



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE QUÍMICA

**DESARROLLO DE BIOPELÍCULAS CON ACTIVIDAD  
ANTIOXIDANTE Y EVALUACIÓN DEL FACTOR DE  
PROTECCIÓN EN ALIMENTOS**

T E S I S  
Que para obtener el título de  
QUÍMICA DE ALIMENTOS  
P R E S E N T A  
BERENICE SILVA NAVARRO



México D.F.

2009



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: Prof. Ma. De los Ángeles Valdivia López

VOCAL: Prof. Hermilo Leal Lara

SECRETARIO: Prof. Luz Sandra Sánchez del Ángel

1er. SUPLENTE: Prof. Alberto Tecante Coronel

2° SUPLENTE: Prof. Bertha Julieta Sandoval Guillén

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 322-323, Conjunto E, Facultad de Química, UNAM

ASESOR DEL TEMA

---

Ma. de los Ángeles Valdivia López

SUPERVISOR TÉCNICO

---

Alberto Tecante Coronel

SUSTENTANTE

---

Berenice Silva Navarro

## **AGRADECIMIENTOS**

A la M. en C. María de los Ángeles Valdivia López por darme la oportunidad de realizar este proyecto para mi desarrollo profesional, así como su confianza y tiempo.

A la Q.F.B. Julieta Sandoval Guillén por su gran apoyo, sus enseñanzas, consejos y amistad durante mi estancia en el laboratorio. Muchas gracias.

Al Dr. Alberto Tecante por su dedicación y tiempo para la revisión y realización de este trabajo.

A la DGAPA-UNAM por el apoyo financiero brindado para este trabajo dentro del proyecto IN204306-3 "Estudio y evaluación de las propiedades funcionales de empaque y recubrimiento de membranas de hidrogeles de polisacáridos"

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química por haberme formado como profesionista.

## AGRADECIMIENTOS

**A mi familia:** mis papas, mi hermano y mi abuelita. Por su gran apoyo, amor y alegría. Este trabajo y mi esfuerzo se los dedico

A mis amigos Myrna, Mariana, Toño y Pako por compartir todas mis alegrías y malos momentos. Los quiero mucho. Gracias en especial a Jerry por haberme brindado todo su apoyo y amistad durante la realización de este proyecto.

A mis compañeros de laboratorio Luis, Aida, Adriana, Nayeli, Fanny, Lucy, Juan, Claudia, Mónica y Miguel por su compañía y ayuda.

ÍNDICE	Página
<b>RESUMEN</b> .....	4
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	5
<b>Capítulo 1. ANTECEDENTES</b> .....	7
1.1    Semilla de chía.....	7
1.1.1    Composición.....	7
1.2.    Antioxidantes naturales .....	8
1.2.1.    Actividad antioxidante de la chía.....	10
1.3.    Empaques.....	13
1.3.1.    Películas biodegradables.....	13
1.3.2.    Empaques activos.....	15
1.4.    Trabajos previos.....	18
<b>OBJETIVOS</b> .....	20
Objetivo general.....	20
Objetivos particulares.....	20
<b>Capítulo 2. MATERIAL Y MÉTODO</b> .....	21
2.1    Diagrama General de Investigación.....	21
2.2    Obtención del concentrado proteínico.....	22
2.3    Caracterización del concentrado proteínico.....	23
2.4    Extracción de polifenoles de semilla de chía.....	24
2.4.1    Determinación de polifenoles totales.....	24
2.5    Evaluación de la actividad antioxidante de los extractos.....	25
2.5.1    Capacidad secuestrante del radical DPPH•.....	25
2.5.2    Capacidad secuestrante del radical ABTS•+.....	26
2.6    Formación de biopelículas activas de chía.....	27

2.6.1	Ensayo cualitativo de la formación de películas activas de chía.....	27
2.6.2	Confirmación de la incorporación de polifenoles naturales en biopelículas activas de chía.....	28
2.7	Evaluación de las propiedades de barrera.....	28
2.7.1	Permeabilidad al vapor de agua.....	28
2.7.2	Permeabilidad al oxígeno.....	30
2.8	Evaluación de la funcionalidad de las biopelículas activas.....	32
2.9	Análisis cualitativo de biodegradación de plásticos.....	35
<b>Capítulo 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>		<b>36</b>
3.1	Obtención del concentrado proteínico.....	36
3.2	Caracterización del concentrado proteínico.....	36
3.2.1	Determinación de proteína total.....	36
3.2.2	Determinación de proteína soluble.....	37
3.3	Extracción de polifenoles de semilla de chía.....	38
3.3.1	Determinación de polifenoles totales.....	38
3.4	Evaluación de la actividad antioxidante de los extractos.....	39
3.4.1	Capacidad secuestrante del radical DPPH•.....	39
3.4.2	Capacidad secuestrante del radical ABTS <sup>+</sup> •.....	40
3.5	Incorporación de antioxidantes naturales en biopelículas de chía.....	42
3.6	Confirmación de la incorporación de polifenoles naturales en biopelículas activas de chía.....	45
3.6.1	Determinación de polifenoles totales.....	45
3.6.2	Evaluación de la actividad antioxidante de las biopelículas activas.....	46
3.7	Evaluación de las propiedades de barrera.....	49
3.7.1	Permeabilidad al vapor de agua.....	49
3.7.2	Permeabilidad al oxígeno.....	51

3.8 Evaluación de la funcionalidad de las biopelículas activas como barreras protectoras de alimentos.....	53
3.8.1 Primer Ensayo.....	53
3.8.2 Segundo Ensayo.....	59
3.9 Análisis cualitativo de biodegradación de plásticos.....	67
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>70</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>72</b>



## RESUMEN

Se realizó la extracción de polifenoles de la semilla de chía bajo condiciones ácidas, obteniéndose extractos con buena actividad antioxidante, superior al 85%, determinada por los ensayos de capacidad secuestrante de los radicales DPPH• y ABTS<sup>+</sup>•. Los extractos obtenidos se usaron para elaborar biopelículas activas, preparadas a partir de concentrado de proteína de chía y glicerol como plastificante. Se encontró que se pueden incorporar en niveles de concentración que caen en el intervalo de 200 ppm hasta 600 ppm. La presencia de los polifenoles naturales en las biopelículas se confirmó a través de su cuantificación y medición de su actividad antioxidante.

Las películas activas obtenidas fueron sometidas a pruebas de barrera: permeabilidad al vapor de agua y al oxígeno, encontrándose que pueden actuar como protectoras eficientes de alimentos. Se evaluó el efecto de protección de las biopelículas activas frente a la oxidación de lípidos para lo cual se seleccionó cacahuete debido a su alta susceptibilidad al deterioro. Se encontró que las películas activas de semilla de chía brindan un efecto de protección superior al de los plásticos sintéticos y al ofrecido por las películas proteínicas de chía sin antioxidantes. Asimismo se estableció que las biopelículas de chía tienen un mayor grado de biodegradabilidad que las películas a base de celulosa usadas como referencia; de igual forma demostraron ser inocuas cuando se probaron en un medio que contenía bacterias y protozoarios.

## INTRODUCCIÓN

La función principal del empaque de productos alimenticios es proporcionarles protección frente a cambios físicos y químicos, contaminaciones microbianas y presentar atractivamente el producto para el consumidor. La utilización de polímeros sintéticos es vital para la economía, pero los residuos que generan a partir de ellos llegan a ser un serio problema ecológico mundial (Bertuzzi et al, 2002). En los últimos años se han incrementado los esfuerzos por encontrar materiales biodegradables, si es posible de residuos industriales reciclables o de recursos renovables. Esta misma sensibilidad se observa en la literatura científica reciente enfocada a películas y recubrimientos comestibles y/o biodegradables (Gómez-Guillén et al, 2007).

Muchos biopolímeros, incluyendo polisacáridos, proteínas y lípidos han sido empleados para obtener películas biodegradables. Además estas pueden ayudar significativamente en la reducción de las consecuencias ambientales de los embalajes.

Existen diferentes sistemas de embalaje que permiten tener un mayor y mejor control de calidad de los alimentos empacados dentro de los cuales se encuentran los llamados empaques activos. Estos empaques se refieren a la incorporación de ciertos aditivos en los sistemas de empacado con el objetivo de mantener o extender la calidad y vida de anaquel de los productos (Kerry et al, 2006).

Los empaques sintéticos tienen ventajas, varias modificaciones interesantes sobre películas sintéticas han sido descritas, sobretodo, para evitar las reacciones de oxidación a través de la incorporación de antioxidantes como hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), extracto de romero y  $\delta$ -tocoferol, así como el uso de extractos de antioxidantes naturales (Hui et al, 2006).

Se sabe que las películas biodegradables pueden proteger productos perecederos del deterioro al retardar la deshidratación, ayudar a retener compuestos volátiles de sabor y

reducir el crecimiento microbiano. También podrían ser usadas como un vehículo para incorporar ingredientes funcionales como antioxidantes, saborizantes y agentes antimicrobianos (Bifani et al, 2007).

La chía es una planta que posee 19-23% de proteína. Este porcentaje se compara favorablemente con el de otros granos como el trigo (14%), maíz (14%), arroz (8,5%) avena (15,3%), cebada (9,2%) y amaranto (14,8%) (Beltrán-Orozco y Romero, 2002). El concentrado proteínico de esta semilla logra la formación de una película, la cual presenta buena textura y flexibilidad, así como propiedades mecánicas y de barrera aceptables (Hernández Jardón, 2007). Además, Alvarado Suárez (2008) observó que esta muestra un marcado efecto de protección en la oxidación de alimentos, superior al de plásticos sintéticos de polietileno de baja densidad (LDPE) y cloruro de polivinilo (PVC).

Por otra parte se ha encontrado que los extractos de agua y etanol de la semilla de chía muestran una fuerte actividad antioxidante dentro de los cuales los polifenoles más importantes son el ácido caféico y los flavonoides. También se ha demostrado que la actividad antioxidante de los extractos de chía puede prevenir la oxidación lipídica de manera eficiente dentro de un sistema alimenticio complejo (emulsión w/o) (Reyes Caudillo, 2006).

En este estudio se plantea conocer el efecto de protección sobre los lípidos de las biopelículas activas, elaboradas a partir de concentrado proteínico de chía con la incorporación de antioxidantes naturales propios de la semilla.

## CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

### 1.1 SEMILLA DE CHÍA

La chía (*Salvia sp.*) es una pequeña planta herbácea anual de verano perteneciente a la familia de las Lamiaceae. El fruto de la planta de chía contiene cuatro semillas ovales de unos dos milímetros de largo por uno y medio de ancho, son lisas, brillantes, de color oscuro y con manchas irregulares de color rojizo (Figura 1). El género *Salvia* se encuentra ampliamente distribuido en el mundo con alrededor de 900 especies, muchas de estas son utilizadas con fines terapéuticos y culinarios (Hernández Jardón, 2007).

En México esta planta es originaria de las áreas montañosas del oeste central. Las formas silvestres se dispersan a través de la Sierra Madre Occidental de Sonora y Chihuahua.



Figura 1. Semilla de chía

#### 1.1.1 COMPOSICIÓN

Se ha determinado que las semillas de chía contienen cantidades de aceite que varían entre 32-39%. Dicho aceite junto con el de lino, ofrecen el porcentaje natural conocido más elevado de ácido  $\alpha$ -linolénico. La semilla de chía contiene 19-23% de proteína. Este porcentaje se compara favorablemente con el de otros granos como el trigo (14%), maíz (10-14%), arroz (8,5%) avena (15,3%), cebada (9,2%) y amaranto (14,8%).

La chía también posee características funcionales de gran importancia que han sido estudiadas con anterioridad. Se ha encontrado que entre las proteínas de la chía destacan las glutelinas que poseen gran estabilidad térmica y capacidad de retención de agua y aceite. También se encontró que el aceite de la chía contiene fitoesteroles que pueden estar relacionados con actividad nutracéutica (Cruz Pérez, 2008). Por otra parte Reyes Caudillo (2006) concluyó que esta semilla tiene un alto contenido de fibra dietética brindando propiedades de capacidad de retención de agua y estabilización de emulsiones. Adicionalmente la chía posee extractos con compuestos naturales polifenólicos que pueden retardar la oxidación lipídica en sistemas alimentarios.

## **1.2 ANTIOXIDANTES NATURALES**

Un antioxidante es una sustancia que cuando se presenta en bajas concentraciones comparada con el sustrato oxidable, previene significativamente la oxidación de dicho sustrato. Los antioxidantes retardan el inicio o disminuyen la velocidad de oxidación actuando como secuestradores de radicales o reduciendo parte de los hidroperóxidos formados. Durante el almacenamiento de grasas y aceites así como de otros alimentos que contienen grasas, la oxidación lipídica es la mayor causa de deterioro de calidad de los alimentos y conlleva al amplio uso de diversos antioxidantes.

Los antioxidantes sintéticos más ampliamente utilizados como el hidroxianisol butilado (BHA), el hidroxitolueno butilado (BHT) y la terbutilhidroquinona (TBHQ), son ligeramente volátiles y se descomponen fácilmente a elevadas temperaturas (Figura 2).

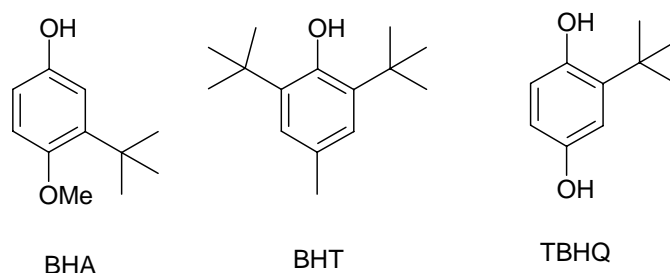


Figura 2. Antioxidantes sintéticos

El creciente conocimiento acerca de los efectos de promoción de la salud de los antioxidantes en los alimentos cotidianos, en combinación con la hipótesis de que un número de conservadores sintéticos pueden tener efectos peligrosos, ha dado lugar a múltiples investigaciones en el campo de los antioxidantes naturales. Hasta ahora, la mayor atención se ha prestado a los aditivos alimentarios obtenidos a partir de plantas aromáticas como el romero y los extractos de salvia (Peschel et al., 2006). Además, se ha incrementado la preferencia de los consumidores por evitar los aditivos sintéticos en favor de los que perciben como naturales, debido a su mayor seguridad y menor toxicidad (Nerín et al., 2008).

Son muchos y muy distintos los materiales vegetales que recientemente se han convertido en uno de los principales intereses de la investigación científica debido a la formación natural de antioxidantes. Los extractos de salvia o romero, otras hierbas, especias, cultivos de cereales, cortezas y raíces son fuentes de compuestos naturales con actividad antioxidante. Estos compuestos son tocoferoles, fosfolípidos, aminoácidos, péptidos y compuestos fenólicos (Matthäus, 2002).

Los extractos de plantas y especias ricos en polifenoles son de gran interés para la industria alimentaria ya que tienen la capacidad de retardar la degradación oxidativa de lípidos y por lo tanto de mejorar la calidad y el valor nutritivo de los alimentos (Amarowicz et al., 2004). Los polifenoles más comunes responsables de este efecto de protección son

flavonoides y derivados de ácido cinámico que se encuentran de forma abundante en el reino vegetal (Taga et al., 1984). Los polifenoles están presentes en las plantas como un grupo muy amplio de estructuras químicas. Los compuestos fenólicos se presentan en la naturaleza conjugados con mono y polisacáridos, así como con otros grupos funcionales como ésteres y metil-ésteres. En general, los fenoles vegetales presentan estructuras complejas y pueden ser reconocidos con facilidad como componentes de la madera, semillas y pigmentos de flores y frutos (Reyes Caudillo, 2006). La actividad antioxidante de los fenoles se debe principalmente a sus propiedades redox que les permiten actuar como agentes reductores o donadores de átomos de hidrógeno. Por lo tanto los antioxidantes naturales funcionan como secuestradores de radicales e interruptores de la cadena oxidativa, también actúan quelando iones metálicos (Amarowicz et al., 2004). En productos alimenticios dos aplicaciones de antioxidantes fenólicos podrían ser de interés: como un sustituto de conservadores sintéticos o como ingredientes activos (Peschel et al., 2006).

### 1.2.1 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LA CHÍA

Dentro del género *Salvia* se han identificado alrededor de 160 estructuras polifenólicas dentro de los cuales los más importantes son los siguientes:

- Ácidos fenólicos polares

Constituyen la mayor parte de los componentes solubles en agua de los extractos de *Salvia sp.* La mayoría de los ácidos fenólicos son exclusivamente aquellos que proceden del ácido caféico (Figura 3), el cual es la estructura que origina una serie de metabolitos

desde los monómeros más simples hasta productos de múltiples condensaciones que dan lugar a una amplia variedad de oligómeros.

