

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**



FACULTAD DE QUÍMICA

**OBTENCIÓN DE PÉPTIDOS POR HIDRÓLISIS DE
COLÁGENO DE PESQUERÍAS CON ACTIVIDAD
ANTIOXIDANTE**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA

IVÁN MARTÍNEZ TÉLLEZ



CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



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: Profesora María de los Ángeles Valdivia López

VOCAL: Profesor José Alfredo Vázquez Martínez

SECRETARIO: Profesor Juan Carlos Ramírez Orejel

1er. SUPLENTE: Profesor José Oscar Humberto Pérez Díaz

2° SUPLENTE: Profesor Jonathan Trapala Reyna

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIOS 322 Y 323, CONJUNTO E, FACULTAD DE QUÍMICA, CIUDAD UNIVERSITARIA

ASESOR DEL TEMA:

María de los Ángeles Valdivia López

SUSTENTANTE:

Iván Martínez Téllez

CONTENIDO

ABREVIATURAS.....	7
1. RESUMEN.....	10
2. INTRODUCCIÓN.....	12
2.1. Objetivos.....	14
2.1.1. Objetivo general.....	14
2.1.2. Objetivos particulares.....	14
3. ANTECEDENTES.....	15
3.1. Proteína de residuos de pesquerías.....	15
3.1.1. Producción de hidrolizados.....	16
3.1.2. Hidrolizados de residuos de pesquerías.....	16
3.1.3. Composición química de los hidrolizados de proteína.....	17
3.1.4. Aminoácidos presentes en los hidrolizados de proteína y sus efectos en la salud.....	18
3.1.5. Hidrolizados de proteína con actividad antioxidante.....	20
3.2. Colágeno de pescado.....	22
3.3. Enzimas proteolíticas.....	24
3.3.1. Papaína.....	25
3.3.2. Pepsina.....	27
3.4. Deterioro oxidativo de los lípidos en alimentos.....	29
3.4.1. Productos de autooxidación lipídica.....	32
3.5. Inhibidores de las reacciones de oxidación y antioxidantes.....	33
3.5.1. Inhibidores de la oxidación.....	33

3.5.1.1. Agentes quelantes y complejantes de iones metálicos.....	34
3.5.2. Antioxidantes.....	35
3.5.2.1. Actividad antioxidante mediante la transferencia de hidrógeno radical	35
3.5.2.2. Actividad antioxidante mediante reducción u oxidación de radicales..	36
3.5.2.3. Actividad antioxidante mediante reacciones de terminación.....	36
3.5.3. Ácido cafeico.....	37
3.6. Formación de aductos entre un polifenol y el grupo amino de péptidos y proteínas.....	39
4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	42
4.1. Métodos.....	43
4.1.1. Caracterización de materia prima y extracción de colágeno.....	43
4.1.2. Actividad enzimática de las proteasas.....	44
4.1.3. Cuantificación de grupo amino libre.....	45
4.1.4. Hidrólisis enzimática.....	45
4.1.4.1. Grado de hidrólisis.....	46
4.1.5. Obtención y caracterización de hidrolizados de colágeno.....	46
4.1.5.1. Peso molecular de los hidrolizados (Tricine-SDS-PAGE).....	47
4.1.6. Acoplamiento de ácido cafeico con hidrolizados de colágeno.....	48
4.1.6.1. Reacción de acoplamiento vía química.....	48
4.1.6.2. Reacción de acoplamiento vía enzimática.....	48
4.1.6.3. Análisis de los hidrolizados funcionalizados por resonancia magnética nuclear de hidrógeno(RMN- ¹ H).....	49
4.1.6.4. Rendimiento de la reacción. Grupo amino y polifenoles totales.....	49

4.1.7. Síntesis química de un enlace covalente entre cloruro de ácido y un éster metílico de glicina	50
4.1.8. Actividad antioxidante.....	51
4.1.8.1. Capacidad secuestrante del radical DPPH.....	51
4.1.8.2. Capacidad secuestrante del radical ABTS.....	52
4.1.8.3. Método de decoloración del β -caroteno (β -CLAMS).....	53
4.1.8.4. Preparación de liposomas y ensayo TBARS.....	53
4.1.9. Evaluación de la capacidad protectora de hidrolizados de colágeno frente al deterioro oxidativo en una emulsión agua en aceite.....	55
4.1.9.1. Índice de peróxidos por método colorimétrico.....	55
4.1.9.2. Índice de Kreis.....	56
4.10. Análisis estadístico.....	56
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	58
5.1. Caracterización de la piel de Cazón y del extracto de colágeno.....	58
5.2. Hidrólisis Enzimática.....	60
5.2.1. Efecto de la concentración de enzima en la velocidad inicial.....	62
5.3. Caracterización de los hidrolizados de colágeno.....	66
5.3.1. Efecto del grado de hidrólisis en el peso molecular de los hidrolizados de colágeno.....	66
5.4. Formación de aductos entre ácido cafeico e hidrolizados de colágeno..	67
5.4.1. Disminución del grupo amino.....	68
5.4.2. Cuantificación de ácido cafeico acoplado y rendimiento de reacción.....	69
5.4.3. RMN ¹ H de los hidrolizados acoplados con ácido cafeico.....	70

5.4.4. Evidencia de la formación del enlace covalente entre los hidrolizados de colágeno y ácido cafeico mediante cromatografía en capa fina.....	72
5.5. Capacidad Antioxidante.....	75
5.6. Pruebas Aceleradas: Evaluación de la capacidad protectora de los hidrolizados de colágeno frente al deterioro oxidativo en una emulsión agua/aceite.....	79
5.6.1. Índice de peróxidos.....	79
5.6.2. Índice de Kreis.....	84
5.7. Aplicaciones de los hidrolizados de colágeno con actividad antioxidante en sistemas alimentarios.....	85
6. Conclusiones.....	87
7. Referencias.....	89

ABREVIATURAS

ABTS	Ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolín-6-sulfónico)
β -CLAMS	Sistema modelo β -caroteno-ácido linoleico
BHA	Butilhidroxianisol
BSA	Albúmina sérica bovina
CAO	Capacidad antioxidante
Da	Dalton
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazilo
EAC	Equivalentes de ácido cafeico
ET	Equivalentes de Trolox
GH	Grado de hidrólisis
HRP	Peroxidasa de rábano picante
HPP	Hidrolizado de proteína de residuo de pesquerías
IK	Índice de Kreis
IP	Índice de peróxidos
RMN ¹ H	Resonancia magnética nuclear de hidrógeno
TBA	Ácido 2-tiobarbitúrico
TBARS	Sustancias reactivas del ácido 2-tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TEAC	Capacidad antioxidante equivalente a Trolox
TFA-d	Ácido trifluoroacético deuterado
TMS	Tetrametilsilano
TNBS	Ácido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico

PI	Periodo de inducción
ppm	Partes por millón
U	Unidad enzimática: cantidad de enzima que cataliza 1 μmol de sustrato en 1 minuto.

Hidrolizados de proteína

H.P.1	Hidrolizado de colágeno obtenido con papaína con un GH de 27.46%
H.P.2	Hidrolizado de colágeno obtenido con papaína con un GH de 30.37%
H.Ps.1	Hidrolizado de colágeno obtenido con pepsina con un GH de 91.62%
H.Ps.2	Hidrolizado de colágeno obtenido con pepsina con un GH de 104.29%
SQ	Aducto formado con H.P.2 + ácido cafeico a 200 ppm + oxígeno
SE	Aducto formado con H.P.2 + ácido cafeico a 200 ppm + HRP

Código de tres letras para los aminoácidos

Ala	Alanina
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Asp	Ácido aspártico
Gln	Glutamina
Glu	Ácido glutámico
Gly	Glicina
His	Histidina
Leu	Leucina
Lys	Lisina
Phe	Fenilalanina

Pro	Prolina
Ser	Serina
Thr	Treonina
Trp	Triptófano
Tyr	Tirosina
Val	Valina

1. RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue la obtención de péptidos activos provenientes de la hidrólisis enzimática de colágeno extraído de residuos de pesquerías, el cual se acopló con un antioxidante mediante la formación de un enlace amino, con un uso potencial como retardantes de las reacciones químicas oxidativas de los lípidos en un alimento modelo.

Para tal propósito, se realizó una extracción ácido-base del colágeno presente en piel de cazón; posteriormente, se llevó a cabo una hidrólisis enzimática empleando dos enzimas proteolíticas: pepsina y papaína. Se comparó el grado de hidrólisis obtenido con cada enzima, así como la actividad antioxidante endógena de los hidrolizados. El mayor grado de hidrólisis (GH) se obtuvo al emplear pepsina, con un GH cercano al 100%; mientras que el GH obtenido al usar papaína fue de 30.79%. Los hidrolizados obtenidos con ambas enzimas proteolíticas presentaron buena actividad antioxidante, la cual se determinó al cuantificar la inhibición de los productos de oxidación lipídica mediante el método del sistema modelo β -caroteno-ácido linoleico (β -CLAMS) y el ensayo de sustancias reactivas del ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS). Adicionalmente, se sintetizaron aductos entre los péptidos de colágeno y el polifenol ácido cafeico mediante una reacción enzimática y una reacción química usando, de manera respectiva, peroxidasa de rábano picante (HRP) y oxígeno molecular, esto con la finalidad de formar un enlace covalente entre los péptidos y el polifenol e incrementar su capacidad antioxidante. Se comparó el rendimiento de la reacción de acoplamiento y la capacidad antioxidante de las dos reacciones descritas, siendo la vía enzimática la que produce mayor porcentaje de acoplamiento entre el polifenol y el hidrolizado de colágeno, 91.56%, en comparación con 54.71%, porcentaje obtenido por la vía química. Sin embargo, los aductos generados por la vía química presentan mayor actividad antioxidante en comparación con los aductos formados por la vía enzimática.

Finalmente, se evaluó la capacidad protectora de los péptidos activos frente a las reacciones oxidativas comunes en lípidos en una emulsión de agua en aceite y su aplicación como conservadores. Tanto los hidrolizados como los aductos inhiben la

etapa de propagación de la autooxidación lipídica, ya que, al compararlos con un tratamiento sin reactivos, las emulsiones que contenían los hidrolizados mostraron un abatimiento en la formación de hidroperóxidos durante el seguimiento del índice de peróxidos como consecuencia de la actividad antioxidante. Los resultados indican que los hidrolizados de residuos de colágeno de pesquerías obtenidos mediante hidrólisis enzimática usando las proteasas pepsina y papaína, presentan actividad antioxidante y es posible aplicarlos en sistemas alimentarios para prolongar la vida útil de los mismos.

2. INTRODUCCIÓN

Los alimentos industrializados han tenido un papel primordial en el desarrollo de la sociedad moderna; la industria de alimentos procesados es la más significativa en términos del valor del PIB dentro del sector secundario de manufactura aportando cerca de 21% del PIB en el año 2015, con una tasa de crecimiento del 2% en los últimos cinco años (INEGI, 2015). Dentro de las ventajas que ofrecen estos productos se encuentran una alta disponibilidad durante la mayor parte del año, su preservación facilita su comercialización y distribución, además, son productos que garantizan su inocuidad, ya que reducen el riesgo de enfermedades transmitidas por alimentos (ETAS). Para lograr tales propósitos, los alimentos se someten a tratamientos térmicos para reducir la cantidad de microorganismos y eliminar los patógenos; sin embargo, el deterioro microbiológico y químico no se puede detener por completo, por lo que es necesario añadir conservadores para prolongar la vida útil de los alimentos. A pesar de las amplias ventajas que ofrece el uso de aditivos, existe un gran sector de la población que cuestiona el uso de los mismos, en especial los aditivos artificiales, ya que existe la creencia de que su ingesta frecuente puede producir enfermedades degenerativas como el cáncer, por lo que es necesario buscar alternativas a los aditivos convencionales.

Por otro lado, la industria de manufactura y producción sigue una tendencia hacia la sustentabilidad, aprovechando de una manera eficiente los recursos disponibles y reduciendo el impacto ecológico que generan los procesos de transformación. De esta forma, se crean nuevas tendencias de consumo; y la industria debe responder a las necesidades y preferencias de los consumidores. En los últimos años, se ha visto un aumento en el consumo de alimentos orgánicos, en alimentos mínimamente procesados y/o sin una gran cantidad de aditivos, así como en el consumo de alimentos funcionales, y la demanda de productos amigables con el ambiente es una tendencia en crecimiento.

La producción de radicales químicos por estrés oxidativo generalmente se asocia al desencadenamiento de enfermedades como la *diabetes mellitus*, cáncer y enfermedades neurodegenerativas, además, su presencia en los alimentos causa

el deterioro de los mismos. Es, por esta razón, que las sustancias antioxidantes han sido objeto de intensos estudios dentro de las diversas áreas de la salud, nutrición y tecnología de alimentos, como preventivos de ciertas enfermedades y como sustancias conservadoras. Dentro de las sustancias antioxidantes se encuentran los hidrolizados de proteína, los cuales exhiben actividad antioxidante, antimicrobiana, anticoagulante y capacidad de reducir los niveles de colesterol sanguíneo, aunado a su valor nutricional y baja toxicidad (Sila & Bougatef, 2016). Los hidrolizados de proteína, en especial los de proteína de pescado, son los biopéptidos que mayormente se han estudiado debido a sus propiedades antioxidantes. Por ello, tienen potenciales aplicaciones como conservadores en las industrias farmacéuticas y alimentaria, teniendo como ventaja su alta disponibilidad, fácil obtención y costo de producción relativamente bajo.

2.1. Objetivos

2.1.1. Objetivo General

Obtener péptidos con actividad antioxidante a partir de hidrolizados de colágeno de piel de cazón, con potencial de uso para retardar reacciones de oxidación lipídica en matrices alimentarias.

2.1.2. Objetivos particulares

- Extraer proteína colágena de residuos de piel de cazón y evaluar su potencial como fuente de proteína.
- Realizar una hidrólisis enzimática de colágeno mediante el uso de proteasas para obtener péptidos con actividad antioxidante.
- Acoplar químicamente los hidrolizados con ácido cafeico mediante dos métodos: vía química y vía enzimática, con la finalidad de incrementar y comparar la actividad antioxidante entre los hidrolizados sin acoplar y de aquellos con acoplamiento, es decir, después de ser funcionalizados.
- Evaluar la capacidad antioxidante de los hidrolizados de colágeno para un alimento rico en lípidos mediante pruebas aceleradas de oxidación para establecer la viabilidad de su uso.

3. ANTECEDENTES

3.1. Proteína de residuos de pesquerías

La pesca y acuicultura representan una actividad económica relevante en el país; en el 2016, este sector tuvo una producción de 388 mil toneladas y una productividad de 35 mil millones de pesos (CONAPESCA, 2017). Adicionalmente, los productos de la pesca son una fuente importante de proteína en la dieta; sin embargo, su viabilidad dependerá de mejorar y buscar estrategias que aumenten su competitividad y desempeño. Actualmente, la pesca es una de las industrias que genera más desechos que son fuente potencial de contaminación. Se estima que esta industria produce hasta un 60% de desperdicios que no son utilizados ni tratados de manera correcta. Los residuos de pesquerías incluyen cabeza, piel, huesos, vísceras, branquias y aletas; sólo el 40% del producto de pesquerías se destina al consumo humano (Dekkers, Raghavan, Kristinsson & Marshall, 2011).

Actualmente, estos residuos son tratados como desperdicios y se desechan o procesan como productos de bajo valor agregado, ya sea como alimento para animales o fertilizantes. Los residuos de pesquerías tienen un alto contenido proteico y pueden utilizarse para generar concentrados de proteína, o como hidrolizados con propiedades funcionales en alimentos, ya sea como agentes espumantes, emulsificantes o dispersantes (Adler, Eriksen & Sejr, 1983).

Para aprovechar estas fuentes ricas en proteína, se han implementado métodos biotecnológicos con la finalidad de acceder a los nutrimentos que, de otra forma, no tendrían una buena biodisponibilidad o, bien, para generar compuestos activos que tienen uso potencial como nutraceuticos (sustancias que ayudan a mejorar la salud o prevenir ciertas enfermedades) y como ingredientes funcionales en alimentos (Najafian & Babji, 2011).

3.1.1. Producción de hidrolizados

Uno de los métodos biotecnológicos que se prefiere para la producción de péptidos activos debido a su bajo costo, alta selectividad, eficiencia y rapidez, es la hidrólisis enzimática de desperdicios de pesquerías usando enzimas proteolíticas, lo que resulta en la obtención de hidrolizados con actividad biológica y/o antioxidante (Najafian & Babji, 2012).

Los hidrolizados de proteína son el resultado de la fragmentación de proteínas de alto peso molecular en péptidos de menor tamaño. Generalmente, estos péptidos son secuencias de 2-20 residuos de aminoácidos. La hidrólisis enzimática de las proteínas nativas reduce el tamaño de la cadena de proteína y aumenta la biodisponibilidad de los aminoácidos presentes; como resultado, los hidrolizados tienen un alto valor nutrimental. Varios estudios han demostrado que algunos hidrolizados presentan actividad biológica y antioxidante. Zhang, Zou, Manchu, Zhou & Wang (2008) aislaron e identificaron un péptido proveniente del pez Mero de manchas cafés, *Ephinephelus chlorostigma*, y demostraron que el péptido expresó actividad antimicrobiana al interactuar y matar directamente las bacterias con las que se puso en contacto.

3.1.2. Hidrolizados de residuos de pesquerías

Los hidrolizados se pueden obtener de los diferentes desperdicios de pesquerías. La composición química, es decir, el tipo de proteína, el contenido lípidos, el contenido de carbohidratos y minerales varía en función de la parte anatómica usada, así como de la especie utilizada. Como consecuencia, el tamaño de los péptidos y las propiedades funcionales de los hidrolizados cambian.

- Hidrolizados de piel de pesquerías. La piel es una fuente importante de colágeno y gelatina; diversos autores han demostrado el potencial que tiene esta parte anatómica para producir hidrolizados funcionales con diferentes especies: Carpa herbívora (*Ctenopharyngodon idella*) (Wasswa, Tang, Gu & Yuan, 2007); Bonito negro (*Rachycentron canadum*) (Yang, Ho, Chu & Chow, 2008); Tilapia (Yang, Liang, Chow & Siebert, 2009); Pargo (*Litjanus vitta*)

(Khantaphant & Benjakul, 2008); Cazón (*Galeorhinus galeus*) (Kittiphattanabawon, Soottawat, Wonnop & Fereidoon, 2012) entre otras. Algunas de las enzimas utilizadas para la hidrólisis fueron alcalasa, pepsina, tripsina y α -quimotripsina.

- Hidrolizados de cabeza de pesquerías. La cabeza es de los desperdicios que se producen en mayor cantidad; está formada principalmente de proteínas estructurales. Entre las especies utilizadas para producir hidrolizados se encuentran el Salmón (*Salmo salar*) (Gbogouri, Linder, Fanni & Parmentier, 2004), Salmón rojo (*Oncorhynchus nerka*) (Stathivel, Smiley, Prinyawiwatkul & Bechtel, 2005) y Alacha (*Sardinella aurita*) (Suossi, Bougatef, Triki & Nasri, 2007). Se recurrió al uso de enzimas digestivas como alcalasa, neutrasa y α -quimotripsina para llevar a cabo la hidrólisis.
- Hidrolizados de residuos esqueléticos. Los huesos también representan una fuente importante de residuos generados en la industria pesquera, y contienen alrededor de un 30% de proteína (Je, Quian, Byun & Kim, 2007). Sumaya, Castillo, Favela, Huerta & Prado, (2005) determinaron los parámetros para producir hidrolizados de proteína en los residuos esqueléticos de la carpa dorada (*Carassius auratus*); Je *et al.* (2007) reportaron la obtención de hidrolizados de proteína a partir de residuos de atún utilizando proteasas como alcalasa, α -quimotripsina, neutrasa, papaína, pepsina y tripsina.

3.1.3. Composición química de los hidrolizados de proteína

En general, los hidrolizados de desperdicios de pesquerías tienen un alto contenido proteico en un intervalo comprendido entre 60-87%, dependiendo de la especie. La Tabla 3.1 muestra el análisis proximal de algunos hidrolizados de residuos de pesquerías; en la misma se muestra la parte anatómica usada para generar los hidrolizados, así como las enzimas utilizadas para llevar a cabo la hidrólisis enzimática.

Tabla 3.1. Análisis proximal de hidrolizados de proteína de residuos de pesquerías reportado en porcentaje (%).

Especie y particularidades	Enzima	Proteína	Grasa	Humedad	Cenizas
Arenque (Visceras)	Alcalasa	87.9	4.0	4.7	12.5
	Papaína	85.3	4.7	4.8	9.6
Capelín (Desperdicios)	Alcalasa	72.4	0.18	6.34	20.8
	Papaína	78.3	0.39	5.32	17.7
Merluza (Desperdicios)	*	82.25	3.94	-	13.82
Salmón (Cabeza)	Pepsina	82.3	0.8	5.3	10.4
Pez Gato (Piel)	Papaína	88.34	1.83	6.75	3.07
Atún (Huesos)	**	66.40	2.37	7.25	25.94
Salmón Rojo (Cabeza)	Alcalasa	63.3	23.7	5.9	7.1
Carpa (Piel)	**	92.0	0.2	2.87	5.86

Adaptada de Chalamaiah, Dinesh, Hemalatha & Jyothirmayi, (2012). *El autor no reporta el uso de una enzima específica **Se usaron distintas enzimas o mezcla de enzimas proteolíticas.

3.1.4. Aminoácidos presentes en los hidrolizados de proteína y efectos en la salud

Los hidrolizados de proteína son una alternativa nutricional debido a su fácil absorción, en especial para personas con condiciones o padecimientos médicos que les impiden el consumo de las proteínas intactas. Clemente (2000) señala que los hidrolizados de proteína son una buena opción debido a su alta disponibilidad, costo moderado y alta calidad en contenido de aminoácidos, en especial en pacientes con una capacidad limitada de absorción debido a una falta de enzimas digestivas, daños hepáticos o con daños específicos en el estómago y pacientes

con alergias que no pueden digerir de manera adecuada las proteínas nativas. Los hidrolizados de distintas fuentes de proteína se usan actualmente en la formulación de varios productos como fórmulas geriátricas, suplementos alimenticios, dietas para el control de peso, dietas terapéuticas y dietas enterales.

La Tabla 3.2 muestra la composición de aminoácidos presentes en hidrolizados de residuos de pesquerías. La composición varía según la especie y residuos de pesquería utilizados.

Tabla 3.2. Aminoácidos presentes en hidrolizados de residuos de pesquerías reportado como g aa/100 g hidrolizado.

Aminoácido (%)	Atún	Tilapia	Salmón	Merluza	Capelín	Carpa
Asparagina	6.7	6.72	6.1	10.10	9.89	5.54
Treonina	7.4	3.02	3.4	5.12	4.56	2.03
Serina	6.7	2.4	3.7	5.33	4.24	3.14
Glutamina	15.2	15.1	7.5	13.80	13.4	9.44
Prolina	14.5	2.26	5.4	6.00	3.67	8.34
Glicina	28.9	4.09	11.0	7.88	5.14	17.1
Alanina	13.3	3.77	8.2	6.53	6.00	15.6
Valina	5.6	3.19	2.6	4.72	5.77	2.26
Metionina	4.8	2.76	1.8	3.02	2.05	1.54
Isoleucina	3.5	3.36	2.0	4.30	4.25	1.60
Tirosina	7.7	6.89	4.0	7.16	7.60	2.86
Fenilalanina	4.0	2.58	1.1	3.50	2.47	3.78

Adaptada de Chalamaiyah *et al.* (2012).

Se ha informado que los hidrolizados de residuos de pesquerías provenientes de cabeza, piel y vísceras contienen todos los aminoácidos esenciales y no esenciales (Bhaskar, Benila, Radha & Lalitha, 2008; Giménez, Alemán, Montero & Gómez, 2009; Sathivel *et al.*, 2005), por lo que pueden ser utilizados como fuentes de aminoácidos esenciales.

3.1.5. Hidrolizados de proteína con actividad antioxidante

Un antioxidante se define como cualquier sustancia capaz de inhibir o evitar una reacción de oxidación; algunos hidrolizados de proteínas presentan esta característica debido a la presencia de péptidos activos, Chalamaiah *et al.* (2012) mencionan que los péptidos con actividad antioxidante se pueden obtener después de una hidrólisis enzimática, ya que se liberan residuos de aminoácidos capaces de secuestrar especies reactivas de oxígeno, quelar iones metálicos pro-oxidantes e inhibir la peroxidación lipídica en los alimentos. La selección de una enzima proteolítica adecuada para la hidrólisis, así como el tiempo de hidrólisis, son parámetros fundamentales para la formación de péptidos activos. Enzimas proteolíticas como alcalasa, α -quimotripsina, neutrasa, papaína, pepsina, tripsina, pancreatina, bromelina, protamex, termolisina y varidasa han demostrado potencial para producir péptidos activos (Hordur & Barbara, 2000).

En algunos casos, se ha logrado aislar e identificar los péptidos de los hidrolizados al secuenciar los aminoácidos que los conforman; los péptidos activos pueden contener de 2-16 residuos de aminoácidos con un peso molecular comprendido entre 100- 1600 Da (Najafian & Babji, 2012).

La Tabla 3.3 muestra la secuencia de algunos hidrolizados de proteína de residuos de pesquerías de distintas especies, la enzima utilizada para realizar la hidrólisis y la actividad antioxidante que los hidrolizados expresaron. El porcentaje de actividad antioxidante varía en función del tamaño del péptido y de la secuencia de aminoácidos presentes en la misma; en general, la actividad antioxidante se encuentra en intervalos que van desde 20 hasta 60%, según el método de análisis. Un punto importante es que los aminoácidos libres y por sí solos no expresan actividad antioxidante; son los péptidos los que tienen dicha capacidad, por lo que es importante conocer su composición y secuencia de aminoácidos (Klompong, Benjakul, Kantachote & Shahidi, 2007).

