



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**TESIS**

**CARACTERIZACIÓN DE FRACCIONES DE PROTEÍNAS DE LA  
SEMILLA DE CHÍA (*Salvia hispanica*)**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**FANNY LIZBETH LEDESMA RODRÍGUEZ**



**MÉXICO D.F.**

**2008**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## DEDICATORIAS

DEDICO ESTE TRABAJO PRINCIPALMENTE A MIS PADRES (BEATRIZ Y HUMBERTO) QUIENES HAN PARTICIPADO EN TODAS Y CADA UNA DE LAS ETAPAS DE MI VIDA, SIN SU APOYO NO HUBIERA SIDO POSIBLE ESTE LOGRO. SABIENDO QUE NO EXISTIRÁ UNA FORMA DE AGRADECER UNA VIDA DE SACRIFICIO Y ESFUERZO, QUIERO QUE SIENTAN QUE EL OBJETIVO LOGRADO TAMBIÉN ES DE USTEDES Y QUE LA FUERZA QUE ME AYUDO A CONSEGUIRLO FUE SU APOYO.

A MIS HERMANAS CON QUIENES HE APRENDIDO A SER PERSEVERANTE, TOLERANTE Y RESPETUOSA DE LAS DECISIONES DE LOS DEMÁS, SABEN QUE LAS QUIERO Y AGRADEZCO QUE ESTÉN A MI LADO DÍA CON DÍA MANTIENDO UNIDA ESTA FAMILIA.

A LA PERSONA QUE ME HA DADO TODO SU AMOR SIN ESPERAR NADA A CAMBIO, QUIEN A PESAR DE TODAS LAS DIFERENCIAS QUE PUEDA EXISTIR ENTRE NOSOTROS HACE LO POSIBLE POR QUE SIGAMOS UNIDOS Y ESTUVO A MI LADO DURANTE ESTA ETAPA.

A MIS MEJORES AMIGAS, QUE CONOCÍ DURANTE MI ESTANCIA EN LA FACULTAD, GRACIAS POR TODOS LOS MOMENTOS QUE PASAMOS JUNTAS.

A MIS COMPAÑEROS DE LABORATORIO 322-323, CON QUIENES DISFRUTE BUENOS MOMENTOS. EN ESPECIAL A JULY QUE FUE MÁS QUE UNA PROFESORA, UNA AMIGA.

A MIS COMPAÑEROS DE PENTA POR HABER HECHO DE MI PRIMER EXPERIENCIA LABORAL ALGO INOLVIDABLE.

## AGRADECIMIENTOS

AGREDEZCO A DIOS POR DARMER LA OPORTUNIDAD DE CUMPLIR UNA DE MIS GRANDES METAS EN LA VIDA. AGRADEZCO A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO POR HABERME ABIERTO SUS PUERTAS Y DARMER LAS HERRAMIENTAS NECESARIAS PARA LOGRAR MI FORMACIÓN COMO PROFESIONISTA Y DE ESA FORMA PONER EN ALTO SU NOMBRE.

AGRADEZCO A MI FAMILIA, ESPECIALMENTE A MIS PADRES POR TODO EL AMOR Y DEDICACIÓN CON EL QUE ME EDUCARON, Y EL APOYO BRINDADO EN TODAS Y CADA UNA DE MIS DECISIONES.

AGRADEZCO A LA FACULTAD DE QUÍMICA POR HABER SIDO MI SEGUNDA CASA, DONDE CONOCÍ LA AMISTAD INCONDICIONAL.

AGRADEZCO A MIS PROFESORES POR COMPARTIRME SUS CONOCIMIENTOS Y MOTIVARME PARA SER MEJOR PERSONA Y PROFESIONISTA.

AGRADEZCO A LA PROFESORA MA. DE LOS ÁNGELES VALDIVIA LÓPEZ POR HABERME INVITADO A PARTICIPAR EN ESTE PROYECTO Y POR SU PACIENCIA PARA RESOLVER TODAS MIS DUDAS.

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	<b>4</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>5</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>6</b>
Objetivo general	6
Objetivos particulares	6
<b>I ANTECEDENTES</b>	
1.1 La Chía ( <i>Salvia hispanica L.</i> )	7
1.1.1 Características botánicas	7
1.2 Proteínas	8
1.2.1 Cambios conformacionales: desnaturalización y coagulación	9
1.2.1.1 Factores que afectan la desnaturalización	12
1.2.2 Propiedades funcionales de las proteínas	13
1.2.3 Técnicas de separación de proteínas	15
1.2.3.1 Cromatografía	15
1.2.3.1.1 Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)	16
1.2.3.1.2 Cromatografía de exclusión molecular	16
1.2.3.2 Detección de proteínas en geles de electroforesis	17
1.2.3.2.1 Tipos de electroforesis	19
1.2.3.3 Ultrafiltración	19
1.3 Películas comestibles	20
1.3.1 Las proteínas como componentes de las películas comestibles	21
1.3.1.1 Efecto de la estructura y composición de las proteínas en las propiedades de las películas	22
1.3.2 Elaboración de películas	23
1.3.2.1 Aditivos en la elaboración películas	24
1.4 Estudios previos	25
<b>II MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
2.1 Diagrama general de la investigación	27
2.2 Obtención de harina desengrasada de semilla de chía	28
2.3 Obtención del concentrado de proteína de semilla de chía (CP)	28
2.4 Caracterización del concentrado de proteína (CP)	29
2.4.1 Determinación de fibra dietética total (FDT) en el concentrado de proteína	29

2.5 Caracterización de los pesos moleculares de las fracciones proteínicas del CP mediante electroforesis	30
2.5.1 Precipitación de proteínas con ácido tricloroacético (TCA)	32
2.6 Caracterización de los pesos moleculares de las fracciones proteínicas del CP mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)	32
2.7 Hidrólisis ácida de polisacáridos	33
2.8 Separación de las fracciones de bajo peso molecular mediante la técnica de ultrafiltración	34
<b>III RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	
3.1 Obtención del concentrado de proteína de semilla de chía (CP)	35
3.2 Caracterización del concentrado proteína (CP)	36
3.2.1 Determinación de fibra dietética total (FDT) en el concentrado de proteína	38
3.3 Caracterización de los pesos moleculares de las fracciones proteínicas del CP mediante electroforesis	41
3.3.1 Precipitación de proteínas con ácido tricloroacético (TCA)	43
3.3.2 Elaboración de películas con el precipitado (CPTCA)	45
3.4 Caracterización de los pesos moleculares de las fracciones proteínicas del CP mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)	46
3.5 Hidrólisis ácida de polisacáridos	52
3.6 Separación de las fracciones de bajo peso molecular mediante la técnica de ultrafiltración	55
3.6.1 Caracterización de pesos moleculares del concentrado (CPUF) mediante la técnica de electroforesis	57
3.6.2 Caracterización de los pesos moleculares del concentrado (CPUF) mediante HPLC	60
3.6.3 Elaboración de películas a partir del concentrado	63
<b>CONCLUSIONES</b>	69
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	71

## RESUMEN

La elaboración de películas a base de proteínas obtenidas a partir de la semilla de chía, ha llegado a considerarse como una alternativa para la sustitución de empaques elaborados a base de polímeros sintéticos obtenidos industrialmente (Damodaran 1997). En este trabajo se estudiaron las fracciones presentes en el concentrado de proteína obtenido de la semilla de chía. Mediante técnicas de electroforesis (Tris-tricina-SDS, Schägger y Von Jagow 1987) y cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), se llevó a cabo la caracterización de los conglomerados proteínicos.

El concentrado de proteína que se extrae de las semillas de chía se compone de ocho conglomerados, según la técnica de electroforesis, en el que los pesos moleculares correspondientes, están en un intervalo de 55 a 12 kDa, las fracciones que se presentan en mayor concentración tienen un peso molecular de 24 a 33 kDa. Por otro lado, según la técnica de HPLC el concentrado presenta nueve conglomerados, con pesos moleculares entre 163 a 7 kDa, la fracción de mayor concentración es la de 163 kDa.