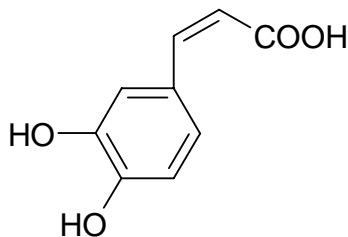


Figura 3. Ácido caféico

Los monómeros del ácido caféico se encuentran comúnmente en forma esterificada y pueden ser: ácidos caféico, ácido ferúlico, ácido clorogénico. El ácido rosmarínico es el dímero más abundante y responsable de la mayor actividad antioxidante en las especies *Salvia*. Los trímeros derivados del ácido caféico, constituyen el grupo más grande de los metabolitos en esta especie (Lu & Foo, 2002).

La actividad antioxidante de los ácidos fenólicos y sus ésteres depende del número de grupos hidroxilo en la molécula. Los compuestos fenólicos poliméricos poseen mayor capacidad antioxidante que los fenoles simples. La presencia de grupos  $-\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$  en derivados de ácidos cinámicos da una gran habilidad como donadores de hidrógeno junto con una estabilización radical (Cruz Pérez, 2008).

- Flavonoides

Están ampliamente distribuidos en especies de *Salvia*, siendo las flavonas, flavonoles y sus glucósidos los más abundantes (Figura 4). La mayoría de los flavonoides son flavonas de apigenina y luteolina. Los principales flavonoles son los metil éteres del kaemferol y la quercetina.



También las proantocianidinas o taninos condensados, se han reportado en especies de *Salvia sp.* El llamado salviatanino se ha investigado con UV e IR deduciéndose que su estructura esta formada a base catequina (Lu & Foo, 2002).

La actividad antioxidante de los flavonoides depende de sus grupos funcionales. La glicosilación de los flavonoides reduce su actividad comparada con su correspondiente aglicón, además de la posición y grado de hidroxilación que es fundamental. Los heterociclos flavonoides contribuyen a la actividad antioxidante por la presencia de 3-OH y permitiendo la conjugación entre anillos aromáticos ya que donan un hidrógeno y un electrón a radicales hidroxilo, peroxilo y peroxinitrilo estabilizándolo de acuerdo al número de grupos OH (Cruz Pérez, 2008).

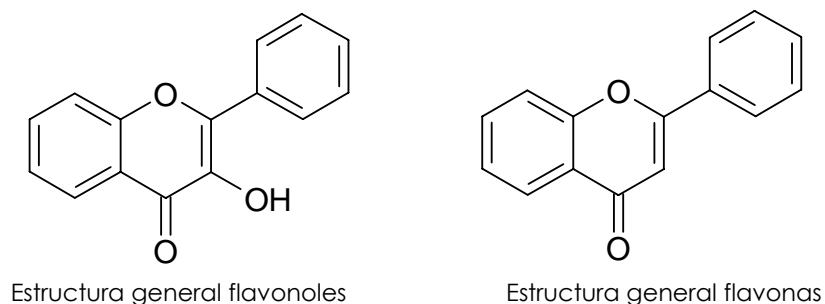


Figura 4. Estructuras de flavonoides

Los resultados obtenidos por Reyes Caudillo (2006) muestran que los extractos polifenólicos de la semilla de chía presentan una buena capacidad para donar hidrógenos o electrones, pudiendo tener una actividad preventiva sobre la reactividad de los radicales. También se encontró que pueden prevenir la oxidación lipídica de manera eficiente en un sistema alimenticio complejo (emulsión o/w).

### **1.3 EMPAQUES**

La industria del embalaje tiene hoy en día un valor aproximado de 345 millones de Euros a nivel mundial y se prevé que continúe creciendo en tamaño e importancia. Dentro del proceso de elaboración de alimentos a nivel industrial, sin importar que exista o no un método de conservación durante su elaboración, su tiempo de vida útil va a depender de un eficiente proceso de empaclado.

Procesos tales como el secado y la congelación serían ineficientes sin un empaclado luego del proceso, esto para controlar los efectos producidos por el oxígeno, la luz, vapor de agua, microorganismos y otros posibles contaminantes.

Hoy en día los empaques no juegan un rol pasivo dentro de la conservación de alimentos, se ha incrementado su papel en la conservación y en mantener la calidad y la seguridad de los alimentos a través de la cadena de distribución (Ahvenanien, 2003).

#### **1.3.1 PELÍCULAS BIODEGRADABLES**

La creciente demanda por alimentos procesados en el mercado, aumenta la cantidad generada de desechos provenientes de empaques de alimentos, generando una preocupación por el impacto ambiental que trae consigo (Ahvenanien, 2003).

Los materiales más utilizados para el envasado de los alimentos son los polímeros petroquímicos, debido a su disponibilidad en grandes cantidades a bajo costo y a sus características favorables de funcionalidad, tales como, buena resistencia a la tracción y al desgarre, buenas propiedades de barrera al O<sub>2</sub> y el calor (Alves et al., 2006).

Los plásticos han tenido un crecimiento importante a lo largo del siglo XX, se producen aproximadamente 220 millones de toneladas por año, esto se debe en parte a la alta demanda de empaques flexibles que se originó a principios de los noventa. Sin embargo,

una de las limitaciones de los materiales plásticos de empaques de alimentos es que son desechados con un muy bajo reciclaje. La presencia de este tipo de materiales de empaque en basureros puede tener muchas problemáticas ya que si no es reciclado, puede permanecer sin degradarse por muchísimos años, además de que en muchos países ya no se cuenta con el espacio suficiente para tener este tipo de depósitos, por lo que en un futuro será un grave problema (Nettles, 2006).

Weber et al. (2002) establecieron que "los polímeros y materiales usados para el empaque de alimentos en la actualidad consisten en una variedad de materiales plásticos derivados del petróleo, metales, vidrio, papel y cartón o una combinación de ellos. Con la excepción del papel y el cartón, todos estos materiales provienen de materiales no renovables, lo que implica que en algún punto se encontrarán más alternativas de materiales de empaque hechos a base de fuentes renovables". Los autores también han resaltado que los derivados de fuentes naturales son cada vez más esenciales en la industria.

El desarrollo de polímeros biodegradables ha sido objeto de investigación como alternativa a los polímeros derivados del petróleo. Aun cuando las cualidades tecnológicas y de producción no sean equiparables a las de un polímero tradicional, estos pueden entrar al mercado debido a la demanda de la sociedad por empaques menos agresivos al medio ambiente (Ahvenanien, 2003).

Los polímeros biodegradables son materiales en los que al menos un paso de su proceso de degradación es a través del metabolismo de organismos vivos, tales como bacterias, levaduras y hongos. En condiciones adecuadas de humedad, temperatura y disponibilidad de oxígeno, la biodegradación conduce a la fragmentación o desintegración de los materiales plásticos con residuos no tóxicos ni nocivos al medio ambiente (Sorrentino et al., 2007).

Los biopolímeros empleados para la formación de empaques biodegradables son obtenidos de fuentes naturales renovables, que incluyen polisacáridos, proteínas y lípidos (Lee et al., 2008), los cuales presentan gran potencial para incrementar la calidad de los alimentos y reducir las necesidades de empaques alimentarios (Bamdad et al., 2006).

Los polímeros biodegradables pueden ser clasificados de acuerdo con su fuente de obtención:

1. Polímeros extraídos directamente o removidos de biomasa (ejemplos: polisacáridos, proteínas, polipéptidos, polinucleótidos).
2. Polímeros producidos por síntesis química usando bio-monómeros renovables o fuentes mixtas de biomasa y petróleo. (ejemplos: ácido poliláctico o bio-poliéster).
3. Polímeros producidos por microorganismos o por bacterias genéticamente modificadas (celulosa, xantana) (Sorrentino et al., 2007).

Uno de los aspectos más importantes en el desarrollo de materiales biodegradables para proteger alimentos del medio ambiente y de los componentes adyacentes, es que estos ofrezcan una baja permeabilidad al vapor de agua, oxígeno y bióxido de carbono. El oxígeno está involucrado en múltiples reacciones de deterioro de los alimentos como son la rancidez oxidativa, el crecimiento de algunos microorganismos, el oscurecimiento enzimático y la pérdida de la calidad nutrimental (Ayranci & Tunc, 2002).

### **1.3.2 EMPAQUES ACTIVOS**

Es un nuevo concepto que puede ser definido como un sistema en el cual el empaque, el producto y el medio interactúan para prolongar la vida de anaquel, asegurar la inocuidad y las propiedades sensoriales, del producto (Hui et al., 2006).

Los empaques activos se refieren a la incorporación de ciertos aditivos en el empaque (suelos dentro del envase, adjuntos al interior de los materiales de embalaje o incorporado al material de envasado) con el objetivo de mantener o extender la calidad del producto (Kerry et al., 2006).

Hay también básicamente dos tipos de empaques activos, el denominado tal cual empaque activo, donde se utilizan compuestos que remuevan el oxígeno, absorban la humedad y generen etanol o CO<sub>2</sub>. El otro tipo de empaque es llamado empaque antimicrobiano ya que este tiene como objetivo aplicar sistemas de liberación en forma controlada de un agente antimicrobiano de la película al alimento (Hui et al., 2006).

Entre los distintos conceptos de envases activos, la incorporación de agentes activos a los envases poliméricos es un interesante desarrollo, puede preservar la calidad de los paquetes de alimentos a través de un largo período de tiempo (Nerián et al., 2006). Hoy en día, la investigación se centra en la incorporación de antimicrobianos o compuestos antioxidantes naturales como extractos de plantas (Devlieghere et al., 2004).

En la actualidad, la tecnología de empaques activos utilizada para la alimentación son los elaborados con removedores de oxígeno. Estos son capaces de eliminar el oxígeno que existe ente la cabeza del envase y el producto o permear a través del material de embalaje durante el almacenamiento. Los removedores de O<sub>2</sub> son ampliamente utilizados para retrasar o prevenir el deterioro debido a la oxidación de los componentes del producto. Por ejemplo, los removedores de O<sub>2</sub> han sido eficientes en la prevención de la decoloración de carnes curadas y té, problemas de rancidez en alimentos con alto contenido en grasa o los cambios de sabor por oxidación en el café (Charles et al., 2006).

Los removedores de oxígeno se desarrollaron para evitar el proceso de oxidación. Sin embargo, los radicales se originan a partir de oxígeno y son los principales iniciadores de la oxidación. Por lo tanto, un enfoque diferente puede ser considerado: tan pronto se eliminen los radicales que se formen, la propagación de la oxidación no tendrá lugar (Nerín et al., 2008).

La incorporación de antioxidantes en materiales de empaque se ha vuelto popular desde que la oxidación es el mayor problema que afecta la calidad de los alimentos. Puesto que la oxidación se inicia por lo general en la superficie de los alimentos, la incorporación de antioxidantes en los empaques es una prometedora manera de proteger a los alimentos de la rancidez (Jongjareonrak et al., 2008). Algunos de los antioxidantes más utilizados en empaques funcionales son BHA, BHT y TBHQ. Sin embargo se han hecho extensas investigaciones para adoptar algunos antioxidantes naturales en empaques activos. Al igual que los materiales biodegradables los antioxidantes naturales son aceptados por los consumidores y nos son considerados como sustancias químicas. (Güçbilmez et al. 2007). Hasta ahora, la mayor atención se ha prestado a los aditivos alimentarios obtenidos a partir de plantas aromáticas como el romero y los extractos de salvia (Peschel et al., 2006).

#### 1.4 TRABAJOS PREVIOS

Desde hace algunos años se ha formado un grupo de trabajo en el Departamento de Alimentos de la Facultad de Química dedicado a estudiar y formalizar las propiedades que posee la semilla de chía. Los constituyentes más estudiados de esta semilla han sido el aceite, la fibra y la proteína, encontrándose importantes cualidades que han hecho a esta semilla atractiva para su continua investigación.

Reyes Caudillo (2006) trabajó con la semilla de chía para conocer las propiedades funcionales y antioxidantes de su fibra. Concluyó que esta semilla tiene un alto contenido de fibra dietética brindando propiedades de capacidad de retención de agua y estabilización de emulsiones. También encontró que los extractos de esta semilla contienen compuestos que muestran actividad antioxidante, los cuales corresponden a estructuras polifenólicas, entre ellas las más importantes son el ácido caféico y los flavonoides. Los extractos obtenidos mostraron una buena actividad antioxidante al retardar de manera eficiente el deterioro oxidativo en una emulsión tipo aderezo. Debido a estos hallazgos, Cruz Pérez (2008) estudió más a fondo el método de extracción de los polifenoles de chía, así como su composición.

Por otra parte se han realizado estudios sobre la proteína de la semilla de chía. Hernández Jardón (2007) evaluó la capacidad de esta para desarrollar películas biodegradables, logrando la formación de películas de proteína de chía, las cuales exhiben un comportamiento de materiales muy flexibles cuando se les somete a pruebas de punción y presentan comportamiento de materiales resistentes y rígidos cuando son sometidas a pruebas de extensión. Al evaluar su permeabilidad al vapor de agua encontró que las películas de chía presentan una mejor protección comparadas con otras películas de diferentes fuentes proteicas (chícharo, lenteja, pescado). Los resultados obtenidos

permitieron determinar que las películas formadas a partir de la proteína de chía presentan propiedades mecánicas y de barrera aceptables. Posteriormente Alvarado Suárez en 2008 estudió las biopelículas de chía utilizando sorbitol y glicerol como plastificante para evaluar su capacidad como barreras protectoras de un sistema alimenticio. Estas mostraron alta eficiencia para retardar el deterioro oxidativo al emplearlas como protectoras de alimentos. Además evaluó su permeabilidad al oxígeno encontrando que presentan valores bajos en comparación con el que presenta una película sintética de LDPE, reafirmando su efectividad como cubiertas de alimentos.

Debido a los resultados obtenidos con anterioridad es que se plantea la posibilidad de desarrollar películas de chía con actividad antioxidante al incorporar los antioxidantes propios de la semilla y evaluar el efecto de protección que puedan brindar, ya que las películas de chía han demostrado ser una buena alternativa como barreras de protección de alimentos.



## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

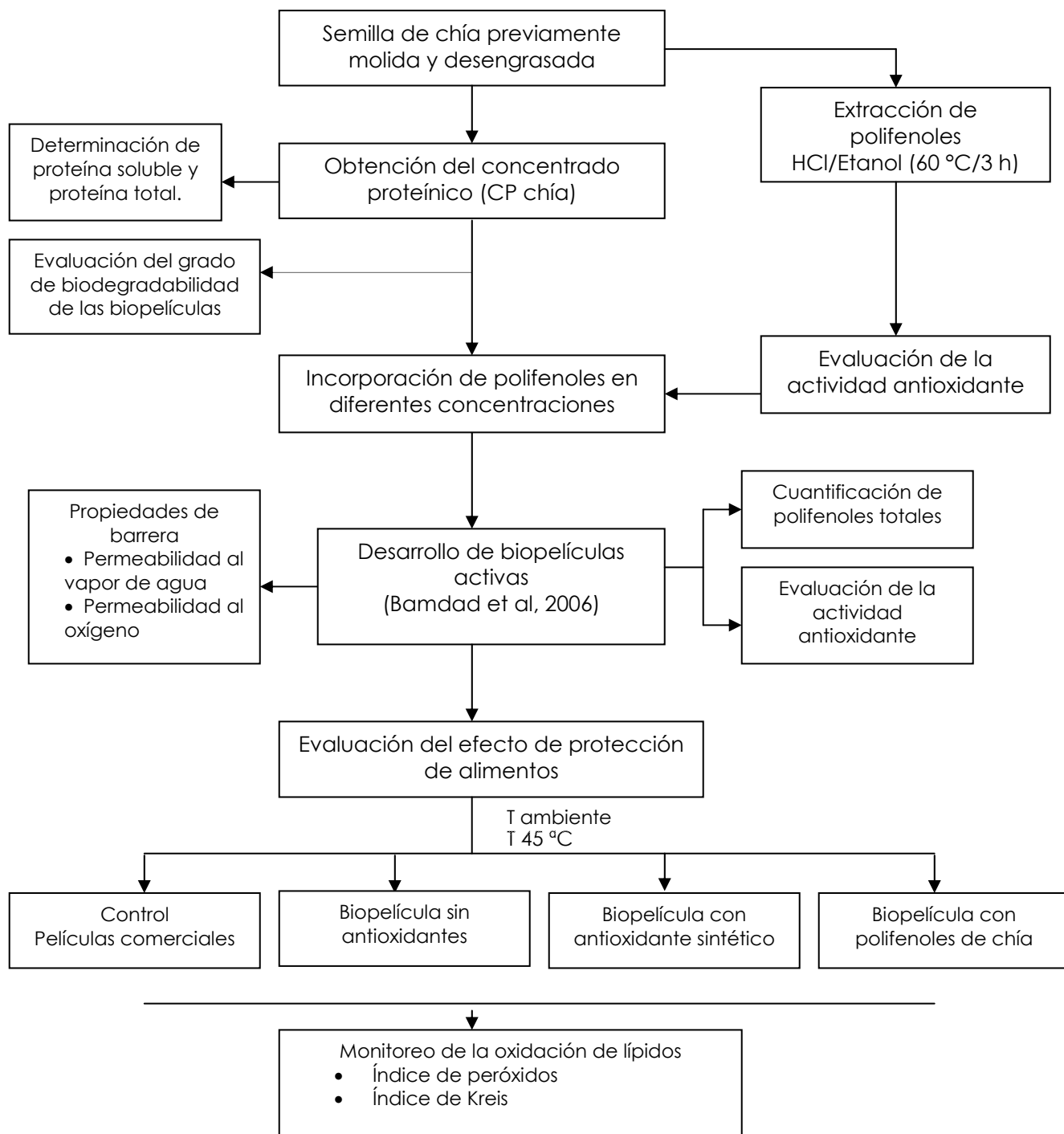
Conocer las propiedades de barrera y protección de las películas activas formadas a partir de concentrado protéico de chíá frente a la oxidación de lípidos en alimentos.