Tabla 3.3. Capacidad Antioxidante de péptidos de hidrolizados de pesquerías.

Especie de Pez	Parte anatómica para HPP ⁽¹⁾	Enzima usada para HPP ⁽¹⁾	Secuencia del péptido y PM ⁽²⁾	Actividad antioxidante
Atún	Esqueleto	Papaína, Pepsina y Tripsina	Val-Lys-Ala-Gly-Phe-Ala-Trp-Thr-Ala-Asn-Gln-Gln-Leu-Ser (1519 Da)	CS ⁽³⁾ del radical DPPH, del radical superóxido e inhibición de oxidación lipídica
Atún	Piel	Colagenasa, Tripsina y Pepsina	Asn-His-Arg-Tyr-Asp-Arg (856 Da)	CS del radical ABTS y FRAP ⁽⁴⁾ (Fe ³⁺)
Alacha	Cabeza y vísceras	Alcalasa	Leu-His-Tyr	CS del radical DPPH, poder reductor e inhibición de la autooxidación del ácido linoleico
			Leu-Ala-Arg-Leu	
			Gly-Ala-His	
			Gly-Ala-Trp-Ala	
			Pro-His-Tyr-Leu	
Carpa herbívora	Músculo	Papaína, Bromelina, Neutrasa y Alcalasa	Pro-Ser-Lys-Tyr-Glu-Pro-Phe-Val (966.3 Da)	Inhibición de peroxidación lipídica y CS del radical hidroxilo

HPP⁽¹⁾: Hidrolizado de proteína de residuos de pesquerías; PM⁽²⁾: Peso molecular; CS⁽³⁾: Capacidad secuestrante; FRAP⁽⁴⁾: Poder reductor y antioxidante del ion férrico Fe³⁺. Adaptada de Chalamaiah *et al.*, (2012).

Los péptidos con actividad antioxidante poseen propiedades quelantes de iones metálicos; pueden donar un hidrógeno o un electrón, lo que les permite interactuar con los radicales formados durante la oxidación de los lípidos y, de esta forma, logran detener la etapa de propagación o evitar la formación de radicales.

La presencia de residuos de aminoácidos hidrofóbicos en la secuencia peptídica permite que los hidrolizados interactúen con los lípidos de los alimentos, lo que facilita la capacidad secuestrante de los radicales por parte de los hidrolizados (Ren, *et al.*, 2008).

Se conoce que aminoácidos aromáticos como la tirosina y fenilalanina, son secuestrantes de radicales; la actividad antioxidante en el caso de la tirosina se debe al grupo fenol capaz de donar un radical H[•], la histidina tiene un grupo imidazol que también puede donar un radical H[•], la metionina es propensa a la oxidación para formar sulfóxido de metionina y la cisteína puede aceptar electrones formando H₂S. Hasta el momento, se desconoce con exactitud el mecanismo de reacción de los péptidos como antioxidantes; sin embargo, se ha informado que la presencia de histidina, metionina, cisteína, prolina, valina, fenilalanina, tirosina y triptófano son fundamentales para la actividad antioxidante de los hidrolizados de proteína de residuos de pesquerías (Bougatef, *et al.*, 2010; Hsu, Lu & Jao, 2009; Ren, *et al.*, 2008; You, Zhao, Cui, Zhao & Yang, 2009).

3.2. Colágeno de pescado

El colágeno es una proteína fibrosa del tejido conectivo; su función principal es de soporte, se encuentra en huesos, piel, tendones y cartílago en la mayoría de las especies de mamíferos. Se usa ampliamente en la industria de alimentos, biomédica, farmacéutica y cosmética debido a sus propiedades funcionales. Generalmente, el colágeno comercial se obtiene de la piel y huesos de bovinos y porcinos; alternativamente, se puede extraer de residuos de varias especies marinas, principalmente de la piel, escamas y huesos (Benjakul, Nalinanon & Shahidi, 2012).

El término colágeno se refiere a una familia de proteínas, cada una con una estructura, función y distribución específica en la matriz extracelular.

El monómero de colágeno es una proteína cilíndrica con una longitud de 2800 Angstroms (Å) y un diámetro de 14-15 Å llamada tropocolágeno, proteína de 3 unidades polipeptídicas denominadas cadenas α , que se doblan entre sí para formar una estructura triple helicoidal; la Figura 3.1 muestra el arreglo estructural del colágeno.

Las tres cadenas de colágeno se estabilizan por puentes de hidrógeno entre los grupos carbonilo y amino adyacentes (Ramshaw, Peng, Glattauer & Werkmeister, 2009).

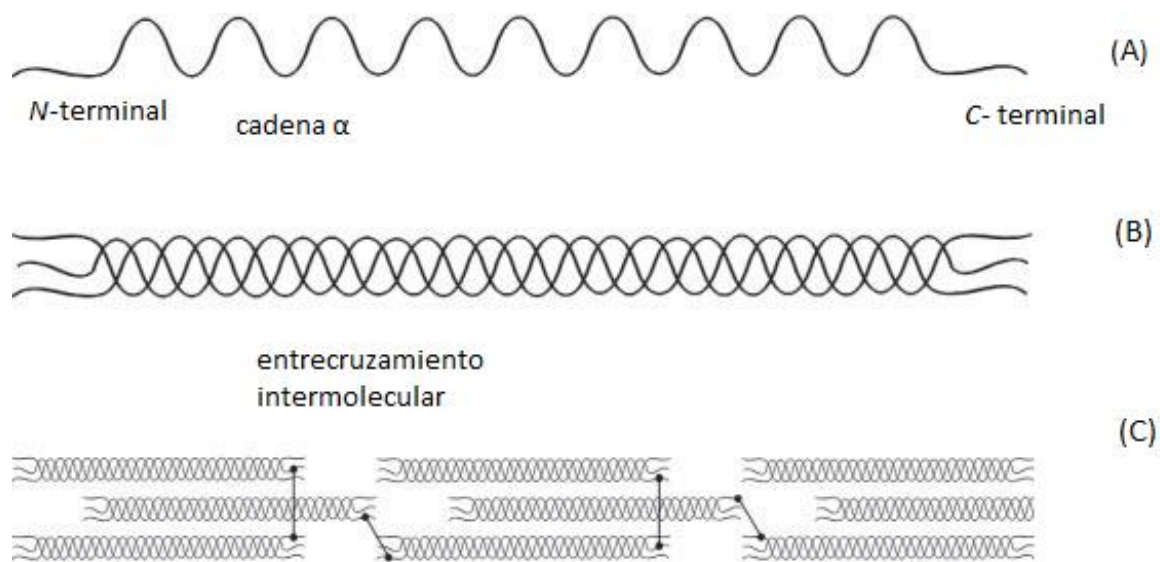


Figura 3.1. Arreglo estructural de las fibras de colágeno. **(A)** Polipéptido de colágeno. **(B)** Tropocolágeno. **(C)** Fibras de colágeno. Modificada de Benjakul, Nalinanon & Shahidi (2012).

Se conocen más de 19 tipos de colágeno, designados como I-XIX. Las tres cadenas α del tropocolágeno tienen una composición de aminoácidos distinta entre sí, a pesar de formar parte del mismo tipo de colágeno. Cada cadena α tiene un peso molecular aproximado de 100,000 Daltons (Da) para tener un peso molecular total de 300,000 Da para el colágeno (Bailey, Gordon & Knott, 1998). El colágeno más común es el de tipo I.

La composición de aminoácidos en el colágeno es particular, está constituido principalmente por glicina, prolina y alanina. Por lo general, no contiene triptófano ni cisteína; sin embargo, contiene hidroxiprolina e hidroxilisina, aminoácidos que no se

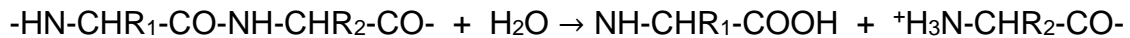
encuentran comunmente en las proteínas. La glicina representa una tercera parte de la composición total de aminoácidos y se posiciona cada tres residuos de aminoácidos: Gly-X-Y, constituyendo una secuencia repetitiva a lo largo de cada cadena polipeptídica; los residuos más comunes en las posiciones X y Y, son, de manera respectiva, prolina e hidroxiprolina.

El colágeno es una proteína hidrofílica por la presencia mayoritaria de residuos de aminoácidos ácidos, básicos e hidroxilados.

El colágeno proveniente de piel, escamas y esqueleto de pesquerías contiene una cantidad mayor en aminoácidos esenciales en comparación con el colágeno obtenido de piel y huesos de especies terrestres (Sikorski, Kolakowska & Sun, 1990).

3.3. Enzimas proteolíticas

Las enzimas proteolíticas catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos en las proteínas y péptidos según la siguiente reacción:



Las enzimas proteolíticas se encuentran en todos los organismos vivos (animales, plantas y microorganismos), y son esenciales para la digestión de aminoácidos, para la coagulación sanguínea, formación de hormonas y para la germinación de semillas y esporas.

Cada enzima proteolítica es específica para determinado enlace peptídico; estas enzimas se pueden clasificar como endo- o exoproteasas.

- Endoproteasas: Hidrolizan los enlaces peptídicos al interior de la cadena polipeptídica. Algunos ejemplos son la tripsina, α -quimotripsina y quimosina.
- Exoproteasas: Hidrolizan los enlaces peptídicos en las posiciones terminales; grupo amino terminal (aminopeptidasas) o carbonilo terminal (carboxipeptidasas).

También son específicas para uno o más residuos de aminoácidos, por lo que se clasifican en serina-proteasas, cisteína-proteasas, proteasas del ácido aspártico (caspasas) y metaloproteasas (Whitaker, 2003).

3.3.1. Papaína (E.C. 3.4.22.2)

La papaína se clasifica como una endoproteasa y como una cisteína-proteasa, es un polipéptido de 212 residuos de aminoácidos con un peso molecular de 23,350 Da. Contiene tres enlaces disulfuro, por lo que tiene una alta termoestabilidad en pH neutro, y también es resistente a la desnaturalización en disolventes orgánicos. La secuencia primaria de la papaína se conoce con exactitud y se ha determinado la estructura terciaria por cristalografía de rayos X (Wong, 1995).

La Figura 3.2 muestra la estructura terciaria de la enzima; en la misma, se observa que la enzima tiene dos dominios, L y R. El dominio L contiene el grupo amino terminal y los residuos 10-100 plegados en forma de hélices, A, B y C; las tres hélices forman un centro altamente hidrofóbico. El dominio R contiene el grupo carboxilo terminal y los residuos 113-207, con una estructura en forma de lámina β -plegada y también contiene el sitio activo de la enzima. El sitio activo de la papaína está formada por el residuo de cisteína 25 (Cys25) localizada en el dominio L, y en el dominio R se encuentran un residuo de histidina 159 (His159) y otro de asparagina (Asn175). La Cys25 se encuentra en una posición adyacente a un N del anillo de imidazol de la His159.

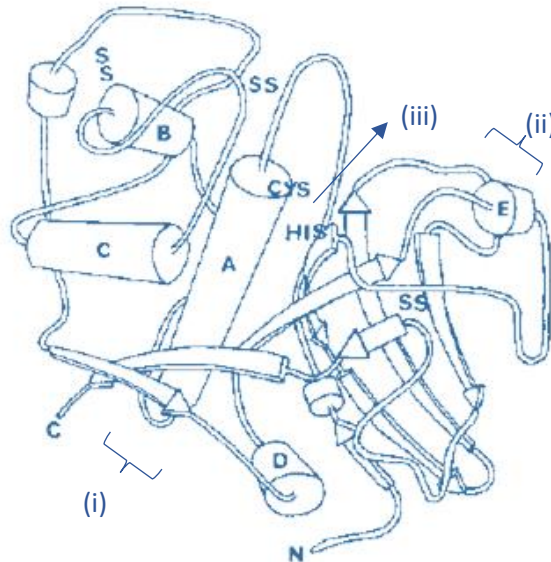


Figura 3.2. Estructura terciaria de la papaína. (i) Dominio L formado por tres hélices α , A, B y C, (ii) dominio R con 7 estructuras β , y (iii) sitio activo Cys25 e His159. SS representa los puentes disulfuro de la enzima. Fuente: Whitaker, 2003.

El mecanismo de la reacción de hidrólisis catalizada por la papaína consiste en los siguientes pasos:

(a) La enzima se une reversiblemente con el sustrato para formar un complejo de Michaelis-Menten, ES.

(b) Ocurre un ataque nucleofílico por parte del anión tiolato de la cisteína 25 al grupo carbonilo del enlace peptídico del sustrato para formar un intermediario tetraédrico.

(c) El paso de formación del intermediario tetraédrico a una enzima acílica es facilitado por la protonación del grupo saliente, en este caso el nitrógeno amidíco del sustrato peptídico, mediante el intercambio de protón con el catión imidazolío de la histidina159.

(d) Finalmente, ocurre un ataque nucleofílico por parte de una molécula de agua asistida por la histidina159, que actúa como un catalizador básico, lo que resulta en la desacilación de la enzima acílica, que es un tioéster en el caso de la papaína.

La Figura 3.3 muestra el mecanismo de acilación-desacilación descrita para la papaína.

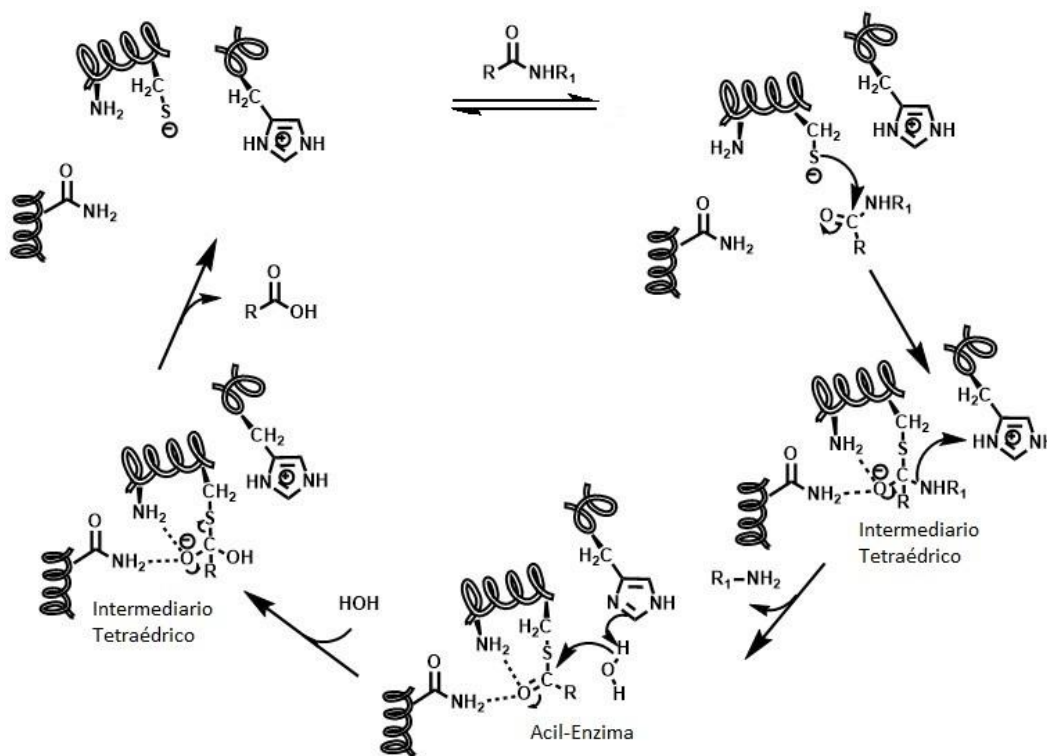


Figura 3.3. Mecanismo propuesto para la reacción de hidrólisis catalizada por la papaína. Fuente: Wong, 1995.

La papaína hidroliza preferentemente los enlaces peptídicos de las regiones hidrofóbicas del sustrato; también actúa sobre los enlaces peptídicos de residuos de aminoácidos básicos.

La actividad enzimática se inhibe por la presencia de iones divalentes como Ba^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , y moléculas como urea, ácido ascórbico, etanol y metanol.

Por el contrario, la actividad enzimática se incrementa con Ca^{2+} 1 mM (aumenta la actividad un 18%), el Mg^{2+} 1 mM (aumenta la actividad en un 24%), y también por la presencia de cisteína.

El pH óptimo de trabajo de la enzima se encuentra comprendido en un rango de 5-8, y la temperatura óptima en un intervalo de 40-50°C (BRENDA, 2018).

3.3.2. Pepsina (E.C. 3.4.23.1)

La pepsina es una endoproteasa, y se clasifica como una proteasa aspártica; es decir, utiliza una molécula de agua ligada a uno o más residuos de ácido aspártico para catalizar la hidrólisis de enlaces peptídicos (Tang, 2013). Consiste en una cadena de 326 residuos de aminoácidos y tiene un peso molecular de 34600 Da. Presenta únicamente 42 residuos ácidos y 4 residuos básicos, el resto está conformado por residuos hidrofóbicos. La estructura secundaria se forma en su mayoría por láminas β -plegadas y sólo 4 α -hélices; la estructura terciaria consiste en dos lóbulos homólogos. La Figura 3.4 muestra la estructura terciaria de la pepsina.

El sitio activo se forma por el residuo de ácido aspártico 32 (Asp32) y otro residuo de ácido aspártico en la posición 215 (Asp215). Los dos grupos carboxilo están unidos entre sí por un puente de hidrogeno y, a su vez, comparten una molécula de agua.

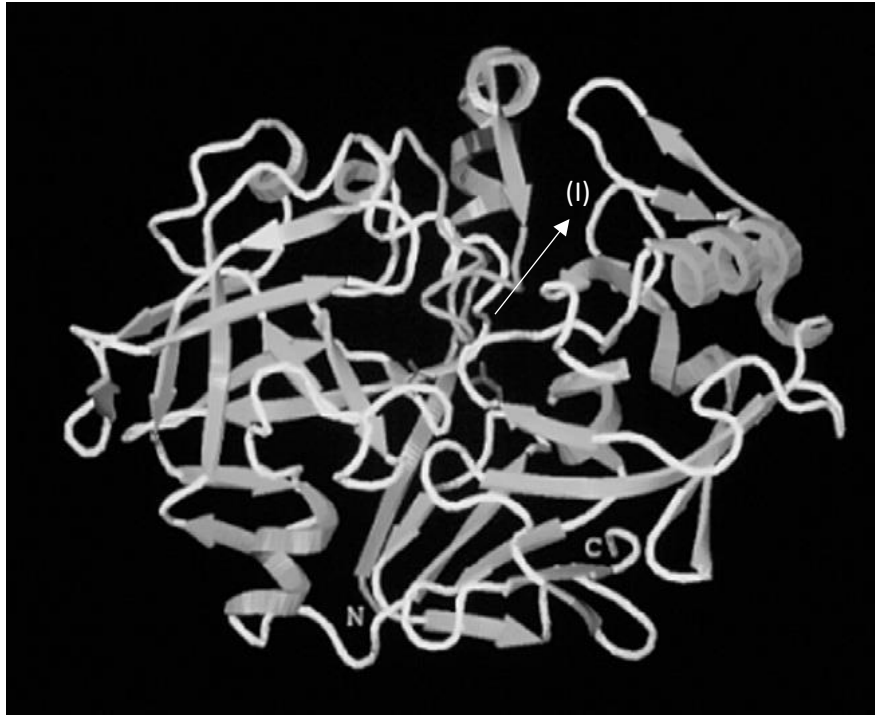


Figura 3.4. Estructura terciaria de la pepsina. (I) Sitio Activo de la enzima. Fuente: Tang, 2013.

El sitio activo de la pepsina puede contener hasta 8 residuos de aminoácidos del sustrato cuando se lleva a cabo la hidrólisis; el mecanismo de reacción propuesto por Suguna, Padlan, Smith, Carlson & Davies (1987), consiste en la protonación del grupo carbonílico del enlace peptídico del sustrato a partir de un H^+ del ácido aspártico del sitio activo, seguido de un ataque nucleofílico de la molécula de agua mencionada al carbonilo polarizado. El ataque se cataliza por una base (OH^-) y está asistido por el anión carboxilato del ácido aspártico dando como resultado un intermediario tetraédrico no covalente. Después, el átomo de nitrógeno peptídico del intermediario tetraédrico acepta un protón, y esto facilita la ruptura del enlace peptídico. La Figura 3.5 muestra el mecanismo de reacción.

La pepsina hidroliza preferentemente los enlaces peptídicos del sustrato en la región donde se encuentran residuos hidrofóbicos y aromáticos. La actividad enzimática se inhibe por la presencia de NaCl al 30%.

El pH óptimo de trabajo de la enzima es de 2 y la temperatura óptima es de $45^{\circ}C$, mientras que su punto isoelectrónico es 3.0 (BRENDA, 2018).

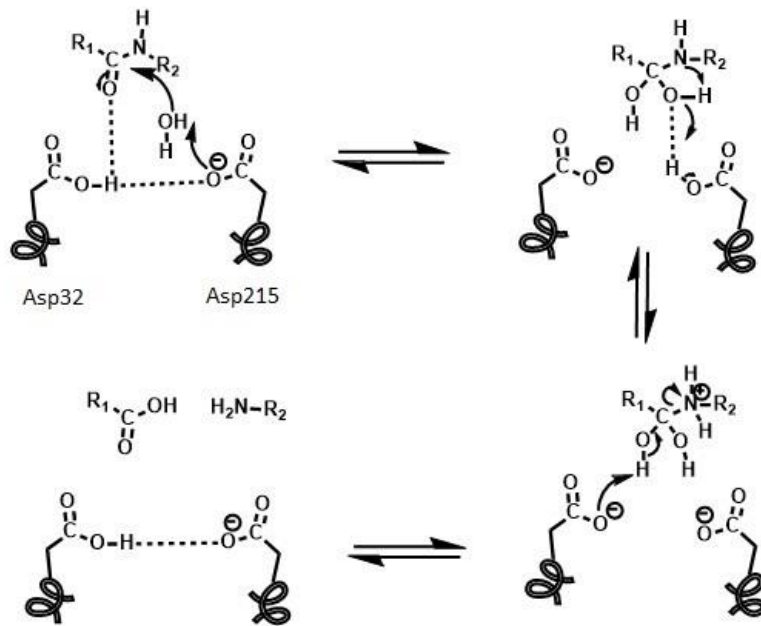


Figura 3.5. Mecanismo de reacción propuesto para la hidrólisis con pepsina. (Whitaker, 2003).

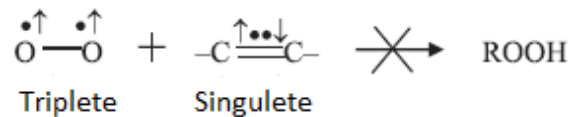
3.4. Deterioro oxidativo de los lípidos en alimentos

Los lípidos están presentes en todos los alimentos, mayormente en forma de triglicéridos y fosfolípidos. Las grasas, los aceites y los alimentos con alto contenido de lípidos se deterioran por reacciones de degradación durante el calentamiento o almacenamiento prolongado. Los procesos de degradación más importantes son las reacciones de oxidación lipídica y la descomposición de los productos formados durante la misma, lo que da como resultado una pérdida del valor nutricional y de la calidad sensorial (H. Gordon, 2001).

El deterioro oxidativo de los lípidos se refiere a la oxidación de los ácidos grasos insaturados libres o esterificados, de los fosfolípidos y también de compuestos como los carotenoides y, en general, de los compuestos que presentan una estructura insaturada.

La reacción del oxígeno con los lípidos se conoce como autooxidación y es el proceso de deterioro principal de los lípidos. A pesar de ser una reacción ubicua, no es termodinámicamente espontánea, es decir, el oxígeno atmosférico no puede

reaccionar directamente con los enlaces dobles de los lípidos. El espín electrónico del oxígeno atmosférico se encuentra en forma de triplete (dos electrones en paralelo), mientras que el del enlace doble está en forma de singulete (electrones en posición anti paralela), por lo que la reacción no procede (Fox, 1981).



Cuando la luz, o compuestos sensibilizantes como la clorofila están presentes, la activación de oxígeno triplete a oxígeno singulete tiene un papel fundamental en el inicio de la oxidación (Schaich, 2005). Alternativamente, la presencia de metales como Fe o Cu y de enzimas como la lipooxigenasa, que se conocen como iniciadores, tienen relevancia durante la primera etapa del proceso de oxidación.

La autooxidación es una reacción mediada por radicales e involucra tres etapas; las cuales se muestran en la Tabla 3.4.

- Iniciación. Se forma un radical alquilo R[•], producto de la sustracción homolítica de un átomo de hidrógeno escindible de la posición alílica de un lípido insaturado por parte de una especie reactiva.
- Propagación. El radical alquilo R[•] reacciona con oxígeno para formar un radical peroxilo ROO[•], que reacciona con otro lípido insaturado para formar un peróxido ROOH con lo que se regenera el radical alquilo R[•]. Este último reacciona con el oxígeno triplete en una reacción en cadena hasta que el sustrato se agota.
- Terminación. Los radicales reaccionan entre sí y con otras especies reactivas para formar compuestos estables.

La Figura 3.6 muestra el esquema de reacción de la autooxidación del ácido linoleico y algunos de los productos de segunda generación producidos como resultado de la descomposición de los hidroperóxidos.

Tabla 3.4. Etapas de la autoxidación lipídica.