El extracto obtenido presentó alrededor de 13% de carbohidratos no digeribles cuya fuente principal es el mucílago propio de la semilla; se observó que éstos pueden hidrolizarse con soluciones ácidas aunado a un tratamiento térmico con agitación. El concentrado proteínico una vez hidrolizado, mantuvo las propiedades necesarias para la formación de películas, con una ligera diferencia en el color de la película elaborada, es decir una película más oscura.

## INTRODUCCIÓN

Hoy en día el uso de plásticos para envases y empaques de los alimentos ha llegado a formar la mayor parte de la basura generada en todo el planeta ocasionando serios problemas de contaminación; a pesar de ser un material reciclable, nunca desaparece porque no es posible degradarlo.

Las películas o cubiertas comestibles pueden ejercer la función de protección contra la pérdida de humedad, barrera contra el oxígeno y pérdida de aroma, entre otras; manteniendo lo más íntegro posible al alimento durante el almacenamiento, transportación y venta del mismo, y pueden funcionar como una alternativa para sustituir a los plásticos (Damodaran 1997).

Las cubiertas o películas a base de proteínas en general, exhiben una alta permeabilidad al vapor de agua, además de buenas propiedades de barrera al oxígeno en ambientes de baja humedad relativa, como por ejemplo las películas formadas a base de colágeno, gluten de trigo y proteína de soya, entre otras (Gennadios y Weller 1990).

Se ha reportado en estudios previos (Hernández 2007), que a partir de la semilla de chíá se obtiene un extracto de proteínas, con el cual se logra la formación de una película. Este concentrado a su vez se compone de distintas fracciones de proteínas. Este estudio tiene como objetivo caracterizar aquellos conglomerados que son importantes para la elaboración de películas, mediante el conocimiento de sus pesos moleculares utilizando técnicas de electroforesis y cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Con esta información es posible mejorar la calidad de la película, utilizando sólo aquellas fracciones importantes o en su defecto las convenientes combinaciones de las mismas; reducir el tiempo de preparación de la misma; obtener mejores rendimientos de

la película y en general optimizar el proceso de obtención de la película, sin que éste afecte a las propiedades mecánicas de la película formada.

## **Capítulo 1. ANTECEDENTES**

### **1.1 La chía (*Salvia hispanica*, L.)**

Hay evidencia científica que muestra que la semilla de chía (*Salvia hispanica*, L.) comenzó a usarse en la alimentación humana unos 3,500 años antes de Cristo y se convirtió en un cultivo básico en el centro de México entre 1,500 y 900 años antes de Cristo. La semilla de chía fue utilizada como alimento por los indios del oeste y del sur de México. Los Aztecas la consumían debido a su aporte energético. Se ha encontrado que este alimento es una buena fuente de ácidos grasos  $\Omega$ -3, proteína y fibra dietética. El mucílago de la semilla puede ser útil como aditivo alimenticio (Beltrán-Orozco y Romero 2007).

Se ha determinado que las semillas de chía contienen cantidades de aceite que varían entre 32 a 39%. La semilla de chía contiene de 19 a 23% de proteína y es también una fuente de proteína de fácil absorción y digestión (Beltrán-Orozco y Romero 2007).

#### **1.1.1 Características botánicas**

El término *chía* se refiere a un pequeño grupo de plantas anuales pertenecientes a la familia Lamiaceae, nativas del suroeste de California, Texas, México y América Central. Son características generales de la especie hispánica poseer plantas anuales, con altura de un metro, con período de florecimiento en julio y agosto; crecen en suelos arcillosos o arenosos que estén bien drenados incluso en zonas áridas; no toleran las heladas ni crecen en la sombra (Beltrán-Orozco y Romero 2007).

La *Salvia hispanica* L. cuenta con varios nombres comunes como salvia española, artemisa española, chía mexicana, chía negra o simplemente chía. La variedad nativa de la República Mexicana es la *chionocalyx fernald*. La figura 1 muestra una fotografía de la semilla de chía (Beltrán-Orozco y Romero 2007).



Fig. 1 Fotografía de la semilla de chía (tamaño de 2 mm aproximadamente).

## 1.2 Proteínas

La estructura primaria de las proteínas está formada por enlaces peptídicos entre unidades simples, llamadas aminoácidos. La estructura secundaria suele formarse mediante giros hacia atrás, en los que las cadenas polipeptídicas se doblan sobre sí mismas por formación de puentes de hidrógeno (Damodaran 1997).

Las cadenas polipeptídicas se encuentran estabilizadas por numerosas interacciones, como fuerzas hidrofóbicas, puentes de hidrógeno e interacciones electrostáticas que les proporcionan una disposición espacial y una orientación de las cadenas laterales de los aminoácidos constitutivos, así como de sus propiedades funcionales (Damodaran 1997).

Además de las interacciones covalentes y no covalentes, la estabilidad de las conformaciones proteínicas se ve afectada por el disolvente, ya que las proteínas contienen cadenas laterales hidrófobas e hidrófilas, que tienden a alejarse y agruparse o a desplegarse y exponerse al agua, según sea el caso. En el interior de la molécula de proteína, ocurren tres tipos de agua: (1) moléculas de agua atrapadas en el seno de la proteína, que rellenan los huecos que quedan en el empaquetamiento de las cadenas laterales; (2) moléculas de agua parcialmente ordenadas (con temperaturas de congelación); (3) moléculas de agua fuertemente unidas que forman la primera monocapa que cubre la superficie y ofrece modificaciones estructurales (agua ligada) (Damodaran 1997).

### **1.2.1 Cambios conformacionales: desnaturalización térmica y coagulación**

Se distinguen dos tipos de cambios estructurales: (1) interacciones entre grupos de las cadenas laterales de los polipéptidos, que dan origen a asociación, coagulación, floculación y precipitación (2) interacciones entre la cadena y el disolvente, que permite la disolución, la disociación, el hinchamiento y la desnaturalización (Fennema 1996).

El calor, las sales, los cambios de pH, los disolventes orgánicos y los agentes desnaturalizantes pueden inducir modificaciones en la estructura de la proteína (Fennema 1996).

La estabilidad de las proteínas es de particular importancia en la determinación de su funcionalidad en sistemas alimenticios. Esto es, porque una propiedad funcional esta gobernada por un estado conformacional específico de la proteína y cualquier alteración de ese estado afecta su funcionalidad. La

desnaturalización de las proteínas es un prerrequisito para que puedan mostrar cualquier propiedad funcional (Damodaran 1997).

La desnaturalización de las proteínas se ha definido como un proceso o secuencia de procesos en el que el arreglo espacial de la proteína es modificado a partir de una forma nativa o típica a un arreglo más desordenado. Dependiendo de la proteína, la desnaturalización puede estar confinada a una región de la proteína o involucrar a la molécula completa, que refleja una naturaleza cooperativa de transición a partir de un estado de conformación nativa a un estado de mínima estructura (Damodaran 1997).

Uno de los métodos más comunes de desnaturalización es su calentamiento en solución. El calentamiento de proteínas globulares en agua o disolventes, incrementa su movimiento térmico, permitiendo la ruptura de varios enlaces intermoleculares e intramoleculares que estabilizan la estructura nativa de la proteína. El resultado es la reorganización de la configuración secundaria y terciaria, donde estaban anteriormente residuos de aminoácidos "hidrofóbicos" orientados hacia el interior, que se exponen al solvente (Damodaran 1997).