### OBJETIVOS PARTICULARES

- ∞ Determinar el efecto de la concentración de polifenoles de semilla de chíá sobre la formación de biopelículas activas elaboradas a partir de concentrado de proteína de chíá.
- ∞ Evaluar el nivel de concentración de polifenoles incorporados en las películas de proteína de chíá formadas.
- ∞ Determinar la permeabilidad al vapor de agua y al oxígeno que presentan las biopelículas activas de semilla de chíá para conocer su capacidad de intercambio gaseoso.
- ∞ Conocer la capacidad de las biopelículas activas como barreras de protección contra el deterioro oxidativo de lípidos en alimentos para evaluar su uso potencial como recubrimiento para prolongar la vida de anaquel.
- ∞ Conocer el grado de biodegradabilidad e inocuidad de las películas de proteína de chíá para establecer sus bondades frente a películas sintéticas.

## CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 DIAGRAMA GENERAL DE INVESTIGACIÓN



## 2.2 OBTENCIÓN DEL CONCENTRADO PROTEÍNICÓ

### 2.2.1 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Para la obtención del concentrado protéico se adquirió un lote de 3.5 kg de semilla de chíá en la Central de Abastos de la ciudad de México, la cual se mantuvo en bolsas de plástico al abrigo de la luz.

- Se llevó a cabo la molienda la semilla de chíá en un molino (IKA WERKE, MF 10 Basic) a 5 500 rpm.
- El harina de chíá obtenida se desengrasó por el método Soxhlet utilizando hexano como disolvente, durante seis horas de reflujo.
- La muestra desengrasada se molió nuevamente en un molino (IKA WERKE, MF 10 Basic) a 5 500 rpm.
- Finalmente el harina se tamizó usando un tamizador (MONTINOX) y mallas del número 10, 20, 30 y 40 para obtener la fracción rica en proteína.

### 2.2.2 OBTENCIÓN DEL CONCENTRADO DE PROTEÍNA DE SEMILLA DE CHÍA (BAMDAD, 2006)

- La fracción rica en proteína de la malla 40 se remojó en agua en una relación 1:10 (w/v) ajustando a pH 11 con NaOH 0.1 N y se agitó durante 1 h. Posteriormente se dejó reposar durante 24 horas a 4 °C.
- Transcurrido ese tiempo, la mezcla se centrifugó (centrífuga Beckman M2) a 5000 rpm durante 20 minutos a 4 °C para obtener el sobrenadante. Posteriormente se ajustó a 5.4 el pH del sobrenadante recolectado utilizando HCl 0.1 N y se dejó reposar 24 horas en refrigeración.
- Después de 24 horas se centrifugó (centrífuga Beckman M2) a 5000 rpm por 20 minutos para obtener el agregado protéico, el cual fue secado en estufa de vacío a 50 °C durante 24 horas y finalmente molido.

## 2.3 CARACTERIZACIÓN DEL CONCENTRADO PROTÉICO

### 2.3.1 EVALUACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA

Una vez obtenido el concentrado de proteína de semilla de chía se realizaron las siguientes determinaciones:

- Determinación de proteína cruda. Método de Kjeldhal

Se pesaron de 0.1-0.5 g de muestra en un papel delgado libre de nitrógeno, colocándolo en tubos de digestión y agregando media pastilla de Kjeltabs y 5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Se colocaron los tubos en el digestor a 420 °C y se calentó hasta la obtención de una coloración azul- verdosa (total digestión de la materia orgánica).

Se llevo a cabo la destilación colocando el tubo enfriado a temperatura ambiente, al equipo de destilación. Se agregaron 50 mL de NaOH 40% y se recolectó un volumen de 100 mL en 50 mL de ácido bórico 4%. Por último se tituló con solución valorada de HCl 0.1 N.

- Determinación de proteína soluble. Método de Lowry

Para llevar a cabo esta determinación en primer lugar se disolvió el concentrado proteínico a pH 11. Posteriormente se preparó la solución de la muestra para un intervalo de 5-100 µg de proteína/mL. Se tomó 1 mL de la solución problema y se mezcló con 1 mL de solución C (mezcla de 50 mL de la solución A y 1 mL de B). (A: Carbonato de sodio 2% y Tartrato de sodio 0.02% en NaOH 1 M; B: Sulfato de cobre 0.5%).

Se dejó reposar a temperatura ambiente por 10 minutos y se adicionaron 0.3 mL de reactivo D (1 parte de reactivo de Folin con 1 parte de agua), se mezcló y se dejó reposar por 30 minutos. Finalmente fue leído en el espectrofotómetro a 750 nm (Nielsen, 1998).

## 2.4 EXTRACCIÓN DE POLIFENOLES DE SEMILLA DE CHÍA

Se pesaron 50 g de harina previamente desengrasada en un matraz de fondo plano y se agregaron 500 mL de una solución 1.2 M de HCl en etanol, Esta mezcla se dejó en agitación constante en un sistema de reflujo con calentamiento a 60 °C durante 3 horas. Pasado el tiempo se enfrió y se diluyó con 250 mL de etanol, se centrifugó la mezcla por 15 minutos a 5000 rpm. El sobrenadante obtenido se concentró a sequedad en un rotavapor (Büchi Rotavapor R-200-205) a 40 °C hasta obtener una mezcla café oscuro. La mezcla fue sometida a un proceso de purificación para lo cual se llevaron a cabo extracciones continuas sólido-líquido con 20 mL de éter etílico hasta que el solvente presento poco o nulo color. Al éter colorido obtenido se le hicieron lavados con agua destilada hasta lograr un pH neutro. La fase orgánica obtenida se volvió a concentrar en rotavapor (Büchi Rotavapor R-200-205) a 40 °C y se redisolvió en la mínima cantidad de etanol (Matthäus, 2002).

### 2.4.1 DETERMINACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES

La cantidad de polifenoles totales se determinó por el método descrito por Matthäus (2002). La concentración de polifenoles se calculó usando ácido gálico monohidratado (Mallinckrodt Chemicals) como estándar y los resultados se expresan como mg equivalentes de ácido gálico (EAG)/ g muestra.

Se tomaron 100 µL de la solución del extracto alcohólico concentrado y se adicionaron 2 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2%. Después de 2 minutos se adicionaron 100 µL del reactivo Folin-Ciocalteu diluido en agua destilada (1:1 v/v). Transcurridos 30 minutos se midió la absorbancia a 750 nm en un espectrofotómetro Beckman DU-65.

## 2.5 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS

Esta evaluación se llevó a cabo utilizando dos métodos de actividad antioxidante. La comparación de esta se realizó mediante un estándar, Trolox, derivado carboxílico de  $\alpha$ -tocoferol (Sigma Aldrich).

### 2.5.1 CAPACIDAD SECUESTRANTE SOBRE EL RADICAL 1,1-DIFENIL-2-PICRILHIDRAZIL (DPPH•)

La reducción del radical DPPH• se observa como un cambio de color de morado a amarillo, presentando un decremento en la absorbancia a 515 nm, cuando el radical es reducido por un antioxidante mediante la donación de un hidrógeno o de un electrón para formar una molécula diamagnética estable.

Se adicionaron 2 mL de una solución de DPPH• (Sigma Aldrich)  $3.6 \times 10^{-5}$  M a 50  $\mu$ L del extracto de polifenoles estandarizado a 200 ppm. El decremento de la absorbancia a 515 nm se registró continuamente a temperatura ambiente. El efecto secuestrante se trazó gráficamente en función del tiempo (Siddhuraju et al., 2002).

El porcentaje de la capacidad secuestrante sobre el radical DPPH• se calcula de la siguiente forma:

$$\%CS_{DPPH\cdot} = \frac{Abs_{t=0} - Abs_{t=16min}}{Abs_{t=0}} \times 100$$

### 2.5.2 CAPACIDAD SECUESTRANTE SOBRE EL RADICAL ÁCIDO 2,2'-AZINO-BIS-(3-ETILBENZOTIAZOLIN-6-SULFÓNICO) (ABTS<sup>+</sup>•)

Es un método aplicable tanto a antioxidantes lipofílicos como hidrofílicos, incluidos los flavonoides, carotenoides y antioxidantes de plasma. La preformación del radical monocatión del ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS<sup>+</sup>•) es generado por la oxidación de ABTS con persulfato de potasio y se reduce en presencia de hidrógeno de la donación de esos antioxidantes.

Para formar el radical ATBS<sup>+</sup>• se mezcló una solución de ABTS (Sigma Aldrich) 7 mM con una solución 2.45 mM de persulfato de potasio y se dejó reposar de 12-16 horas en la oscuridad a temperatura ambiente para asegurar la completa oxidación del reactivo ABTS. Transcurrido el tiempo se diluyó con etanol hasta lograr una absorbancia de 0.70 a 734 nm. Se adicionó 1 mL de esta solución a 10 µL del extracto de polifenoles estandarizado a 200 ppm (Re, et al., 1999). El decremento de la absorbancia a 734 nm se registró continuamente a temperatura ambiente. El efecto secuestrante se trazó gráficamente en función del tiempo.

El porcentaje de la capacidad secuestrante sobre el radical ABTS<sup>+</sup>• se calcula de la siguiente forma:

$$\%CS_{ABTS^{+}\cdot} = \frac{Abs_{t=0} - Abs_{t=16min}}{Abs_{t=0}} \times 100$$

## 2.6 FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS ACTIVAS DE SEMILLA DE CHÍA

Las películas se elaboraron siguiendo la metodología de Bamdad et al. (2006) con algunas modificaciones:

- Se disolvió el concentrado protéico de chía bajo constante agitación en agua destilada (5 g CPchía/100 mL H<sub>2</sub>O).
- El glicerol se adicionó al 50% con respecto a la cantidad del CPchía (w/w).
- Se ajustó la solución a pH 11 con NaOH 0.1 N
- La solución se calentó a baño de agua a 70 °C durante 20 min.
- Transcurrido el tiempo se filtró

La incorporación de los polifenoles extraídos se realizó una vez obtenida la solución calentada y filtrada para la elaboración de películas. Se utilizó extracto de polifenoles de chía muy concentrado, el cual fue agregado a la solución antes mencionada muy lentamente y con agitación constante. Una vez homogenizada la solución final se vació en recipientes de teflón dejándose secar a temperatura ambiente durante 48 horas.

### 2.6.1 ENSAYO CUALITATIVO DE LA FORMACIÓN DE PELÍCULAS ACTIVAS DE CHÍA

Este ensayo consistió en observar el desarrollo de las biopelículas empleando diferentes concentraciones de polifenoles extraídos, desde 200 ppm hasta 1000 ppm para escoger las concentraciones con las que se trabajaría más adelante.

En esta prueba se evaluó en primer lugar la observación de la formación de una película y posteriormente la facilidad que presentaban para ser extraídas del molde. De esta forma el desarrollo de las películas activas fue clasificado como óptimo o pobre.



## 2.6.2 CONFIRMACIÓN DE LA INCORPORACIÓN DE POLIFENOLES NATURALES EN LAS BIOPLÉCULAS DE SEMILLA DE CHÍA

Para corroborar la presencia de los polifenoles naturales en las películas de proteína de chía, se llevó a cabo la cuantificación de polifenoles totales de acuerdo a Matthäus (2002) explicada con anterioridad en el apartado 2.4.1. También se realizaron pruebas de capacidad secuestrante sobre la película activa de los radicales DPPH• y ABTS<sup>+</sup>•, detalladas en las secciones 2.5.1 y 2.5.2 respectivamente.

## 2.7 EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES DE BARRERA DE LAS BIOPELÍCULAS ACTIVAS

### 2.7.1 PERMEABILIDAD AL VAPOR DE AGUA

Para determinar la permeabilidad al vapor de agua de las biopelículas activas de chía se realizaron ensayos usando el método ASTM E96-95 (2002). Este método consiste en determinar gravimétricamente la cantidad de agua que adsorbe un desecante.

Se emplearon celdas de acrílico a peso constante en las cuales se colocó una cantidad conocida de cloruro de calcio anhidro (35 g aprox.). Una vez sujetadas las películas entre el anillo y boca de las celdas de permeación (Figura 5), se ubicaron en una cámara a una humedad relativa del  $62 \pm 2\%$  lograda con una solución saturada de  $(\text{NO}_3)_2\text{Mg} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , la cual fue mediada con un higrómetro (Oakton, Japón). La prueba se efectuó durante 5 días haciendo mediciones cada 24 horas registrando el aumento de peso de cada celda, la humedad relativa y la temperatura. Las determinaciones se hicieron por triplicado.



Vista lateral de la celda



Colocación de la película en la celda.  
Vista superior

Figura 5. Celda de permeación

La PVA se obtuvo con el siguiente tratamiento de datos:

- a) Transmisión de Vapor de Agua ( $\text{g/h}\cdot\text{m}^2$ )

$$\text{TVA} = (G/t)/A$$

Donde G es la ganancia en peso durante la prueba, t es el tiempo que duró la prueba (h) y A es el área de la boca de las celdas ( $\text{m}^2$ ).

- b) Permeanza ( $\text{g/h}\cdot\text{m}^2\cdot\text{Pa}$ )

$$\text{Permeanza} = \text{TVA}/(S\cdot R)$$

Donde S es la presión de vapor de agua (Pa) a la temperatura de prueba y R es la humedad relativa.

- c) Permeabilidad al vapor de agua ( $\text{ng}/\text{Pa}\cdot\text{s}\cdot\text{m}$ )

$$\text{PVA} = \text{Permeanza}\cdot\text{espesor}$$

Donde el espesor corresponde al de las películas evaluadas, el cual fue medido con micrómetro.

### 2.7.2 PERMEABILIDAD AL OXÍGENO

La permeabilidad al oxígeno se determinó en las biopelículas activas con antioxidantes tanto natural (polifenoles de chía) como sintético (terbutilhidroquinona (TBHQ)). Se siguió el procedimiento volumétrico de acuerdo al método ASTM D1434 (1998). Con este método se obtuvo el coeficiente de transmisión de oxígeno de cada una de las películas a través de seguimiento del cambio de volumen generado por la transferencia de moléculas de oxígeno a través de de la película y es el coeficiente de transmisión de oxígeno con el cual se obtuvo la permeabilidad.

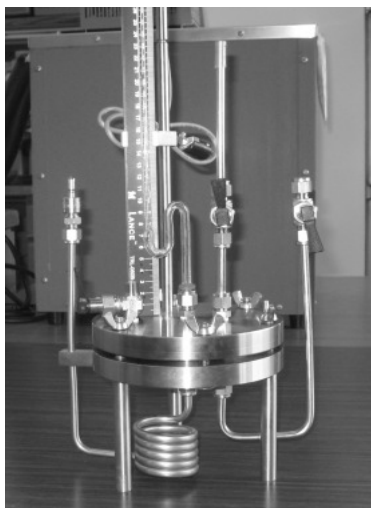


Figura 6. Celda de transmisión de gas

El procedimiento consistió en la colocación de dos piezas de papel filtro de retención media en la parte superior de la celda de transmisión de gas (Figura 6) ubicando el espécimen de prueba en la parte superior de la celda previamente acondicionado a una humedad relativa constante del 50% y cortadas de forma circular con un diámetro aproximado de 9 cm. Posteriormente se colocó la parte superior de la celda y se sellaron los dos compartimentos de la celda de transmisión usando un aro de teflón ligeramente engrasado y fueron fijados con cuatro tornillos colocados de manera simétrica.

Se aplicó una presión de gas positiva con un cilindro de gas comprimido (oxígeno) por un lapso de 10 minutos. Esto se llevó a cabo con las válvulas abiertas, con el fin de purgar la celda de aire y saturarla de oxígeno. Se introdujeron aproximadamente 20 mm de líquido capilar (4-metil-2-pentanona) en el capilar de precisión y se cerró la válvula de escape superior, teniendo cuidado de que el capilar este limpio y libre de obstáculos. A continuación se ajustó la presión de acuerdo al espécimen de trabajo. Una vez alcanzado el estado estacionario se tomaron las lecturas del desplazamiento del líquido con cronómetro, haciendo las mediciones en lo alto del menisco.