Etapa	Reacción
Iniciación	$X^{\bullet} + RH \rightarrow R^{\bullet} + XH$
Propagación	$R^{\bullet} + O_2 \rightarrow ROO^{\bullet}$ $ROO^{\bullet} + R'H \rightarrow ROOH + R'^{\bullet}$
Terminación	$ROO^{\bullet} + ROO^{\bullet} \rightarrow ROOR + O_2$ $ROO^{\bullet} + R^{\bullet} \rightarrow ROOR$ $R^{\bullet} + R^{\bullet} \rightarrow RR$

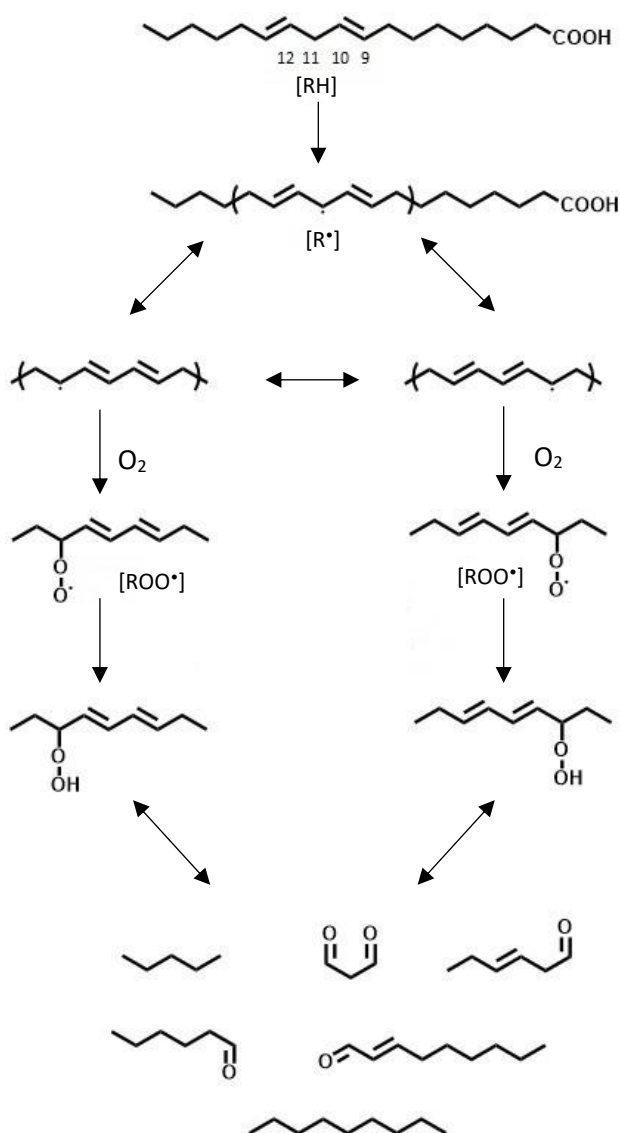


Figura 3.6. Esquema de autoxidación del ácido linoleico. Fuente: Badui, 2006.

3.4.1. Productos de autooxidación lipídica

Los componentes formados en la fase inicial de la autooxidación son los hidroperóxidos, compuestos no volátiles e inodoros muy inestables, que se descomponen de manera espontánea o en reacciones catalizadas para formar compuestos volátiles indeseables que se perciben como el olor a “rancio”. Dentro de estos compuestos se encuentran aldehídos, cetonas, alcoholes y epóxidos de bajo peso molecular, así como alcanos y polímeros no volátiles.

Además de la formación de compuestos que generan la rancidez, la autooxidación produce la pérdida de color en los alimentos debido al deterioro de pigmentos como los carotenos. La formación de radicales tiene un impacto en la pérdida del valor nutrimental debido a que reaccionan con las vitaminas E, A, D y K.

La Figura 3.7 muestra la cinética de autooxidación típica de los lípidos insaturados. Se observan tres zonas: la zona (i) correspondiente a la etapa de iniciación, también conocida como periodo de inducción. En ésta, la concentración de lípidos permanece constante y se consume muy poco oxígeno; esta zona se puede acotar por la presencia de factores prooxidantes, o se puede alargar debido al uso de antioxidantes o inhibidores de reacciones de oxidación. La zona (ii) es la etapa de propagación donde se consume la mayor cantidad de oxígeno, los lípidos insaturados se empiezan a degradar con rapidez, se forman los primeros productos de oxidación y los antioxidantes pierden su capacidad de inhibir a los radicales libres. La zona (iii) es la etapa de terminación donde la mayor parte de los lípidos se ha degradado. Los radicales reaccionan entre sí para producir componentes estables, los hidroperóxidos comienzan a degradarse y se forman los productos secundarios de oxidación.

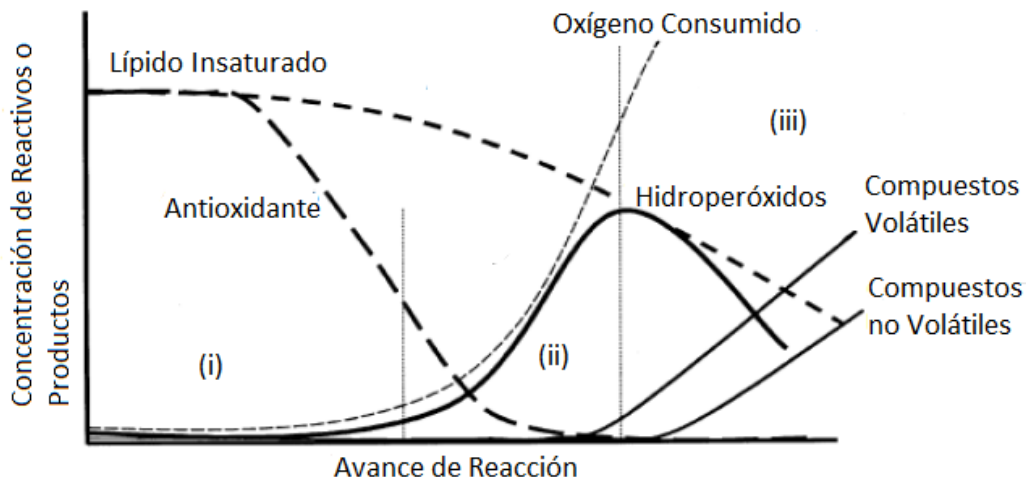


Figura 3.7. Cinética de degradación de lípidos y formación de productos de oxidación. (i) Iniciación (ii) Propagación (iii) Terminación. Adaptada de Kamal-Eldin, 2003.

3.5. Inhibidores de las reacciones de oxidación y antioxidantes

Todas las moléculas que protegen los alimentos de la autooxidación se conocen como inhibidores de la oxidación, y sólo los sustratos que inhiben la reacción mediante radicales se conocen como antioxidantes (Yanishlieva, 2001). Tanto los inhibidores de la oxidación como los antioxidantes actúan en la etapa de iniciación ya que prolongan el periodo de inducción; sin embargo, sólo los antioxidantes pueden disminuir la rapidez de formación de los radicales en la etapa de propagación.

Los inhibidores de la oxidación son preventivos y forman parte de la primera línea de defensa, ya que suprimen la formación de radicales y de las especies reactivas de oxígeno, que incluyen al radical aniónico superóxido (O_2^-), radicales hidroxilos ($OH\cdot$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno singulete (1O_2). Los antioxidantes capaces de secuestrar radicales son la segunda línea de defensa, ya que inhiben la etapa de iniciación y/o la etapa de propagación (Yanishlieva, 2001).

3.5.1. Inhibidores de la oxidación

Las moléculas que descomponen los hidroperóxidos son capaces de inhibir la oxidación al inducir la descomposición de estos últimos, a través de la formación de alcoholes no reactivos o productos estables mediante reacciones de reducción.

Ejemplos de estos compuestos son las moléculas que contienen en su estructura azufre elemental, como los tioles, sulfuros y disulfuros. Los tioles como la cisteína y el glutatión se oxidan a compuestos con enlaces disulfuro. Los sulfuros como la metionina y el ácido 3,3'-tiodipropiónico se oxidan para formar sulfóxidos; los disulfuros como la cistina se oxidan en ácidos sulfinicos, y los sulfóxidos pueden reaccionar con otras moléculas de hidroperóxido generando sulfonas. Los hidroperóxidos también pueden reaccionar con los grupos amino libres de las proteínas resultando en la formación de iminas mediante una deshidratación subsecuente. La Tabla 3.5 muestra las reacciones descritas anteriormente.

Tabla 3.5. Reacciones de descomposición de hidroperóxidos por compuestos de azufre y nitrógeno.

Grupo Funcional	Mecanismo de Reacción
Tioles	$2 RSH + R'OOH \rightarrow RSSR + R'OH + H_2O$
Sulfuros	$RSR + R'OOH \rightarrow RSOR + R'OH$
Disulfuros	$RSSR + R'OOH \rightarrow RSSOR + R'OH$
Sulfóxidos	$RSOR + R'OOH \rightarrow RSO_2R + R'OH$
Grupos amino	$RNH_2 + R'OOH \rightarrow RN(OH)R' + H_2O$

Adaptada de Yanishlieva (2001).

3.5.1.1. Agentes quelantes y complejantes de iones metálicos

Los agentes quelantes y complejantes de iones metálicos tienen un impacto relevante en la estabilidad frente la oxidación al bloquear la acción de los iones metálicos prooxidantes, limitando así la formación de hidroperóxidos. Muchas sustancias quelantes de metales están presentes en alimentos, en especial en aquellos de origen vegetal. Las sales de ácido fítico, oxalatos, fosfolípidos, ácidos policarboxílicos, hidroxamatos (derivados del ácido hidroxámico), fenoles y el ácido etilendiaminotetraacético son ejemplos de quelantes. El ácido tartárico, málico y ascórbico tienen la capacidad de formar complejos con iones metálicos. Algunos aminoácidos y péptidos también tienen propiedades quelantes. Chen & Nawar (1991) encontraron que la actividad antioxidante de los péptidos que contienen histidina se debe a su capacidad para quelar iones metálicos.

Para que una sustancia pueda actuar como un agente quelante, o complejante, debe tener una estructura capaz de envolver al ion metálico y bloquear completamente todos los orbitales para evitar la transferencia de electrones, o bien estar presente en una concentración adecuada de tal manera que múltiples moléculas hagan lo mismo.

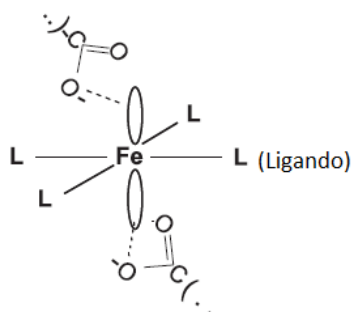


Figura 3.8. Mecanismo quelante del EDTA para el Fe. Fuente: Schaich, Shahidi, Zhong & Eskin, 2013.

3.5.2. Antioxidantes

Se consideran antioxidantes las moléculas que son capaces de neutralizar o inhibir los productos de oxidación lipídica, alargando el periodo de inducción o disminuyendo la rapidez de la etapa de propagación mediante reacciones que involucren radicales (Yanishlieva, 2001).

3.5.2.1. Actividad antioxidante mediante la transferencia del radical hidrógeno

La transferencia de radical hidrógeno es el mecanismo de reacción más conocido de la actividad antioxidante. Para que un compuesto sea considerado un antioxidante (AH), su radical (A[•]) debe ser estable, no reactivo o derivar en productos que favorezcan la propagación en cadena de los radicales.

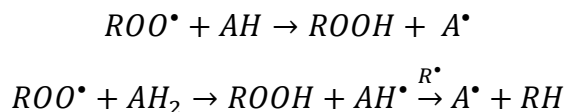


Figura 3.9. Mecanismo de reacción de antioxidantes por transferencia de hidrógeno Fuente: Leopoldini, Marino, Russo & Toscano, 2004.

De las estructuras antioxidantes más importantes capaces de donar radicales hidrógeno, se encuentran los compuestos fenólicos. La reactividad de los radicales de los compuestos fenólicos (A^\bullet) se reduce por la deslocalización electrónica del electrón desapareado entre las estructuras resonantes del anillo aromático.



Figura 3.10. Formación y estructuras resonantes del radical A^\bullet del fenol. Fuente: Schaich *et al.*, 2013.

Los antioxidantes de esta categoría incluyen monofenoles, polifenoles, aminas aromáticas, hidroxil aminas, tiofenoles, aminofenoles, carotenoides, aminoácidos y proteínas entre otros.

3.5.2.2. Actividad antioxidante mediante reducción u oxidación de radicales

Los radicales se pueden reducir u oxidar a iones no reactivos mediante la transferencia de electrones; compuestos con esta capacidad incluyen el ácido ascórbico y agentes reductores como fenoles y quinonas.

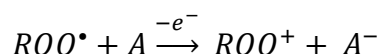
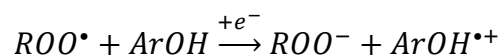


Figura 3.11. Reacciones de óxido-reducción entre antioxidantes y radicales. Fuente: Schaich *et al.*, 2013.

3.5.2.3. Actividad antioxidante mediante reacciones de terminación

Las reacciones de terminación pueden ocurrir directamente entre los antioxidantes y los radicales R^\bullet , este tipo de reacciones se presentan frecuentemente con las quinonas, quinonas imínicas y nitro compuestos, que posteriormente captan un radical hidrógeno, como se muestra en la Figura 3.12.

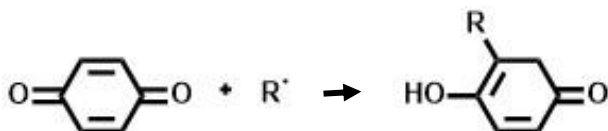


Figura 3.12. Reacción de terminación entre un antioxidante y un radical. Fuente: Schaich *et al.*, 2013.

3.5.3. Ácido cafeico

Los polifenoles son un conjunto de moléculas cuya característica común es que poseen una estructura con varios grupos bencénicos sustituidos con grupos hidroxilos; se encuentran distribuidos ampliamente en numerosas plantas (Haminiuk, Maciel, Plata & Peralta, 2012). Los compuestos fenólicos se pueden agrupar en diferentes clases dependiendo de su estructura siendo las más importantes:

- Los ácidos fenólicos derivados del ácido hidroxicinámico, como el ácido cafeico, ferúlico y *para*-cumárico.
- Los flavonoides, que constituyen el grupo más importante dentro de los polifenoles, siendo los más hallados en las plantas, tienen bajo peso molecular y comparten el esqueleto común de difenilpiranos. Esta estructura básica les permite generar una multitud de sustituciones dando lugar a flavonoles, flavonas, flavanonas, flavanolles, isoflavonoides, catequinas, chalconas, dihidrochalconas, antocianidinas, flavandioles, proantocianidinas o taninos condensados (Haminiuk *et al.*, 2012).

Numerosas investigaciones han evaluado la capacidad antioxidante de los polifenoles frente a los radicales. La capacidad antioxidante se puede considerar como la actividad biológica responsable del efecto preventivo que se les atribuye sobre determinadas enfermedades, por ello existe un gran interés en el consumo habitual de estas moléculas (Valencia, *et al.*, 2017).

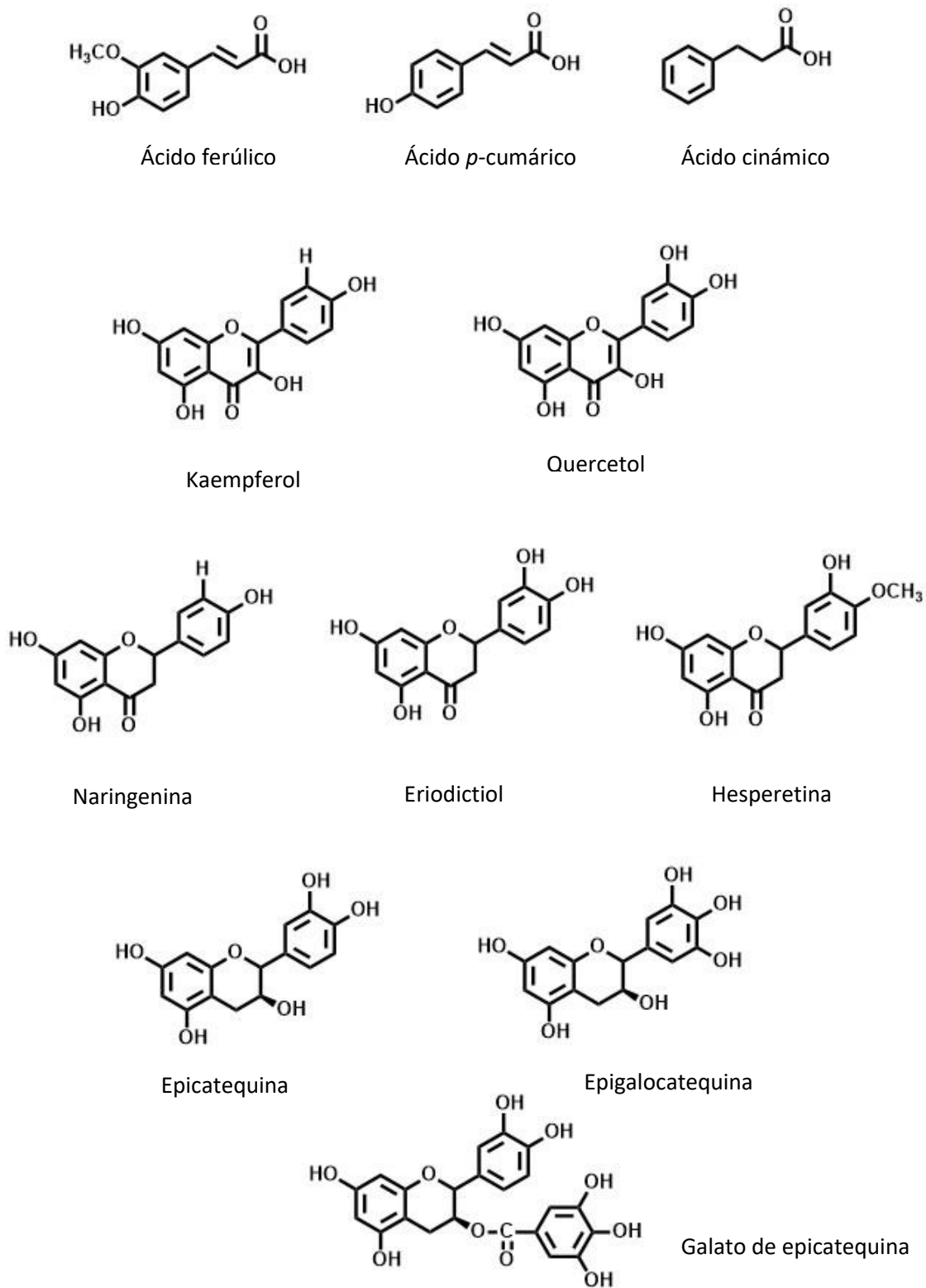


Figura 3.13. Estructura molecular de algunos polifenoles representativos.

El ácido cafeico es un ácido fenólico que se encuentra por lo general conjugado con ácido tartárico o ácido quínico y, en raras ocasiones, en estado libre (Valencia, *et al*, 2017). Se encuentra principalmente en la piel de frutas y verduras, tiene un peso molecular de 180 g/mol y su estructura química es la siguiente:

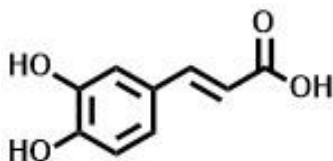


Figura 3.14. Estructura molecular del ácido cafeico.

3.6. Formación de aductos entre un polifenol y el grupo amino de péptidos y proteínas

Los polifenoles se pueden oxidar con oxígeno molecular para formar quinonas, que tienen a su vez la capacidad de reaccionar con grupos amino libres de péptidos y proteínas, lo que resulta en la formación de hidroquinonas unidas a cadenas polipeptídicas mediante un enlace covalente (Figuroa & Rouau, 1998). En este sentido, Prigent *et al.* (2009) determinaron un aumento en el peso molecular de la α -lactoalbúmina y de la lisozima de 680 Da a 690 Da al incorporar ácido clorogénico a pH 7.0; este cambio lo atribuyeron a la formación de enlaces covalentes.

Strauss y Gibson (2004) han informado el entrecruzamiento de proteínas constituido por estructuras moleculares rígidas entre quinonas y proteínas. Los autores proponen el siguiente mecanismo para la reacción de entrecruzamiento:

Un difenol, que puede ser un ácido fenólico u otro polifenol, se oxida fácilmente a una quinona (i) mediante una reacción enzimática o por interacción con oxígeno molecular. La quinona puede formar un dímero (ii) en una reacción de condensación, o puede reaccionar con el grupo amino o sulfhídrido de las cadenas polipeptídicas para formar un enlace covalente C-N o C-S con el anillo fenólico, dando como resultado la regeneración de la hidroquinona. Subsecuentemente, puede ocurrir una segunda oxidación y unirse a otro polipéptido, originándose un entrecruzamiento en la proteína (iii). Alternativamente, dos quinonas, cada una

unida a una cadena polipeptídica, pueden formar un dímero (iv). La Figura 3.15 muestra el entrecruzamiento entre proteínas y polifenoles.

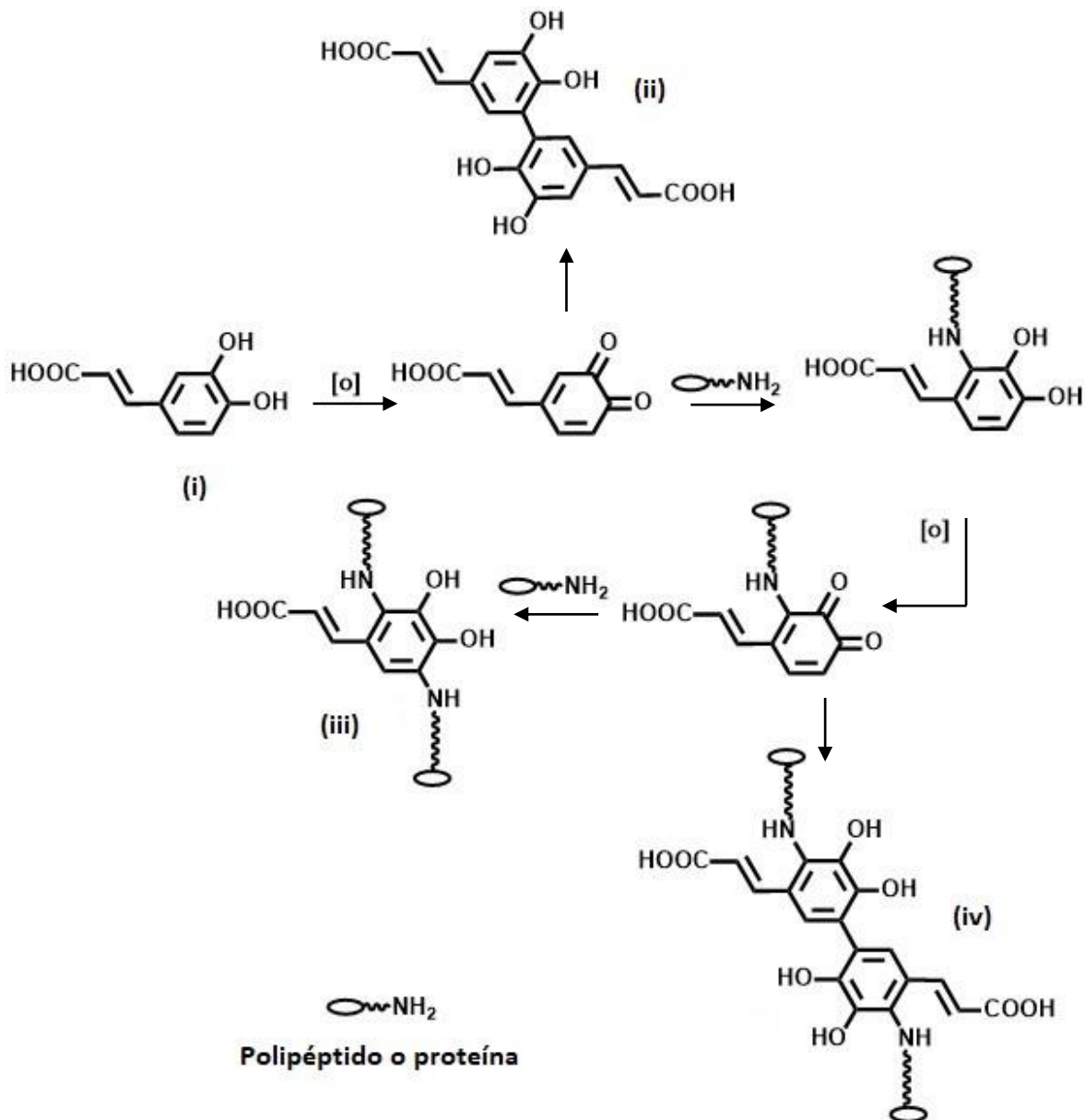


Figura 3.15. Mecanismo de reacción entre un ácido fenólico con el grupo amino de cadenas polipeptídicas. Adaptado de Strauss y Gibson (2004).

La formación de estructuras poliméricas de gran peso molecular como resultado del entrecruzamiento de proteínas tiene aplicaciones útiles, como el microencapsulamiento de compuestos activos y saborizantes, o como sustitutos de materia lipídica en alimentos. En general, los geles formados a partir de estos materiales tienen una mayor dureza mecánica y una mayor estabilidad térmica con

respecto a aquellos formados únicamente por una disolución de proteínas, esto último se debe a la formación de enlaces covalentes termorresistentes, y a la disminución de la cantidad de grupos amino libres, ocasionando una carga menor neta y, finalmente, que los geles absorban menos agua y sean más lipofílicos (McEvoy, Ross & Higgins, 1989).

Por otro lado, Trombley, Loegel, Danielson & Hagerman (2011) sugieren que la actividad y la biodisponibilidad de los polifenoles se ven afectadas por los enlaces covalentes polifenol-proteína. Este tipo de interacciones altera la estructura de las proteínas, el contenido de polifenoles libres y, por lo tanto, la capacidad antioxidante.