La coagulación térmica es la interacción al azar de las moléculas de proteína mediante un tratamiento térmico, permitiendo la formación de agregados que podrían ser solubles o insolubles (precipitados), la gelación térmica, por otro lado, es la formación de una red tri-dimensional que muestra cierto grado de ordenamiento. Para proteínas monoméricas la coagulación, está normalmente precedida por la desnaturalización. Para proteínas oligoméricas con complejos estructurales cuaternarios, el calor puede causar la asociación/disociación de los oligómeros, y la perturbación de su estructura cuaternaria puede dar como resultado la agregación (Damodaran 1997).

Las moléculas de proteína desdobladas se asocian mediante interacciones intermoleculares para formar agregados de moléculas irreversiblemente desnaturalizadas, que pueden dar lugar a la precipitación coagulación o gelación. La formación de una matriz de gel térmicamente inducida o de una coagulación a partir de proteínas involucra los tres eventos siguientes:

Desnaturalización      →      Agregación      →      Enlace

La agregación proteínica involucra la formación de complejos de alto peso molecular a partir de proteínas desnaturalizadas, que son enlazadas por enlaces específicos en sitios específicos de las cadenas proteínicas o mediante enlaces no específicos dentro de las cadenas de proteínas. Los pasos iniciales de una coagulación térmica en soluciones acuosas de proteínas son:

1. Disociación reversible de la estructura cuaternaria dentro de subunidades o de monómeros.
2. Desnaturalización irreversible de las estructuras secundaria y terciaria.

La disociación y desdoblamiento de las moléculas de proteínas incrementan la exposición de grupos reactivos, especialmente, grupos hidrofóbicos de proteínas globulares. Las interacciones proteína-proteína, se ven de esta manera favorecidas y normalmente causan la agregación, siempre que la concentración de proteína y las condiciones termodinámicas sean óptimas para la formación de la estructura terciaria. Las interacciones hidrofóbicas se involucran tanto en la agregación como en la gelación. Las interacciones hidrofóbicas no-específicas se han implicado en las reacciones disociativas-asociativas que inicien la agregación o gelación y que también le proporcionan la fuerza y estabilidad a los geles de proteína durante el enfriamiento (Damodaran 1997).

### 1.2.1.1 Factores que afectan la desnaturalización

- **Calor.** Dependiendo de las propiedades moleculares de las proteínas, en su desdoblamiento resultan dos tipos de interacciones. Las proteínas que contienen niveles altos de residuos de aminoácidos apolares, que producen agregaciones al azar mediante interacciones hidrofóbicas, resultando en un coagulo o precipitado opaco. Por otro lado las proteínas que contienen niveles críticamente bajos de residuos de aminoácidos apolares forman agregados solubles, que son térmicamente reversibles, redes de gel transparentes una vez enfriados. Cuando las condiciones de calentamiento son extremas, la proteína puede no tener tiempo suficiente para alinearse por sí misma en un nuevo ordenamiento. En estas circunstancias se forman agregados pobremente hidratados o precipitados con una matriz muy compacta (Damodaran 1997).
- **pH.** Puede relacionarse con el desdoblamiento de las proteínas y activación de grupos sulfhidrilos. A pH isoeléctricos, la falta de fuerzas de repulsión inhibe el desdoblamiento de proteínas. A pH alejados de los puntos isoeléctricos se inducen fuerzas repulsivas mediante proteínas altamente cargadas y como resultado, su desdoblamiento. La exposición prolongada a pH extremadamente altos, sin embargo suprime la formación del agregado. A valores fuertemente básicos los grupos carboxilatos-fenólicos e interacciones de grupos carboxilatos amino protonados ( $\text{NH}_3^+$ ) son inhibidos; esto interfiere con los enlaces de agregados y afecta la formación del gel (Damodaran 1997).

- **Azúcares y polioles.** Los azúcares protegen a las proteínas de la pérdida de solubilidad durante el secado y pueden inhibir la coagulación. Los niveles bajos de azúcares incrementan el número de asociaciones hidrofóbicas evidenciados mediante el incremento en la superficie hidrofóbica; como los niveles de azúcar se incrementan, estas interacciones se refuerzan. Los polioles disminuyen la constante dieléctrica del medio e interactúan con cadenas de proteínas no-polares, debilitando interacciones hidrofóbicas y así disminuye la estabilidad térmica (Damodaran 1997).
- **Modificadores de proteína.** Se ha sugerido que el dodecil sulfato de sodio (SDS) estabiliza la proteína mediante la formación de enlaces entre grupos cargados positivamente (Damodaran 1997).

### **1.2.2 Propiedades funcionales de las proteínas**

Son aquellas propiedades fisicoquímicas que les permiten contribuir a que los alimentos exhiban características deseables. Las propiedades funcionales de una proteína están relacionadas con las características físicas, químicas y conformacionales, las cuales incluyen el tamaño, la forma, la composición y secuencia de aminoácidos, la carga y la distribución de la carga (factores intrínsecos), así como del medio que los rodea, que en ocasiones puede modificarse, pH, fuerza iónica, temperatura, actividad acuosa, constante dieléctrica (factores extrínsecos) (Badui 1993).

El término “funcionalidad” es aplicado a los ingredientes de los alimentos, que se han definido como cualquier propiedad extra aparte de las propiedades nutricionales que influyen en la utilidad de los ingredientes de los alimentos. Las proteínas son de particular importancia, debido a que juegan un papel

significativo en las características sensoriales de textura, así como las nutricionales de diversos productos alimenticios y tienen la habilidad para actuar como una matriz para contener agua, lípidos, azúcares, sabores y otros ingredientes durante la formación de geles y agregados (Damodaran 1997).

Las propiedades funcionales están relacionadas con las propiedades físicas, químicas y conformacionales, que incluyen tamaño, forma, composición y secuencia de aminoácidos, su carga y su distribución de carga. Las propiedades de las proteínas de alimentos que afectan la funcionalidad incluyen, proporción de hidrofobicidad/hidrofilia, estructura secundaria, terciaria y cuaternaria, arreglo de segmentos polipeptídicos, enlaces intra e intermoleculares y la flexibilidad/rigidez de la proteína como una respuesta a las condiciones externas (Damodaran 1997).

Las propiedades funcionales de la proteínas se pueden clasificar en tres grandes grupos: a) propiedades de hidratación dependientes de las interacciones proteína-agua, b) propiedades relacionadas con las interacciones proteína-proteína y c) propiedades de superficie. Al primer grupo pertenecen propiedades tales como la absorción y retención de agua, la humectabilidad, el hinchamiento, la adhesión, la dispersabilidad, la solubilidad y la viscosidad, a las que con frecuencia se hace referencia con el término propiedades hidrodinámicas. Las del segundo grupo participan en procesos tales como la precipitación y la formación de geles y otras estructuras. El tercer grupo de propiedades está relacionado fundamentalmente con la tensión superficial, la emulsificación y las características espumantes de la proteína. Estos tres grupos no son totalmente independientes; por ejemplo, la formación de geles no solo implica interacciones proteína-proteína, sino también interacciones

proteína-agua y la viscosidad y la solubilidad dependen de las interacciones proteína agua y proteína-proteína (Fennema 1996).

### **1.2.3 Técnicas de separación de proteínas**

Muchas de las técnicas de separación de proteínas tienen como finalidad la producción de alimentos o la producción de ingredientes para la formulación de alimentos; mientras otros se utilizan para purificar proteínas a partir de una matriz alimenticia. Estas técnicas de separación explotan las diferencias bioquímicas de las proteínas tales como su solubilidad, tamaño, carga, características de absorción y afinidad con otras moléculas (Nielsen 2003).

#### **1.2.3.1 Cromatografía**

La cromatografía es un método tanto físico como químico de separación, que se distingue por poner en contacto dos fases inmiscibles: una estacionaria y otra móvil. Una muestra que se introduce en la fase móvil, es transportada a lo largo de la columna que contiene una fase estacionaria distribuida. Las especies de la muestra experimentan interacciones repetidas entre la fase móvil y la fase estacionaria; si son eficientes ambas fases, los componentes de la muestra se separan gradualmente en bandas en la fase móvil. Al final del proceso los componentes separados emergen en orden creciente de interacción con la fase estacionaria; el menos retardado emerge primero, el más retenido eluye al último (Willard 1991).