La permeabilidad al oxígeno se obtuvo con el siguiente tratamiento de datos:

a) Velocidad de transmisión de gas ( $\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ )

$$\text{GTR} = 10^{-6} \cdot \rho_0 \cdot V_r / \text{ART}$$

Donde:

A = área de transmisión del espécimen ( $\text{mm}^2$ )

$\rho_0$  = presión ambiental (Pa)

R = constante universal del gas ideal ( $8.314 \times 10^3 \text{ L} \cdot \text{Pa} / \text{mol} \cdot \text{K}$ )

T = temperatura ambiente (K)

$V_r$  = velocidad del líquido en el capilar ( $\text{mm}^3/\text{s}$ )

b) Permeanza ( $\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s} \cdot \text{kPa}$ )

$$P = \text{GTR} / \Delta P$$

Donde  $\Delta P$  es la diferencia de presión parcial de gas en ambos lados de la película (kPa).

c) Permeabilidad al Oxígeno ( $\text{cm}^3 \cdot \mu\text{m} / \text{m}^2 \cdot \text{d} \cdot \text{kPa}$ )

$$P_O = P \cdot \text{espesor}$$

Donde el espesor corresponde al de las películas evaluadas, el cual fue medido con micrómetro.

## 2.8 EVALUACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD DE LAS BIOPELÍCULAS ACTIVAS

Con el objetivo de evaluar la funcionalidad de las películas activas como empaques de alimentos se llevaron a cabo diferentes ensayos usando estas películas para proteger una matriz alimentaria.

El alimento escogido para realizar estas pruebas fue cacahuete debido a su alto contenido en grasa y bajo  $a_w$ .

En las evaluaciones se utilizaron biopelículas activas de chía con polifenoles naturales así como biopelículas de chía con la incorporación de un antioxidante sintético (TBHQ). Las concentraciones de antioxidantes empleadas en las biopelículas activas se muestran en la Tabla 1. Como control se emplearon biopelículas de chía sin antioxidantes así como plásticos sintéticos: Egapack (PVC, cloruro de polivinilo) y Ziploc (LDPE, polietileno de baja densidad) y naturales (cubierta de celulosa).

**Tabla 1. Concentraciones de antioxidantes utilizadas en la elaboración de películas activas de chía**

Películas Activas de Concentrado de proteína a de chía	
Antioxidante	Concentración (ppm)
Polifenoles de chía	200
	400
	600
TBHQ	200

El cacahuete fue molido y pesado (15 g) y se colocó dentro de las diferentes películas protectoras, las cuales fueron selladas térmicamente como se observa en la Figura 7. Se analizó el tiempo cero para conocer el deterioro inicial de las muestras, posteriormente se realizaron dos monitoreos más, el tiempo 1 y el tiempo 2, correspondientes a 30 y 60 días respectivamente.



Figura 7. Cacahuete molido empacado en película activa de chíá.

Durante el tiempo que transcurrió la prueba, el monitoreo de la oxidación lipídica de la muestra fue realizado con los siguientes métodos:

- Extracción de lípidos por lotes

Se pesó de 5 a 10 g de muestra en un matraz Erlenmeyer de 250 mL y se adicionó 40 mL de diclorometano. Posteriormente se agitó durante 10 minutos a temperatura ambiente, dejándose sedimentar para filtrar la parte superior sobre el matraz bola.

Se recuperó el residuo y se adicionaron 40 mL del disolvente. La extracción se repitió hasta la extracción total de la grasa. Para verificar la extracción total del aceite se dejó caer una gota del filtrado sobre papel filtro, al evaporarse el disolvente no debe dejar residuo de aceite. Finalmente se evaporó el disolvente en rotavapor (Büchi Rotavapor R-200-205).

- Determinación de Índice Peróxidos Micrométodo (Kirk, et al, 1996)

Se pesaron  $2.5 \pm 0.1$  g de aceite de cacahuete en un matraz Erlenmeyer de 250 mL y se adicionaron 25 mL de una solución de ácido acético/diclorometano (3:2) y se agitó. Se agregaron 0.5 mL de una solución saturada de yoduro de potasio y se dejó reposar en la oscuridad durante 60 segundos, medidos con cronómetro.

Transcurrido el tiempo se añadieron 75 mL de agua desionizada hervida y fría. Se adicionó 0.5 mL de solución de almidón indicador (almidón soluble al 1% en agua) y finalmente se tituló lentamente con tiosulfato de sodio 0.1 N hasta la desaparición del color azul por 30 segundos. El índice de peróxidos se obtuvo calculando los miliequivalentes de tiosulfato utilizados en la titulación por kilogramo de muestra.

- Índice de Kreis (Kirk, et al, 1996)

Este método se basa en la capacidad de los peróxidos de oxidar el ion yoduro del KI y producir yodo, el cual se valora con tiosulfato.

Se disolvieron de 50 a 500 mg de aceite de cacahuete en 5 mL de diclorometano. Después se añadieron 10 mL de una solución de ácido tricloroacético al 30% en ácido acético glacial y 1 mL de floroglucinol al 1% en ácido acético. Posteriormente se incubó por 15 minutos en un baño maría a 45 °C, se dejó enfriar y se agregaron 4 mL de etanol. Finalmente se midió la absorbancia de la muestra a 540 nm frente a un blanco de reactivos. El Índice de Kreis se calculó como Abs a 540 nm/g de aceite.

Para evaluar la efectividad de las películas activas se obtuvo el Factor de Protección (PF) de éstas a través del periodo de inducción de la cinética del deterioro oxidativo de la muestra protegida. El factor de protección se calculó de la siguiente manera:

$$PF = \frac{IP_x}{IP_0}$$

Donde  $IP_0$  - periodo de inducción de la muestra sin antioxidante, (días).

$IP_x$  - periodo de inducción de la muestra con antioxidante, (días).

## 2.9 ANÁLISIS CUALITATIVO DE BIODEGRADACIÓN DE PLÁSTICOS

La evaluación del grado de biodegradabilidad de las películas de proteína de semilla de chía se llevó a cabo con el fin de dar formalidad de esta cualidad en las películas.

La prueba fue implementada por el Laboratorio de Biología Experimental de la Facultad de Química de la UNAM, basándose en las pruebas estándar de biodegradabilidad y toxicidad (OECD, 1993), ya que para la realización de este ensayo se empleó un tiempo menor al requerido para las pruebas estandarizadas. El ensayo consistió en realizar pruebas de biodegradabilidad cualitativa de tres materiales plásticos: dos biopelículas de concentrado de proteína de chía usando dos diferentes plastificantes, glicerol y sorbitol, así como un recubrimiento de celulosa.

Las pruebas se basaron en la observación del deterioro de las muestras debido al desarrollo microbiano. Estas se realizaron a partir de una inoculación de microorganismos, los cuales fueron aislados de composta utilizada para la degradación de plásticos.

A cada una de las muestras en condiciones asépticas se les realizó un corte de 5 cm aproximadamente y se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL de medio mineral. En cada uno de los matraces se agregó 1 mL de solución salina isotónica con un consorcio de 7 microorganismos (mezcla de bacterias y otros organismos unicelulares) en una concentración de 0.5 en la escala de Mac Farland que equivale a  $1.5 \times 10^8$  microorganismos por mL. Durante siete días las muestras se mantuvieron en incubación a 37 °C, con agitación contante y revisión cada 24 horas.



## CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1 OBTENCIÓN DEL CONCENTRADO PROTEÍNICO

Los resultados de la composición de macrocomponentes de la semilla de chía se observan en la Tabla 2.

**Tabla 2. Análisis de la semilla de chía.**

Determinación	g/ 100g semilla
Grasa	31.7 ± 0.64
Proteína	24.17 ± 0.45
Carbohidratos	35.77

Como se menciona en la literatura la chía posee un alto contenido de proteína (19-23%), corroborándose que la chía constituye una buena materia prima para obtener un concentrado de proteína, el cual es necesario para la elaboración de películas biodegradables hechas de proteína. Una vez analizada la semilla, el harina se tamizó por malla 40 para obtener una fracción rica en proteína. A partir de esta fracción se llevó a cabo el protocolo de extracción del concentrado proteínico de la semilla.

### 3.2 CARACTERIZACIÓN DEL CONCENTRADO PROTEÍNICO

#### 3.2.1 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA CRUDA TOTAL. MÉTODO DE KJELDHAL

El concentrado de proteína de chía (CPchía) fue caracterizado a través de la determinación de proteína cruda total. Los resultados de la determinación realizada por triplicado se muestran en la Tabla 3.

**Tabla 3. Porcentaje de proteína cruda total en el CP chía por el método de Kjeldhal**

	% Proteína total
Promedio	86.2 ± 3.97

Se empleó el factor 6.25

La determinación de proteína cruda total se realizó por el método de Kjeldhal, encontrándose un porcentaje promedio del 86.2%, tomando como factor de conversión el estándar de 6.25.

Se logró concentrar la proteína de chía 3.6 veces ya que se partió de harina con 24% de proteína, indicando que el proceso de extracción fue llevado a cabo correctamente. El porcentaje de proteína total obtenido es ligeramente menor al reportado en estudios anteriores realizados por Hernández Jardón (2007), del 92%.

El porcentaje restante (13.8%) del concentrado de chía probablemente corresponde a componentes no protéicos, esencialmente carbohidratos.

### 3.2.2 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA SOLUBLE. MÉTODO DE LOWRY

La caracterización del concentrado protéico también comprende la determinación de proteína soluble, realizada a través del método de Lowry. Los resultados mostrados en la Tabla 4 indican que una cantidad significativa de proteína total fue extraída por solubilización. La solubilidad de las proteínas es una condición necesaria llevar a cabo la elaboración de biopelículas.

**Tabla 4. Porcentaje de proteína soluble en el CP de chía por el método de Lowry**

	% Proteína soluble
Promedio	71.8 ± 1.15

### 3.3 EXTRACCIÓN DE POLIFENOLES DE SEMILLA DE CHÍA

Con la finalidad de elaborar biopelículas activas de similla de chía que incluyeran antioxidantes naturales propios de esta semilla se llevó a cabo la extracción de polifenoles de la semilla. De acuerdo con Cruz Pérez (2008) se realizó una extracción ácida a 60 °C para obtener el extracto de compuestos polifenólicos.

#### 3.3.1 DETERMINACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES

Una vez extraídos los polifenoles de la semilla de chía se llevó a cabo su cuantificación. En la Tabla 5 se observa el contenido de polifenoles totales.

**Tabla 5. Contenido de polifenoles totales en los extractos obtenidos de semilla de chía**

Muestra	Extracción	mg EAG/ g semilla	Referencia
Extracto de chía <sup>■</sup>	Ácida	2.539 ± 0.117	Esta tesis
Extracto de chía <sup>*</sup>		2.881 ± 0.012	Cruz Pérez (2008)
Extracto de chía <sup>▲</sup>		0.889 ± 0.009	Reyes Caudillo (2006)
Extracto de chía	Cruda	0.921 ± 0.040	Reyes Caudillo (2006)

■ Promedio de 5 réplicas

\* T = 60 °C

▲ T = 90 °C

El promedio de polifenoles totales de la muestra es de 2.53 ± 0.0117 mg EAG/ g semilla, valor similar a los resultados obtenidos por Cruz Pérez (2008) quien trabajó previamente con estos extractos. Como se observa en la Tabla 4 el contenido de polifenoles totales de la chía depende de las condiciones de extracción con que se realice. Con los resultados obtenidos se confirma que la extracción ácida de polifenoles de chía a 60 °C es una mejor metodología para obtener una mayor cantidad de estos. Esta característica es necesaria ya que contar con cantidades suficientes de antioxidantes fue indispensable para realizar las diversas pruebas que se presentan más adelante.

### 3.4 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS

Una vez realizada la extracción de polifenoles de la semilla de chía, se realizó la evaluación de su actividad con el propósito de verificar que los extractos obtenidos fueran activos para su posterior utilización al elaborar las biopelículas activas.

La actividad antioxidante de los extractos polifenólicos de semilla de chía fue evaluada a través de dos ensayos de capacidad secuestrante de radicales libres. Estas especies son el radical DPPH• (1,1-difenil-2-picrilhidracil) y el radical catiónico ABTS<sup>+</sup>• [ácido 2,2'-Azino-Bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)], ya que son rápidos y sencillos, y al ser capturados por la mezcla polifenólica se presenta un cambio de color que se puede cuantificar espectrofotométricamente (Rogisnky et al., 2005).

#### 3.4.1 CAPACIDAD SECUESTRANTE SOBRE EL RADICAL 1,1-DIFENIL-2-PICRILHIDRAZIL (DPPH•)

Este ensayo se basa en la capacidad del radical DPPH• en reaccionar con donadores de hidrógeno como los polifenoles.

La Figura 8 muestra la cinética de la muestra, utilizando como estándar el Trolox, derivado del  $\alpha$ -tocoferol. En ella se observa que la muestra tarda alrededor de 6 minutos en llegar al estado estacionario, mientras que el Trolox lo hace casi al instante.

Se obtuvo una capacidad secuestrante promedio del 83.2% de los extractos polifenólicos, comparada con el Trolox (93.8%). Esto indica una buena actividad antioxidante. Ninguna de las dos especies tuvo 100% de inhibición ya que el producto final de la reacción deja un ligero color amarillo que absorbe en el espectro visible, por lo que un porcentaje de inhibición a partir del 93% indica inhibición completa (Millauskas et al., 2004).

Reyes Caudillo (2006) determinó un porcentaje para polifenoles de chía más alto, alrededor del 93%, sin embargo en investigaciones recientes Cruz Pérez (2008) encontró

que el valor de la capacidad secuestrante puede presentar valores hasta de 71.9% ya que depende del lugar de procedencia de la chía y de la temperatura con que se realice la extracción de los polifenoles.

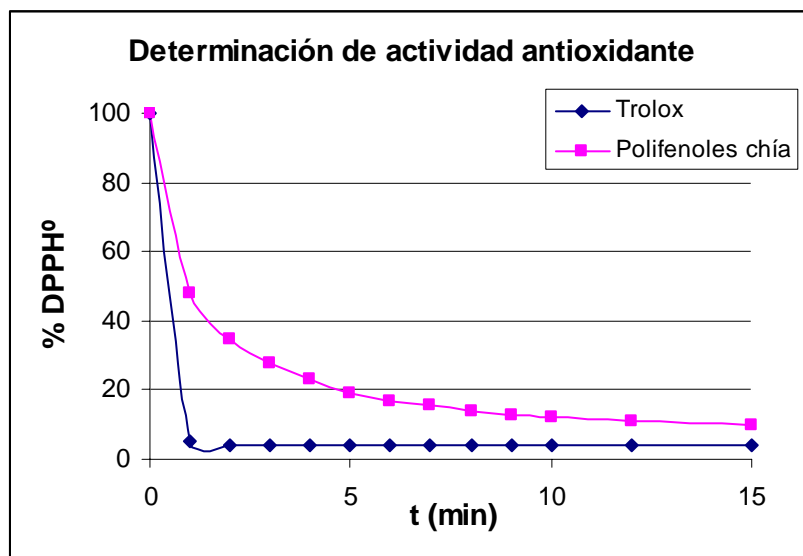


Figura 8. Cinética de la capacidad secuestrante del extracto a 200 ppm sobre el radical DPPH•

### 3.4.2 CAPACIDAD SECUESTRANTE SOBRE EL RADICAL ÁCIDO 2,2'-AZINO-BIS-(3-ETILBENZOTIAZOLIN-6-SULFÓNICO) (ABTS<sup>+</sup>•)

Con el objetivo de confirmar la actividad antioxidante de los polifenoles extraídos se llevó a cabo la determinación por el método de ABTS<sup>+</sup>• de una misma muestra por triplicado como se muestra en la Figura 9.

La gran ventaja de utilizar este método es su relativa facilidad, ya que es muy eficiente para determinaciones rutinarias, sin embargo su selectividad en la reacción con los donadores de hidrógeno es ligeramente menor a la del radical DPPH•.

Este ensayo mostró una capacidad secuestrante de 94% en promedio del extracto, muy semejante al porcentaje del Trolox (95,7%). Cruz Pérez (2008) reportó valores de 98.9% para su extracto polifenólico al utilizar las mismas condiciones de extracción.

La rapidez de reacción de las muestras así como la del Trolox es similar, llegan al estado estacionario en un intervalo de 0 a 1 min después de la reacción. Los resultados obtenidos en este ensayo son más altos que los resultados del primer ensayo corroborando que los extractos obtenidos a partir de semilla de chía contienen antioxidantes que presentan una buena capacidad de donar hidrógenos o electrones que podrían prevenir la reactividad de radicales.