4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

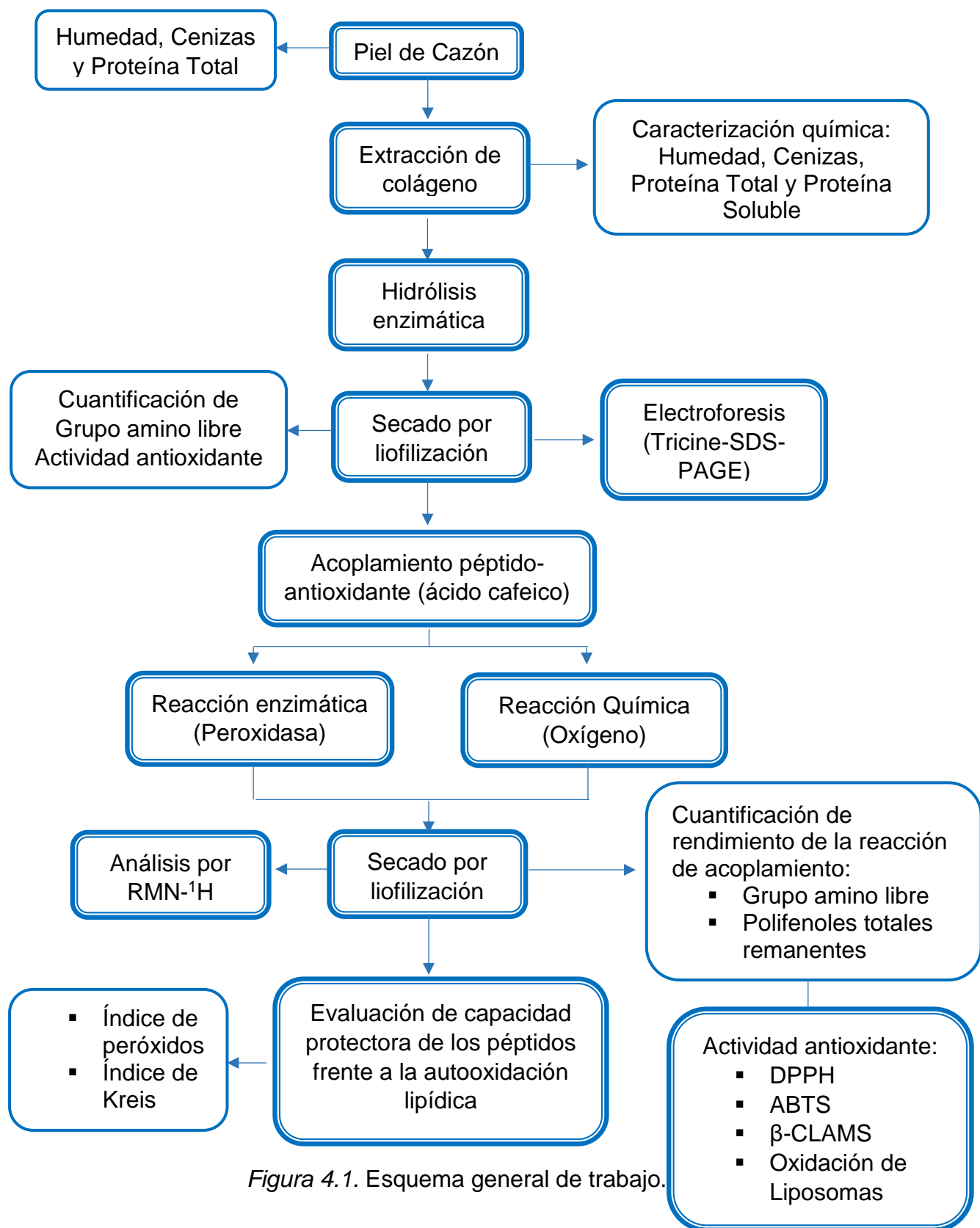


Figura 4.1. Esquema general de trabajo.

4.1. Métodos

La Figura 4.1 muestra el esquema general de trabajo de la presente tesis. Las metodologías se describen a continuación.

4.1.1. Caracterización de materia prima y extracción de colágeno

La piel de cazón negro se obtuvo de la central de pescados y mariscos “La Nueva Viga” ubicada en Eje 6 sur s/n, Del. Iztapalapa, Ciudad de México; se recolectó de varios locales que se dedican al destazado de pescado. Las muestras se colocaron en bolsas de polipropileno y en hielo para evitar su descomposición durante el traslado al laboratorio L-323 de Análisis de Alimentos ubicado en el edificio E de la Facultad de Química, CU, UNAM. En el laboratorio, la piel fue lavada con agua corriente y se retiró la mayor parte del tejido miofibrilar, se cortó en trozos de aproximadamente 3x5 cm y se almacenó a -18°C hasta su uso. Para caracterizar la materia prima se usaron los siguientes métodos:

- **Proteína Total.** Método de Kjeldahl, empleando un factor de 6.25 (AOAC, 1984).
- **Humedad.** Método de secado en estufa con vacío (AOAC 950.46, 1995).
- **Cenizas.** Método de cenizas totales por calcinación (AOAC 938.08, 1995).
- **Carbohidratos Totales.** Método de Fenol-Sulfúrico (Nielsen, 1998).

Mediante la técnica descrita por Limpisophon, Tanaka, Weng, Abe & Osako (2009) con algunas modificaciones, se extrajo el colágeno de la piel de cazón.

La piel limpia y en trozos se sumergió en una solución de NaOH 0.1 M en agua corriente en una proporción de 1:10 p/v con agitación constante durante 4 horas; pasado el tiempo de agitación, el sobrenadante se desechó y la piel se lavó con agua corriente hasta tener un pH neutro. En esta primera etapa, se eliminó la mayor parte de pigmentos y de proteína no colágena; después, la piel se sumergió en una solución de CH₃COOH 0.05 M en una relación 1:10 p/v, y se mantuvo con agitación constante durante 4 horas. Transcurrido el tiempo, la piel se retiró de la solución y se lavó hasta obtener pH neutro. Finalmente, la piel se sometió a un tratamiento térmico a una temperatura de 55°C en agua corriente en una proporción 1:10 p/v

con agitación constante durante 4 horas. En este último paso, el agua de extracción se recuperó y el pH de la solución se llevó hasta el punto isoeléctrico de la proteína (3.5-4) con CCl_3COOH al 5%. Para precipitar la proteína, se añadió como agente deshidratante $(\text{NaPO}_3)_6$ al 30% con relación al volumen final. Se dejó en reposo durante 48 horas en condiciones de refrigeración, el pellet obtenido se recuperó mediante centrifugación y se cuantificó la cantidad de proteína soluble del mismo a pH 7, así como en el sobrenadante para calcular el rendimiento de extracción.

La composición química del extracto proteico húmedo (pellet) se caracterizó mediante la determinación de Biuret, para la cuantificación de proteína soluble, utilizando albúmina bovina sérica (BSA) como estándar (Nielsen, 1998), además de los métodos previamente mencionados.

4.1.2. Actividad enzimática de las proteasas

Para obtener los hidrolizados de colágeno se utilizaron 2 proteasas: papaína (*Sigma-Aldrich*, P4762) y pepsina (*Sigma-Aldrich*, P7000). Se seleccionaron estas enzimas debido a que liberan péptidos con mayor actividad antioxidante en comparación con otras enzimas proteolíticas. Con el propósito de estandarizar la cantidad de enzima en unidades de actividad (U), se midió la actividad proteolítica; para ello, se cuantificó el aumento del grupo amino libre con ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfónico (TNBS) producido por la reacción de hidrólisis utilizando caseína al 1% como sustrato. En un tubo de ensayo, se adicionaron 40 μL de enzima en una concentración conocida y 960 μL de una solución amortiguadora en concentración adecuada para lograr la actividad óptima. La mezcla se introdujo en un baño de agua a la temperatura óptima para cada enzima por 5 min; después, se añadió 1 mL de solución de caseína al 1%, la reacción se llevó a cabo por 15 min. Transcurrido el tiempo, se adicionaron 3 mL de CCl_3COOH al 10% con la finalidad de detener la reacción y precipitar la proteína no hidrolizada. Las muestras se centrifugaron y el sobrenadante se utilizó para medir el grupo amino.

Adicionalmente, se cuantificó la proteína soluble mediante el método de Lowry para determinar la concentración de cada enzima en solución y poder calcular la actividad enzimática.

4.1.3. Cuantificación de grupo amino libre

Para determinar el grupo amino libre, se utilizó la técnica descrita por Adler Nissen (1979) con algunas modificaciones. Se tomaron 40 μL de solución de proteína o hidrolizado y se adicionaron 1.96 mL de solución amortiguadora de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ 0.1 M de pH=9.3; posteriormente, se agregaron 40 μL de ácido TNBS 0.03 M, se agitó la mezcla y se dejó reposar por 30 min. Finalmente, la absorbancia se leyó a una longitud de onda de 340 nm, se ajustó con un blanco de muestra y se realizó una curva patrón de glicina en un intervalo de concentraciones de 80-400 $\mu\text{g/mL}$.

4.1.4. Hidrólisis enzimática

Una vez que se caracterizó el pellet, se llevó a cabo su hidrólisis enzimática con una concentración de colágeno al 5% p/v, medido como proteína soluble, en un volumen total de 50 mL. En un matraz Erlenmeyer de 250 mL, se resuspendió el pellet con un volumen mínimo necesario de agua destilada, alcalinizando el medio hasta pH 11 con NaOH 1 N para asegurar una disolución total de la proteína; el volumen final se completó, de manera respectiva, con un amortiguador de glicina-HCl 0.2 M pH=2.0 y una solución amortiguadora de fosfatos 0.2 M pH=7 para la pepsina y la papaína, los matraces se colocaron en un baño de agua, equipo *Boekel Scientific*[®], a una temperatura de 45°C y con agitación de 110 rpm. Se dejó acondicionar la mezcla por 15 minutos; transcurrido este tiempo, se midió y ajustó el pH para asegurar el pH óptimo de trabajo de cada enzima. Posteriormente, se añadió la enzima a cada matraz homogeneizando la mezcla; la reacción de hidrólisis se llevó a cabo por 3 horas a temperatura y agitación constantes. Al final se inactivaron las enzimas con calentamiento a 90°C durante 30 min.

Para conocer el efecto de la concentración de enzima sobre el grado de hidrólisis del colágeno, se ensayaron tres actividades diferentes para cada enzima, las cuales se muestran en la Tabla 4.1, los experimentos se hicieron por triplicado.

Tabla 4.1. Ensayo de actividad enzimática proteolítica de pepsina y papaína.

Enzima	Actividad Total ¹	U de enzima/ g de proteína
Pepsina	33801 U	6760.2
	48950 U	9790
	64466 U	12893.2
Papaína	2.82 U	0.564
	5.63 U	1.126
	8.44 U	1.69

1. Se entiende como actividad total la cantidad de enzima añadida por volumen de hidrólisis.

4.1.4.1. Grado de hidrólisis

Para determinar la cinética de la hidrólisis, se tomaron alícuotas de 1 mL a las que se adicionaron 3 mL CCl₃COOH al 10% para detener la reacción por precipitación de la enzima y de las proteínas no hidrolizadas. Las muestras se centrifugaron y el sobrenadante se recuperó para cuantificar el grupo amino libre y calcular el grado de hidrólisis.

El grado de hidrólisis se calculó con la siguiente fórmula (Nissen, 1979):

$$GH\% = \left(\frac{AN_2 - AN_1}{Npb} \right) \times 100$$

Donde AN₁ es la cantidad de grupo amino primario antes de la hidrólisis (mg/g proteína), AN₂ es la cantidad de grupo amino primario después de la misma (mg/g proteína) y Npb es el contenido de nitrógeno en forma de enlaces peptídicos (mg/g proteína), para el colágeno se utilizó un valor de 155.55 (Lidong, *et al.*, 2014).

4.1.5. Obtención y caracterización de hidrolizados de colágeno

Para recuperar los hidrolizados de colágeno, las muestras provenientes de las hidrólisis se centrifugaron a 6000 rpm durante 20 minutos, en una centrifugadora *Hermle*[®], con la finalidad de separar el colágeno no hidrolizado y la materia de peso molecular alto; el sobrenadante se recuperó y se secó por liofilización.

Para caracterizar los hidrolizados obtenidos se determinó:

- ✓ **Proteína Total** (empleando un factor de 6.25)
- ✓ **Grupo amino libre** (Método de TNBS)
- ✓ **Proteína Soluble** (Método de Biuret usando BSA para la curva patrón)
- ✓ **Peso molecular de los hidrolizados** (Electroforesis)

4.1.5.1. Peso molecular de los hidrolizados (Tricine-SDS-PAGE)

La electroforesis en gel de poliacrilamida-tricine-dodecilsulfato de sodio (Tricine-SDS-PAGE) es un método eficiente para separar proteínas de bajo peso molecular o péptidos como aquellos provenientes de una hidrólisis, comprendidos en un intervalo de 1,000-30,000 Da.

Se realizó una electroforesis Tricine-SDS-PAGE de acuerdo con el método descrito en la literatura (Syed, Haider, Reid & Barry, 2012) en un sistema para electroforesis (*Bio-Rad Mini-PROTEAN®*). El gel separador se preparó en una concentración de 12%, y el gel concentrador en 4%, con un espesor de 0.75 mm. Se utilizó una solución amortiguadora de corrida de Tris-Tricine 25 mM y SDS 0.05% (p/v), y una solución amortiguadora de carga 2x (Tris-HCl 100 mM pH 6.8, SDS al 1% (p/v), 2-mercaptoetanol 4% v/v, azul brillante de Coomassie 0.02% p/v, y glicerol 24% p/v).

En tubos Eppendorf, se preparó 1 mL de las muestras al mezclar los hidrolizados con la solución amortiguadora de carga 2x para obtener una concentración final de 7.5 mg/mL. En cada carril se colocaron 20 µL de muestra, y en los carriles extremos se colocaron 7 µL de marcador de bajo peso molecular (*Bio-Rad®*). La electroforesis se llevó a cabo empleando 60 V hasta que la mayoría de las muestras llegaran al gel separador. Posteriormente, se incrementó el potencial hasta 110 V durante aproximadamente 1.5 h. Transcurrido el tiempo de corrida, el gel se sumergió en una solución fijadora de glutaraldehído al 3% por 20 min y después, en una solución de tinción de azul de Coomassie R-250 sin metanol, se incubó con un movimiento rotatorio durante 2 h a temperatura ambiente. Finalmente, el gel fue decolorado con tres lavados con una solución de decoloración rápida (metanol 40%, ácido acético 10%, y agua 50%).

4.1.6. Acoplamiento de ácido cafeico con hidrolizados de colágeno

La reacción de acoplamiento entre el ácido cafeico y los hidrolizados de colágeno mediante la oxidación del grupo fenol para formar una *o*-quinona que pueda reaccionar con los grupos amino libres se realizó a través de dos métodos, una oxidación enzimática y oxidación química usando oxígeno molecular.

El hidrolizado que se utilizó para formar el aducto péptido-ácido cafeico fue el hidrolizado H.P.2, obtenido con papaína, con un grado de hidrólisis de 30.79%.

4.1.6.1. Reacción de acoplamiento vía química

Se utilizó la técnica descrita por Strauss y Gibson (2004) con algunas modificaciones. En un matraz bola de 50 mL, se colocó 1 g de hidrolizado de colágeno H.P.2, y la cantidad necesaria de ácido cafeico para obtener una concentración final de 200 ppm del antioxidante; se agregaron 10 mL de agua destilada alcalinizada con NaOH 0.1 N para obtener pH 8.0. La mezcla resultante se expuso a una atmósfera de oxígeno mediante la adaptación de un globo lleno del gas a la boca del matraz; la reacción se llevó a cabo por 4 horas con agitación constante y a temperatura ~25°C.

4.1.6.2. Reacción de acoplamiento vía enzimática

Para la oxidación del grupo fenólico, se utilizó peroxidasa de rábano picante (HRP). En primer lugar, se agregaron 1 g del hidrolizado H.P.2 y 2 mg de ácido cafeico a un vaso de precipitados de 50 mL, en un volumen total de 10 mL con una solución amortiguadora de fosfatos pH 7; se utilizó la siguiente relación enzima/ antioxidante 1 U HRP/0.5 mg de antioxidante. La mezcla se agitó y se añadieron 30 µL de H₂O₂ al 5%/U de enzima HRP cada 10 minutos durante 1 hora.

Se determinó la actividad enzimática de la peroxidasa con la finalidad de estandarizar la cantidad de unidades a utilizar en el proceso de funcionalización de los hidrolizados; para ello, se preparó una disolución de peroxidasa a una concentración de 0.1 mg/mL, se tomó una alícuota de 1 mL de la solución de enzima adecuadamente diluida y se agregaron 3.8 mL de amortiguador de fosfatos 0.1 M

de pH 7, 1 mL de guayacol 40 mM y 0.2 mL de H₂O₂ 40 mM. Se agitó la mezcla y después de exactamente 5 min se leyó la absorbancia a una λ de 470 nm en un espectrofotómetro (*BECKMAN DU[®]65*). Adicionalmente, se preparó un blanco de muestra usando 1 mL del amortiguador de fosfatos en lugar de la muestra.

4.1.6.3. Análisis de los hidrolizados funcionalizados por resonancia magnética nuclear de hidrógeno (RMN-¹H)

Una vez que se realizó la funcionalización, los hidrolizados se liofilizaron y analizaron mediante un equipo de resonancia magnética protónica (RMN-¹H) marca Agilent MR de 400 MHz, presente en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAI) de la Facultad de Química, UNAM. Las muestras se disolvieron en ácido trifluoroacético deuterado (TFA-d), y se empleó tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Los datos obtenidos se procesaron con el software *Mest-ReNova[®] 8.1*.

4.1.6.4. Rendimiento de la reacción: Grupo Amino y Polifenoles Totales

Se cuantificó el grupo amino libre con TNBS antes y después de la reacción y el contenido de polifenoles totales unidos a los hidrolizados de colágeno mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu, que se basa en una reacción de óxido-reducción entre los compuestos fenólicos y los ácidos fosfomolibdico y fosfotúngstico, formando óxidos de tungsteno y molibdeno de coloración azul con absorción máxima a 765 nm (García, 1990).

Para la cuantificación de polifenoles, se tomaron 0.5 mL de la muestra adecuadamente diluida y se mezclaron con 2.5 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu diluido 1:10 con agua destilada y 2 mL de Na₂CO₃ 7.5%. Se incubó por 60 min en oscuridad y se midió la absorbancia a 765 nm en un espectrofotómetro (*BECKMAN DU[®]65*) (Skerget, *et al.*, 2005). A continuación, se trazó una curva patrón de ácido cafeico en CH₃OH al 80% en un intervalo de concentraciones de 10-200 ppm. Los resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido cafeico (EAC)/g de hidrolizado.

Posteriormente, se preparó una solución etanólica de los hidrolizados funcionalizados, la solución se filtró, ya que los hidrolizados acoplados con ácido cafeico son insolubles en CH₃CH₂OH, y al sobrenadante se le midió la cantidad de polifenoles totales remanentes, que corresponden a la fracción que no enlazada a los hidrolizados. Después, se determinó el porcentaje de acoplamiento como una diferencia entre el contenido de polifenoles totales solubles en agua y el contenido de polifenoles remanentes en el sobrenadante:

$$\% \text{ Acoplamiento} = \frac{P_H - P_S}{AC} \times 100$$

Donde P_H es el contenido de polifenoles totales solubles en agua (ácido cafeico unido + ácido cafeico libre), P_S es el contenido de polifenoles totales remanentes en el sobrenadante de la solución etanólica y AC es la cantidad de ácido cafeico agregado al principio de la reacción.

4.1.7. Síntesis química de un enlace covalente entre cloruro de ácido y un éster metílico de glicina

Con la finalidad de corroborar que el ácido cafeico tiene la capacidad formar enlaces covalentes con los grupos amino libres de los hidrolizados, se diseñó una síntesis química del enlace peptídico a partir de la formación de un cloruro de ácido proveniente del ácido cafeico para después hacerlo reaccionar con un éster metílico de glicina. El cloruro de ácido se sintetizó de la siguiente forma de acuerdo con lo descrito por Haiming, Dongsheng, Rouling & Yaqian (2014).

En un matraz bola se pesaron 200 mg de ácido cafeico y se suspendieron en 10 mL de tolueno, se añadió 1 gota de dimetilformamida como catalizador y, finalmente, se agregaron 0.48 mL de SOCl₂; se calentó a reflujo por 6 horas bajo una atmósfera de nitrógeno.

Una vez formado el cloruro de ácido, en un rotavapor se evaporó la mayor cantidad de tolueno y el producto obtenido se hizo reaccionar nuevamente con un éster metílico de glicina en metanol durante una hora con agitación constante. Este último proceso se repitió usando los hidrolizados de colágeno en lugar del éster metílico.

Los productos finales se recrystalizaron y se analizaron por cromatografía en capa fina usando una mezcla de diclorometano/metanol en una proporción 70:30 como eluyente; las placas fueron reveladas con ácido fosfomolibdico.

Adicionalmente, los productos obtenidos se analizaron por RMN¹H usando metanol deuterado como disolvente; los datos se procesaron con el Software *Mest-Re Nova*[®] 8.1.

4.1.8. Actividad antioxidante

Se determinó y comparó la actividad antioxidante endógena de los hidrolizados de colágeno y de los hidrolizados funcionalizados con ácido cafeico. Mediante métodos que involucran reacciones con radicales y metodologías que evalúan la capacidad de inhibir los productos de oxidación lipídica, se pueden conocer las propiedades antioxidantes de los hidrolizados por presencia de péptidos activos.

4.1.8.1. Capacidad secuestrante del radical DPPH

Se utilizó el radical estable 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo, DPPH (*Sigma Aldrich*, D9132) para determinar la capacidad antioxidante de los hidrolizados de colágeno y de la solución estándar de ácido cafeico. Con este método, es posible determinar la capacidad de inhibir los radicales de las muestras al medir el decremento en la absorbancia del radical DPPH a 515 nm, como consecuencia de un cambio de color de púrpura a amarillo, el decremento en la absorbancia se produce cuando el antioxidante dona un radical hidrógeno al radical DPPH y se forma una molécula estable de la forma DPPH-H (Matthäus, 2002).

En esta parte experimental, se preparó una solución metanólica de DPPH 3.6×10^{-5} M y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro (*BECKMAN DU[®]-65*) a 515 nm (t_0); después se mezclaron 2 mL de dicha solución con 50 μ L de solución de hidrolizados de colágeno (20 mg/mL) y se evaluó el decremento de la absorbancia a 515 nm durante 16 min y se registró el valor de absorbancia a los 16 min (t_f).

El porcentaje de inhibición se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ Inhibición} = \left(\frac{Abs_{t=0 \text{ min}} - Abs_{t=16 \text{ min}}}{Abs_{t=0 \text{ min}}} \right) \times 100$$

Se trazó una curva patrón de Trolox® para poder expresar los resultados como valores de capacidad antioxidante equivalente de Trolox® (TEAC) en equivalentes μmol de Trolox®/ g de hidrolizado ($\mu\text{mol TE/ g hidrolizado}$).

4.1.8.2. Capacidad secuestrante del radical ABTS

Al igual que el ensayo con el radical DPPH, el ensayo con ABTS es un método que permite determinar la capacidad de inhibir radicales, con la diferencia que se genera un radical catiónico y éste es más reactivo que el radical DPPH (H. Gordon, 2001).

En esta parte, se determinó la capacidad de las muestras para capturar el radical catiónico ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazonil-6-sulfónico (ABTS^{•+}) (*Sigma Aldrich*, 30931-67-0). El radical fue generado mediante la oxidación de ABTS 7 mM con persulfato de potasio 2.45 mM, la disolución se incubó en obscuridad a temperatura ambiente por 16 h. Posteriormente, el radical fue diluido con agua hasta obtener una absorbancia de 0.70 ± 0.03 a 734 nm (A_0), medida en espectrofotómetro (*BECKMAN DU®-65*).

Para la reacción con las disoluciones de hidrolizados de colágeno (20mg/mL) y de 200 ppm de ácido cafeico, se hicieron reaccionar 20 μL de muestra con 1980 μL de radical ABTS^{•+} en una celda de espectrofotometría y se midió el decremento en la absorbancia por 10 min a 734 nm. Como control positivo se utilizó una solución etanólica de 200 ppm de quercetina.

El porcentaje de capacidad antioxidante se determinó como el porcentaje de inhibición del radical ABTS^{•+}, de la siguiente manera:

$$\% \text{ CAO} = \left(\frac{A_0 - A_f}{A_0} \right) \times 100$$

Donde A_0 es el valor de la absorbancia en el tiempo cero y A_f es el valor de la absorbancia a 734 nm registrada a los 10 min. El cociente representa la cantidad de ABTS a los 10 min y, la resta, la cantidad que el hidrolizado es capaz de inhibir.

Se trazó una curva patrón de Trolox[®] (*Sigma Aldrich*, 53188-07-1) en etanol al 96% con concentraciones de 10 a 450 ppm con las mismas condiciones de ensayo para expresar los resultados como valores de capacidad antioxidante equivalente a Trolox[®] (TEAC) en μmol equivalentes de Trolox[®]/g de hidrolizado (μmol TE/g hidrolizado).

4.1.8.3. Método de decoloración del β -caroteno (β -CLAMS)

En este método, un sistema modelo formado por β -caroteno y ácido linoleico, β -CLAMS, por sus siglas en inglés, sufre una rápida decoloración en ausencia de un antioxidante. El radical del ácido linoleico que se forma cuando un átomo de hidrógeno se sustrae del grupo metileno reactivo, ataca a las moléculas de β -caroteno provocando que este último pierda su estructura conjugada original y, por lo tanto, su color anaranjado característico (Matthäus, 2002).