#### **1.2.3.1.1 Cromatografía líquida de alta eficiencia (High performance liquid chromatography)**

Es definida como la separación de compuestos mediante absorción o desorción desde una superficie de soporte, sólida mediante un solvente conocido como eluyente (Nielsen 2003).

La cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), es capaz de separar macromoléculas y especies iónicas, productos naturales lábiles, materiales poliméricos y gran variedad de otros grupos polifuncionales de alto peso molecular (Nielsen 2003).

En la *HPLC* el compuesto pasa por la columna cromatográfica a través de la fase estacionaria mediante el bombeo de líquido (*fase móvil*) a *alta presión* a través de la columna. La muestra a analizar es introducida en pequeñas cantidades y sus componentes se retrasan diferencialmente dependiendo de las interacciones químicas o físicas con la fase estacionaria a medida que adelantan a través de la columna (Willard 1991).

#### **1.2.3.1.2 Cromatografía de exclusión molecular**

Se basa en el radio de Stokes de la proteína, que es el promedio del radio de proteína en solución. También conocida como filtración en gel o cromatografía de permeación en gel, separa las proteínas en base a su tamaño. Una solución de proteína eluye a través de una columna empacada con un soporte sólido de largos polímeros entrecruzados, cuyas partículas son esferas porosas, como agarosa o dextrana. Las moléculas grandes que son excluidas de los poros de

las esferas de la matriz se mueven rápidamente a través de la columna y eluyen de la columna en corto tiempo. Las moléculas pequeñas entran en los poros de las esferas y son retardadas, por lo que su movimiento a través de la columna es lento. Las moléculas de tamaño intermedio interactúan de manera parcial con las esferas y eluyen en tiempos intermedios (Nielsen 2003).

Las esferas tienen distintos promedios de tamaño de poro que permiten la eficiente separación de fracciones de proteínas de diferentes pesos moleculares. Generalmente se usa para la separación de sales, fracciones de proteína, y para estimar sus pesos moleculares. Se trata de una cromatografía de baja resolución de forma que se suele utilizar en los pasos finales del proceso de purificación. También es muy útil para la determinación de la [estructura terciaria](#) y la [estructura cuaternaria](#) de las proteínas purificadas (Nielsen 2003).

### **1.2.3.2 Detección de proteínas en geles de electroforesis**

La electroforesis se define como la migración de moléculas cargadas en solución sometidas a un campo eléctrico. Las proteínas son separadas de su mezcla compleja en bandas, por la migración de buffers acuosos que pasan a través de una matriz sólida polimérica llamada gel. Los geles de poliacrilamida son la matriz más común para la electroforesis de proteínas (Nielsen 2003).

Cuando una mezcla de moléculas ionizadas y con carga neta es colocada en un campo eléctrico, experimenta una fuerza de atracción hacia el polo que posee carga opuesta; dejando transcurrir cierto tiempo las moléculas cargadas positivamente se desplazarán hacia el cátodo (el polo negativo) y aquellas cargadas negativamente se desplazarán hacia el ánodo (el polo positivo).

Permite la separación de proteínas con diferente peso molecular y carga eléctrica (Andrews 1986).

La carga positiva o negativa de las proteínas, depende del pH de la solución y de su propio pI. Una proteína se encuentra negativamente cargada si el pH de la solución se encuentra por encima del pI, mientras que una proteína está cargada positivamente si el pH de la solución está por debajo del pI. La magnitud de la carga y el voltaje aplicado determinarán que tanto migra la proteína en el campo eléctrico. Cuanto mayor es el voltaje y mayor es la carga en la proteína, mayor es la migración dentro del campo eléctrico. El peso molecular y la forma de la proteína determinan la distancia que migra, dentro del gel. La movilidad de la proteína disminuye cuando aumenta la fracción molecular, y a la vez aumenta el radio de Stokes, por lo tanto las proteínas pequeñas tienden a migrar más rápido a través del gel. Del mismo modo disminuyendo el tamaño del poro del gel, disminuirá la movilidad (Nielsen 2003).

- Una electroforesis desnaturizante, la más común, es la que somete a las proteínas a migración asegurando la completa desnaturización (pérdida de la estructura tridimensional). En esta situación la migración es proporcional a la carga y al tamaño de la molécula pero no a su forma. El agente desnaturizante más empleado es el dodecil sulfato de sodio o SDS, un detergente (Andrews 1986).
- Una electroforesis nativa es la que somete a las proteínas a migración sin desnaturización. En esta situación las proteínas migran en función de su carga, de su tamaño y de su forma. Además se mantienen en ciertos casos las interacciones entre subunidades y entre proteínas, separándose los complejos.

Los buffers empleados en estos caso son: tris-glicina (intervalo de pH 8.3 a 9.5), tris-borato (intervalo de pH 7.0 a 8.5) y tris-acetato (intervalo de pH 7.2 a 8.5) (Andrews 1986).

- Geles de Tris-Tricina-SDS, usados para una mayor resolución en la separación de proteínas de bajo peso molecular alrededor de 5 a 20 kDa (Schägger y Von Jagow 1987).

#### **1.2.3.2.1 Tipos de electroforesis**

- SDS-PAGE (dodecil sulfato de sodio-poliacrilamide gel electrophoresis)
- Geles en gradiente (isoelectroenfoque)
- Electroforesis bidimensional
- Detección de proteínas en el gel
- Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida.

#### **1.2.3.3 Ultrafiltración**

El proceso de ultrafiltración se basa en la separación de partículas que se encuentran por debajo del tamaño de poro de una membrana semipermeable, aplicando presión. Las moléculas que son más grandes que el poro de la membrana serán retenidas y forman parte del concentrado, mientras las moléculas pequeñas que atraviesan la membrana llegan a formar el permeado (Nielsen 2003).

La ultrafiltración puede utilizarse para concentrar una solución de proteína, para la remoción de sales, fraccionar proteínas con base en su peso molecular.

Actualmente se utiliza para concentrar leche en la elaboración de queso y para la manufactura de productos de proteína de trigo (Nielsen 2003).

### **1.3 Películas comestibles**

Las cubiertas y películas comestibles se han utilizado en alimentos para protegerlos del ataque microbiano y prevenir la pérdida de actividad acuosa durante el almacenamiento de los mismos (Damodaran 1997).

Algunos biopolímeros, incluyendo los polisacáridos, proteínas y lípidos se han usado como películas biodegradables. Las proteínas más estudiadas son las de gelatina, proteína de soya, de trigo y de maíz (Bamdad et al. 2006).

Las películas comestibles se definen como una o varias capas de material que puede ser consumido por los seres vivos y que a su vez pueden actuar como barrera a la transferencia de agua, gases y solutos de alimentos (Bamdad et al. 2006).

Algunas de las ventajas de las películas comparadas en particular con materiales poliméricos de empaque son:

- ✓ Representan un material ideal de empaque por constituirse de materiales renovables, y de esa forma no contamina.
- ✓ Pueden consumirse junto con el producto empacado.
- ✓ Pueden suplementar el valor nutricional de los alimentos, particularmente aquellas que se forman a partir de proteínas.
- ✓ Pueden utilizarse para un empacado individual de porciones pequeñas de producto.

Entre otras funciones (Gennadios y Weller 1990).

En muchas aplicaciones de alimentos, la función más importante de las películas comestibles, es la reducción de la pérdida de humedad, funcionando como barreras al vapor de agua, gases y solutos (Gennadios et al. 1997).