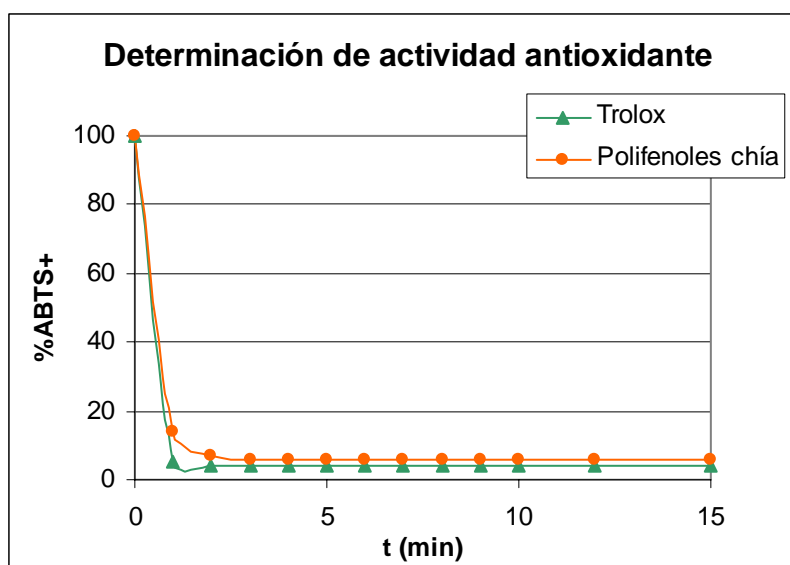


Figura 9. Cinética de la capacidad secuestrante del extracto a 200 ppm sobre el radical ABTS<sup>+</sup>•

### 3.5 INCORPORACIÓN DE ANTIOXIDANTES NATURALES EN BIOPELÍCULAS DE CHÍA

Después de comprobar la actividad antioxidante de los extractos polifenólicos obtenidos, se procedió a elaborar biopelículas a partir de concentrado proteínico, siguiendo el método de Bamdad et al. (2006). La película se preparó con una concentración del 5% CP chía y glicerol al 50% (w/w) con respecto al CP. Se ajustó el pH a 11 y se calentó a 70 °C por 20 min. Finalmente se filtró y se incorporaron los polifenoles naturales de semilla de chía en el mínimo volumen posible.

En la literatura no se mencionan las concentraciones permitidas para la incorporación de antioxidantes naturales tanto en alimentos como en biopelículas, por lo que se partió de una concentración de 200 ppm, ya que es la permitida para antioxidantes sintéticos, hasta una concentración de 1000 ppm.

Este ensayo fue realizado con el fin de observar el desarrollo de las biopelículas al incorporar los extractos polifenólicos en diferentes niveles de concentración. Los resultados se muestran a continuación.

**Tabla 6. Ensayo cualitativo de formación de películas incorporando polifenoles extraídos de la chia**

Muestra	Concentración de polifenoles (ppm)	Formación de la película
1	200	Óptima
2	300	Óptima
3	400	Óptima
4	500	Óptima
5	600	Óptima
6	700	Pobre
7	800	Pobre
8	900	Pobre
9	1000	Pobre

Como se observa en la Tabla 5 al incorporar extractos polifenólicos en concentraciones de 200 ppm a 600 ppm se obtienen biopelículas con óptimo desarrollo, es decir, con buena flexibilidad y fáciles de manejar. Estas películas se pudieron desprender sin problemas de los moldes. En contraste, al utilizar concentraciones de polifenoles de 700 ppm a 1000 ppm el desarrollo de la biopelícula fue pobre, a pesar de la formación de un gel no se pudo desprender del molde, por lo que en sí no se desarrolló adecuadamente la película. En todos los casos el color final de la película fue caramelo (Figura 10), correspondiente al color característico de las biopelículas de proteína de chía.



Figura 10. Película activa de chía con polifenoles naturales.

Los polifenoles se agregaron en una solución concentrada (7 mg/mL aproximadamente) con el fin de modificar mínimamente el pH de la solución de la película. Al agregar los polifenoles a la solución de la película se observaron precipitaciones debido a la naturaleza ácida que presentan los extractos y a la alta concentración en la que se adicionaron, por lo cual se utilizó agitación constante al incorporarlos. Esta es una de las razones por las cuales probablemente no se desarrollaron películas adecuadas a concentraciones mayores de 600 ppm de polifenoles ya que modifican el pH de la solución final de la película y por lo tanto las condiciones óptimas para su formación.



Hernández Jardón (2007) realizó estudios de la influencia que tiene el pH para la formación de películas de proteína de chíá y observó que a valores menores de pH 10 se obtenían películas delgadas y quebradizas.

También encontró que la formación de películas de concentrado proteínico de chíá depende de la presencia de pequeños péptidos de peso molecular menor de 5 kDa, ya que sin ellos las películas no presentan buena flexibilidad y son difíciles de manejar. La incorporación de polifenoles en concentraciones por arriba de 600 ppm posiblemente interfiere en las interacciones de estas moléculas para formar la red tridimensional ordenada que da lugar a la película, resultando en una mala formación de películas.

Otra razón por la cual no se forman películas adecuadas con altas concentraciones de polifenoles probablemente se deba a que estos interfieren en la interacción de las proteínas con el plastificante (glicerol) por lo que el desarrollo de las películas es pobre.

Con la finalidad de observar la formación de biopelículas activas de chíá con la incorporación de antioxidantes sintéticos se realizó una prueba para verificarlo. Se decidió preparar películas activas con TBHQ y una mezcla de BHA/BHT ya que son los antioxidantes más utilizados en alimentos. Se prepararon las películas activas siguiendo la misma metodología que en el caso anterior al preparar las películas con polifenoles naturales, para ambas películas estos antioxidantes se incorporaron en una concentración de 200 ppm ya que es la permitida para antioxidantes sintéticos. Las películas obtenidas mostraron un desarrollo óptimo en ambos casos. Al incorporar TBHQ la película resultante mostró un color ligeramente más oscuro al presentado por las películas con antioxidantes naturales.

### 3.6 CONFIRMACIÓN DE LA INCORPORACIÓN DE LOS POLIFENOLES NATURALES EN BIOPELÍCULAS ACTIVAS DE SEMILLA DE CHÍA

Una vez realizados los ensayos de desarrollo de biopelículas se decidió trabajar con biopelículas activas utilizando concentraciones de 200 ppm, 400 ppm y 600 ppm de polifenoles naturales. Para corroborar la presencia de estos en las películas se hicieron pruebas de determinación de polifenoles totales así como la evaluación de la capacidad secuestrante de las películas activas.

#### 3.6.1 DETERMINACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES

Con el fin de verificar la cantidad agregada teóricamente se llevó a cabo la cuantificación de los polifenoles en las películas. Los resultados se muestran a continuación en la Tabla 7.

**Tabla 7. Contenido de polifenoles totales en las biopelículas activas de semilla de chía.**

Película de CP chía	Concentración de polifenoles totales (mg EAG/ g película)		
	Experimental	Pel. Activa - Pel. S/antiox	Agregada
200 ppm polifenoles	16.81 ± 0.37	2.01 ± 0.39	1.48
400 ppm polifenoles	18.06 ± 0.44	3.26 ± 0.46	2.96
600 ppm polifenoles	19.62 ± 0.39	4.82 ± 0.42	4.44
Sin antioxidantes	14.80 ± 0.02		-----

Nota: Todas las películas contienen la misma humedad (2%)

Como se observa en la tabla anterior en los tres casos se observa un aumento de polifenoles totales en comparación con la película de chía sin antioxidantes naturales. Se muestran cantidades ligeramente mayores a las adicionadas. La película usada como

control muestra reacción con el reactivo de Folin–Ciocalteu ya que el concentrado de proteína con el que esta elaborada posee residuos con estructuras polifenólicas.

Por otra parte, el método Folin–Ciocalteu no es específico para polifenoles únicamente ya que pueden interferir azúcares reductores (Mätthaus, 2002), los cuales son parte del concentrado proteínico con el cual se forman las películas de chíá. A pesar de las diferencias observadas entre los valores agregados y experimentales se puede corroborar la incorporación de los polifenoles de chíá en las biopelículas.

### 3.6.2 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LAS BIOPELÍCULAS ACTIVAS

La evaluación de la actividad antioxidante de las biopelículas activas se determinó al igual que los extractos de chíá, a través de los ensayos de capacidad secuestrante de los radicales DPPH• y ABTS•.

Los ensayos se llevaron a cabo en las tres biopelículas activas elaboradas que se estuvieron manejando (200 ppm, 400 ppm y 600 ppm de polifenoles). Para realizar las pruebas, todas las muestras de biopelícula fueron estandarizadas a la misma concentración de antioxidantes, es decir, se ajustó siempre la concentración de polifenoles a 200 ppm. En la Tabla 8 se muestran los porcentajes de capacidad secuestrante obtenidos para ambos ensayos.

**Tabla 8. Resultados de la evaluación de la capacidad secuestrante sobre los radicales DPPH• y ABTS• en las biopelículas activas**

Muestra	% Capacidad secuestrante	
	DPPH°	ABTS+
Biopelícula CP chíá con polifenoles naturales	81.1 ± 2.10a	91.8 ± 3.41c
Polifenoles chíá	83.2 ± 1.42a	94.0 ± 0.84c
Trolox	93.8 ± 0.15b	95.7 ± 0.27d

Letras iguales indican que no existe diferencia significativa  $\alpha = 0.05$

Tanto en el ensayo de capacidad secuestrante del radical DPPH• como del radical ABTS•+, los resultados obtenidos de las tres biopelículas activas analizadas no muestran diferencia estadística entre ellas. Tampoco se encontró diferencia significativa al compararlas con los valores de los extractos polifenólicos analizados previamente. Los resultados indican que los polifenoles adheridos a las películas poseen la misma capacidad de donar hidrógenos o electrones para prevenir la reactividad del radical que los extractos de los polifenoles.

La Figura 11 muestra tanto la cinética de la biopelícula activa así como la de los extractos polifenólicos de chía del ensayo con DPPH•.

Durante los primeros 5 minutos se puede observar que la cinética de la película activa es diferente a la del extracto polifenólico, debido a las interacciones entre los polifenoles, las proteínas y el plastificante de las biopelículas los antioxidantes tardan en reaccionar con el radical, además del ruido generado por el mismo procedimiento, son la razones por las cuales la curva de esta muestra tarda en establecer la pendiente hacia el estado estacionario

Al realizar esta determinación se obtuvo una gran interferencia durante la cinética de las biopelículas, sin embargo se logran ver las tendencias de las curvas.

En el caso de la determinación con el radical ABTS•+ se puede apreciar, en la Figura 12, que la biopelícula llega al estado estacionario en alrededor de 5 minutos. La reacción tarda en estabilizarse debido a que los polifenoles no están totalmente libres ya que se encuentran formando interacciones con los demás componentes de las películas sin embargo, se encuentran disponibles para reaccionar con el radical. Al contrario del ensayo anterior con el radical DPPH•, las cinéticas de la capacidad secuestrante sobre el radical ABTS•+ no mostraron ninguna interferencia a lo largo del tiempo transcurrido.

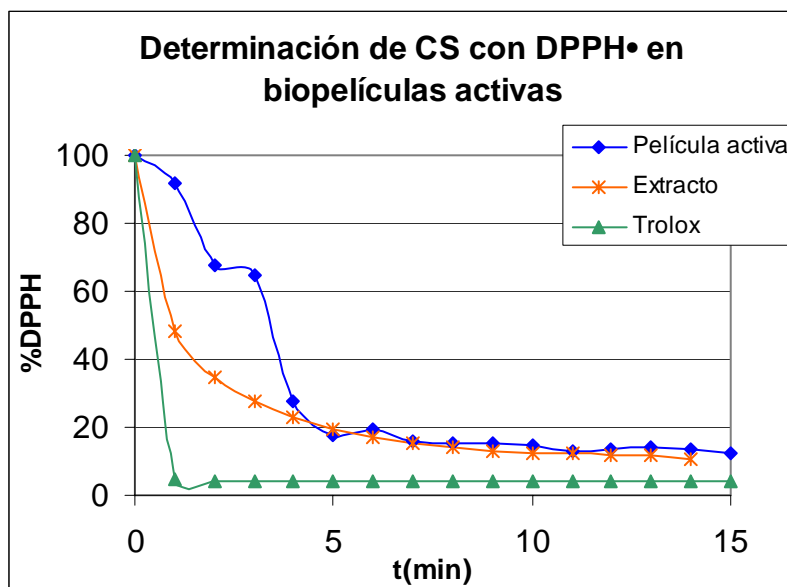


Figura 11. Cinética de la capacidad secuestrante de las biopelículas activas sobre el radical DPPH•

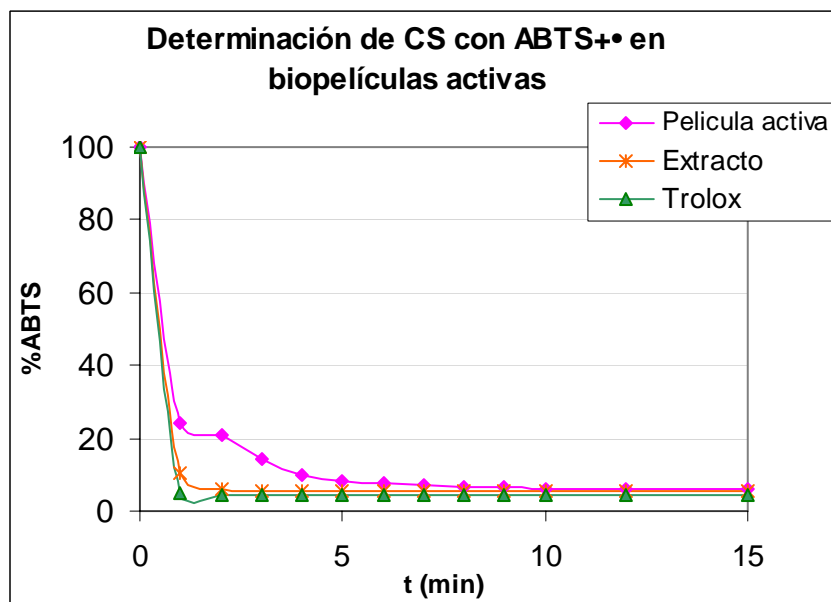


Figura 12. Cinética de la capacidad secuestrante de las biopelículas activas sobre el radical ABTS•+

La diferencia que se observa en el porcentaje de capacidad secuestrante entre los ensayos con DPPH• y ABTS•+ se debe a que el segundo es menos selectivo y reacciona con compuestos aromáticos que no necesariamente son donadores de hidrógeno (Roginsky et al., 2005).

### 3.7 EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES DE BARRERA DE LAS BIOPELÍCULAS ACTIVAS

Una vez elaboradas las películas activas se procedió a conocer sus propiedades de barrera a través de la permeabilidad al vapor de agua y al oxígeno ya que uno de los aspectos más importantes en el desarrollo de materiales biodegradables para proteger alimentos del medio ambiente y de los componentes adyacentes, es que estos ofrezcan una baja permeabilidad al vapor de agua, oxígeno y bióxido de carbono (Ayranci & Tunc, 2003).

#### 3.7.1 PERMEABILIDAD AL VAPOR DE AGUA

La permeabilidad al vapor de agua (PVA) es una propiedad importante de las películas que ha sido ampliamente estudiada. Esta determinación se llevó a cabo siguiendo la metodología ASTM E9-95 (2002) para conocer la ganancia en peso de un desecante cubierto con las películas, en condiciones de temperatura y humedad relativas controladas.

En la Tabla 9 se muestran los valores de PVA promedio de las biopelículas activas, elaboradas a partir de CPchía, con dos diferentes antioxidantes: sintético (TBHQ) y natural (polifenoles de chía) y se comparan con otras películas biodegradables tanto normales como activas así como con la PVA de plásticos sintéticos comerciales.

Se observa claramente que la PVA presentada por las películas proteínicas es mayor a los valores reportados por los plásticos sintéticos ya que se sabe de estudios anteriores que las películas obtenidas a partir de proteína son hidrofílicas (Fang et al., 2002).

Al comparar las películas activas de chía con otras películas activas reportadas, es notoria la diferencia que presentan entre ellas, siendo superiores las elaboradas a partir de CPchía. Sin embargo las películas de proteína de chía sin antioxidantes poseen menor PVA que las películas activas del mismo origen. Las películas activas con TBHQ muestran

un ligero aumento en la permeabilidad con respecto a las primeras, mientras que las películas que contienen polifenoles naturales de chía señalan el doble de PVA.

**Tabla 9. Permeabilidad al vapor de agua de las películas activas elaboradas con CPchía y de otras películas de origen proteínico y sintético.**

Tipo de película		PVA ng/Pa*s*m 10 <sup>3</sup>	PVA relativa respecto a LDPE
Concentrado de proteína de semilla limón		2.12 ± 0.279♦*	11.78
Concentrado de proteína de chía		1.32 ± 0.022▼○	7.33
Activa	CPchía/glicerol 50% (w/w)	TBHQ 200 ppm	1.66 ± 0.371▪a
		Polifenoles de chía 600ppm	2.09 ± 0.111▪b
	Gelatina de pescado (PP)	Polifenoles de hoja de murtila	50.8 ± 3.06♣
	CMC	Polifenoles de hoja de murtila	67.38 ± 0.32ψ
Plásticos Sintéticos		Egapack (PVC)	0.28 ± 0.016♦
		Ziploc (LDPE)	0.18 ± 0.0047♦
Cubierta de celulosa		0.64 ± 0.025▼	3.55

▪ Promedio de 3 réplicas

♣ Gómez-Guillén et al, 2006; 2%PP/25% glicerol

▼ Hernández Jardón, 2007

○ 5%CPchía/50%glicerol(w/w)

♦ Alvarado Suárez, 2008

\* 5%CPchía/50%glicerol(w/w)

ψ Bifani et al, 2007; 2%CMC/20%glicerol(w/w)

Letras diferentes indican diferencia significativa  $\alpha=0.05$

La PVA de las películas de chía es mayor al de las películas sintéticas debido a que esta propiedad depende del balance de aminoácidos del biopolímero. Olivos Lugo (2005) encontró que el 60% de los aminoácidos de la chía son de naturaleza hidrofílica.

