(x, y, z) = \begin{pmatrix} 0.516 \\ 0.599 \\ 0.058 \end{pmatrix}$$