En esta etapa, 20 mg de ácido linoleico y 200 mg de Tween 80 se transfirieron a un matraz bola de 100 mL; se añadió 1 mL de solución de β -caroteno (*Sigma Aldrich*, 7235-40-7) 0.2 mg/mL en CH_2Cl_2 . El disolvente orgánico se evaporó en un rotavapor a vacío y 40°C; después, se añadieron lentamente 50 mL de agua destilada con agitación constante hasta formar una emulsión estable. Se tomó una alícuota de 5 mL de la emulsión y se agregaron 0.2 mL de solución de los hidrolizados de colágeno de concentración conocida; se midió inmediatamente la absorbancia a 470 nm ($t = 0$) frente a un blanco de la emulsión sin β -caroteno. Las mezclas de reacción se incubaron en un baño de agua a 50°C durante 2 horas; al final, se midió nuevamente la absorbancia a la misma longitud de onda. El grado de decoloración se calculó como la diferencia entre las absorbancias medidas al $t=0$ y al final de la reacción.

4.1.8.4. Preparación de liposomas y ensayo TBARS

El ensayo de las sustancias reactivas del ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS, por sus siglas en inglés) cuantifica los productos secundarios de la oxidación lipídica, principalmente malonaldehído. Se basa en la reacción entre el malonaldehído (y productos similares, como aquellos que incluyen dicarbonilos insaturados) y el ácido

2-tiobarbitúrico (TBA) para producir un compuesto colorido que se mide espectrofotométricamente (F. O'Keefe & Pike, 2010).

Se prepararon liposomas de acuerdo a la técnica descrita en la literatura (Reyes, Tecante & Valdivia, 2008; Siddhuraju, Mohan, & Becker, 2002; Yen & Chuang, 2000). Para ello, se dispersaron 5 g de lecitina de soya en 500 mL de amortiguador de fosfatos 20 mM de pH 7.4; se sónico durante 30 min en un baño de hielo (*Branson 3510-DTH Ultrasonic Cleaner*) bajo una atmosfera de nitrógeno. Se prepararon soluciones de los hidrolizados de colágeno en concentración de 2 mg/mL. Para la prueba de peroxidación de liposomas; se mezclaron 0.5 mL de las soluciones con 2 mL de liposomas, 0.1 mL de FeCl₃ 25 mM, 0.1 mL de H₂O₂ 25 mM, 0.1 mL de ácido ascórbico 25 mM y 1.2 mL de amortiguador de fosfatos 0.2 M de pH 7.4. La mezcla de reacción se incubó a 37°C por 4 horas. Transcurrido el tiempo de incubación, se agregó 1 mL de butilhidroxianisol (BHA) (20 mg/mL en metanol) para detener la reacción de oxidación.

El grado de oxidación de los liposomas se determinó subsecuentemente al cuantificar las TBARS; para ello, se añadió 1 mL de TBA al 1%, y 1 mL de HCl al 10% a la mezcla de reacción, y la nueva mezcla se calentó en un baño de agua a 100°C por 30 min. Se dejó enfriar en baño de hielo por 15 min y, finalmente, se añadieron 5 mL de diclorometano, la mezcla se centrifugó por 20 min a 6000 rpm (*Hermle*[®]); se midió la absorbancia del sobrenadante a λ 532 nm. Se utilizó Trolox[®] como control positivo para comparar los resultados.

El porcentaje de inhibición de la formación de TBARS se calculó de la siguiente forma:

$$\% \text{ Inhibición: } \frac{A_0 - A_t}{A_0 - A_1} \times 100$$

Donde A₀, A₁ y A_t son los valores respectivos de las absorbancias para el control, el blanco y las muestras problema.

4.1.9. Evaluación de la capacidad protectora de hidrolizados de colágeno frente al deterioro oxidativo en una emulsión agua en aceite

Los hidrolizados de colágeno, así como de aquellos acoplados con ácido cafeico, se añadieron a una emulsión agua en aceite que se preparó al mezclar aceite de cártamo comercial con vinagre en una proporción aceite:vinagre (3:1). Para eliminar las interferencias del antioxidante sintético TBHQ, presente en el aceite comercial, se realizaron 3 extracciones con etanol 96% en una relación 1:1 para asegurar su completa eliminación de la matriz lipídica.

4.1.9.1. Índice de peróxidos por método colorimétrico

Es un método colorimétrico indirecto, basado en la oxidación de Fe (II) a Fe (III) por los peróxidos de la muestra y su determinación mediante la producción de un cromóforo de color rojo que se forma al producirse un complejo entre el tiocianato de amonio y el Fe (III).

Se colocó el equivalente a 0.001-0.1 g de aceite de la emulsión y se disolvieron en una mezcla de CH₂Cl₂/CH₃OH (70:30). Posteriormente, se adicionaron 0.05 mL de tiocianato de amonio al 30% y se midió la absorbancia a λ 500 nm (E₀) frente a un blanco de disolventes; a continuación, se adicionaron 0.05 mL de cloruro ferroso (FeCl₂) al 0.35% en HCl 0.2 M, se mezcló y después de, exactamente, 5 min, se midió nuevamente la absorbancia a λ 500 nm (E₂). Simultáneamente, se hizo una determinación al agregar 0.05 mL de FeCl₂ al blanco de muestra (E₁). Finalmente, se trazó una curva de calibración con cloruro férrico (FeCl₃) disuelto en CH₂Cl₂/CH₃OH (70:30) en un intervalo de concentraciones de 5-50 µg de Fe/10 mL. La curva se realizó mezclando 10 mL de cada disolución de FeCl₃ con 0.05 mL de tiocianato de amonio al 30% y 0.05 mL de HCl 0.2 M, midiendo la absorbancia a una λ de 500 nm frente a un blanco de disolventes.

El índice de peróxidos (IP) se calculó de la siguiente manera:

$$IP \left(\frac{mEq}{Kg} \right) = \frac{m}{W \times 55.84}$$

Donde W es la masa de la muestra de aceite en g, 55.84 es el peso molecular del Fe, y m son los μg de Fe/10 mL obtenidos de la curva de calibración utilizando la absorbancia corregida:

$$A_{\text{corregida}} = E_2 - (E_1 + E_0)$$

4.1.9.2. Índice de Kreis

Dentro de los productos de oxidación secundarios, que incluyen aldehídos y cetonas se encuentra el aldehído epihidrinal o malonaldehído. El índice de Kreis es un método colorimétrico basado en la producción de un color rosado debido a la reacción en medio ácido entre el floroglucinol y el malonaldehído proveniente de la grasa oxidada en medio ácido (Kirk, Sawyer & Egan, 2002).

Se disolvieron entre 50-500 mg de aceite de la emulsión en 5 mL de diclorometano. Después, se añadieron 10 mL de ácido tricloroacético al 30% en ácido acético glacial y 1 mL floroglucinol al 1% en ácido acético, se agitó, y la mezcla se incubó en un baño de agua a 45°C por 15 min. Se dejó enfriar, y se agregaron 4 mL de etanol al 96%, se homogeneizó y se midió la absorbancia a 540 nm frente a un blanco de reactivos. El índice de Kreis se informa como Abs 540 nm/g de grasa.

4.10. Análisis Estadístico

Las determinaciones se hicieron por triplicado y se expresaron como el valor promedio \pm intervalo de confianza a un 95% de probabilidad.

Para las etapas de caracterización hidrolizados y extractos proteicos, el cálculo del rendimiento de reacción de acoplamiento, la determinación de la actividad antioxidante, y la evaluación de la capacidad protectora frente al deterioro oxidativo, se realizó un análisis de varianza de un solo factor (ANOVA), con un nivel de significancia $\alpha=0.05$, y las medias fueron evaluadas mediante un análisis de diferencia mínima significativa (LSD) de Fischer, con un nivel de significancia $\alpha=0.05$. Los datos fueron procesados en una hoja de cálculo usando el programa *Microsoft Excel® 2010*.

Para conocer el efecto de la concentración de enzima en el grado de hidrólisis, se realizó un análisis de varianza de dos factores (ANOVA), tomando como fuentes de variación el tiempo de hidrólisis y la actividad enzimática, con un nivel de significancia $\alpha=0.05$, y el análisis de medias se evaluó mediante la prueba LSD de Fischer, con un nivel de significancia $\alpha=0.05$, usando el mismo programa de computo.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Caracterización de la piel de cazón y del extracto de colágeno

En la Tabla 5.1 se muestra el análisis proximal de la piel de cazón negro y del extracto de colágeno. El componente mayoritario en ambos casos es agua, seguido de proteína; el contenido de proteína total en base seca de la piel es de 82.29%, por lo que se considera que este residuo de pesquería es una fuente rica en proteína que se puede aprovechar para generar hidrolizados. La proteína del tejido de esta parte anatómica es mayormente colágeno, proteína estructural que le sirve al tiburón para tener una buena movilidad y como barrera protectora. La presencia de carbohidratos se debe a que el colágeno contiene regiones unidas a azúcares como glucosa, galactosa, arabinosa, xilosa y ribosa, a través de enlaces glucosídicos (Benjakul *et al.*, 2012), así como a otras glicoproteínas presentes en el tejido conectivo.

Tabla 5.1. Análisis químico proximal de la materia prima y del extracto proteico de piel de cazón.

Componente	Piel	Extracto proteico
	(g/100 g de piel)	(g/100 g de pellet)
Humedad	64.71 ± 6.04	67.45 ± 2.63
Proteína Total	36.78 ± 4.06	23.47 ± 5.85
Proteína Total (base seca)	82.29 ± 0.24	84.21 ± 0.29
Cenizas	4.88 ± 0.82	3.87 ± 0.98
Carbohidratos Totales	1.37 ± 0.15	1.27 ± 0.17

La composición química del extracto de colágeno es similar a los valores informados en la literatura; por ejemplo, se menciona un contenido de proteína en extractos de colágeno de 88.34% (Yin, *et al.*, 2010), de 88.6% (Silva, Bandeira & Pinto, 2014) y de 84.4% (Alemán, Giménez, Montero & Gómez, 2011); las diferencias en la composición química se deben a variaciones de las especies, edad, alimentación, zona geográfica, entre otros factores.

Se obtuvieron dos fracciones de proteína colágena después de precipitar con CCl_3COOH y $(\text{NaPO}_3)_6$; se denominó como fracción A al extracto de colágeno que se obtuvo en mayor proporción, y B a la fracción menor. La fracción A presenta un color grisáceo que se atribuye a pigmentos que no se eliminaron por completo en la extracción y que quedaron ocluidos durante la precipitación, mientras que la fracción B es de color blanco sin la presencia aparente de pigmentos. La composición química de ambas fracciones es similar y no existe una diferencia significativa entre ellas a un nivel de significancia $\alpha=0.05$, por lo que estos resultados no se reportan.



Figura 5.1. Extractos de colágeno obtenidos de piel de cazón.

5.2. Hidrólisis enzimática

Para obtener los hidrolizados de colágeno, se utilizaron dos proteasas, papaína y pepsina. La cinética de su hidrólisis enzimática se muestra en la Figura 5.2. El grado de hidrólisis se determinó al cuantificar con TNBS el aumento del grupo amino libre.

El grado de hidrólisis es el porcentaje de enlaces peptídicos que se hidrolizan con respecto al número total de enlaces presentes en la proteína (Nissen, 1986), y es una manera útil de evaluar el avance del proceso hidrolítico.

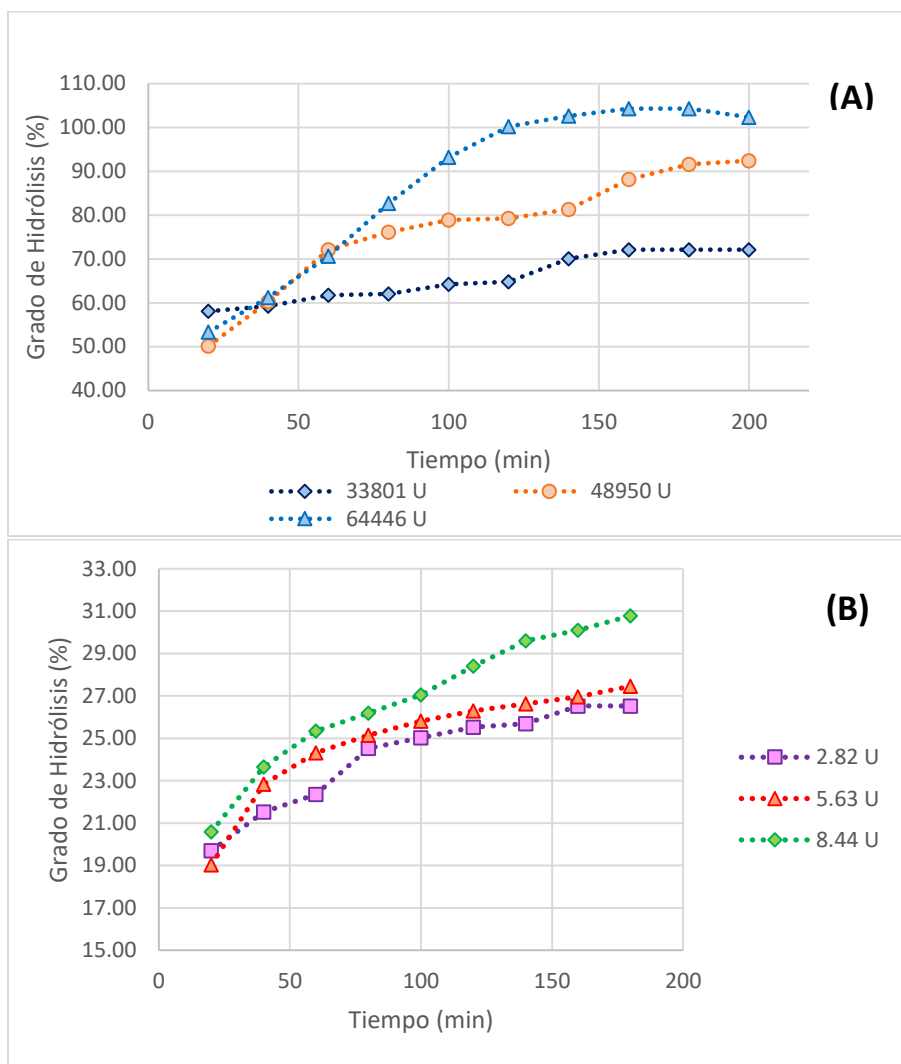


Figura 5.2. Evaluación de la actividad enzimática de (A) pepsina y (B) papaína sobre colágeno a diferentes concentraciones con respecto al tiempo. La concentración está expresada como actividad total.

La cinética de hidrólisis enzimática de las proteínas de pesquerías se caracteriza por tener una rápida velocidad inicial que disminuye gradualmente siguiendo una cinética de tipo Michaelis-Menten de primer orden. La Figura 5.2 muestra que durante los primeros 60 min existe un rápido incremento en el grado de hidrólisis y, después, la velocidad de reacción disminuye hasta alcanzar un estado estacionario, donde aparentemente se detiene la reacción de hidrólisis. El estado estacionario se asocia con una posible inhibición por productos. Se observa una disminución en la velocidad de hidrólisis como posible consecuencia en la disminución del valor de la K_m (constante de Michaelis, que es equivalente a la concentración de sustrato a la cual se alcanza la mitad de la velocidad máxima) debido a la competencia entre los péptidos producidos, que actúan como sustratos efectivos, y la proteína sin hidrolizar. También por una posible autodigestión de la enzima (Kristinsson & Rasco, 2000). La mayoría de los enlaces peptídicos se hidrolizan durante los primeros 60 min; sin embargo, se observan diferencias entre el grado de hidrólisis obtenido con cada enzima.

El grado de hidrólisis (GH) es un factor importante que afecta la bioactividad de los hidrolizados de proteína, ya que tiene una influencia directa en el tamaño de los péptidos y en la liberación de ciertos aminoácidos o grupos funcionales en las cadenas terminales (Alemán *et al.*, 2011).

El GH obtenido a los 30 min, 60 min, 120 min y 180 min, con un nivel de significancia $\alpha=0.05$ se resume en la Tabla 5.3. Los resultados indican que el GH usando papaína depende de la concentración de enzima, así como del tiempo de hidrólisis; para el caso de la pepsina no se encontró diferencia significativa en el grado de hidrólisis al variar la concentración de enzima, es decir, las tres concentraciones experimentales de enzima empleadas en la presente investigación producen estadísticamente el mismo grado de hidrólisis, mientras que el tiempo de reacción sí tiene un efecto significativo en el GH. En general, se observa que al incrementar la concentración de proteasas aumenta el grado de hidrólisis. La actividad enzimática de 8.44 U usando papaína produce el mayor GH a los 180 min, que corresponde un 30.79%, mientras que los hidrolizados obtenidos con pepsina a ese mismo tiempo tienen un

GH mayor al 70%, por lo que prácticamente todo el colágeno se ha hidrolizado y se encuentra como aminoácidos libres, dipéptidos, tripéptidos y en general como péptidos de bajo peso molecular.

Tabla 5.3. Grado de hidrólisis (%) obtenido con papaína y pepsina a distintos tiempos.

Tiempo		30 min	60 min	120 min	180 min
Pepsina	33801 U	58.06±0.2 ^{A,γ}	61.72±0.9 ^{A,γ}	64.79±0.65 ^{B,γ}	72.12±0.80 ^{C,γ}
	48950 U	50.14±1.3 ^{A,γ}	72.12±0.5 ^{A,γ}	79.24±1.20 ^{B,γ}	91.62±0.88 ^{C,γ}
	64446 U	53.31±0.7 ^{A,γ}	70.63±1.5 ^{A,γ}	100.23±0.8 ^{B,γ}	104.29±1.2 ^{C,γ}
Papaína	2.82 U	19.69±1.2 ^{a,α}	22.36±0.65 ^{b,α}	25.43±0.35 ^{c,α}	26.53±0.24 ^{d,α}
	5.63 U	19.03±0.5 ^{a,α}	24.32±0.98 ^{b,α}	25.8±0.25 ^{c,α}	27.46±1.23 ^{d,α}
	8.44 U	20.58±0.8 ^{a,β}	25.34±0.48 ^{b,β}	27.04±0.79 ^{c,β}	30.79±1.03 ^{d,β}

Las letras diferentes indican que existe una diferencia significativa entre tratamientos a un $\alpha=0.05$.

Pepsina el factor tiempo $C>B>A$.

Papaína el factor tiempo $d>c>b>a$ y el factor concentración de enzima $\beta>\alpha$

5.2.1. Efecto de la concentración de enzima en la velocidad inicial

El análisis estadístico indica que la concentración de papaína tiene un efecto significativo, con un nivel de significancia $\alpha=0.05$, en el grado de hidrólisis del extracto de colágeno, la actividad total de 8.44 U produce el mayor grado de hidrólisis, cercano al 31%, a las 180 min. En la Figura 5.3 se pueden observar dos zonas en la cinética de hidrólisis; la primera zona corresponde a la velocidad inicial, en la que la hidrólisis aumenta rápidamente hasta llegar a un máximo donde hay un punto de inflexión, mientras que la pendiente disminuye como consecuencia de una disminución en la velocidad de reacción. En esta zona se alcanza el estado estacionario.

Kristinsson & Rasco^b (2000) determinaron que la cinética de cinco enzimas proteolíticas diferentes en la hidrólisis de proteínas del músculo de pescado siguen una relación lineal con cinética de primer orden en la parte inicial de la hidrólisis, antes de llegar al estado estacionario. Esta misma relación se encontró en la hidrólisis de colágeno usando papaína y pepsina en la presente investigación.

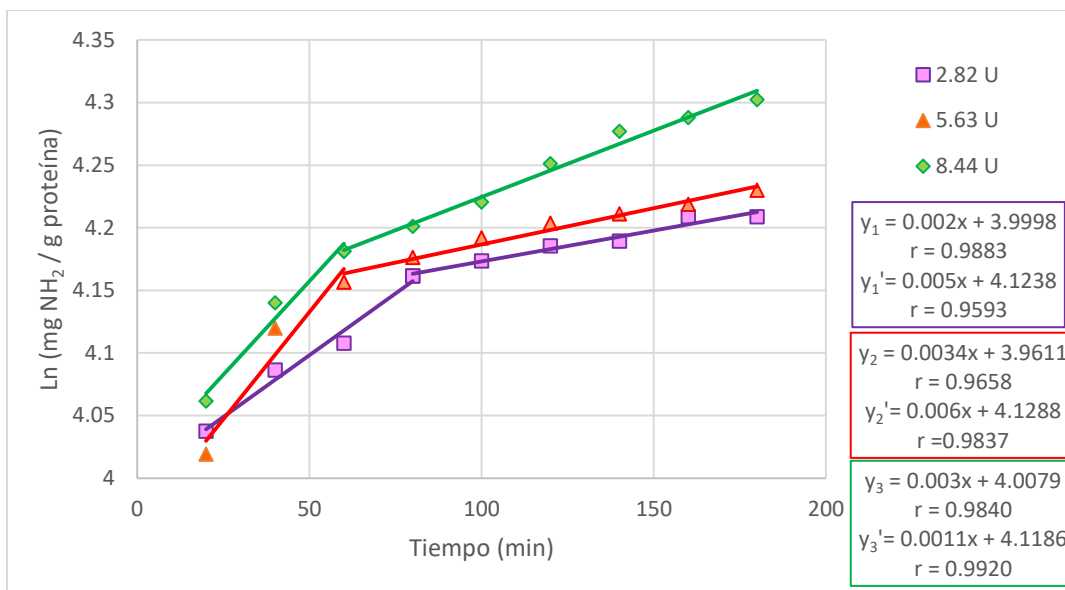


Figura 5.3. Cinética de hidrólisis de orden uno de dos periodos en la liberación de los grupos amino libres usando papaína para tres actividades totales (U) diferentes.

Para evaluar el efecto que tiene la concentración de enzima utilizada en el aumento de los grupos amino libres, se eliminó el tiempo como variable estadística, comparándose las constantes de rapidez iniciales y del estado estacionario tanto de la hidrólisis como de la producción de grupos amino libres en un tiempo de 180 min. En la Tabla 5.4 se puede observar que las actividades de 5.63 U y 8.44 U usando papaína tienen un efecto similar en la constante de velocidad inicial, esto es, que la rapidez de la reacción es igual en ambos casos, mientras que la actividad de 2.82 U corresponde a una constante de rapidez menor ($0.002 \pm 0.0016 \text{ min}^{-1}$), por lo que la rapidez de hidrólisis es mucho menor y, por lo tanto, se obtiene un grado de hidrólisis menor. Sin embargo, la constante de rapidez (K_2) en el estado estacionario es mayor para la actividad mayor, 8.44. Por otro lado, el grupo amino libre producido en el $t = 180 \text{ min}$ es significativamente diferente, $\alpha = 0.05$, en los tres casos, y la actividad de 8.44 U produce la mayor hidrólisis de enlaces peptídicos con un valor de $73.88 \text{ mg NH}_2/\text{g}$ de proteína.

Tabla 5.4. Comparación entre las constantes de rapidez de la reacción de hidrólisis y el grupo amino libre al t=180 min usando papaína.

Actividad Total	Orden 1 $\ln[P] = \ln[P]_0 + kt$		Gpo. amino (t=180 min)
	K_1 (min ⁻¹)	K_2 (min ⁻¹)	mg NH ₂ /g de Proteína
2.82 U	0.002 ± 0.0016 ^a	0.005 ± 0.0010 ^c	67.61 ± 0.52 ^α
5.63 U	0.0034 ± 0.0014 ^b	0.006 ± 0.0012 ^c	68.79 ± 0.2 ^β
8.44 U	0.003 ± 0.0002 ^b	0.0011 ± 0.0001 ^d	73.88 ± 0.24 ^γ

Las letras diferentes entre columnas indican que existe una diferencia significativa a un nivel de significancia, $\alpha=0.05$, $b>a$, $d>c$ y $\gamma>\beta>\alpha$.

K_1 =constante de rapidez de hidrólisis en la primera etapa (Velocidad inicial), y K_2 =constante de rapidez de hidrólisis en el estado estacionario.

Para el caso de la pepsina, en la cinética de hidrólisis mostrada en la Figura 5.4 se aprecian tres zonas: una primera zona que corresponde a la velocidad inicial donde se lleva a cabo la mayor ruptura de enlaces peptídicos, una zona intermedia donde la velocidad de la reacción disminuye y, después, da un salto brusco para una segunda velocidad de hidrólisis rápida, y una tercer zona donde, finalmente, se alcanza el estado estacionario. El comportamiento de la zona intermedia se explica porque durante la hidrólisis de las proteínas se exponen residuos hidrofóbicos que en condiciones normales en solución acuosa se orientan hacia el interior de la proteína por fuerzas hidrofóbicas; sin embargo, conforme avanza la hidrólisis y la desnaturalización del colágeno los residuos hidrofóbicos son susceptibles de ser atacados por la enzima. Este tipo de comportamiento se ha observado con la alcalasa y con pepsina y quimotripsina (Gbogouri, Linder, Fanni & Parmentier, 2004; Nilsang, Lertsiri, Suphantharika & Assavanig, 2005).

La Tabla 5.5 muestra que la constante de rapidez para la actividad más baja de pepsina, 33801 U, es menor en comparación con las otras dos actividades, 48950 y 64446 U, por lo que la hidrólisis con esta actividad es más lenta, mientras que las dos actividades restantes presentan la misma velocidad de hidrólisis en la primera parte de la reacción. El grupo amino cuantificado a los 180 min de reacción indica que existe una diferencia significativa, $\alpha=0.05$, entre las distintas concentraciones de enzima utilizada, siendo la actividad total de 64446 U la que produce la mayor cantidad de grupo amino libre y el mayor grado de hidrólisis.