Por trabajos previos realizados por Hernández Jardón (2007) ya se tenía conocimiento de que las películas de proteína de semilla de chía presentaban PVA menores a las de otras películas de origen proteínico, proporcionando una propiedad de barrera al vapor de agua aceptable. Por esta razón se evaluó la PVA en dos biopelículas de chía activas de la misma naturaleza (CPchía y glicerol como plastificante), encontrándose que muestran una menor resistencia a la migración de agua del exterior hacia la matriz protegida.

Las biopelículas activas de chía con antioxidantes naturales contienen compuestos polifenólicos, los cuales les confieren un aumento de grupos polares en la composición de las películas, incrementando la afinidad por el agua que se refleja en un aumento de la PVA. Por otra parte la película activa con TBHQ muestra una permeabilidad al vapor de agua ligeramente mayor a la presentada por las películas de proteína de chía sin antioxidantes, sin embargo no es significativo. Esto puede deberse a que este antioxidante sintético solamente cuenta con dos grupos hidroxilo en su estructura y presenta poca afinidad con el agua ya que es ligeramente soluble en ella, además se encuentra en una baja concentración en la película; por estas razones afecta en menor grado esta propiedad de la película. A pesar de mostrar aumentos en la PVA, las películas activas de chía presentan valores similares a los reportados para las películas de proteína de semilla de limón  $0.00212 \text{ ng/Pa}\cdot\text{s}\cdot\text{m}$  y superiores al de zeína de maíz  $0.116 \text{ ng/Pa}\cdot\text{s}\cdot\text{m}$  (Bamdad et al., 2005).

### 3.7.2 PERMEABILIDAD AL OXÍGENO

El oxígeno es el responsable de la mayoría de las reacciones de oxidación en alimentos, incluyendo el crecimiento de microorganismos, oscurecimiento enzimático y la oxidación de moléculas específicas como proteínas, vitaminas, ácidos grasos, etc. Por lo tanto la permeabilidad al oxígeno de las películas de proteína es un aspecto fundamental de su funcionalidad (Sundaresan & Ludescher, 2008).

Las propiedades de barrera de una película están dadas por la naturaleza del polímero, por lo general los hidrofílicos muestran buenas propiedades de barrera al oxígeno (Sothornivit & Pitak, 2007). En el caso de las elaboradas con proteína se debe considerar, al igual que en la determinación de PVA, el balance de aminoácidos que presentan.



En la Tabla 10 se muestran los resultados obtenidos de permeabilidad al oxígeno (PO) de las películas activas de chía con diferentes antioxidantes, así como la permeabilidad al oxígeno de otras películas proteínicas y la de un plástico sintético.

**Tabla 10. Permeabilidad al oxígeno de las películas activas elaboradas con CPchía y de otras películas de origen proteínico y sintético a Temperatura y Presión estándar.**

Tipo de película		PO cm <sup>3</sup> μm/m <sup>2</sup> dkPa	CV %	PO relativa con respecto a metilcelulosa
Concentrado de proteína de semilla limón		19.37▲◇	7.74	2.85
Concentrado de proteína de chía		17.79▲◇	1.58	2.62
Activa	CPchía/glicerol 50% (w/w)	TBHQ 200ppm	14.23•a	8.45
		Polifenoles de chía 600ppm	12.86•a	11.13
Plástico Ziploc (LDPE)		57.85▲	5.68	8.51
Metilcelulosa		6.8♣	36	1

▪ Promedio de 3 réplicas

♣ Sothornivit & Pitak, 2007

Letras iguales indican que no existe diferencia significativa  $\alpha=0.05$

▲ Alvarado Suárez, 2008

◇ CP/50%glicerol(w/w)

Como se observa en la Tabla anterior la permeabilidad al oxígeno que presentan ambas películas activas no presenta diferencia significativa entre ellas. Al comparar sus valores con un plástico sintético, LDPE, se observa que presentan una cuarta parte de la PO de este, por lo que se pueden considerar valores bajos, ya que en general, una barrera al oxígeno de un polímero se define como un polímero con un valor de PO inferior a 38.9 cm<sup>3</sup>μm/m<sup>2</sup>dkPa (Hong & Krotcha, 2006). Estos resultados señalan una mejora de la PO con respecto a la mostrada por la película de concentrado de proteína de chía sin antioxidantes, la cual ya exhibía una baja permeabilidad al oxígeno.

Estudios previos realizados por Hong & Krotcha (2006) han demostrado que las películas de proteína presentan una baja permeabilidad al oxígeno, por lo que tienen un gran potencial para sustituir en parte a los costosos polímeros sintéticos ya que presentan ventajas como recubrimientos de alimentos susceptibles a la oxidación. Además de que pueden retardar la velocidad de respiración de frutas y verduras (Sothornivit & Pitak, 2007).

### **3.8 EVALUACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD DE LAS BIOPELÍCULAS ACTIVAS COMO BARRERAS PROTECTORAS DE ALIMENTOS**

Por último se llevó a cabo la evaluación de la funcionalidad de las biopelículas activas de proteína de chíá como protectoras de alimentos utilizándolas como recubrimiento de una matriz alimentaria susceptible al deterioro oxidativo. Para este fin se empleó cacahuate tostado debido a su alto contenido de lípidos y a su baja actividad acuosa que evita el desarrollo microbiano.

#### **3.8.1 PRIMER ENSAYO**

Para este primer ensayo se evaluó la capacidad que poseen tanto biopelículas como plásticos sintéticos para actuar como barreras protectoras de alimentos. Se utilizaron ocho recubrimientos en total: cuatro biopelículas activas de concentrado de proteína de chíá con diferentes concentraciones de antioxidantes, tres de ellas con polifenoles naturales y una con TBHQ; una biopelícula de chíá sin antioxidantes, dos plásticos sintéticos (Egapack y Ziploc) y una cubierta de celulosa.

Este primer ensayo se realizó por un lapso de 30 días y a dos diferentes temperaturas (ambiente y 45 °C) para lo cual se elaboraron dos lotes.

- Temperatura ambiente

Este primer lote se mantuvo a temperatura ambiente durante treinta días. En la Tabla 11 se muestran los resultados del deterioro oxidativo de las muestras determinados a través del índice de peróxidos.

**Tabla 11. Velocidad de formación de peróxidos de las muestras protegidas con diferentes películas a temperatura ambiente.**

Tipo de recubrimiento	Tiempo 1 Día 30	T1/T0	Velocidad media
	meq peróxido/kg de aceite		meq peróxido/kg de aceite*día
Biopelícula CPchía/ glicerol 50%	26.1 (6.33%) <sup>a</sup>	10.44	0.870
Biopelículas activas CP chía/ glicerol 50%	TBHQ 200 ppm	17.7 (4.26%) <sup>c</sup>	0.590
	Polifenoles chía 200 ppm	24.5 (3.66%) <sup>a</sup>	0.817
	Polifenoles chía 400 ppm	20.6 (4.45%) <sup>b</sup>	0.690
	Polifenoles chía 600 ppm	18.9 (9.56%) <sup>c</sup>	0.630
Plásticos sintéticos	Egapack	33.3 (5.20%)	1.110
	Ziploc	31.1 (13.07%)	1.036
Cubierta de celulosa	21.5 (9.86%) <sup>b</sup>	8.60	0.716

Nota: T0 = 2.5 (6.4%) meq peróxido / kg de aceite  
 Letras iguales indican que no existe diferencia significativa ( $\alpha = 0.05$ )

En el tiempo cero se observa presencia baja de peróxidos ya que el cacahuete es un alimento muy susceptible a la oxidación. Transcurridos los 30 días se observa una diferencia en la formación de peróxidos en las muestras. Las muestras más deterioradas fueron las protegidas con los plásticos sintéticos Egapack y Ziploc con más de 30 meq de peróxido/kg de aceite. Las que le siguen en formación de peróxidos fueron las protegidas con biopelículas de chía, tanto el control sin antioxidantes como la activa con 200 ppm, con 26.05 y 24.5 meq peróxido/kg de aceite respectivamente, entre los cuales no se encontró diferencia significativa. A estos resultados le siguen los obtenidos con las muestras recubiertas con celulosa, 21.5 meq peróxido/kg aceite, y con la biopelícula activa con 400 ppm de polifenoles, con 20.65 meq peróxidos/kg aceite; estos valores tampoco mostraron diferencia significativa. Finalmente las menos deterioradas fueron las protegidas con biopelículas activas con 600 ppm de polifenoles naturales, 18.9 meq peróxidos/kg aceite, y con antioxidante sintético 17.7 meq peróxidos/kg aceite. Cabe señalar que entre estas dos muestras no se encontró diferencia significativa. Estas muestras

presentaron el menor incremento de meq de peróxidos en 30 días y la menor velocidad de oxidación de lípidos.

Además del índice de peróxidos se llevó a cabo la determinación de compuestos carbonílicos por medio del índice de Kreis, los resultados se muestran a continuación en la Tabla 12.

**Tabla 12. Determinación del índice de Kreis de las muestras protegidas con diferentes películas a temperatura ambiente**

Tipo de recubrimiento	Tiempo 1 Día 30	T1/T0	Velocidad media
	Abs 540 nm/ g aceite		Abs 540 nm/ g aceite*día
CPchía/ glicerol 50%	0.316 (11.84%)	1.80	0.0105
Biopelículas activas CP chía/ glicerol 50%	TBHQ 200ppm	0.228 (8.89%)	0.0076
	Polifenoles chía 200ppm	0.355(8.76%)	0.0118
	Polifenoles chía 400ppm	0.260 (3.52%)	0.0087
	Polifenoles chía 600ppm	0.217(12.13%)	0.0072
Plásticos sintéticos	Egapack	0.629 (2.66%)	0.0210
	Ziploc	0.676(4.08%)	0.0225
Cubierta de celulosa	0.254(10.586%)	1.45	0.0085

Nota: T0 = 0.175(7.46%) Abs 540nm /g aceite

En el segundo monitoreo realizado a los treinta días se observó un aumento en el contenido de compuestos carbonílicos. Los valores más altos corresponden a las muestras protegidas por los plásticos sintéticos, mostrando más del triple de compuestos carbonílicos de los que se tenían en un inicio. Estos resultados fueron seguidos de las muestras cubiertas con la biopelícula sin antioxidantes como con la biopelícula activa con 200 ppm mostrando el doble de compuestos carbonílicos. Las muestras protegidas con películas activas con TBHQ 200 ppm y polifenoles 600 ppm presentaron el menor incremento a los 30 días y la menor velocidad de formación de compuestos carbonílicos con valores muy similares. Los resultados del índice de Kreis son congruentes con el índice

de peróxidos ya que en la etapa de inicio del deterioro oxidativo valores altos de peróxidos corresponden a altos contenidos de compuestos carbonílicos.

Uno de los factores que influyen en los resultados anteriores es la luz ya que los lípidos son susceptibles a la oxidación en presencia de esta. Las biopelículas presentan una coloración caramelo que podría proteger a las muestras de este factor, en cambio los plásticos sintéticos que son transparentes son más susceptibles a la catálisis de la luz ya que permiten por completo el paso de esta, sin embargo esto no se presenta en el caso de la cubierta de celulosa que también es transparente y la oxidación que presenta es similar a las de las biopelículas. En trabajos previos Alvarado Suárez (2008) observó que el color de las películas no es un factor determinante en la protección que presentan las películas proteínicas de chíá. Además de la luz el oxígeno genera la mayor formación de radicales que propician la oxidación. En el caso de las biopelículas activas se observa menor deterioro que el resto de las cubiertas debido a que presentan un efecto combinado, por una parte permiten baja permeabilidad al oxígeno y por otra parte los antioxidantes estabilizan los radicales formados retardando el proceso de rancidez.

- Temperatura 45 °C

Este lote se mantuvo en una incubadora a 45 °C durante 30 días con la finalidad de aumentar la velocidad de oxidación del cacahuete y observar el efecto de protección de las películas activas de chíá. Los resultados del deterioro oxidativo determinado a través del índice de peróxidos se muestran en la Tabla 13.

**Tabla 13. Velocidad de formación de peróxidos de las muestras protegidas con diferentes películas a 45°C en oscuridad**

Tipo de recubrimiento		Tiempo 1 Día 30	T1/T0	Velocidad media
		meq peróxido/kg de aceite		meq peróxido/kg de aceite*día
CPchía/ glicerol 50%		20.4 (5.92%)a	8.16	0.680
Biopelículas activas CP chía/ glicerol 50%	TBHQ 200ppm	18.1 (7.07%)b	7.24	0.603
	Polifenoles chía 200ppm	21.7 ( 8.59%)a	8.68	0.723
	Polifenoles chía 400ppm	20.9 (1.67%)a	8.36	0.697
	Polifenoles chía 600ppm	18.6 (4.01%)b	7.44	0.620
Plásticos sintéticos	Egapack	28.9(9.69%)	11.6	0.963
	Ziploc	28.1(10.32%)	11.2	0.937
Cubierta de celulosa		20.3 (4.34%)a	8.12	0.677

Nota: T0 = 2.5 (6.41%) meq peróxido / kg de aceite  
 Letras iguales indican que no existe diferencia significativa ( $\alpha = 0.05$ )

El valor que presentó la muestra en el tiempo cero fue bajo. En el tiempo uno se observan valores de deterioro oxidativo altos. Las muestras que presentaron mayor cantidad de peróxidos fueron las protegidas con Egapack y Ziploc, con más de 28 meq de peróxido/kg de aceite, además presentaron la mayor velocidad de formación de peróxidos. A estos valores le siguen las muestras protegidas con: la biopelícula de chía, 20.4 meq de peróxido/ kg de aceite; biopelículas activas con 200 ppm y 400 ppm de polifenoles, con 21.7 y 20.9 meq de peróxido/kg de aceite respectivamente, y la cubierta de celulosa, 20.3 meq de peróxido/kg aceite. Ninguna de las cuatro muestras mostró diferencia significativa entre ellas. Finalmente, las muestras que presentaron menor daño oxidativo fueron las protegidas con películas activas de proteína de chía con TBHQ y 600 ppm de polifenoles naturales, con 18.1 y 18.6 meq de peróxido/kg de aceite respectivamente. Entre estas muestras no se encontró diferencia significativa. Y la velocidad media de formación de peróxidos de estas últimas es alrededor de 0.6 meq peróxido/ kg aceite\*día.

Al comparar la velocidad media del lote 1 (T amb.) y el lote 2 (45 °C) se observa una ligera superioridad de formación de peróxidos a temperatura ambiente, sin embargo las

muestras protegidas con películas activas con TBHQ 200 ppm y 600 ppm de polifenoles en ambas temperaturas la velocidad es muy similar, tan solo se observa un aumento de 0.01 meq peróxidos/kg aceite\* día entre el lote 1 y el lote 2 en las dos muestras. Tampoco se encontró diferencia significativa en la cantidad de peróxidos formados a los 30 días en ambas temperaturas. En el caso de las determinaciones realizadas a las muestras contenidas en Egapack y Ziploc hay una diferencia significativa de meq peróxidos/kg aceite entre las dos temperaturas y una mayor velocidad a Temperatura ambiente.

Los valores de la determinación del índice de Kreis se muestran en la Tabla 14.

**Tabla 14. Determinación del índice de Kreis de las muestras protegidas con diferentes películas a 45°C en obscuridad**

Tipo de recubrimiento		Tiempo 1 Día 30	T1/T0	Velocidad media
		Abs 540 nm /g aceite		Abs 540 nm /g aceite*día
CPchía/ glicerol 50%		0.245 (5.22%)	1.40	0.0082
Biopelículas activas CP chía/ glicerol 50%	TBHQ 200ppm	0.223 (11.48%)	1.27	0.0074
	Polifenoles chía 200ppm	0.252 (10.5%)	1.44	0.0084
	Polifenoles chía 400ppm	0.239(7.58%)	1.37	0.0080
	Polifenoles chía 600ppm	0.218(9.47%)	1.25	0.0073
Plásticos sintéticos	Egapack	0.368(3.152%)	2.10	0.0123
	Ziploc	0.421 (5.43%)	2.41	0.0140
Cubierta de celulosa		0.238(13.07%)	1.36	0.0079

Nota: T0 = 0.175(7.46%) Abs 540nm /g aceite

Los resultados de la determinación de los compuestos carbonílicos muestran un aumento en el tiempo uno con respecto al tiempo cero. Se observó la mayor cantidad de compuestos carbonílicos en las muestras protegidas con los plásticos sintéticos. El menor aumento de compuestos carbonílicos corresponde a las muestras protegidas con películas activas con TBHQ 200 ppm y 600 ppm de polifenoles así como la menor velocidad de formación, alrededor de 0.007 Abs 540 nm/g aceite\*día. Las muestras con

mayor velocidad y formación de compuestos carbonílicos corresponden a las protegidas con Ziploc y Egapack.