### **1.3.1 Las proteínas como componentes de las películas comestibles**

Las proteínas como componentes de las películas hacen que estas exhiban un valor relativamente alto de permeabilidad al vapor de agua, de dos a cuatro veces mayor que el de los empaques poliméricos comúnmente conocidos, como polietileno, polipropileno y poliéster, entre otros. La resistencia límite de la permeabilidad al vapor de agua, por parte de las películas compuestas por proteínas es atribuida a la inherente hidrofilia de las mismas, y la hidrofilia de los plastificantes utilizados como el glicerol y sorbitol, que son incorporados con la finalidad de brindarle flexibilidad a la película. Las proteínas más estudiadas son: colágeno, gelatina, proteínas de leche, de cereales y de semillas (Gennadios et al. 1997). Además reducen la fragilidad de la película debido a que interfiere con enlaces de puentes de hidrógeno entre moléculas lipídicas e hidrocoloides (Tharanathan 2003).

### **1.3.1.1 Efecto de la estructura y composición de las proteínas en las propiedades de las películas**

En su estado nativo, las proteínas generalmente existen ya sea como proteínas fibrosas, las cuales son insolubles en agua, o como proteínas globulares, las que son solubles en soluciones acuosas de ácidos, bases o sales. Las proteínas fibrosas se asocian en general a través de puentes de hidrógeno. Las proteínas globulares involucran estructuras esféricas, que se mantienen unidas a través de combinaciones de puentes de hidrógeno, enlaces iónicos, hidrofóbicos y covalentes (disulfuro) (Damodaran 1997).

Varias proteínas globulares incluyendo, gluten de trigo, zeína de maíz, proteína de soya y proteína de trigo, han sido estudiadas por su propiedad de ser formadoras de películas. Las películas de proteínas en general, se elaboran a partir de dispersiones o soluciones de la proteína en la que el disolvente se evapora. El disolvente es generalmente agua, etanol, o mezclas de etanol-agua (Damodaran 1997).

Las proteínas globulares deben ser desnaturalizadas con calor, ácidos, bases y disolventes con el fin de formar estructuras que se requieren para la formación de la película. Una vez extendidas las cadenas de proteína, pueden asociarse mediante puentes de hidrógeno, enlaces iónicos y covalentes. La interacción proteína-proteína que produce una película cohesiva es afectada por el grado de extensión de la cadena y de la naturaleza y secuencia de sus residuos de aminoácidos (Damodaran 1997).

El incremento de las interacciones proteína-proteína en la cadena, da como resultado películas más fuertes pero menos flexibles, estas interacciones se pueden asociar mediante puentes de hidrógeno o enlaces iónicos, resultando

películas con excelentes propiedades de barrera al oxígeno pero susceptibles a una baja humedad relativa. Los polímeros en los que predominan grupos hidrofóbicos, tienden a ser malas barreras al oxígeno pero excelentes barreras a la humedad. De esa manera las películas formadas a base de proteínas con baja permeabilidad al vapor agua requieren la adición de componentes lipídicos (Damodaran 1997).

A menudo pueden agregarse plastificantes de bajo peso molecular a las películas de proteína para reducir la interacción proteína-proteína. Los plastificantes más utilizados incluyen mono-, di-, y oligosacáridos, polioles y lípidos (Damodaran 1997).

### **1.3.2 Elaboración de películas**

La elaboración de películas consiste principalmente en la interacción de dos componentes; un polímero de alto peso molecular y el plastificante. La adición de un agente plastificante es necesaria para reducir las fuerzas intermoleculares entre las proteínas, le da rigidez a la estructura y le confiere propiedades mecánicas a las películas (Gennadios y Weller 1990). El plastificante se ha definido como una molécula pequeña, con baja volatilidad, cuya adición permite una modificación de la estructura tridimensional del polímero, ya que contiene grupos polares que pueden interactuar con algunos grupos funcionales de las proteínas; que pueden influenciar las características finales de las películas, propiamente en las propiedades mecánicas (Bourtoom et al. 2006).

La formación de películas ha sido descrita en dos pasos: primero, el proceso que involucra la desnaturalización de las proteínas, seguido de una deshidratación superficial. Durante el secado el acoplamiento de las proteínas involucra interacciones intermoleculares, tales como enlaces disulfuro e interacciones hidrofóbicas, para lograr la formación de una red. También se ha reportado que los enlaces de hidrógeno, que constituyen la estructura de la hoja  $\beta$  plegada, son esenciales para la formación de la red (Yong y Rhee 2004). Además de los cambios en las propiedades funcionales de las proteínas una vez aisladas, debido a algunos tratamientos químicos que se pueden llevar a cabo, como la acilación, por ejemplo, las proteínas tienden a modificarse durante el almacenamiento, debido a la agregación de las moléculas de las proteínas. Se ha reportado que las proteínas de bajo peso molecular se unen con las de pesos moleculares altos mediante puentes disulfuro, de hidrógeno e hidrofóbicos. Las propiedades funcionales de agregados de proteínas de alto peso molecular difieren de las de bajo peso molecular (Yong y Rhee 2004).

### **1.3.2.1 Aditivos en la elaboración películas**

Existen estudios de la elaboración de películas, agregando sustancias llamadas adjuntos, tales como antimicrobianos, antioxidantes, nutrientes, colorantes y otros que incrementan las funciones para proteger a los alimentos, como el ácido ferúlico. Esta molécula forma un enlace con las proteínas o polisacáridos que mediante la disminución de permeabilidad al oxígeno, permite incrementar la vida de anaquel mediante la producción de un intermediario estabilizador-resonante de radicales libres (Ou et al. 2005). Otro de los adjuntos es la

pululanasa, que incrementa las propiedades de barrera al oxígeno y a la permeabilidad al vapor de agua por medio de la formación de puentes de hidrógeno entre el plastificante y la pululanasa (Mahamadou et al. 2007).

#### **1.4 Estudios previos**

Hay estudios que demuestran que a partir de la semilla de chía se pueden elaborar películas comestibles, a través de la interacción de la fracción proteínica con un plastificante. Hernández 2007, logró extraer un concentrado de proteína que sometió a un tratamiento térmico a 70 °C por 20 minutos, previa adición del plastificante, y ajuste del pH a 11. Posteriormente se dejó secar a temperatura ambiente, logrando obtener la película de un color caramelo (Hernández 2007).

Hernández (2007), encontró las condiciones de pH, el tipo de plastificante así como la concentración a la que se requiere, y que contribuyen a la óptima elaboración de las películas. A pH alcalino la elaboración de películas se ve favorecida, en comparación de un pH ácido, siendo el pH de 11 el óptimo y utilizando tanto glicerol como sorbitol como plastificante a una concentración de 50% y 75% (w/w), respectivamente (Hernández 2007).

De la misma manera Hernández (2007), determinó que las fracciones proteínicas de bajo peso molecular son importantes para la elaboración de las películas.

Una vez elaboradas las películas, se evaluaron las propiedades mecánicas y propiedades de barrera de las mismas, comparándolas con películas sintéticas y naturales que se utilizan para la protección de embutidos. Los resultados obtenidos permiten determinar que las películas elaboradas a partir de proteína

de chía presentan propiedades mecánicas y de barrera aceptables, ofreciendo la posibilidad de ser probadas como barreras de protección en matrices alimentarias.

Por otro lado Alvarado (2008), evaluó la funcionalidad de las películas de proteína de chía, empleándolas como empaque de un sistema alimenticio, jamón serrano. Mediante la determinación del deterioro oxidativo a través de los radicales libres, resultó ser superior la funcionalidad como barrera, comparada con un plástico sintético. También determinó la cantidad de fibra 8.5 (g de fibra/100 g de película) presente en las películas así como la microscopía de las mismas (Alvarado 2008).

Con el recuento anterior se identificó la necesidad de conocer a detalle qué fracciones proteínicas presentes en el concentrado de proteína (CP), obtenidas a partir de la semilla de chía, son las responsables de la expresión de la funcionalidad que se relaciona con la elaboración de películas.