Al tomar como fuentes de variación el tiempo de hidrólisis y la cantidad de enzima, el efecto del tiempo en el grado de hidrólisis resultó mayor en comparación con la cantidad de enzima, para el caso de la pepsina. Esto se puede apreciar en los valores de las constantes de rapidez para las dos actividades más altas, que no muestran una diferencia significativa entre ellas, $\alpha=0.05$, por lo que, aparentemente, la cantidad de enzima en concentraciones muy elevadas genera el mismo grado de hidrólisis. También se relaciona con la K_m y la cantidad de sustrato; sin embargo, en concentraciones bajas de enzima, el grado de hidrólisis se ve afectado por la cantidad de enzima añadida, como lo indican los resultados usando papaína.

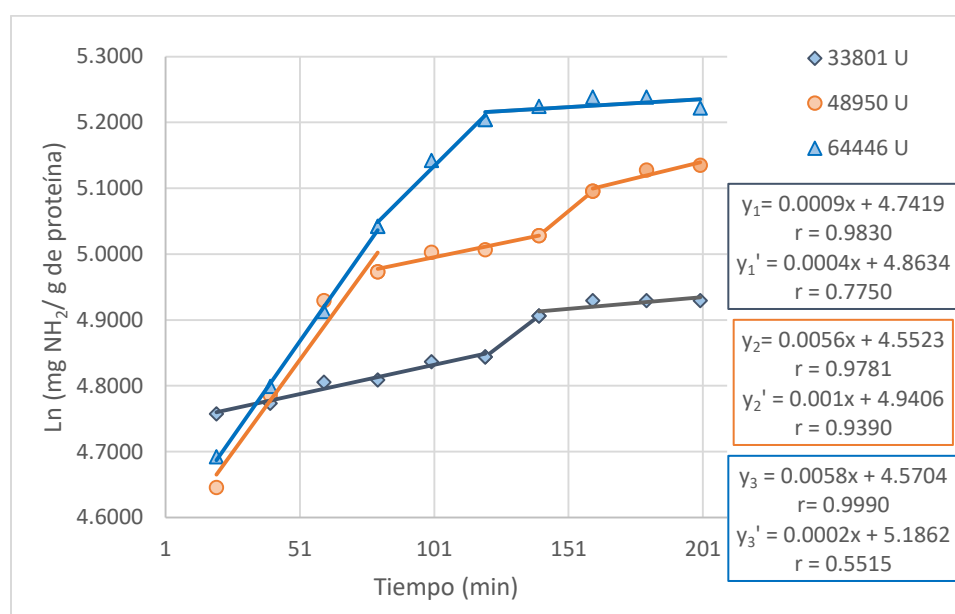


Figura 5.4. Cinética de hidrólisis de orden 1 para la velocidad inicial usando pepsina.

Tabla 5.5. Constante de rapidez de la velocidad inicial y el grupo amino libre al $t=180$ min usando pepsina a tres actividades distintas.

Actividad Total	Orden 1 $\ln[P] = \ln[P]_0 + kt$ K_1 (min^{-1})	Gpo. amino ($t=180$ min) mg NH_2/g de proteína
33801 U	0.0009 ± 0.00030^c	140.59 ± 2.26^a
48950 U	0.0056 ± 0.00020^d	168.45 ± 2.31^b
64446 U	0.0058 ± 0.00040^d	187.18 ± 2.69^y

Letras diferentes entre columnas indican que existe diferencia significativa, $\alpha=0.05$: $d>c$ y $y>\beta>a$.

5.3. Caracterización de los hidrolizados de colágeno

Después de los procesos enzimáticos, los hidrolizados de colágeno se recuperaron mediante secado por liofilización y se caracterizaron para determinar el contenido de proteína total, proteína soluble y grupo amino libre.

Tabla 5.6. Proteína Total, proteína soluble y grupo amino de los hidrolizados.

Grado de Hidrólisis (%)		Proteína Total (%) ¹	Proteína Soluble (%)	Grupo amino (mg NH ₂ /g de hidrolizado)
Pepsina	72.12	79.63 ± 1.5	76.89 ± 0.32	280.23 ± 2.34
	91.62	82.46 ± 2.4	79.32 ± 1.32	336.90 ± 1.32
	104.29	86.56 ± 3.1	73.63 ± 2.45	374.36 ± 0.56
Papaína	26.53	84.01 ± 1.32	74.89 ± 1.05	135.22 ± 1.75
	27.46	81.32 ± 2.65	73.23 ± 0.98	137.58 ± 1.05
	30.79	83.65 ± 1.43	80.83 ± 2.48	147.76 ± 2.19

¹ No se encontró diferencia significativa entre las muestras ($\alpha=0.05$).

De acuerdo con la Tabla 5.6, el contenido de nitrógeno total para los hidrolizados de colágeno obtenidos con ambas enzimas es similar, y el grado de hidrólisis no tiene un efecto en el contenido de nitrógeno proteico. La proteína soluble es una medida indirecta de la presencia de enlaces peptídicos, ya que el método de Biuret se basa en la formación de un complejo colorido violeta entre el Cu²⁺ y dos enlaces peptídicos. Y, en este caso, el resultado de una alta concentración de proteína soluble por este método indica que hay, mayormente, péptidos que aminoácidos libres en los hidrolizados.

5.3.1. Efecto del grado de hidrólisis en el peso molecular de los hidrolizados de colágeno

La hidrólisis de colágeno reduce el tamaño y el peso de la proteína y, a su vez, se liberan residuos de aminoácidos que pueden expresar actividad antioxidante, un GH extenso puede resultar contraproducente, ya que los péptidos pierden su actividad antioxidante al hidrolizarse demasiado o por completo, llegando a aminoácidos libres, por esta razón, el GH y el tamaño de los péptidos son variables que se deben

conocer, controlar y estandarizar, lo que permitirá contar con hidrolizados potencialmente funcionales.

Para conocer el tamaño de los productos de hidrólisis, se realizó una electroforesis de bajo peso molecular (Tricine-SDS-PAGE).

El marcador de peso molecular que se utilizó posee un intervalo de 10,000-100,000 Da, mediante esta técnica no es posible identificar los péptidos de menor tamaño que se encuentran por debajo de 10,000 Da.

En el gel de electroforesis (el cual no se muestra), se observó que los hidrolizados obtenidos con papaína, con un GH de 27.46%, poseen un perfil de pesos moleculares entre 65,000 y 75,000 Da, mientras que los hidrolizados obtenidos con la misma enzima con un GH de 30.79% poseen mayormente péptidos con un peso molecular entre 20,000 y 50,000 Da, aunque también se observaron bandas correspondientes a péptidos con un peso molecular entre 14,000 y 90,000 Da, pero en menor proporción.

Los hidrolizados de colágeno obtenidos con pepsina con GH 72.12% mostraron bandas con posibles péptidos con peso molecular de 40,000 Da, los hidrolizados con un mayor GH obtenidos empleando pepsina no mostraron señales en la electroforesis, debido a que, posiblemente, son péptidos muy pequeños, o incluso aminoácidos libres.

En el gel de electroforesis se observan bandas por arriba de 100,000 Da, pero no es posible identificar su peso molecular debido a que una extrapolación empleando la curva generada por el estándar implica la pérdida de linealidad, y el resultado no es confiable, también se observó un ensanchamiento de las bandas debido, posiblemente, a un alto contenido de sales en las muestras o a errores sistemáticos.

5.4. Formación de aductos entre ácido cafeico e hidrolizados de colágeno

La interacción polifenol-proteína se puede dar por enlaces covalentes y no covalentes (Tugba, Esra & Filiz, 2013). Estas interacciones modifican las propiedades físicas de las proteínas que se pueden aprovechar para potenciar las propiedades funcionales de las macromoléculas. De esta manera, se pueden

elaborar empaques funcionales a base de películas de proteína que ayudan a la conservación de alimentos o formando geles con una mayor resistencia mecánica.

En el caso de los hidrolizados de colágeno, se puede aumentar su capacidad antioxidante al unir, mediante un enlace covalente, un polifenol a los grupos amino libres de los péptidos resultantes. Para ese fin, se llevó a cabo la oxidación del grupo fenólico del ácido cafeico mediante una reacción química y otra enzimática, a fin de producir una *o*-quinona reactiva que pudiese formar un enlace covalente con los grupos amino de los hidrolizados.

Para la formación del aducto por síntesis química y síntesis enzimática, se escogió el hidrolizado obtenido con papaína con GH de 30.79%. El propósito fue contar con un hidrolizado con actividad antioxidante intermedia en forma de péptidos.

5.4.1. Disminución del grupo amino

Con la intención de corroborar que la molécula oxidada del ácido cafeico reacciona con los grupos amino libres de los hidrolizados, se cuantificó el grupo amino libre antes y después de la reacción de acoplamiento con la premisa de que al formarse el enlace covalente entre el polifenol y el hidrolizado, disminuiría la cantidad de los grupos $-NH_2$. En este sentido, la Tabla 5.7 muestra que la síntesis química (SQ) produce una disminución del grupo amino menor en comparación con la síntesis enzimática (SE). Por lo tanto, se asume que la vía enzimática produce una mayor cantidad de enlaces covalentes. A ese respecto, se tiene como antecedente que una disminución en los grupos amino libres junto con un aumento en la rigidez de los geles en el caso de las soluciones con proteínas, así como una alta estabilidad térmica resistente a la sinéresis, son efectos de la formación de enlaces covalentes entre polifenoles y proteínas (Strauss & Gibson, 2004).

Tabla 5.7. Disminución en la concentración del grupo amino por posible formación de enlaces covalentes.

Grupo amino Inicial (mg NH ₂ /g de hidrolizado)	SQ ¹ Grupo amino residual (mg NH ₂ /g de hidrolizado)	SE ² Grupo amino residual (mg NH ₂ /g de hidrolizado)	SQ Disminución en el grupo amino (%)	SE Disminución en el grupo amino (%)
147.54	76.51	67.07	48.14	54.54
145.21	74.32	66.97	48.82	53.88
148.45	76.96	68.14	48.37	54.09
147.07 ± 1.67	75.93 ± 1.41 ^a	67.39 ± 0.65 ^b	48.44 ± 0.35	54.17 ± 0.34

Letras diferentes indican que existe una diferencia significativa entre tratamientos, con una confianza del 95%; a>b.

1. Aducto formado por síntesis química (SQ).
2. Aducto formado por síntesis enzimática (SE).

5.4.2. Cuantificación de ácido cafeico acoplado y rendimiento de reacción

Tanto el ácido cafeico como los hidrolizados acoplados son solubles en agua. Al preparar una solución acuosa de los hidrolizados funcionalizados y medir los polifenoles totales mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu se cuantifica el ácido cafeico total; es decir, el que se encuentra unido a los hidrolizados más la fracción de cafeico que permanece libre. Al ser insolubles en soluciones alcohólicas, los aductos precipitan; por ello, al sobrenadante metanólico, se le determinaron los polifenoles remanentes, que corresponden a la fracción de ácido cafeico que no se unió a los hidrolizados y, por diferencia, se puede conocer el rendimiento de la reacción de acoplamiento. La Tabla 5.8 muestra que la vía enzimática tiene un porcentaje de acoplamiento mayor en comparación con la vía química, debido a que la enzima oxida con mayor facilidad al ácido cafeico, según lo observado en la presente investigación. En contraste, la oxidación por la vía química es menor, ya que la oxidación del grupo fenólico se limita por parámetros como la presión parcial de oxígeno, la difusión del gas en la disolución o tiempo agitación.

Tabla 5.8. Ácido cafeico unido a los hidrolizados y rendimiento de acoplamiento.

SQ Ácido cafeico acoplado (ppm)	SE Ácido cafeico acoplado (ppm)	SQ Rendimiento (% de acoplamiento)	SE Rendimiento (% de acoplamiento)
109.42 ± 0.68	183.12 ± 0.75	54.71	91.56

5.4.3. RMN¹H de los hidrolizados acoplados con ácido cafeico

En adición a las pruebas realizadas para comprobar la unión química del antioxidante a los hidrolizados, se obtuvieron espectros de RMN¹H del hidrolizado blanco y de los hidrolizados funcionalizados con ácido cafeico mediante la ruta química y la ruta enzimática. Desafortunadamente, las muestras fueron insolubles en los disolventes deuterados comúnmente empleados en RMN, incluyendo D₂O. Por tal motivo, se empleó ácido trifluoroacético (TFA) para disolver parcialmente las muestras y analizarlas. De acuerdo con los resultados esperados, deberían aparecer señales correspondientes a los hidrógenos aromáticos del antioxidante en la región comprendida entre 6.0 y 7.5 ppm. Sin embargo, las señales de los hidrógenos que corresponden a la muestra disuelta en TFA se traslapan con las señales esperadas, por lo que no se puede obtener información que corrobore el acoplamiento de los espectros, los cuales se muestran a continuación, en las figuras 5.5-5.7.

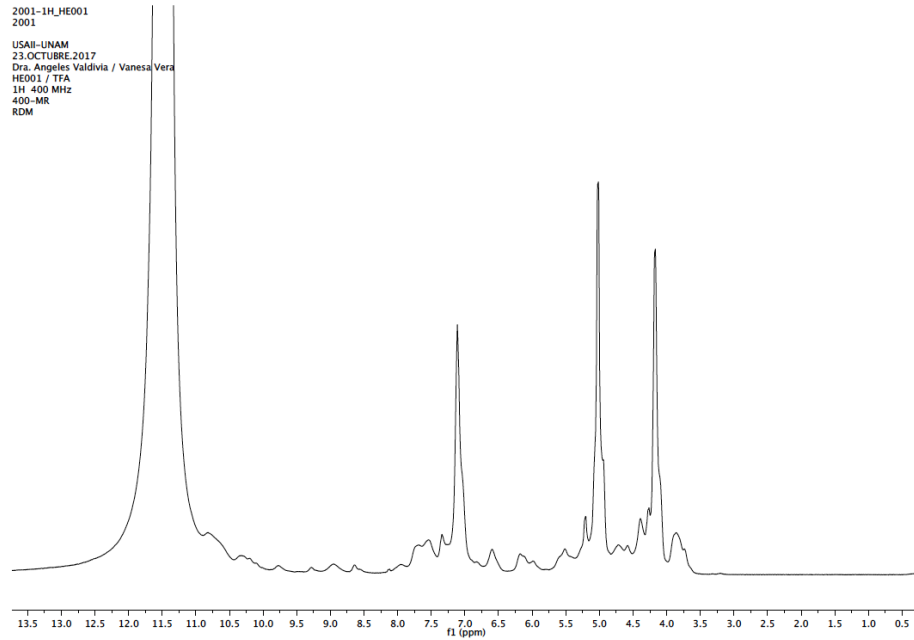


Figura 5.5. Espectro de RMN¹H de hidrolizado blanco de colágeno.

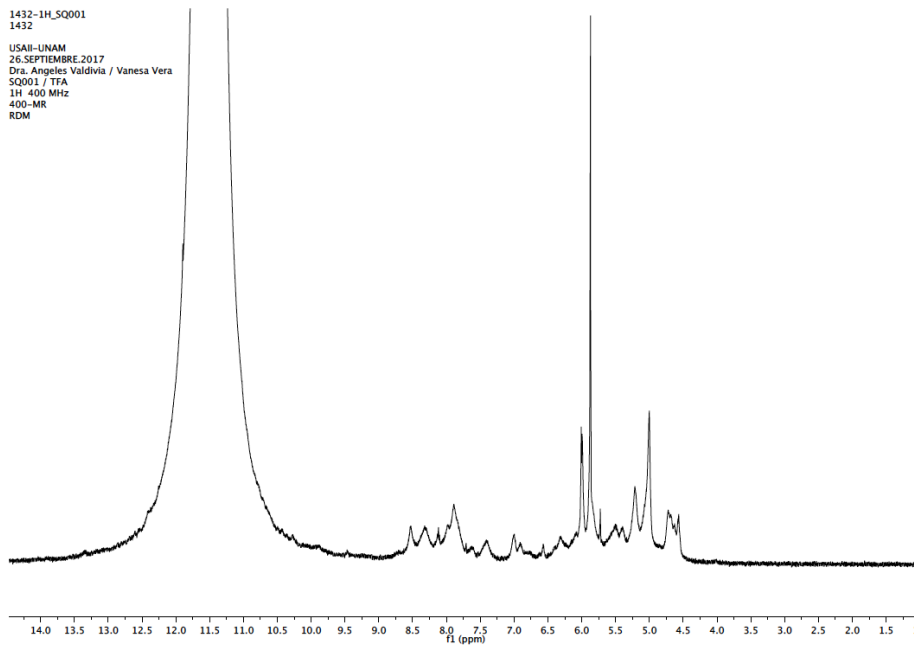


Figura 5.6. Espectro de RMN¹H de hidrolizado acoplado con ácido cafeico mediante síntesis química.

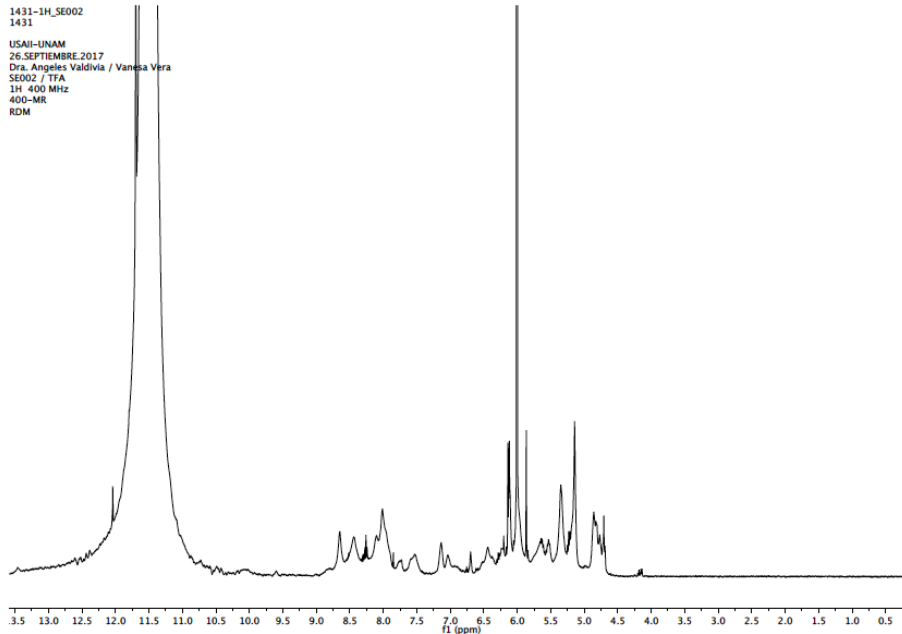


Figura 5.7. Espectro de RMN¹H de hidrolizado acoplado con ácido cafeico a través de síntesis enzimática.

5.4.4. Evidencia de la formación del enlace covalente entre los hidrolizados de colágeno y ácido cafeico mediante cromatografía en capa fina

Otra manera de corroborar la formación del enlace covalente entre el ácido cafeico y los hidrolizados de colágeno, es la comparación de la diferencia en polaridad de las especies involucradas, ya que las interacciones covalentes entre proteínas y antioxidantes dan como resultado una disminución de los grupos ionizables de los péptidos provocando que sean moléculas menos polares (McEvoy, Ross & Higgins, 1989). En este sentido, la cromatografía en capa fina es una técnica de separación útil que se basa en las interacciones de los analitos con la fase móvil y la fase estacionaria, para separar mezclas complejas debido a las interacciones intermoleculares y, también, por diferencias entre los pesos moleculares de los analitos; considerando los argumentos anteriores, se esperó que los aductos formados entre el antioxidante y los hidrolizados en la presente investigación, tuvieran una polaridad menor que el ácido cafeico y que los hidrolizados de colágeno sin acoplar.

Para atender la problemática de contar con un blanco de acoplamiento polifenol-péptido, se diseñó una síntesis química para formar un enlace covalente haciendo reaccionar un cloruro de ácido proveniente del ácido cafeico y el éster metílico de glicina. Después de dicha síntesis, la cromatografía en capa fina reveló que se obtiene un producto con una polaridad menor al ácido cafeico, como resultado de la posible formación de un enlace peptídico entre el grupo carbonilo y el grupo amino del éster metílico, reacción que genera un compuesto altamente apolar. La Figura 5.8 muestra la cromatoplaca revelada con ácido fosfomolibdico; en ella se puede observar que el ácido cafeico es retenido por más tiempo por la fase estacionaria debido a que es un compuesto polar, y la fase móvil que es diclorometano/metano (70:30) que es moderadamente polar lo eluye con menor eficacia; mientras que el compuesto sintetizado es retenido con menor fuerza por la fase estacionaria debido a que es menos polar. El R_f (relación existente entre las distancias recorridas por el soluto y por el eluyente desde el origen de la placa) obtenido para el ácido cafeico es de 0.37, y el del producto sintetizado es de 0.65.

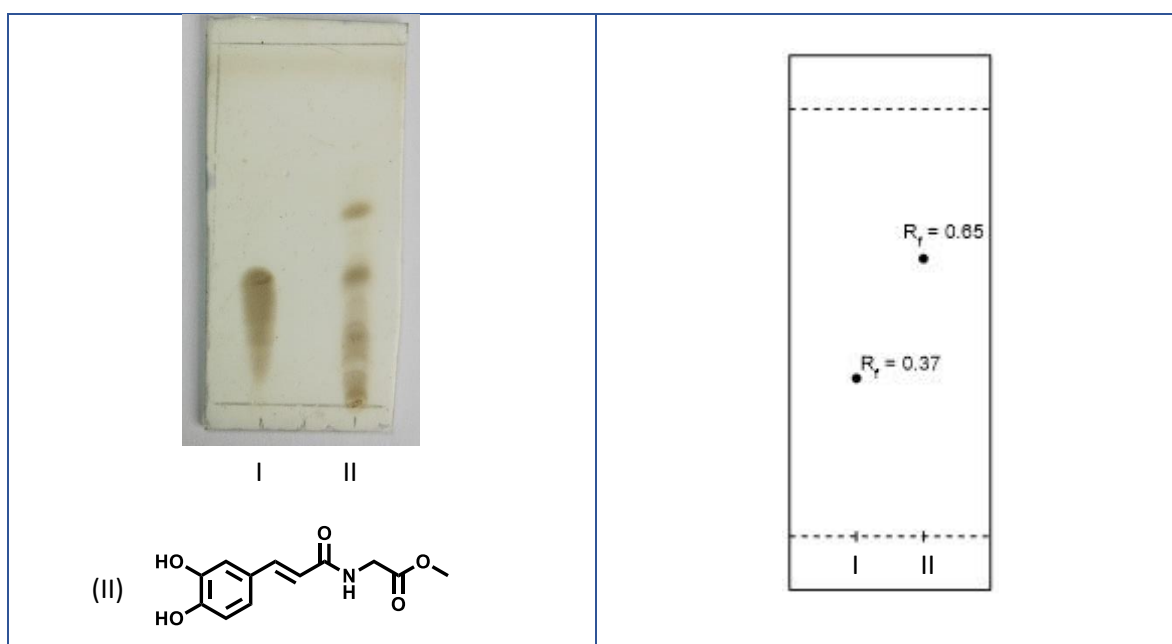


Figura 5.8. Cromatoplaca obtenida para el (I) ácido cafeico y (II) el producto de síntesis con sus correspondientes valores de R_f .

Adicionalmente, se analizó por cromatografía en capa fina uno de los aductos obtenidos de la síntesis química, SQ, productos obtenidos al hacer reaccionar al ácido cafeico con los hidrolizados de colágeno mediante la oxidación del grupo fenólico del antioxidante usando oxígeno. La Figura 5.9 muestra la cromatoplaca obtenida y los valores de R_f para el ácido cafeico, los hidrolizados de colágeno y el aducto formado; se observa un comportamiento similar al descrito anteriormente, ya que el ácido cafeico y los hidrolizados de colágeno son moléculas polares que son retenidos por más tiempo por la fase estacionaria mientras, que el aducto obtenido, que es menos polar debido a la formación enlaces covalentes, se retiene con menos fuerza y eluye con mayor facilidad. La cromatografía en capa fina permite también conocer, de manera indirecta, la existencia del enlace covalente, ya que los valores de R_f indican que se trata de nuevos compuestos.

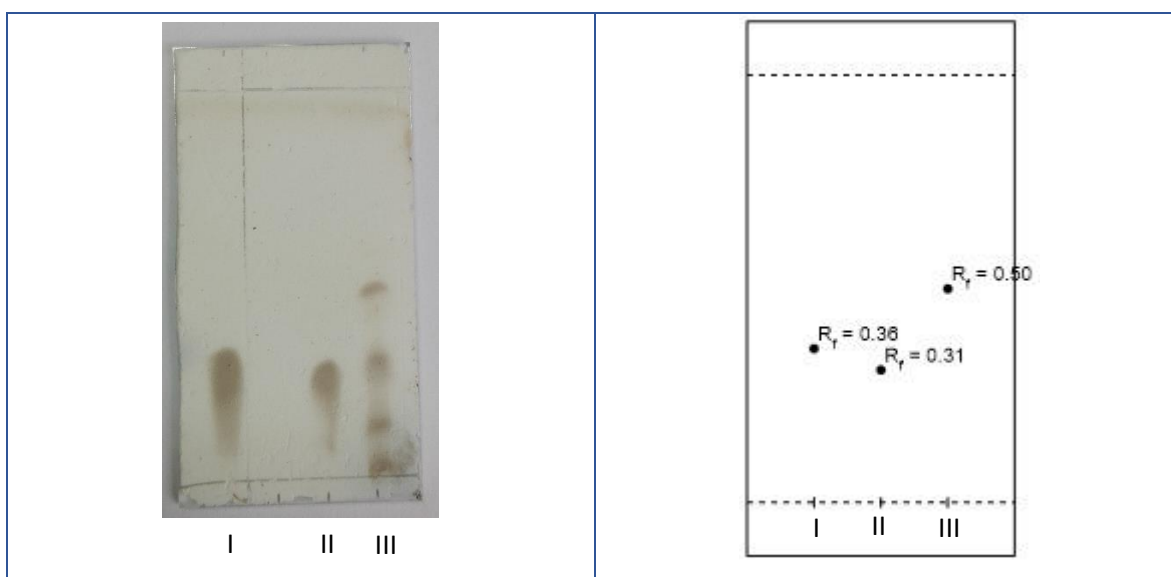


Figura 5.9. Cromatoplaca y valores de R_f para el (I) hidrolizado de colágeno, (II) ácido cafeico y (III) aducto formado.