En el tiempo de prueba no se observó con claridad el efecto de la temperatura sobre la velocidad de oxidación de los lípidos del cacahuete ya que al comparar el lote dos (45 °C) con el lote uno (T ambiente), contrario a lo que se esperaba, la velocidad de oxidación a 45 °C fue menor. Los antioxidantes propios de la oleaginosa junto con las películas activas de chía fueron suficiente protección para evitar una oxidación acelerada a esta temperatura.

### 3.8.2 SEGUNDO ENSAYO

Con el objetivo de analizar la cinética del deterioro oxidativo de la muestra, se realizó un segundo ensayo utilizando cacahuete recubierto con las mismas películas: activas, plásticas sintéticas y naturales, empleadas en el primer ensayo. Para este ensayo el tiempo de almacenamiento fue de 60 días a temperatura ambiente ya que los resultados del ensayo anterior mostraron valores similares de peróxidos a ambas temperaturas, inclusive se encontró una velocidad de oxidación lipídica ligeramente superior a temperatura ambiente. En este segundo ensayo se realizaron tres monitoreos: tiempo cero, treinta días y finalmente 60 días.

En la Tabla 15 se muestran los valores obtenidos del índice de peróxidos en los diferentes tipos de recubrimientos para el tiempo cero, tiempo uno y tiempo dos.



**Tabla 15. Velocidad de formación de peróxidos de las muestras protegidas con diferentes películas**

Tipo de recubrimiento	Tiempo 1 Día 30	Tiempo 2 Día 60	T1/T0	T2/T0	Velocidad media	
	meq peróxido / kg de grasa				meq peróxido/ kg*día	
CPchía/ glicerol 50%	24.90(5.02%)	39.57(5.27%)	8.03	12.76	0.599	
Biopelículas activas CP chía/ glicerol 50%	TBHQ 200ppm	18.55(2.54%) <sup>b</sup>	31.57(1.46%) <sup>a</sup>	5.98	10.18	0.465
	Polifenoles 200ppm	23.55(8.26%) <sup>a</sup>	33.82 (2.96%) <sup>a</sup>	7.59	10.91	0.504
	Polifenoles chía 400ppm	20.63(2.94%) <sup>c</sup>	29.10 (9.2%) <sup>a</sup>	6.65	9.39	0.425
	Polifenoles chía 600ppm	18.95(6.84%) <sup>b</sup>	26.86(4.89%)	6.11	8.66	0.354
Plásticos sintéticos	Egapack	35.64 (5.19%)	106(9.42%)	11.49	34.19	1.061
	Ziploc	43.11(7.14%)	185(18.5%)	13.91	59.67	1.071
Cubierta de celulosa	24.02(3.67%) <sup>a</sup>	43.11(7.14%)	7.75	30.03	1.058	

Nota: T0 = 3.6 (3.1%) meq peróxido / kg de aceite  
Letras iguales indican que no existe diferencia significativa ( $\alpha = 0.05$ )

Se observa que en el tiempo cero hay baja presencia de peróxidos. Transcurridos los primeros 30 días se observan diferentes cantidades de peróxidos formados en las muestras. Estas cantidades señalan una tendencia similar a la del primer ensayo a temperatura ambiente: las muestras más deterioradas corresponden a los plásticos sintéticos, seguidas de la cubierta de celulosa y las biopelículas de chía sin antioxidante y con 200ppm de polifenoles, que no muestran diferencia significativa entre ellas; posteriormente la biopelícula activa con 400 ppm y finalmente las biopelículas activas con TBHQ y 600ppm de polifenoles fueron las muestras con menor cantidad de peróxidos.

En el tiempo dos la diferencia en la cantidad de peróxidos de las muestras con los distintos recubrimientos es mucho mayor. Los valores del índice de peróxidos para las muestras protegidas con los plásticos sintéticos se elevan considerablemente, llegando a valores superiores de 100 meq peróxido/kg de aceite. La muestra protegida con Egapack aumentó 34.19 veces y la protegida con Ziploc 59.67 veces la cantidad de peróxidos formados con respecto a la cantidad inicial. La muestra de la cubierta de celulosa también presenta valores muy altos, aumentando 30.03 veces la cantidad de peróxidos

con respecto al tiempo cero. En cambio, la película de proteína de chía muestra un marcado efecto de protección ya que presenta menos de la mitad de peróxidos que los anteriores tres recubrimientos, sin embargo las películas activas de chía muestran valores aun más bajos. Las biopelículas con 200 ppm y 400 ppm de polifenoles de chía, y con TBHQ presentaron el mismo efecto de protección. La muestra recubierta con la biopelícula activa con 600ppm de antioxidantes naturales presentó la menor cantidad de peróxidos.

En la figura 13 se observa la cinética del deterioro oxidativo obtenida a través del índice de peróxidos. Las curvas de las muestras protegidas con los plásticos sintéticos y con la cubierta de celulosa indican que a los 60 días estas se encuentran en el periodo de propagación del deterioro oxidativo. Estas curvas, que corresponden a una cinética de primer orden, presentan velocidades elevadas con respecto a las películas de chía. La muestra cubierta con Ziploc fue la deteriorada con mayor velocidad, a 1.071 meq peróxido/kg\*día. La cinética de todas las muestras protegidas con películas activas de chía indica que a los 60 días de almacenamiento estas se encuentran en el periodo de inducción. Al prolongarse el periodo de inducción y no alcanzar la etapa de propagación la velocidad de formación de peróxidos es menor. Al termino del monitoreo se observa que la muestra cubierta con la película activa con 600 ppm de polifenoles presentó la menor velocidad de oxidación lipídica, es decir, 0.354 meq peróxido/kg\*día. Estos resultados indican una mayor protección de la muestra al utilizar las películas activas de chía en comparación con los plásticos sintéticos.

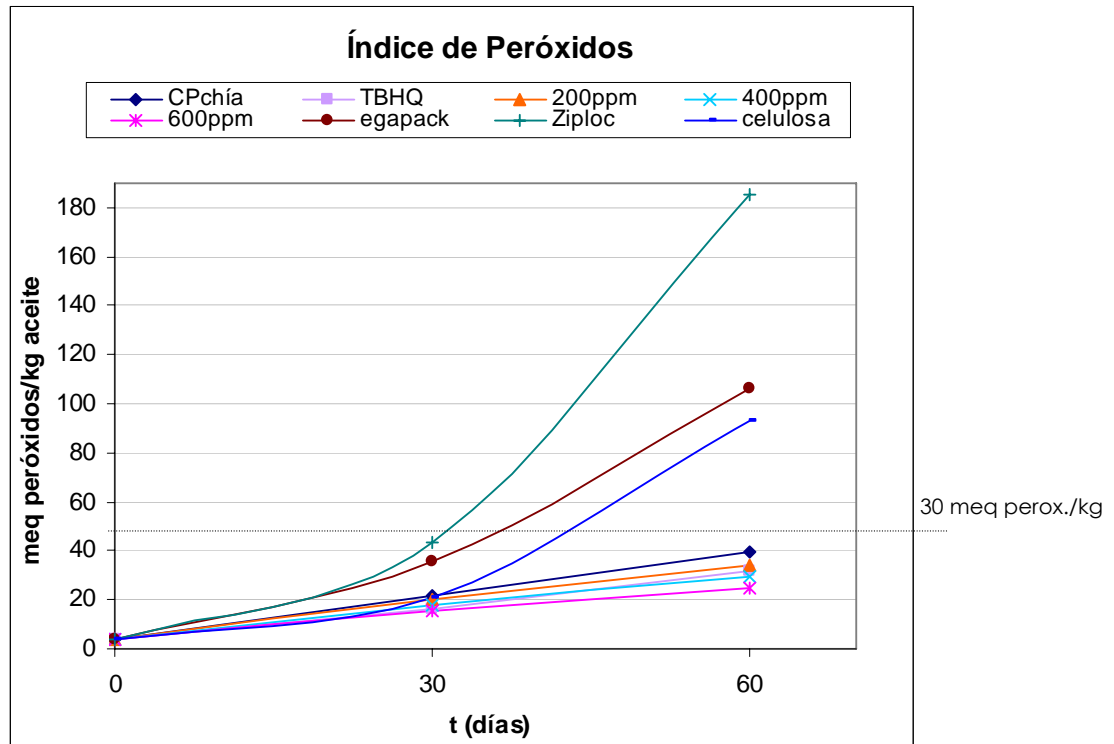


Figura 13. Índice de peróxidos de muestras protegidas con diferentes películas a T ambiente.

Con respecto al índice de Kreis (Tabla 16) se observa una tendencia similar a la presentada por el índice de peróxidos. En el tiempo cero se observan valores muy bajos, aumentando en el tiempo uno siendo las muestras protegidas con películas activas las menos deterioradas ya que presentaron el menor aumento de compuestos carbonílicos con respecto al tiempo cero. En el tiempo dos los valores aumentan aun más, manteniendo la tendencia y la diferencia con los plásticos sintéticos es más notoria, el valor más alto corresponde a la muestra cubierta con Ziploc seguida del Egapack y la cubierta de celulosa. Las muestras protegidas con películas activas con 200 ppm y 600 ppm de polifenoles presentaron los menores aumentos de compuestos carbonílicos al final del monitoreo con respecto al tiempo cero y la menor velocidad de formación de estos.

**Tabla 16. Determinación del índice de Kreis de las muestras protegidas con diferentes películas.**

Tipo de recubrimiento		Tiempo 1	Tiempo 2	T1/T0	T2/T0	Velocidad media
		Día 30	Día 60			Abs 540 nm /g grasa*día
		Abs 540 nm /g grasa				
CPchía/ glicerol 50%		0.803(6.42%)	1.355(6.64%)	3.21	5.42	0.0184
Biopelículas activas CP chía/ glicerol 50%	TBHQ 200ppm	0.346(5.31%)	1.333(6.02%)	1.38	5.33	0.0178
	Polifenoles 200ppm	0.298(12.34%)	1.281(4.52%)	1.19	5.12	0.0181
	Polifenoles 400ppm	0.453(9.37%)	1.119(11.69%)	1.81	4.48	0.0148
	Polifenoles 600ppm	0.489(2.144%)	1.136(4.11%)	1.96	4.54	0.0145
Plásticos sintéticos	Egapack	0.980(15.21%)	2.188(2.78%)	3.92	8.75	0.0323
	Ziploc	0.842 (7.48%)	7.403(5.23%)	3.37	29.61	1.0547
Cubierta de celulosa		0.521(3.79%)	1.756(3.22%)	2.084	7.02	0.0251

Nota T0 = 0.25 (4.26%) Abs 540 nm / g aceite

El avance del índice de Kreis respecto al tiempo se observan en las Figuras 14, en donde se confirma la etapa de propagación del deterioro en el caso de las cubiertas plásticas, mientras que en el caso de las películas de proteína de chía a los 60 días todavía se observa la etapa de iniciación de la oxidación lipídica del cacahuete.

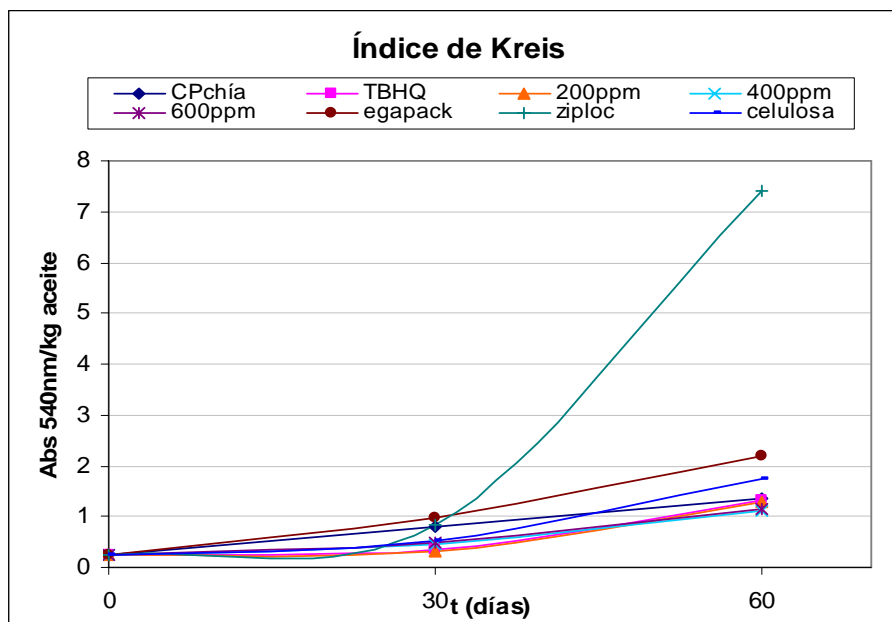


Figura 14. Índice de peróxidos de muestras protegidas con diferentes películas a T ambiente.

Como se observa en los resultados anteriores las películas de proteína de chíá presentan superior funcionalidad como barreras protectoras de alimentos a la presentada por los plásticos sintéticos ya que retardan el deterioro oxidativo al prolongar el periodo de inducción en la cinética de formación de peróxidos y disminuir su velocidad de formación. Este retardo del deterioro oxidativo fue observado previamente por Alvarado Suárez (2008) al comparar películas proteínicas de chíá con un plástico sintético, confirmándose el efecto de protección de las películas de chíá sobre una matriz alimentaria.

Con la finalidad de comparar el efecto de protección que brindan las biopelículas activas de chíá con respecto a las demás cubiertas, se calculó un factor de protección (PF), el cual esta basado en la cinética de formación de peróxidos, indicando el retardo del inicio del periodo de propagación que produce un antioxidante, en el deterioro oxidativo de una muestra. Para obtener el PF de las diferentes películas es necesario conocer el término del periodo de inducción, en la cinética de la oxidación del cacahuete, de cada una de las muestras. Ya que este parámetro relaciona las muestras que contienen antioxidantes con las demás cubiertas en función del tiempo. En la Tabla 17 se muestran los resultados obtenidos.

**Tabla 17. Valores del factor de protección de las biopelículas activas de chíá.**

Cubierta	Antioxidante	Concentración	Factor de Protección (PF)
Película CP chíá	-----	-----	3.53
Película activa de CP chíá	TBHQ	200 ppm	3.53
	Polifenoles de semilla de chíá	200 ppm	3.53
		400 ppm	3.53
		600 ppm	3.53
Celulosa	-----	-----	1.76
Egapack (PVC)	-----	-----	1.18
Ziploc (LDPE)	-----	-----	1.00

El cálculo de los resultados obtenidos se realizó tomando como referencia el fin del periodo de inducción de la muestra protegida con Ziploc, ya que fue la muestra que presentó mayor índice de peróxidos al final del monitoreo.

Como se observa en la Tabla 17 todas las películas de proteína de chíá, tanto con antioxidantes como sin ellos, muestran un factor de protección de 3.53 ya que al final del monitoreo la cinética de oxidación del cacahuete prácticamente se encuentra en el periodo de inducción. Las tres películas plásticas, Ziploc, Egapack y celulosa, muestran factores de protección menores a los obtenidos por las películas de chíá. Las películas de chíá muestran un aumento en el factor de protección de 3.53 veces con respecto al Ziploc, 3.0 veces respecto al Egapack y 2.0 veces respecto a la cubierta de celulosa.

A pesar de que la película de chíá usada como control no contenía ningún antioxidante, obtuvo un factor de protección igual al mostrado por las películas activas. Esto puede deberse a que durante la obtención del concentrado proteínico con el cual se elaboraron las películas de chíá, algunos componentes con carácter antioxidante pudieron ser arrastrados, brindando cierto grado de protección a las películas. Ledesma Rodríguez (2008) encontró que el concentrado de proteína de chíá, obtenido bajo las mismas condiciones empleadas en este trabajo, presenta alrededor del 14% de fibra y, como se ha mencionado con anterioridad, Reyes Caudillo (2006) demostró que los polifenoles de la semilla de chíá están asociados a este componente.

Independientemente de que todas las películas de chíá mostraron un retardo similar del periodo de inducción en la cinética de oxidación lipídica del cacahuete, la película proteínica de chíá sin antioxidantes presentó un mayor índice de peróxidos comparado

con el de todas las biopelículas activas de chía al final del monitoreo. Las muestras protegidas por éstas mostraron valores cercanos a los 30 meq de peróxido/ kg de aceite (Figura 18), límite especificado para cacahuates tostados (Evranuz, 1993). Como se indica en la Tabla 15 la muestra protegida con la película de chía obtuvo 39.57 meq de peróxidos/ kg aceite, aproximadamente 10 unidades por arriba del límite. Las películas activas con TBHQ y 200 ppm y 400 ppm de polifenoles naturales obtuvieron valores alrededor de los 30 meq peróxidos/ kg aceite sin mostrar diferencia significativa entre ellas, y la película activa con 600 ppm de polifenoles de chía presentó mejor protección ya que la muestra protegida con esta película mostró 4 unidades por debajo del límite para cacahuates tostados.