## **OBJETIVOS**

- **Objetivo general**

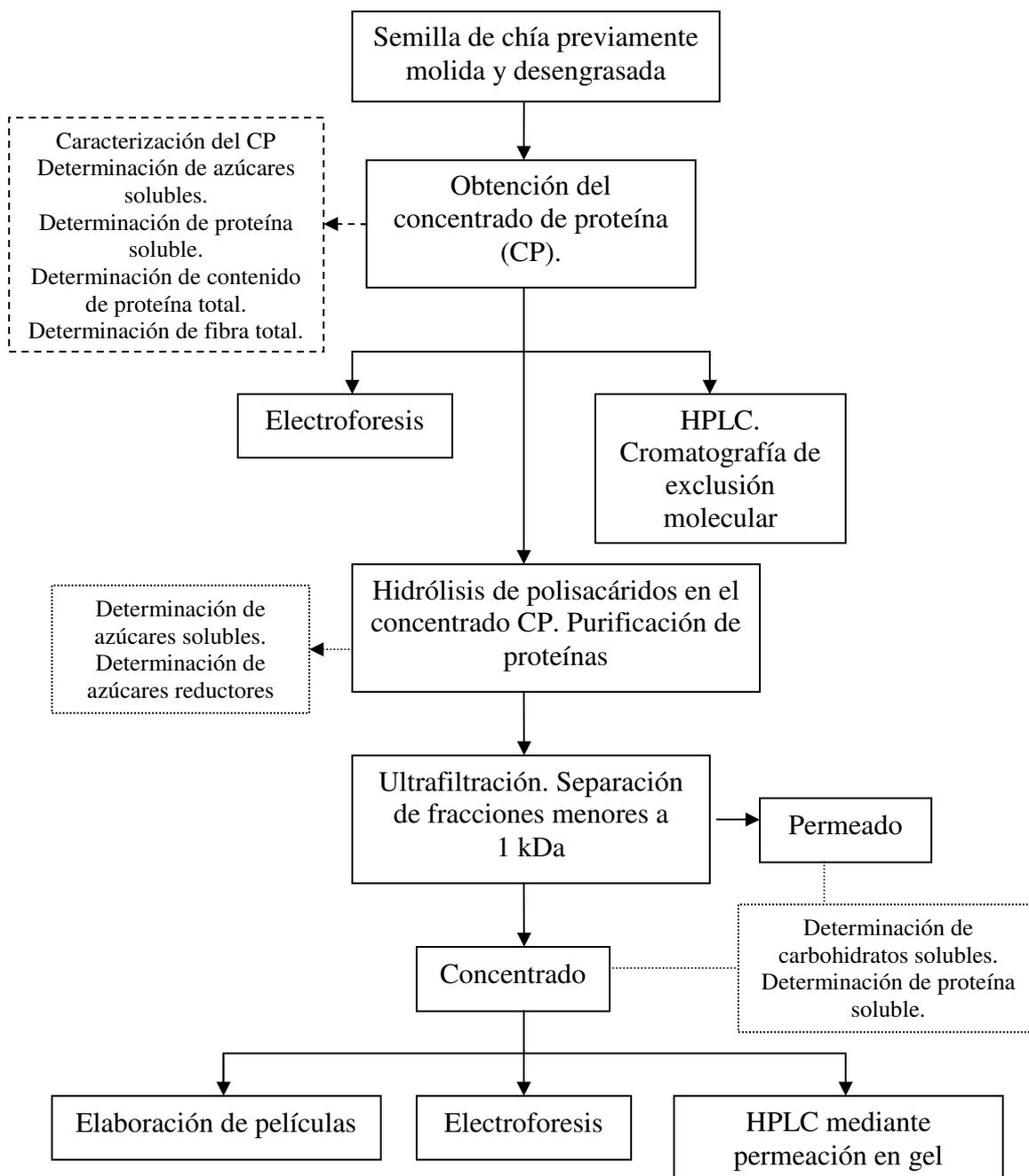
- ✓ Caracterizar las fracciones que componen al concentrado de proteína (CP), mediante el conocimiento de sus pesos moleculares a través de técnicas de separación y determinar aquellas que son necesarias para la elaboración de películas.

- **Objetivos particulares**

- ✓ Estudiar las condiciones de hidrólisis ácida para la eliminación de mucílago residual en el concentrado de proteína (CP).
- ✓ Realizar el estudio electroforético para conocer el número y pesos moleculares de las fracciones presentes en el concentrado de proteína (CP).
- ✓ Realizar el estudio en cromatografía de exclusión molecular para establecer el peso molecular de las fracciones presentes en el concentrado de proteína (CP).

## Capítulo 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Diagrama general de la investigación



## **2.2 Obtención de harina desengrasada de semilla de chía**

Se llevó a cabo la molienda de la semilla de chía (*Salvia hispánica*), cultivada en Jalisco, proveniente de la Central de Abastos de la Cd. de México, en un molino de la marca IKA WERKE, modelo MF 10 basic a 6000 rpm; posteriormente se desengrasó por el método de Soxhlet, se utilizó hexano como disolvente y se sometió a reflujo durante 6 h a 40 °C. Una vez desengrasada la muestra, se llevó a cabo nuevamente la molienda de la muestra; la harina obtenida se hizo pasar por un tamizador de la marca MONITOX, No. 10 a 100, con el fin de separar las fracciones del harina según el tamaño de partícula, a través de las mallas del número 10, 20, 30 y 40. La fracción que atravesó la malla 40 es la que contiene la mayor proporción de proteína (Hernández 2007).

## **2.3 Obtención del concentrado de proteína de semilla de chía (CP)**

El harina desengrasada con alto contenido de proteína que se obtuvo del tamizado, se sometió a las siguientes condiciones:

1. Suspensión en agua a pH 11, ajustado con NaOH 0.1N, relación 1:10 w/v, en agitación continua durante 1 h. La mezcla se dejó reposar en el refrigerador durante toda la noche, posteriormente se centrifugó a 5000 rpm durante 20 minutos y se recuperó el sobrenadante (Bamdad et al. 2005).
2. El pH del sobrenadante se ajustó a 5.4 con HCl 0.1 N. La mezcla se dejó reposar en el refrigerador durante toda la noche. Posteriormente se

centrifugó a 5000 rpm durante 20 minutos; se recuperó el precipitado y se dejó secar en estufa de vacío de la marca MAPSA, modelo HDT-27; a una temperatura de 50 °C toda la noche (Bamdad et al. 2005).

3. Una vez seco, el concentrado se hizo pasar por un molino casero, para obtener un concentrado de partículas más finas.

## **2.4 Caracterización del concentrado de proteína (CP)**

Con el propósito de conocer la composición del concentrado de proteína, se determinó el contenido de carbohidratos y proteína, respectivamente. La técnica de fenol-sulfúrico de Dubois et al. (1956), mostró el contenido de azúcares solubles totales; mientras que el contenido de proteína, se determinó mediante el método de Kjeldahl (Método Oficial de la AOAC 981.10) para proteína cruda y para la proteína soluble se utilizó la técnica de Lowry et al. (1951).

### **2.4.1 Determinación de fibra dietética total (FDT) en el concentrado de proteína (CP)**

La fibra total se determinó mediante el método reportado por Mañas et al. (1994). Se pesó 0.5 g de concentrado de proteína CP, que se sometió a la acción de enzimas como la amilasa, la proteasa y la amiloglucosidasa, posteriormente se obtuvo la fracción de fibra soluble (FDS), así como la fracción de fibra insoluble (FDI); la FDI se sometió a una hidrólisis ácida con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 12 M, durante 1 h a 35 °C, a la fracción resultante se le denominó lignina de Klaison. Las fracciones de FDS y FDI se caracterizaron mediante la determinación de ácidos urónicos y la determinación de azúcares neutros por el método de fenol-sulfúrico.