5.5. Capacidad antioxidante

Con la finalidad de determinar si los hidrolizados de colágeno expresan actividad antioxidante, se midió y comparó la capacidad de inhibir los radicales coloridos ABTS y DPPH. De esta forma, se puede conocer si los hidrolizados reaccionan directamente con radicales, debido a la presencia de aminoácidos aromáticos, mediante un mecanismo que implica la donación de un radical hidrógeno y la estabilización del nuevo radical formado por resonancia. Sin embargo, los hidrolizados también pueden tener una capacidad inhibidora mediante otros mecanismos que no involucran radicales. Las pruebas complementarias de inhibición de los productos de oxidación lipídica ayudan a tener un panorama más extenso de las propiedades antioxidantes de los hidrolizados de colágeno.

Las Figuras 5.10 y 5.11 muestran la cinética de inhibición de los radicales ABTS^{•+} y DPPH respectivamente, donde se comparó la actividad de los hidrolizados de colágeno acoplados con ácido cafeico y sin acoplar. La Tabla 5.9 resume el porcentaje de Capacidad Antioxidante (%CAO) y la capacidad antioxidante equivalente a Trolox[®] (TEAC).

Los hidrolizados de colágeno obtenidos con pepsina (H.Ps.1) y (H.Ps.2) tienen un porcentaje de inhibición de los radicales menor al 10%, por lo que no expresan actividad antioxidante en las condiciones experimentales de la presente investigación. El grado de hidrólisis obtenido con pepsina es mayor al 72% y, por lo tanto, se asume que estos hidrolizados se encuentran principalmente como aminoácidos libres. Para que un hidrolizado de proteína exprese actividad antioxidante, los aminoácidos no deben de estar libres, sino como péptidos (Chalamaiah *et al.*, 2012); sin embargo, algunos péptidos pueden ser incapaces tanto de donar radicales hidrógeno como de estabilizar nuevos radicales por resonancia.

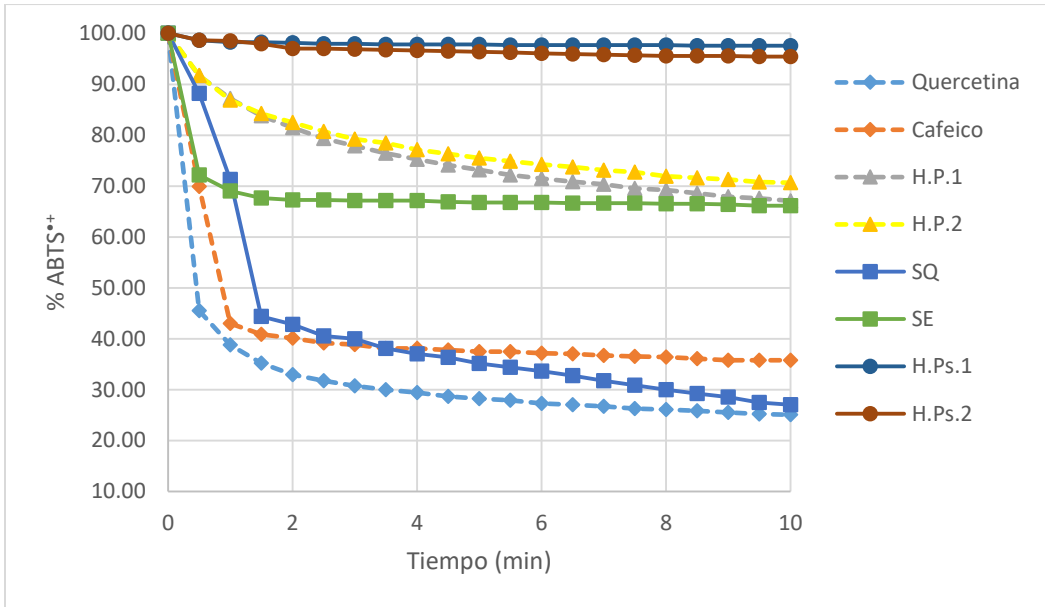


Figura 5.10. Cinética de inhibición del radical ABTS^{•+} para los hidrolizados de colágeno acoplados con ácido cafeico y sin funcionalizar.

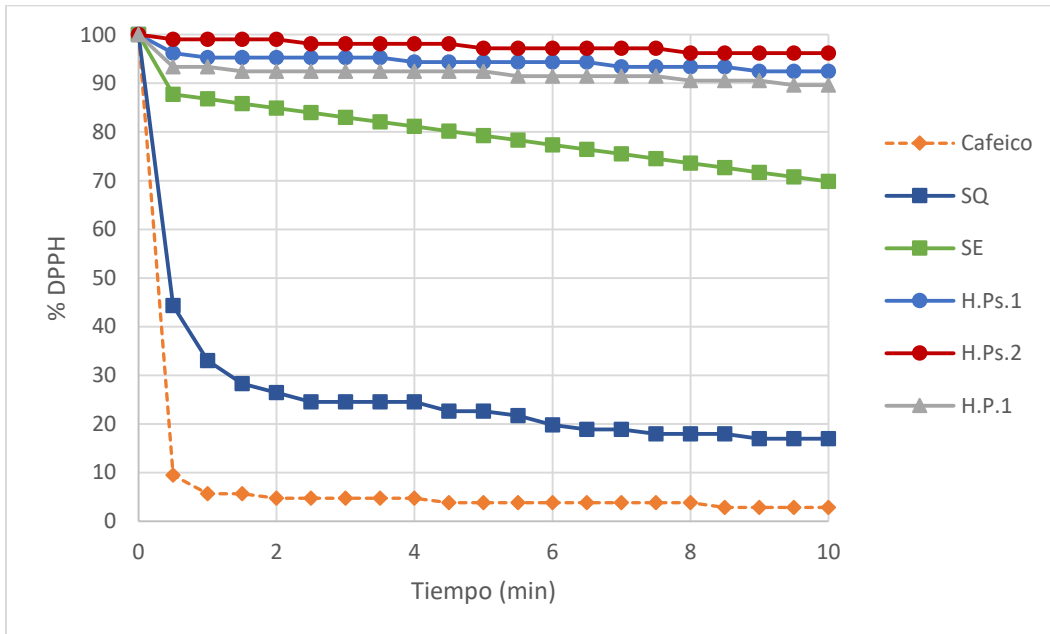


Figura 5.11. Cinética de inhibición del radical DPPH para los hidrolizados de colágeno antes y después de acoplarse con ácido cafeico.

Tabla 5.9. Capacidad antioxidante de hidrolizados de colágeno acoplados y sin acoplar al capturar el radical ABTS y DPPH.

	ABTS		DPPH	
	%(CAO)	TEAC ($\mu\text{mol ET/g}$ de hidrolizado) ⁽¹⁾	%(CAO)	TEAC ($\mu\text{mol ET/g}$ de hidrolizado) ⁽¹⁾
Cafeico	64.07 \pm 0.66	-*	97.06 \pm 0.14	-*
H.P.1	32.44 \pm 1.25	535.14 \pm 25.20 ^a	11.40 \pm 2.60	-**
H.P.2	28.72 \pm 0.72	455.34 \pm 16.71 ^b	19.12 \pm 1.06	46.46 \pm 4.84 ^{α}
H.Ps.1	2.85 \pm 1.71	-**	6.95 \pm 0.79	-
H.Ps.2	5.15 \pm 0.57	-	4.0 \pm 1.03	-
SQ	73.02 \pm 0.91	1295.81 \pm 17.3 ^c	83.57 \pm 0.57	1563.6 \pm 13.53 ^{β}
SE	34.55 \pm 0.23	565.96 \pm 11.23 ^a	30.40 \pm 1.22	312.01 \pm 28.78 ^{γ}

TEAC= Capacidad antioxidante equivalente a Trolox. ET= Equivalentes de Trolox
⁽¹⁾ Letras diferentes indican que existe una diferencia significativa ($\alpha=0.05$): $c>a>b$; $\beta>\gamma>\alpha$.

* El ácido cafeico se usó como control positivo. ** El porcentaje de inhibición de los radicales con estos hidrolizados es menor al 10%, y no se considera que exprese actividad antioxidante.

Los hidrolizados de colágeno con un GH de 27.46% (H.P.1) y 30.79% (H.P.2) obtenidos con papaína exhiben una capacidad antioxidante al capturar el radical ABTS⁺, de manera respectiva de 32.44 y 28.72 %, mientras que, con el radical DPPH, sólo el hidrolizado con GH 30.79% expresa una capacidad antioxidante de 19.12%. Estos resultados indican que los hidrolizados obtenidos con papaína tienen la capacidad de reaccionar directamente con los radicales libres, y que el %CAO con el radical DPPH es menor en comparación con el radical ABTS. Esta diferencia se debe a que el radical ABTS es más reactivo que el DPPH (H. Gordon, 2001).

El ácido cafeico en concentración de 200 ppm posee un respectivo %CAO de 64.07 y 97.06 con ABTS y DPPH. La capacidad antioxidante del ácido cafeico disminuye después de formar aductos con los hidrolizados de colágeno, mientras que la funcionalización de los hidrolizados por la vía enzimática (SE) presenta una disminución de actividad antioxidante mayor en comparación con la vía química (SQ), que presenta una actividad antioxidante similar al ácido cafeico libre. Aunque la formación del enlace covalente entre el antioxidante y el hidrolizado disminuye la

capacidad antioxidante del ácido cafeico, los aductos poseen una mayor capacidad de inhibir los radicales que los hidrolizados sin funcionalizar.

Tabla 5.10. Actividad antioxidante de los hidrolizados de colágeno al inhibir productos de oxidación lipídica.

	β -CLAMS	Inhibición de peroxidación de liposomas (TBARS)
Trolox®	96.93 \pm 1.36 ^a	73.38 \pm 2.35 ^A
H.P.1	93.84 \pm 1.28 ^b	27.55 \pm 1.68 ^B
H.P.2	92.55 \pm 1.20 ^b	34.06 \pm 1.29 ^C
H.Ps.1	80.36 \pm 1.10 ^d	66.97 \pm 0.25 ^D
H.Ps.2	84.92 \pm 0.67 ^b	71.53 \pm 3.45 ^A
SQ	96.47 \pm 0.51 ^a	65.66 \pm 0.39 ^D
SE	86.64 \pm 0.77 ^c	62.61 \pm 1.27 ^D

Letras diferentes en las columnas indican que existe diferencia significativa ($\alpha=0.05$): $a>b>c>d$; $A>D>C>B$.

Otra forma de evaluar la actividad antioxidante es midiendo la capacidad que tienen los hidrolizados de inhibir directamente los productos de oxidación lipídica mediante reacciones colorimétricas; la capacidad de inhibir dichos productos se da por mecanismos que involucran radicales o por reacciones redox; Yanishlieva (2001) propone mecanismos de reacción alternativos que no involucran radicales, y que explican la actividad antioxidante para tioles, sulfuros y aminas.

La Tabla 5.10 resume la capacidad antioxidante de los hidrolizados de colágeno, el ensayo de decoloración de β -caroteno muestra que los aductos acoplados con ácido cafeico y los hidrolizados de colágeno sin funcionalizar tienen una capacidad antioxidante superior al 80%, por lo que se consideran buenos antioxidantes, equiparables a la actividad del Trolox®. El aducto formado por vía química presenta una actividad antioxidante mayor en comparación con el aducto formado por vía enzimática y los hidrolizados sin modificación.

Para el ensayo de inhibición de las sustancias reactivas del ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS), el hidrolizado con un GH de 104.29% obtenido con pepsina muestra la

mayor capacidad antioxidante, mientras que los hidrolizados obtenidos con papaína tienen una capacidad antioxidante menor al 30%.

La efectividad de los antioxidantes se debe estudiar mediante varios métodos complementarios entre sí, ya que su actividad en los alimentos y en los sistemas biológicos varía en función de factores como la polaridad, la solubilidad y la capacidad de quelar metales.

5.6. Pruebas Aceleradas: Evaluación de la capacidad protectora de los hidrolizados de colágeno frente al deterioro oxidativo en una emulsión agua en aceite

Para determinar la capacidad de los hidrolizados de colágeno de inhibir los productos de oxidación en un alimento, se hicieron determinaciones periódicas del índice de peróxidos e índice de Kreis durante 60 días a una emulsión agua en aceite envasada en recipientes de vidrio de 250 mL, los cuales se almacenaron en una cámara climática a 40°C para favorecer la oxidación. Con fines comparativos, se utilizó ácido cafeico en concentración de 200 ppm y Trolox® como controles.

5.6.1. Índice de Peróxidos

Las figuras 5.12 y 5.13 muestran el seguimiento de formación de los hidroperóxidos en aceite de cártamo en las emulsiones. La Figura 5.12 compara todos los tratamientos, la emulsión blanco, las emulsiones con hidrolizados y las emulsiones control con ácido cafeico 200 ppm y Trolox®. Todas las curvas muestran tres zonas características de la cinética de formación de los primeros productos de oxidación lipídica, es decir, la zona de inducción, propagación y de terminación. Estas zonas se aprecian más claramente en la emulsión blanco que no contiene hidrolizados ni antioxidantes, misma que presenta un periodo de inducción menor en comparación con los otros tratamientos y una zona de propagación más pronunciada porque no existe una inhibición de los productos de oxidación.

La etapa de inducción de las emulsiones que contienen Trolox® y ácido cafeico se extiende, de manera respectiva, hasta los 60 y 52 días, lo que confirma que los antioxidantes actúan inhibiendo los radicales que generan hidroperóxidos,

protegiendo al alimento del deterioro oxidativo al prolongar el periodo de inducción de la oxidación.

Para observar con mayor claridad el comportamiento de los hidrolizados, la Figura 5.13 muestra sólo las cinéticas de formación de los hidroperóxidos de las emulsiones que contienen hidrolizados de colágeno obtenidos con papaína y pepsina y de los hidrolizados acoplados con ácido cafeico por vía química y enzimática, y se hace una comparación con la cinética de la emulsión que contiene ácido cafeico. La Figura 5.14 muestra la cinética experimental, misma que se calculó mediante la regresión lineal de los datos de las emulsiones problema. Se determinó que la cinética del periodo de inducción que mejor se ajusta a los datos experimentales es de orden 0; este orden de reacción está asociado con una baja concentración de los productos de oxidación con respecto a la concentración de los reactantes, por lo que, aparentemente, la rapidez de la reacción es independiente de la concentración en el periodo de inducción (Boekel, 2008).

El final del periodo de inducción se calculó en el punto en el que se intersectan las líneas de regresión lineal entre el periodo de inducción y el periodo de propagación. No se cuenta con datos suficientes para calcular el orden de reacción ni la constante de velocidad para el periodo de propagación, por lo que no se informa; sin embargo, es posible observar el cambio de pendiente en el inicio de la etapa de propagación para determinar el tiempo de inducción que producen los hidrolizados en las emulsiones.

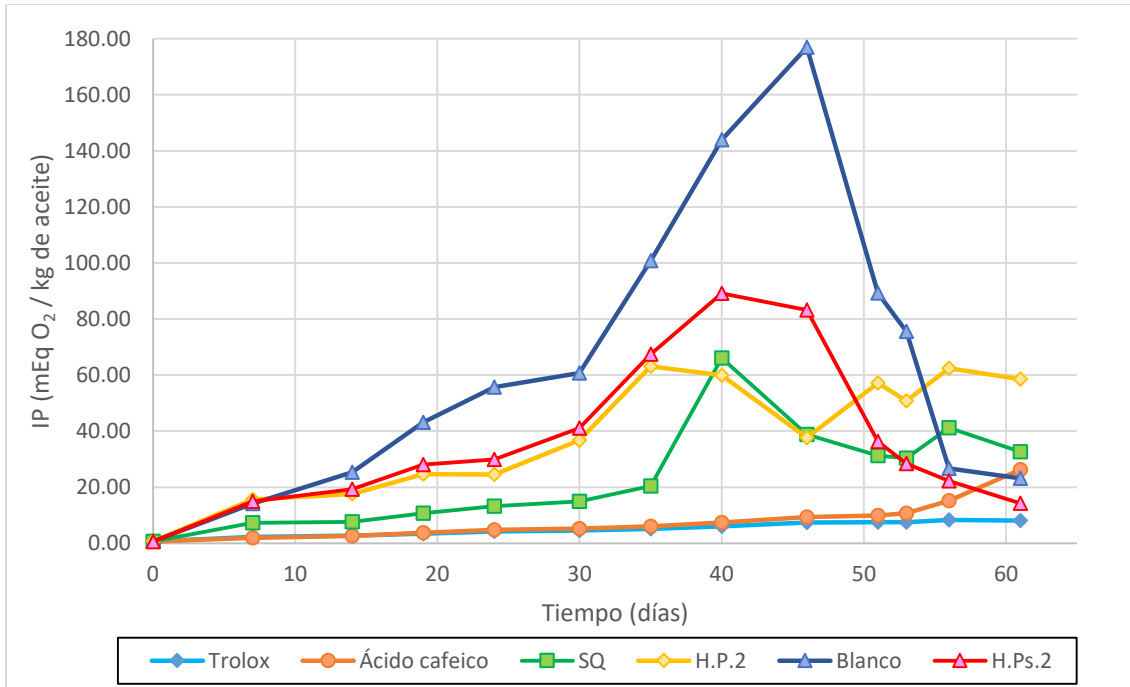


Figura 5.12. Seguimiento de formación de hidropéroxidos de las emulsiones a 40°C.

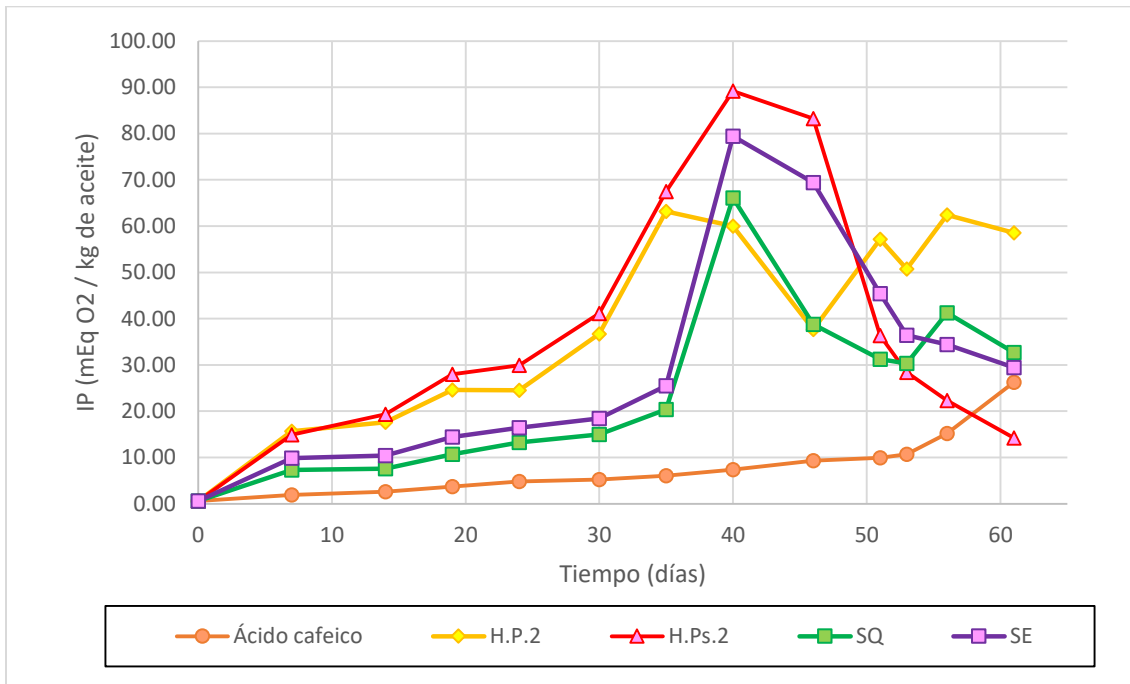


Figura 5.13. Cinética de formación de hidropéroxidos de las emulsiones que contienen a los hidrolizados de colágeno a 40°C.

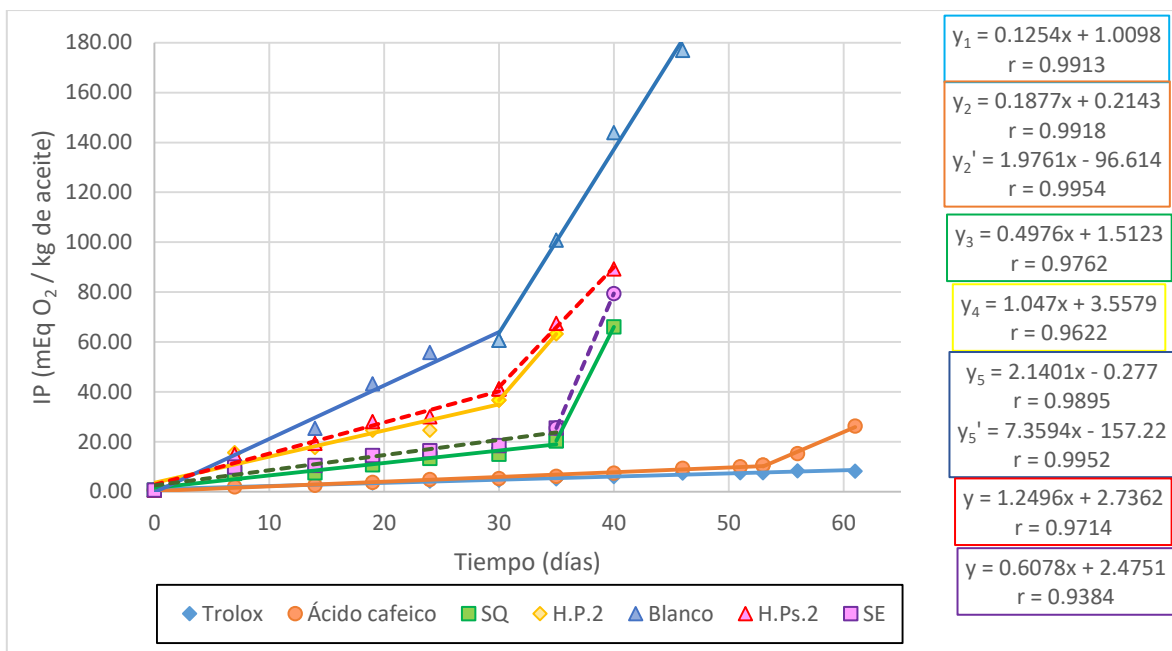


Figura 5.14. Cinética de orden 0 del periodo de inducción e inicio de la etapa de propagación.

Tabla 5.11. Factor Protector de los hidrolizados y actividad antioxidante en las emulsiones.

	PI (días) ¹	Orden 0 [P]=[P] ₀ + kt	Factor de protección (FP)	Actividad Antioxidante (AA)
Trolox®	0-61	0.1254 ± 0.0016 ^a	2.033	-
Blanco	0-30	2.1401 ± 0.0018 ^b	1	-
H.P.2	0-31	1.0470 ± 0.0019 ^c	1.033	0.033
H.Ps.2	0-31	1.2496 ± 0.0021 ^d	1.033	0.033
SQ	0-35	0.4976 ± 0.0013 ^e	1.17	0.17
SE	0-35	0.6078 ± 0.0024 ^f	1.17	0.17

*[P]= mEq O₂ / kg de aceite; K= mEq O₂/ kg*día constante de rapidez del periodo de inducción, orden 0.

¹ Periodo de inducción determinado a partir del punto de intersección de las líneas de regresión en la figura 5.9.

Letras diferentes entre columnas indican que existe diferencia significativa ($\alpha=0.05$): b>d>c>f>e>a

El periodo de inducción obtenido para las emulsiones con hidrolizados de colágeno producidos por ambas enzimas proteolíticas presenta el mismo valor. Como consecuencia, el factor protector es igual en ambos casos; lo mismo sucede con los hidrolizados acoplados con ácido cafeico obtenidos por las dos síntesis. El factor protector, FP, es la relación que existe entre el periodo de inducción mostrado por los hidrolizados con actividad antioxidante y el periodo de inducción sin la presencia de antioxidante. Un valor mayor a 1 indica que los hidrolizados tienen la capacidad de prolongar el periodo de inducción al inhibir a los radicales producidos en esta primera etapa: mientras más grande sea el cociente, mayor será la actividad antioxidante y, por lo tanto, los hidrolizados serán capaces de prolongar por más tiempo el inicio de la etapa de propagación, protegiendo al alimento del deterioro oxidativo.

A pesar de que los hidrolizados de colágeno presentan el mismo periodo de inducción, las constantes de rapidez de la cinética de orden 0 son diferentes para cada emulsión, siendo la emulsión blanco la más rápida en cuanto a la formación de hidroperóxidos en comparación con las demás, y la reacción más lenta corresponde a la emulsión control, que contiene Trolox®.