El aumento en el efecto de protección brindado por las películas activas de chía, indica la combinación de dos factores: por un lado, la baja permeabilidad al oxígeno que ofrecen estas películas brinda una mayor protección a la oxidación de un alimento y por otro lado, los polifenoles naturales agregados a la película, los cuales se encuentran disponibles para donar átomos de hidrógeno a los radicales formados. Esta disponibilidad de los protones de las biopelículas activas se observó previamente al determinar su actividad antioxidante a través de los ensayos de capacidad secuestrante de los radicales DPPH• y ABTS•+.

### 3.9 ANÁLISIS CUALITATIVO DE BIODEGRADACIÓN DE PLÁSTICOS

La evaluación del grado de biodegradabilidad de las películas de proteína de semilla de chía se llevó a cabo con el fin de corroborar esta cualidad en las películas, ya que estas se elaboran a partir de material natural renovable, sin embargo no se contaba con ningún estudio que confirmara esta propiedad de las biopelículas.

Las tres muestras analizadas, dos biopelículas de chía con diferentes plastificantes y una cubierta de celulosa, fueron colocadas en el medio (Figura 15) por siete días en incubación a 37 °C. Se realizaron revisiones cada 24 horas. En las primeras 24 a 48 horas en los matraces que contenían las dos biopelículas de chía se detectó material degradado (Figura 16). En éstas el medio era turbio y se podía ver en las paredes de los matraces un anillo, producto del desarrollo de los microorganismos. En el caso de la celulosa se vio una ligera turbidez y la película se observó íntegra.

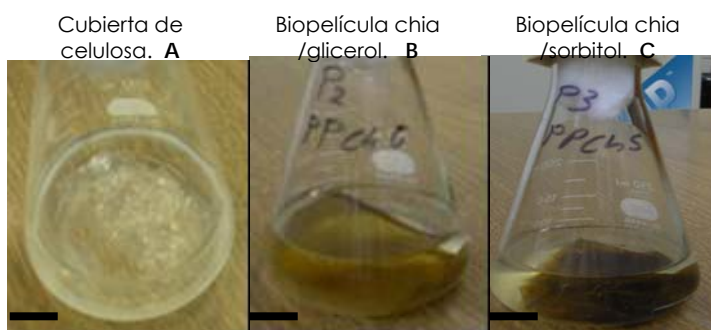


Figura 15. Las tres muestras en medio mineral con suspensión de microorganismos antes de ser incubadas

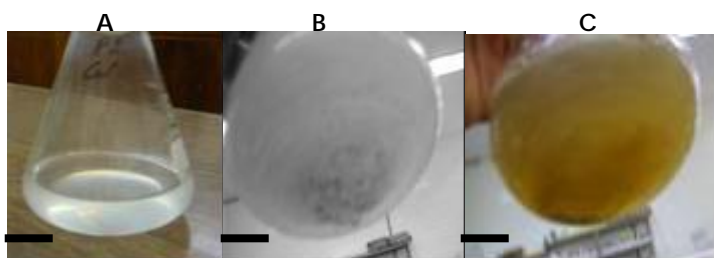


Figura 16. Las tres muestras después de 48 horas de incubación. En las fotografías B y C se observa el fondo del matraz

Nota: las barras negras en las fotografías representan una medida de 2 cm



Con estas evidencias se procedió a hacer una tinción de Gram. Las observaciones microscópicas con un aumento de 100x en un microscopio de campo claro revelaron abundantes cocobacilos Gram negativos y se logró ver algunas partículas de las películas de chíá con microorganismos (Figura 17). A los 7 días el material de prueba de las películas de proteína de chíá ya se había consumido casi por completo. En las observaciones al microscopio del medio de la muestra de celulosa también se encontraron cocobacilos Gram negativos pero en menor cantidad.

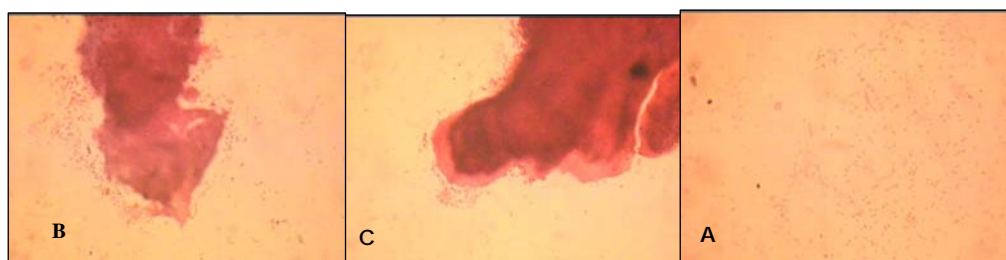


Figura 17. Observaciones microscópicas a 100x en microscopio de campo claro.

Con los resultados anteriores se puede suponer que el material de las películas de chíá fue degradado por los microorganismos debido a la disponibilidad de la proteína, el glicerol y el sorbitol. Este tipo de materiales son fácilmente utilizados por los microorganismos como fuente de carbono para su desarrollo. Debe tenerse en cuenta que el medio mineral con el que se realizaron las pruebas es un medio que no cuenta con fuente de carbono, por lo tanto los microorganismos se ven forzados a consumir el carbono proporcionado por las películas para poder subsistir.

En la muestra de celulosa después de siete días no se observó ningún cambio, sólo se pudo ver un ligero enturbiamiento del medio que se puede apreciar en la Figura 21. La tinción de Gram de este matraz reveló cocobacilos Gram negativos como se mencionó anteriormente. El desarrollo de los microorganismos puede deberse a un arrastre de

nutrientes o a que estén utilizando el material de una manera más retardada. Asimismo, se observó que el material plástico no perdió consistencia, debido a un bajo consumo de este por los microorganismos presentes en el medio.

Durante la realización de esta prueba se utilizaron protozoos, microorganismos unicelulares de vida libre muy susceptibles a compuestos tóxicos. Al exponerse directamente las tres muestras plásticas de prueba a estos microorganismos, no ocasionaron efectos negativos observables, es decir, no dieron indicios de toxicidad aguda por contacto directo, indicando una alta probabilidad de que las películas de proteína de chíá puedan presentar inocuidad y seguridad para la protección de alimentos.

Es importante resaltar que las pruebas estándar de biodegradabilidad requieren de un manejo más prolongado de las muestras y un procedimiento más complejo que implica incluir testigos de referencia y tiempos de prueba más extensos. Este tipo de pruebas no fueron las empleadas para las muestras proporcionadas, debido al tiempo requerido para su aplicación (7 meses aproximadamente). Sin embargo, el procedimiento aplicado se basó en los principios de las mismas y los resultados son completamente reproducibles, partiendo de las mismas condiciones empleadas (materiales, inóculos y tiempos de contacto). Las pruebas realizadas en este estudio proporcionan resultados que pueden relacionarse con las pruebas normalizadas.

## CONCLUSIONES

- ° Se logró la formación de películas de CP chía incorporando polifenoles extraídos de la semilla, desde 200 ppm hasta 600 ppm.
- ° La capacidad secuestrante de las biopelículas activas de chía muestran una actividad antioxidante similar a la de los extractos polifenólicos de semilla de chía.
- ° La PVA de las películas activas de chía es baja comparada con otras películas activas y proteínicas, sin embargo es ligeramente mayor, 1.58 veces, a la exhibida por las películas de chía sin antioxidantes.
- ° Las películas activas de chía muestran una permeabilidad al oxígeno 0.72 veces menor a la presentada por las películas proteínicas de chía, confirmando que pueden funcionar como recubrimientos de alimentos brindando una buena protección frente a la oxidación.
- ° El factor de protección exhibido por las películas activas de chía en la protección del deterioro oxidativo es 3.5 veces superior al del plástico sintético LDPE, 3.0 mayor al del PVC y 2.0 mejor al de la celulosa.
- ° Se estableció que las películas activas con 600ppm de polifenoles de chía demuestran una diferencia significativamente mayor en comparación con un antioxidante sintético, como el TBHQ, como barreras protectoras frente a la oxidación en alimentos.

- Las películas de proteína de chía son fácilmente degradadas por microorganismos bajo condiciones de biodegradación aerobia en medio acuoso.
- Las películas de chía mostraron una probable inocuidad y seguridad para ser utilizadas como protectoras de alimentos al ser evaluados por microorganismos unicelulares.

---

## BIBLIOGRAFÍA

- ⦿ Ahvenanien R. (2003). Novel Food Packaging Techniques. Cambridge England Woodehead Publishing Limited, pp 1-18, 519-530.
- ⦿ Alvarado Suárez L. A. (2008). Estudio para evaluar biopelículas proteínicas como barreras protectoras de alimentos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM. México D.F.
- ⦿ Alves V., Costa N., Hilliou L., Larotonda F., Gonçalves M., Sereno A., Coelho I. (2006). Design of biodegradable composite films for food packaging. *Desalination* 199, 331–333.
- ⦿ Amarowicz R., Pegg R. B., Rahimi-Moghaddam P., Barl B., Weil J.A. (2004). Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chemistry*, 84, 551–562.
- ⦿ ASTM E 96-95 (2002). Standard Test Method for Water Vapor Transmission of Materials, en 1997 Annual Book of ASTM Standards, ASTM International (EUA). Vol. 14.02, 161-170.
- ⦿ ASTM D 1434 (1998) Standard Test Method for Determining Gas Permeability Characteristics of plastic film and sheeting en 2003 Annual Book of ASTM Standards, ASTM International (EUA). Vol. 15.10, 196-207.
- ⦿ Ayranci E., Tunc S. (2003). A method for the measurement of the oxygen permeability and the development of edible films to reduce the rate of oxidative reactions in fresh foods. *Food Chemistry*, 80, 423–431.
- ⦿ Bamdad F., Goli A. H., Kadivar M. (2006). Preparation and characterization of proteinous film from lentil (*Lens culinaris*). Edible film from lentil (*Lens culinaris*). *Food Research International*, 39, 106–111.

- 
- ◉ Beltrán-Orozco M. C. y Romero M. R. (2002). La chía como alimento milenario. Departamento de graduados e investigación en alimentos, E.N.C.B.I.P.N. pag 1-26.
  - ◉ Bertuzzi M. A., Armada, M., Gottifredi J. C., Aparicio A. R., Jiménez, P. (2002). Estudio de la permeabilidad al vapor de agua de films comestibles para recubrir alimentos. Congreso Regional de Ciencia y Tecnología. Universidad Nacional de Catamarca, Argentina.
  - ◉ Bifani V., Ramírez C., Ihl M., Rubilar M., García A., Zaritzky N. (2007). Effects of murta (*Ugni molinae* Turcz) extract on gas and water vapor permeability of carboxymethylcellulose-based edible films. LWT, 40, 1473–1481.
  - ◉ Charles F., Sánchez J. and Gontard N. (2006). Absorption kinetics of oxygen and carbon dioxide scavengers as part of active modified atmosphere packaging. Journal of Food Engineering, 72, pp. 1–7.
  - ◉ Cruz Pérez N. (2008). Compuestos polifenólicos de la chía: efecto del método de extracción y temperatura sobre la estabilidad antioxidante. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM. México D.F.
  - ◉ Devlieghere F., Vermeiren L., Debevere J. (2004). New preservation technologies: Possibilities and limitations. International Dairy Journal, 14, 273–285.
  - ◉ Evranuz E. O. (1993). The effects of temperature and moisture content on lipid peroxidation during storage of unblanched salted roasted peanuts: shelf life studies for unblanched salted roasted peanuts. International Journal of Food Science and Technology, 28, 193-199.
  - ◉ Fang Y., Tung M.A., Britt I.J., Yada S., and Dalgleish D.G. (2002). Tensile and Barrier Properties of Edible Films Made from Whey Proteins. Journal of Food Science, 67, (1), 188-193.

- 
- ◉ Gómez-Guillén M.C., Ihl M., Bifani V., Silva A., Montero P. (2007). Edible films made from tuna-fish gelatin with antioxidant extracts of two different murta ecotypes leaves (*Ugni molinae* Turcz). *Food Hydrocolloids*, 21, 1133–1143.
  - ◉ Güçbilmez Ç., Yemencioflu A., Arslanoflu A. (2007). Antimicrobial and antioxidant activity of edible zein films incorporated with lysozyme, albumin proteins and disodium EDTA. *Food Research International*, 40, 80–91.
  - ◉ Hernández Jardón G. (2007). Proteínas de chía (*Salvia hispanica*): estudio para valorar sus propiedades como formadoras de películas. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM. México D.F.
  - ◉ Hui Y. H., Guerrero I., Rosmini M. (2006). *Ciencia y Tecnología de Carnes*. Limusa. México., Pp 212-214, 566-5667.
  - ◉ Hong S., Krochta J. M. (2006). Oxygen barrier performance of whey-protein-coated plastic films as affected by temperature, relative humidity, base film and protein type. *Journal of Food Engineering*, 77, 739–745.
  - ◉ Jongjareonrak A., Benjakul S., Visessanguan W., Tanaka M. (2008). Antioxidative activity and properties of fish skin gelatin films incorporated with BHT and  $\alpha$ -tocopherol *Food Hydrocolloids*, 22, 449–458.
  - ◉ Kerry J. P., O'Grady M. N., Hogan S. A., (2006). Past, current and potential utilisation of active and intelligent packaging systems for meat and muscle-based products: A review. *Meat Science*, 74,113–130.
  - ◉ Kirk R. S., Sawyer, R y Egan H. (1996). *Composición y Análisis de Alimentos de Pearson*. Segunda edición. Editorial CECSA. México., Pp. 28 – 29.
  - ◉ Ledesma Rodríguez F. L. (2008) Caracterización de fracciones de proteína de la semilla de chía (*Salvia hispanica*). Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM. México D.F.

- 
- ⦿ Lee J-W., Son S-M., Hong S-I. (2008). Characterization of protein-coated polypropylene films as a novel composite structure for active food packaging application. *Journal of Food Engineering*, 86, 484–493.
  - ⦿ Lu Y., Foo L. Y. (2002). Polyphenolics of *Salvia* a review. *Phytochemistry*, 59, 117–140.
  - ⦿ Matthäus B. (2002). Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 3444-3452.
  - ⦿ Millauskas G., Venskutanis P. R., Van Beek T. A. (2004). Screening of radical scavenging of some medicinal and aromatic plants extracts. *Food Chemistry*, 85, 231-237.
  - ⦿ Nerian C., Tovar L., Dienane D., Camo J., Salafranca A., Beltrán J. A. and Roncalés P. (2006). Stabilization of Beef Meat by a New Active Packaging Containing Natural Antioxidants. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 54, 7840-7846.
  - ⦿ Nerín C., Tovar L., Salafranca J. (2008). Behaviour of a new antioxidant active film versus oxidizable model compounds. *Journal of Food Engineering*, 84, 313–320.
  - ⦿ Nettles C. (2006). Opportunities for bio-based packaging technologies to improve the quality and safety of fresh and further processed muscle foods. *Meat Science*, 74, 131–142.
  - ⦿ Nielsen S. (1998). *Food Analysis*. Segunda edición. ASPEN Publishers Gaithersburg, Maryland. Pp 242.
  - ⦿ OECD (1993). *Guidelines for the Testing of Chemicals*. Ready biodegradability, 301A. "DOC Die-away Test". Organization for Economic Cooperation and Development. France. Pp 1-18.
  - ⦿ Olivos Lugo B. L. (2005). Estudio de las propiedades térmicas, funcionales y nutritivas de la fracción proteínica de la semilla de chía (*Salvia hispanica*). Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM.



- 
- Peschel W., Sánchez-Rabaneda F., Diekmann W., Plescher A., Gartzía I., Jiménez D., Lamuela-Raventós R. (2006). An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. *Food Chemistry*, 97, 137–150.
  - Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M. y Rice-Evans C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, Vol. 26, Nos. 9/10, pp. 1231–1237.
  - Reyes Caudillo E. (2006). La Chía (*Salvia hispánica*): fuente de fibra dietética total con propiedades funcionales y antioxidantes. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM.
  - Roginsky V. Lissi E. (2005). Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, 92, 235–254.
  - Siddhuaraju P., Mohan P. S., Becker K., (2002). Studies on the antioxidant activity of Indian Laburnum (*Cassia fistula* L): a preliminary assessment of crude extracts from stem bark, leaves, flowers and fruit pulp. *Food Chemistry*, 19, 61-67.
  - Sorrentino A., Gorrasi G. and Vittoria V. (2007). Potential perspectives of bio-nanocomposites for food packaging applications. *Trends in Food Science & Technology*, 18, 84-95.
  - Sothornvit R., Pitak N. (2007). Oxygen permeability and mechanical properties of banana films. *Food Research International*, 40, 365–370.
  - Sundaresan K. V., Ludescher R. D. (2008). Molecular mobility and oxygen permeability in amorphous  $\beta$ -lactoglobulin films. *Food Hydrocolloids*, 22, 403–413.
  - Taga S., Miller E. and Pratt D.E. (1984). Chia seed as a source of natural lipid antioxidants. *JAOCS*, vol. 6. no.5
  - Weber, C. J., Haugaard, V., Festersen, R., & Bertelsen, G. (2002). Production and applications of biobased packaging materials for the food industry. *Food Additives and Contaminants*, 19, 172–177.