**2.5 Caracterización de los pesos moleculares de las fracciones proteínicas del CP mediante electroforesis. Sistema de Tris-Tricina-SDS (TSDS-PAGE) (Schägger y Von Jagow 1987).**

Las electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida en Tris-Tricina-SDS se utilizaron para separar con más resolución aquellas fracciones de proteínas de un peso molecular entre 5 a 70 kDa.

Soluciones electroforesis TSDS-PAGE utilizadas

- **Acrilamida** (30% w/v acrilamida y 2.7% w/v bis-acrilamida)
- **Buffer Tris-HCl/SDS** (3 M Tris-HCl, 0.3% SDS)
- **Glicerol** 80%
- **Persulfato de amonio** 10%
- **TEMED**
- **Buffer cátodo, reservorio superior** (100 mM Tris-HCl, 100 mM Tricina, 0.1% SDS)
- **Buffer ánodo, reservorio inferior** (200 mM Tris-HCl, pH 8.9)

**Cuadro1. Preparación de gel separador y concentrador para electroforesis.**

	<b><i>Gel separador 15%</i></b>	<b><i>Gel concentrador 4%</i></b>
Acrilamida	7.5 mL	972 µL
Buffer Tris-HCl/SDS	5 mL	1.86 mL
Agua	0.9 mL	4.67 mL
Glicerol 80%	1.58 mL	---
Persulfato de amonio* 10%	75 µL	40 µL
Temed	10 µL	4.5 µL

\*Uso de persulfato de amonio recién preparado.

Los geles se montaron en la cámara MINIPROTEAN II (Bio-Rad), y en el reservorio superior se puso el buffer del cátodo y en el reservorio inferior el buffer del ánodo.

Los polipéptidos utilizados como marcadores de peso molecular fueron; Isomerasa Triosa Fosfato (26.6 kDa), Mioglobina (17 kDa),  $\alpha$ -lactoalbúmina (14.2 kDa), Aprotina (6.5 kDa), Cadena insulina B (3.496 kDa) y Bradikina (1.060 kDa) (SIGMA-Aldrich).

La preparación de la muestra consistió en una suspensión de CP cuya concentración inicial fue de 10 mg/mL, a pH 11. Posteriormente el CP se mezcló con el buffer de tratamiento (0.125 M Tris-HCl, 4% SDS, 20% glicerol, 10% mercaptoetanol, 0.01% azul de bromofenol a pH 6.8) en relación 1:1 (v/v), que se sometió a un tratamiento térmico por 5 minutos. Una vez preparada la muestra, se colocó dentro de los pocillos de los geles y se corrieron en la cámara antes mencionada. Los geles fueron teñidos con una solución de azul de Coomasie (colorante que se une a los péptidos), durante la noche y al día siguiente se destiñeron con la solución I (50% metanol, 10% ácido acético). Para determinar el peso de las bandas se utilizó el densitómetro modelo GS 700 Bio-Rad y el programa Quantity-One.

### **2.5.1 Precipitación de proteínas con ácido tricloroacético (TCA) al 15%**

Con la finalidad de llevar a cabo la purificación de la muestra de CP, se aplicó un tratamiento de precipitación de proteínas, esto debido a que la muestra presentó cierto contenido de carbohidratos que posiblemente fueron arrastrados durante la extracción de proteínas, y se consideraron impurezas. El método que se utilizó fue el descrito por Biochem (Protein precipitations procedure 2007).

### **2.6 Caracterización de los pesos moleculares de las fracciones proteínicas del CP mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) por permeación en gel**

Esta técnica de cromatografía se utilizó para conocer los pesos moleculares de las fracciones que componen al CP, este método consistió en la separación de dichas fracciones por medio de exclusión molecular, que se basó en el tamaño molecular de las mismas.

Se prepararon disoluciones de CP en agua a pH 7, a diferentes concentraciones con el fin de establecer la concentración adecuada para el estudio. Las disoluciones que se trabajaron fueron de: 1.6 y 3.2 mg/mL. Se utilizó un buffer de fosfatos 0.1 M a pH 6.8, como fase móvil; además de el cromatógrafo de líquidos de alta resolución Beckman 110 A, un detector Waters 2487, Dual  $\lambda$  absorbance y una precolumna de la marca Phenomenex. Las condiciones que se mantuvieron en el equipo fueron de:

- **Flujo** 0.5 mL/min.
- **Loop** 200  $\mu$ L
- **Presión** constante de 1000 psi

- **Fase móvil** buffer de fosfatos 0.1 M, pH 6.8
- **Columna** BioSep-SEC-S2000, marca Phenomenex
- **Precolumna** Phenomenex
- **Tiempo de ensayo** 40 minutos

Los estándares que se usaron fueron los polipéptidos utilizados como marcadores de peso molecular de la marca BIORAD: Tiroglobulina (670 kDa), Bovina  $\gamma$ -globulina (158 kDa), Ovoalbúmina de gallina (44 kDa), Mioglobulina de equino (17 kDa) y Vitamina B12 (1.35 kDa).

## **2.7 Hidrólisis ácida de polisacáridos**

Una suspensión de CP pH 11 se sometió a una hidrólisis ácida. Para llevar a cabo la hidrólisis, la suspensión se llevó a un pH 2.5 con HCl 0.1 N, bajo condiciones similares a las de la elaboración de películas (Bamdad et al. 2005), es decir la suspensión se sometió a un tratamiento térmico a 70°C, durante 1 h con agitación constante.

## 2.8 Separación de las fracciones de bajo peso molecular mediante la técnica de ultrafiltración

La suspensión que se sometió a la hidrólisis ácida, se hizo pasar por una membrana de celulosa regenerada de la marca Millipore (AMICON Bioseparations), dentro de una celda para ultrafiltración con agitación, de la misma marca, modelo 8400, con el fin de separar las fracciones de pesos moleculares menores de 1 kDa. Se sometió a una presión constante de 60 psi, ejercida por gas nitrógeno, que hizo pasar la muestra en solución a través de la membrana, la duración de la ultrafiltración para un volumen de 350 mL, fue de 4 h aproximadamente. La figura 2 muestra la fotografía de la celda de ultrafiltración.



Fig. 2. Fotografía de una celda de ultrafiltración

### III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 Obtención del concentrado de proteína de semilla de chía (CP)

Estudios previos han demostrado que la semilla de chía proveniente de Jalisco, presenta un alto contenido de proteína, comparado con el de otros granos como: maíz (10-14%), trigo (13.4%) y arroz (10%) (Ayerza y Coates 2004). De acuerdo con la Tabla 1 (Olivos 2005) que muestra el análisis proximal de la semilla de chía, el contenido de proteína es de 24.6%.

Para la obtención de una fracción rica en proteína, fue necesario desengrasar la semilla y molerla hasta que se obtuvo un tamaño de partícula que atravesó la malla 40, se ha comprobado que esta fracción en particular, presenta un alto contenido de proteína (Hernández 2007).

Tabla 1. Análisis proximal de la semilla de chía proveniente de Jalisco

Componente (g /100 g de materia seca)	Jalisco
Grasa	32.23 ± 0.08
Proteína	24.60 ± 0.25
Cenizas	5.96 ± 0.06
Fibra dietética total	34.59 ± 0.07
Carbohidratos	2.62*

\*Determinación por diferencia

La fracción de proteína de la semilla de chía, fue sometida a distintos procesos de extracción de diferentes fracciones proteínicas, los resultados de la extracción de las distintas fracciones proteínicas y su contenido, se muestran en la Tabla 2 (Olivos 2005).

Tabla 2. Cuantificación de las fracciones proteínicas de la semilla de chía

Fracción proteínica	Contenido (g /100g de proteína total)
Albúminas	3.9
Globulinas	6.96
Prolaminas	0.27
Glutelinas	22.95
Insoluble (residuo)*	53.89
Oligopeptidos y aminoácidos libres **	12.03

\*Fracción que no pudo ser extraída por solubilidad, se considera proteína insoluble y nitrógeno no proteico.