Si bien los hidrolizados no tienen un efecto significativo al prologar el periodo de inducción a un nivel comparable como el Trolox o el ácido cafeico, sí tienen una acción protectora al detener la etapa de propagación. Este comportamiento es consistente con la actividad antioxidante: los hidrolizados sin acoplar presentan una baja actividad antioxidante al inhibir radicales, conforme a lo observado con el ensayo decoloración del radical ABTS y DPPH. La mayoría de los antioxidantes que pueden donar un radical hidrógeno actúan en el periodo de inducción; sin embargo, los hidrolizados son capaces de inhibir los productos de oxidación lipídica, lo que se ve reflejado con el ensayo β -CLAMS y TBARS. Los hidrolizados descomponen los hidroperóxidos que se forman en la etapa de propagación formando alcoholes y sustancias menos reactivas, como se observa en la Figura 5.12 y en la Tabla 5.12.

En el t= 40 días, se observa el punto máximo de formación de hidroperóxidos y el inicio de la etapa de terminación que resulta de la descomposición de los primeros productos de oxidación de todas las emulsiones problema; en dicho punto, la emulsión blanco presenta el mayor grado de oxidación con un valor de 143.9 mEq O₂/ kg de aceite, mientras que la emulsión control que contiene Trolox[®] presenta un valor de 6.04 mEq O₂/kg de aceite. El hidrolizado con GH 30.37% obtenido con papaína presenta el menor valor de índice de peróxidos y, en consecuencia, es el que inhibe mayormente los productos de oxidación en la etapa de propagación en comparación con el resto de los hidrolizados. El hidrolizado que inhibe con menos eficiencia los hidroperóxidos en esta misma etapa es el que presenta GH 100%, obtenido con pepsina. Los hidrolizados acoplados con ácido cafeico también presentan una inhibición de los productos de oxidación en la etapa de propagación pero en menor intensidad. El hidrolizado obtenido por la vía química es el que tiene un mayor efecto de inhibición de la etapa de propagación de los dos hidrolizados funcionalizados.

Tabla 5.12. Índice de Peróxidos t = 40 días.

	IP (mEq O ₂ / kg de aceite)
Trolox [®]	6.04 ± 0.113 ^a
Blanco	143.92 ± 0.482 ^b
H.P.2	59.97 ± 1.125 ^c
H.Ps.2	89.20 ± 1.251 ^d
SQ	66.05 ± 0.410 ^e
SE	79.43 ± 0.970 ^f

Existe diferencia significativa ($\alpha=0.05$): b>d>f>e>c>a

5.6.2. Índice de Kreis

El índice de peróxidos es una medida útil de conocer el estado de deterioro de un alimento siempre y cuando se conozca la historia del mismo. Es decir, si se hace una cinética para determinar la etapa en la que se cuantifican los peróxidos, un valor bajo de éstos no necesariamente implica que el estado oxidativo del alimento es

bajo; por esta razón, se hacen otras determinaciones para conocer avance de la rancidez oxidativa, como es el índice de Kreis.

La Figura 5.15 muestra el seguimiento del índice de Kreis durante un periodo de 35 días. La emulsión blanco es la que presenta una mayor cantidad de productos de oxidación de segunda generación; aunque no se registraron los días posteriores, se esperaría que la aparición de estos compuestos en las emulsiones con hidrolizados se diera a partir del día 40, que es cuando inicia el periodo de terminación y disminuye la cantidad de hidroperóxidos a causa de su descomposición.



Figura 5.15. Seguimiento del índice de Kreis a 40°C.

5.7. Aplicaciones de los hidrolizados de colágeno con actividad antioxidante en sistemas alimentarios

Los hidrolizados de proteína colágena exhiben una buena actividad antioxidante. Las pruebas aceleradas demostraron que estos compuestos son capaces de prolongar el periodo de inducción y de inhibir los peróxidos en la etapa de propagación. Los resultados indican que al aplicarlos a la formulación de una

emulsión lipídica tienen potencial para ser usados como conservadores y proteger los alimentos del deterioro oxidativo.

Un comportamiento similar al de los hidrolizados de colágeno obtenidos en la presente investigación se informó en la literatura con hidrolizados de proteína del pez gobio (*Zosterisessor ophiocephalus*) que inhibieron la oxidación lipídica de una salchicha de carne de pavo, (Rim, *et al.*, 2013), demostrando que los hidrolizados con la mayor actividad antioxidante pueden inhibir la oxidación lipídica de manera efectiva durante el almacenamiento. Los hidrolizados de pez gobio inhibieron en un 50% las TBARS durante la etapa de propagación con respecto al blanco, prolongando así la vida de anaquel de la salchicha. Los resultados proporcionan evidencia suficiente que indica que los hidrolizados de proteína de pesquerías con actividad antioxidante tienen potencial como conservadores.

Se requieren estudios más extensos para determinar los cambios y las reacciones que los hidrolizados pueden experimentar a consecuencia de los tratamientos térmicos a los que se someten los alimentos, ya que pueden perder su actividad antioxidante debido a reacciones colaterales con otros macrocomponentes presentes en los alimentos mediante reacciones de Maillard, degradación de Strecker o la posible formación de polímeros durante el freído de las grasas.

Como cualquier conservador, se debe determinar el límite máximo al cual la sustancia expresa funcionalidad sin comprometer la salud de los consumidores o afectar las propiedades sensoriales del alimento. En caso de ser usados como nutracéuticos, se deben realizar estudios toxicológicos para determinar los niveles de ingesta diaria admisible o sus posibles efectos adversos.

6. Conclusiones

- Se logró la hidrólisis enzimática de colágeno usando enzimas proteolíticas, siendo la papaína la enzima que produce mejores resultados.
- La pepsina presenta una alta actividad enzimática, las concentraciones de la misma empleadas en la presente investigación producen hidrolizados con un grado de hidrólisis cercano al 100%, lo que implica que no se obtengan péptidos activos.
- La concentración de papaína de 1.69 U/g de proteína produce hidrolizados con un grado de hidrólisis de 30.37%.
- La evaluación del peso molecular de los hidrolizados se puede realizar con electroforesis de bajo peso molecular, Tricine-SDS-PAGE, con la condición de que el grado de hidrólisis no sea mayor al 70%.
- El acoplamiento de ácido cafeico con los hidrolizados por medio de enlaces covalentes se puede lograr con buena eficiencia mediante una oxidación enzimática empleando peroxidasa de rábano picante (HRP).
- La RMN¹H no es una técnica adecuada de análisis para corroborar la formación del enlace covalente de los aductos formados, ya que existe un traslape de señales entre el disolvente y los hidrolizados.
- Los hidrolizados de colágeno de residuos de pesquerías presentan actividad antioxidante; los obtenidos con papaína mostraron mayor actividad antioxidante en comparación con aquellos obtenidos con pepsina al inhibir los radicales coloridos DPPH y ABTS; mientras que la inhibición de los productos de oxidación mediante el ensayo de TBARS y β -CLAMS se obtienen resultados similares.
- El acoplamiento de ácido cafeico con los hidrolizados disminuye la actividad antioxidante del polifenol; sin embargo, ésta es mayor que la actividad de los hidrolizados sin acoplar.
- La actividad antioxidante de los hidrolizados inhibe los productos de oxidación lipídica preferentemente por reacciones que no involucran radicales.

- Los hidrolizados de colágeno son capaces de prolongar el periodo de inducción de la oxidación lipídica, pero su mayor actividad se observa en la propagación al inhibir más del 50% de los peróxidos formados en esta etapa.
- Los resultados de este estudio permiten visualizar que los hidrolizados de colágeno con actividad antioxidante tienen potencial como aditivos antioxidantes de alimentos ricos en lípidos insaturados.

7. Referencias

1. Adler, Nissen, Jens. (1979). Determination of the Degree of Hydrolysis of food protein hydrolysates by Trinitrobenzenesulfonic Acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27:6, 1256-1262.
2. Adler, Nissen, J. (1986). *Enzymic hydrolysis of food proteins*. New York:Elsevier Applied Science Publishers.
3. Adler, Nissen, J., Eriksen, S., Sejr, Olsen, H. (1983) Improvement of the functionality of vegetable proteins by controlled enzymatic hydrolysis. *Plant foods for Human Nutrition*, 32, 411-423.
4. Alasalvar, C., Shahidi, F., & Quantick, P. (2002). Food and health applications of marine neutraceuticals. **En:** Alasalvar, C. & T. Taylor. *Seafoods – quality technology and nutraceutical applications*. Berlin, Germany: Springer-Verlag, 175-204.
5. Alemán, A., Giménez, B., Montero, P., Gómez, M.C. (2011). Antioxidant activity of several marine skin gelatins. *LWT-Food Science and Technology*, 44, 407-413.
6. AOAC. 1984. *Official Methods for Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 14th Edition. Arlington, VA, 1141.
7. AOAC Official Method 938.08 (1995) Ash of seafood. AOAC International.
8. AOAC Official Method 950.46 (1995) Moisture in meat. Drying in vacuo at 95-100°C AOAC International.
9. Badui-Dergal, Salvador. *Lípidos* (2006) **En:** Badui-Dergal, Salvador, *Química de los alimentos*. 4^{ta} Ed., Pearson Addison Wesley, 245-300.
10. Bailey, A.J., Gordon, R. & Knott, L. (1998). Mechanisms of maturation and ageing of collagen. *Mechanisms of Ageing and Development*, 106, 1-56.
11. Barzideh, Z., Abd, A., Chee, G., Zainul, A. & Abd, K. (2014). ACE Inhibitory and Antioxidant Activities of Collagen Hydrolysates from the Ribbon Jellyfish (*Chrysaora* sp.) *Food Technology and Biotechnology*, 52, 495-504.
12. Benjakul, S., Nalinanon, S., & Shahidi F. *Fish Collagen* (2012) **En:** Simpson, K., Nollet, L., Toldrá, F., Benjakul, S., Paliyath, G., Hui, Y., *Food biochemistry and Food Processing*. 2nd Edition. Wiley-Blackwell, 365-387.

13. Bhaskar, N., Benila, T., Radha, C., & Lalitha, R. G. (2008). Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of catla (*Catla catla*) for preparing protein hydrolysates using a commercial protease. *Bioresource Technology*, 99, 335–343.
14. Boekel, Martinus, A.J.S. (2008) Kinetic Modeling of Food Quality: A Critical Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 7, 144-158.
15. Bougatef, A., Nedjar-Arroume, N., Manni, L., Ravallec, R., Barkia, A., Guillochon, D., & Nasri, M. (2010). Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of sardinelle (*Sardinella aurita*) by products proteins. *Food Chemistry*, 118, 559–565.
16. BRENDA. 2018. Information on EC 3.4.22.2- papain. [En línea] Disponible en: <https://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=3.4.22.2> (último acceso el 3 de Marzo 2018).
17. BRENDA. 2018. Information on EC 3.4.23.1- pepsin A. [En línea] Disponible en: <https://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=3.4.23.1> (último acceso el 3 de Marzo 2018).
18. Chalamaiah, M., Dinesh Kumar, B., Hemalatha, R., Jyothirmayi T. (2012). Fish protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: A review. *Food Chemistry*, 135, 3020-3038.
19. Chen, Z.Y, Nawar, W., (1991). The role of amino acids in the autoxidation of milk fat. *Journal of the American of Oil Chemists' Society*, 68, 47-50
20. Clemente, A. (2000). Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. *Trends in Food Science and Technology*, 11, 254–262.
21. CONAPESCA. 2017. El comportamiento económico y desempeño dinámico del sector pesquero propició un crecimiento de su PIB de un 19%. [En línea] Disponible en: <https://www.gob.mx/conapesca/prensa/el-comportamiento-economico-y-desempeno-dinamico-del-sector-pesquero-propicio-un-crecimiento-de-su-pib-de-un-19> (último acceso el 2 de Febrero 2018).

22. Dekkers, E., Raghavan, S., Kristinsson, H. G., & Marshall, M. R. (2011). Oxidative stability of mahi mahi red muscle dipped in tilapia protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 124, 640–645
23. Duartea, J., Vinderola, G., Ritzc, B., Perdigon, G., & Matara, C. (2006). Immunomodulating capacity of commercial fish protein hydrolysate for diet supplementation. *Immunobiology*, 211, 341–350.
24. F. O’Keefe, S. & A. Pike, O. *Fat Characterization* (2014) **En:** S. Suzanne Nielsen. *Food Analysis*. 4th. Ed. Springer. 239-260.
25. Figueroa-Espinosa, M.C., & Rouau, X. (1998). Oxidative cross-linking of pentosans by a fungal laccase and horseradish peroxidase: Mechanism of linkage between feruloyated arabinoxylans. *Cereal Chemistry*, 75(2), 259-266.
26. Fox, J. (1981) Fatty acids’ spontaneous oxidation clarified. *Chemical and Engineering News Archive*, 59(43), 18-20.
27. García, J. (1990) *Técnicas analíticas para vinos*. Barcelona: Romanyá Valls S.A.
28. Gbogouri, G. A., Linder, M., Fanni, J., & Parmentier, M. (2004). Influence of hydrolysis degree on the functional properties of salmon by product hydrolysates. *Journal of Food Science*, 69, 615–622.
29. Giménez, B., Alemán, A., Montero, P., & Gómez-Guillen, M. C. (2009). Antioxidant and functional properties of gelatin hydrolysates obtained from skin of sole and squid. *Food Chemistry*, 114, 976–983.
30. Haimming, S., Dongsheng, X., Rouling, Y. & Yaqian, C. (2014). Synthesis of caffeic acid phenethyl ester derivatives, and their cytoprotective and neuritogenic activities in PC12 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 5046-5053.
31. Haminiuk, C.W.I., Maciel, G.M., Plata, Oviedo, M.S.V. & Peralta, R.M. (2012). Phenolic compounds in fruits- an overview. *International Journal of Food Science and Technology*, 47(10), 2023-2044.

32. H. Gordon, Michael. Measuring antioxidant activity (2001) **En:** Jan Pokorny, Nedyalka Yanishlieva & Michael Gordon. Antioxidants in Food. Practical Applications. 1st. Ed. CRC Press. 72-84
33. Hordur G. Kristinsson & Barbara A. Rasco (2000). Fish Protein Hydrolysates: Production, Biochemical, and Functional Properties, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 40:1, 43-81,
34. Hsu, K., Lu, G., & Jao, C. (2009). Antioxidative properties of peptides prepared from tuna cooking juice hydrolysates with Orientase (*Bacillus subtilis*). Food Research International, 42, 647–652
35. INEGI. 2015. Indicadores macroeconómicos de coyuntura. Producto Interno Bruto a precios constantes según actividad. [En línea] Disponible en: <http://www.inegi.org.mx/sistemas/bie/cuadrosestadisticos/GeneraCuadro.aspx?s=est&nc=492&c=23904> (último acceso 12 de febrero de 2018).
36. Je, J. Y., Park, P. J., Kwon, J. Y., & Kim, S. K. (2004). A novel angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) frame protein hydrolysate. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52, 7842–7845.
37. Je, J. Y., Qian, Z., Byun, H., & Kim, S. (2007). Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis. Process Biochemistry, 42, 840–846.
38. Kamal-Eldin, A. (2003). Lipid Oxidation Pathways. Washington, D.C: AOCS Press, Champaign, IL.
39. Khantaphant, S., & Benjakul, S. (2008). Comparative study on the proteases from fish pyloric caeca and the use for production of gelatin hydrolysate with antioxidative activity. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B, 151, 410–419.
40. Kirk, R., Sawyer, R. & Egan, H. (2002). Composición y Análisis de Alimentos de Pearson. Segunda Edición. Mexico D.F.: Compañía Editorial Continental S.A. de C.V.
41. Kittiphattanabawon, P., Soottawat, B., Wonnop, V., & Fereidoon, S. (2012). Gelatin hydrolysate from black tip shark skin prepared using papaya latex

- enzyme, antioxidant activity and its potential in model systems. *Food Chemistry*, 135, 1118-1126.
42. Klompong, Vilailak, Benjakul, Soottawat, Kantachote, Duangporn & Shahidi, Fereidoon (2007). Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. *Food Chemistry*, 102, 1317-1327.
 43. Kristinsson, H. G. & Rasco, B. A. (2000). Fish protein Hydrolysates: Production, Biochemical, and Functional Properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40:1, 43-81.
 44. Kristinsson, H. G. and Rasco, B. A.^b (2000) Kinetics of enzymatic hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins by alkaline proteases and a visceral serine protease mixture. *Process Biochemistry*, 36, 131-139.
 45. Leopoldini, M., Marino, T., Russo, N. & Toscano, M. (2004). Antioxidant properties of phenolic compounds: H-atom versus electron transfer mechanism. *The Journal of Physical Chemistry A*, 108, 4916-4922.
 46. Liaset, B., Madsen, L., Hao, Q., Criales, G., Mellgren, G., Marschall, H., Hallenborg, P., Espe, M., Froyland, L., & Kristiansen, K. (2009). Fish protein hydrolysate elevates plasma bile acids and reduces visceral adipose tissue mass in rats. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1791, 254–262.
 47. Lidong, Guo, Pádraigín, A. Harnedy, Li, Zhang, Bafang, Li, Zhaohui, Zhang, Hu, Hou, Xue, Zhao & FitzGerald, Richard J. (2014). In vitro assessment of the multifunctional bioactive potential of Alaska pollock skin collagen following simulated gastrointestinal digestion. *Journal of Science and Food Agriculture*
 48. Limpisophon, K., Tanaka, M., Weng, W., Abe, S., & Osako, K. (2009). Characterization of gelatin films prepared from under utilized blue shark (*Prionace glauca*) skin. *Food Hydrocolloids*, 23, 1993-2000.
 49. Matthäus, B. (2002). Antioxidant Activity of Extracts Obtained from Residues of Different Oilseeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 3444-3452.

50. McEvoy, H., Ross-Murphy, S.B., & Higgins, J.S. (1989). Mechanical properties of chemically and physically crosslinked gelatin gels. *Polymer Communications*, 30(5), 133-135.
51. Najafian, L., Babji, A.S. (2011). A review of fish-derived antioxidant and antimicrobial peptides: Their production, assessment, and applications. *Peptides*, 33, 178-185.
52. Nielsen, S. (1998). *Food Analysis 2nd Ed.*, An Aspen Publication, Gaithersburg, Maryland.
53. Nilsang, S., Lertsiri, S., Suphantharika, M. & Assavanig, A. (2005). Optimization of enzymatic hydrolysis of fish soluble concentrate by commercial proteases. *Journal of food Engineering*. 70, 571-578.
54. Prigent, S., Voragen, A., Van Koningsveld, G., Baron, A., Renard, C., & Gruppen, H. (2009). Interactions between globular proteins and procyanidins of different degrees of polymerization. *Journal of Dairy Science*, 92, 5843-5853.
55. Ramshaw, J., Peng, Y., Glattauer, V. & Werkmeister, J. (2009). Collagens as biomaterials. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 20, 3-8.
56. Reyes Caudillo, E., Tecante, A. & Valdivia López, M.A. (2008). Dietary fibre content and antioxidant activity of phenolic compounds present in Mexican chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. *Food Chemistry*, 107, 656-663.
57. Ren, J., Zhao, M., Shi, J., Wang, J., Jiang, Y., Cui, C., Kakuda, Y., & Xue, S. J. (2008). Purification and identification of antioxidant peptides from grass carp muscle hydrolysates by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. *Food Chemistry*, 108, 727–736.
58. Rim, Nasri, Islem, Younes, Mourad, Jridi, Mariem, Trigui, Ali, Bougatef & Naïma, Nedjar-Arroume. (2013) ACE inhibitory and antioxidative activities of Goby (*Zosterisessor ophiocephalus*) fish protein hydrolysates: Effect on meat lipid oxidation. *Food Research International*, 54, 552-561.
59. Ryan J. Elias, Sarah S. Kellerby & Eric A. Decker (2008) Antioxidant Activity of Proteins and Peptides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48:5, 430-441.

60. Sathivel, S., Smiley, S., Prinyawiwatkul, W., & Bechtel, P. J. (2005). Functional and nutritional properties of red salmon (*Oncorhynchus nerka*) enzymatic hydrolysates. *Journal of Food Science*, 70, 401–406.
61. Schaich, K.M. Lipid oxidation in fats and oils: an integrated view. (2005). **En:** Shahidi, F., *Bailey's Industrial Fats and Oils*, 6th Ed. John Wiley, New York, Vol.1, 269-355.
62. Schaich, K.M., Shahidi, F., Zhong, Y. & Eskin, N.A. Lipid Oxidation. (2013). **En:** Eskin, N.A. & Shahidi, F., *Biochemistry of Foods*, 3rd Ed. Academic Press, 419-478.
63. Shirley, A., Pomponi (1999) The bioprocess–technological potential of the sea. *Journal of Biotechnology*, 70, 5-13.
64. Siddhuraju, 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*, 79, 61–67.
65. Sikorski, Z.E., Kolakowska, A. & Sun Pan, B., The nutritive composition of the major groups of marine food organisms (1990) **En:** Sikorski, Z.E., *Seafood: Resources, Nutritional composition and Preservation*. CRC Press, Boca Raton, FL. 29-54.
66. Sila, Assaad & Bougatef, Ali (2016). Antioxidant peptides from marine by-products: Isolation, identification and application in food systems. A review. *Journal of functional foods*, 21, 10-26.
67. Silva, R., F. Bandeira, S., & Pinto, L. (2014). Characteristics and chemical composition of skins gelatin from cobia (*Rachycentron canadum*). *LWT-Food Science and Technology*, 57, 580-585.
68. Skerget, M., Kotnik, P., Hadolin, M., Hras, A., Simonic, M. & Knez, Z. (2005). Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chemistry*, 89, 191-198.
69. Souissi, N., Bougatef, A., Triki-Ellouz, Y., & Nasri, M. (2007). Biochemical and functional properties of Sardinelle (*Sardinella aurita*) by-product hydrolysates. *Food Technology and Biotechnology*, 45, 187–194.

70. Spellman, D., McEvoy, E., O’Cuinn, G., FitzGerald, R.J. (2003) Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: Comparison of the TNBS, OPA and pH stat methods for quantification of degree of hydrolysis. *International Dairy Journal*, 13, 447-453.
71. Strauss, George, M. Gibson, Suzane (2004). Plant phenolics as cross-linkers of gelatin gels and gelatin-based coacervates for use as food ingredients. *Food Hydrocolloids*, 18, 81-89.
72. Suguna, K., Padlan, E., Smith, C., Carlson, W. & Davies, D. (1987). Binding of a reduced peptide inhibitor to the aspartic proteinase from *Rhizopus chinensis*: implications for a mechanism of action. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 84, 7009-7013.
73. Sumaya Martínez, T., Castillo Morales, A., Favela Torres, E., Huerta Ochoa, S., & Prado Barragan, L. A. (2005). Fish protein hydrolysates from gold carp (*Carassius auratus*): A study of hydrolysis parameters using response Surface methodology. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 98-104.
74. Tang, J., Pepsin A (2013) **En:** Rawlings, N.D. & Salvesen, G., *Handbook of proteolytic enzymes Vol. 1*. 3rd Ed. Academic Press, 27-35.
75. Trombley, J. D., Loegel, T. N., Danielson, N. D., & Hagerman, A. E. (2011). Capillary electrophoresis methods for the determination of covalent polyphenol–protein complexes. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 401, 1523–1529.
76. Tugba, O., Esra, C., & Filiz, A. (2013). A review on protein-phenolic interactions and associated changes. *Food Research International*, 51, 954-970.
77. Valencia, E., Figueroa, I., Sosa, E., Bartolomé, M., Martínez, H. & García, M. (2017). Polifenoles: propiedades antioxidantes y toxicológicas. *Revista de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo*, 16, 15-29.
78. Wasswa, J., Tang, J., Gu, X., & Yuan, X. (2007). Influence of the extent of enzymatic hydrolysis on the functional properties of protein hydrolysate from

- grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin. Food Chemistry, 104, 1698–1704.
79. Whitaker, J., Proteolytic enzymes (2003) **En:** Whitaker, J., Voragen, A. & Wong, D., Handbook of food enzymology. 1st. Ed. Marcel Dekker, Inc. 969-994.
80. Wong, D. Proteolytic Enzymes (1995) **En:** Wong, D., Food Enzymes: Structure and Mechanism. New York: Chapman & Hall. 131-145.
81. Yang, J., Ho, H., Chu, Y., & Chow, C. (2008). Characteristic and antioxidant activity of retorted gelatin hydrolysates from cobia (*Rachycentron canadum*) skin. Food Chemistry, 110, 128–136.
82. Yang, J., Liang, W., Chow, C., & Siebert, K. J. (2009). Process for the production of Tilapia retorted skin gelatin hydrolysates with optimized antioxidative properties. Process Biochemistry, 44, 1152–1157.
83. Yanishlieva-Maslarova, N.V. Inhibiting oxidation (2001) **En:** Jan Pokorny, Nedyalka Yanishlieva & Michael Gordon. Antioxidants in Food. Practical Applications. 1st. Ed. CRC Press. 22-70.
84. Yen, G. C., & Chuang, D. Y. (2000). Antioxidant activity of water extracts of *Cassia tora* L. in relation to the degree of roasting. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 48, 2760–2765.
85. Yin, H., Pu, J., Wan, Y., Xiang, B., Bechtel, P. J., & Sathivel, S. (2010). Rheological and functional properties of Catfish skin protein hydrolysates. Journal of Food Science, 75, E11-E17.
86. You, L., Zhao, M., Cui, C., Zhao, H., & Yang, B. (2009). Effect of degree of hydrolysis on the antioxidant activity of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysates. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 10, 235–240.
87. Zhang, Y., Zou, A., Manchu, R., Zhou, Y. & Wang, S. (2008). Purification and antimicrobial activity of antimicrobial protein from Brown-spotted Grouper, *Epinephelus fario*. Zoological Research, 52, 62-78.