\*\*Representa la proteína que se perdió durante la extracción.

De acuerdo con la Tabla 2, la fracción proteínica más abundante fue la de las glutelinas, una fracción soluble en soluciones alcalinas, y que para este estudio, es la más importante debido a que la obtención del concentrado de proteína (CP), se hace mediante la solubilización de las mismas en soluciones alcalinas, a partir de harina de semilla de chía desengrasada.

### 3.2 Caracterización del concentrado de proteína (CP)

Con el objeto de conocer tanto el contenido de proteína así como el de carbohidratos solubles, presentes en el concentrado de proteína obtenido de la semilla de chía, se efectuaron una serie de determinaciones cuyos resultados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Resultado del análisis químico del concentrado de proteína de chía

Componente	Contenido (g /100 g de CP)
Azúcares solubles totales	12.8 ± 0.2
Proteína soluble	70.8 ± 2.3
Proteína total	80.2 ± 1.7

El rendimiento de la extracción de proteínas fue del 88%, es decir que del contenido de proteína total presente en el CP, las proteínas extraídas mediante su solubilidad en álcalis corresponden al 88%; este valor es bajo comparado con el de otras fuentes: semilla de limón del 92% (Alvarado 2008). Este rendimiento se basa en los valores de la Tabla 3.

De acuerdo con el valor de carbohidratos solubles totales obtenido de 12.8 (g de carbohidratos solubles/100 g de CP), y considerando que se llevó a cabo una extracción de proteínas, el concentrado de proteína que se obtuvo a partir de la semilla de chía presenta un alto contenido de carbohidratos, que no es del todo favorable ya que, la presencia de otros componentes podría llegar a afectar el análisis de los pesos moleculares de las fracciones de proteínas, tal es el caso de la técnica de electroforesis en la que, la presencia de carbohidratos causa interferencias, haciendo que las bandas se noten difusas.

En la técnica de cromatografía líquida mediante permeación en gel, también se presentaron algunas dificultades debido a la presencia de los carbohidratos, ya que se piensa que estas moléculas se encuentran estrechamente enlazadas a ciertas proteínas, con las que forman polímeros de alto peso molecular que al pasar por la columna cromatográfica no son del todo separadas y se detectan pocas fracciones con pesos moleculares muy altos que no son congruentes con las fracciones detectadas en el gel de electroforesis y que se muestran más adelante.

Lo anterior se debe a que la semilla presenta un alto contenido de polisacáridos que en su mayoría son no digeribles (fibra), hecho que era evidente debido a que, resultó difícil de eliminar la presencia del mucílago durante la extracción; por lo que se decidió aplicar una técnica de hidrólisis ácida de polisacáridos

con el objetivo de reducir en la medida de lo posible la presencia de este componente.

El contenido de proteína total en el CP es de 80.2 (g proteína total/100 g de CP), que se observa en la Tabla 3. El contenido de proteína total esperado era alrededor de 90 (g de proteína total/100 g de CP), según lo reportado en estudios anteriores (Hernández 2007), sin embargo el resultado se encuentra por debajo de lo esperado. Esto puede deberse a la presencia de carbohidratos antes mencionada que componen el mucílago propio de la semilla de chía, que al no haber sido eliminado previamente, se arrastraron durante la extracción de las proteínas.

En la Tabla 3 se muestra el contenido de proteína soluble que es de 70.8 (g de proteína soluble/100 g de CP). Al comparar el rendimiento de extracción con el de otras fuentes, en la semilla de chía se extrae menor cantidad de proteína, este hecho se debe al alto contenido de carbohidratos que son solubles, pero que no muestran carácter reductor, por lo que es posible que estas moléculas se encuentren enlazadas a las proteínas.

### **3.2.1 Determinación de fibra dietética total en el concentrado de proteína**

Por lo anterior, se decidió llevar a cabo la determinación de fibra, mediante el método de Mañas et al. (1994), el contenido de fibra dietética total (FDT), se clasifica en fibra dietética insoluble (FDI) y fibra dietética soluble (FDS). De acuerdo con el método, el contenido de fibra soluble y el de la fibra insoluble en una muestra de CP fue de 4.6 y 9.4 (g de fibra/100 g de CP), respectivamente. Mientras que los valores para las mismas fracciones en la semilla de chía son

de 6.84 y 34.90 (g de fibra/100 g de semilla de chía), respectivamente. Estos valores se reportan en las Tablas 4 y 5.

Comparando el contenido de FDT de la semilla de chía de 41.41 (g de FDT/100 g de semilla de chía), que se muestra en la Tabla 4, con el contenido de FDT del CP cuyo valor es 14 (g de FDT/100 g de CP) reportado en la Tabla 5, se observa que el 33.73% de FDT de la semilla de chía se extrae durante la obtención de proteínas formadoras de películas (CP).

También se observa que el contenido de FDI es la fracción que predomina en ambas muestras. El contenido de azúcares neutros (AN) en la fracción de FDI, demuestra la presencia de celulosa y hemicelulosa insoluble; el valor de ácidos urónicos (AU) representa la cantidad de residuos de ácido glucurónico asociados a la hemicelulosa insoluble.

La fracción de FDS, es la fracción que se encuentra en menor proporción. Se compone generalmente de azúcares neutros (AN), los cuales indican la presencia de diversos carbohidratos que forman la estructura del mucílago y la baja cantidad de (AU) sugiere que no hay pectina asociada al mucílago y que este valor proviene de residuos de ácidos urónicos presentes en polisacáridos estructurales del mucílago (Reyes–Caudillo et al. 2007).

En la Tabla 5, el contenido de  $AN_{FDS}$  en el CP de 3.8 (g de AN/100 g de CP), al ser el valor más comparado con el resto de las fracciones, confirma que el mucílago continúa presente en gran medida, aún después de la extracción de proteínas, que puede ser posible gracias a la solubilidad de algunos residuos de polisacáridos en soluciones alcalinas, o que permanecen muy unidos a los proteínas y se extraen con ellas.

Por otro lado la cantidad de ácidos urónicos de ambas fracciones ( $AU_{FDS}$ ,  $AU_{FDI}$ ) en el CP, es la fracción que se espera hidrolizar durante un tratamiento ácido, debido a que permanece en menor proporción y los residuos de polisacáridos posiblemente estén más expuestos.

Tabla 4. Comparación del contenido de fibra dietética total y sus fracciones en la semilla de chía (g/100 g de semilla de chía)

<b>FDT*</b>	<b>FDS*</b>		<b>FDI*</b>		
41.41	6.84		34.90		
	<b>AN*</b>	<b>AU*</b>	<b>AN</b>	<b>AU</b>	<b>Lignina</b>
	5.12	1.72	14.97	3.60	16.33

\* FDT: fibra dietética total; FDS: fibra dietética soluble; FDI: fibra dietética insoluble; AN: azúcares neutros; AU: ácidos urónicos.

Tabla 5. Comparación del contenido de fibra dietética total y sus fracciones en una muestra de CP (g/100 g de concentrado de proteína)

<b>FDT</b>	<b>FDS</b>		<b>FDI</b>		
14.0	4.6		9.4		
	<b>AN</b>	<b>AU</b>	<b>AN</b>	<b>AU</b>	<b>Lignina</b>
	3.8	0.6	2.6	0.1	6.7

### 3.3 Caracterización de los pesos moleculares de las fracciones proteínicas del CP mediante electroforesis

En esta etapa se efectuó una prueba para la caracterización de las fracciones de proteína del concentrado de proteína de la semilla de chía (CP), a través de la técnica de electroforesis, mediante el sistema de Tris-tricina. En la figura 3 se presenta el gel de Tris-tricina del CP, en el se observa que las diluciones que se utilizaron fueron de 50, 100 y 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , también se observa que conforme aumenta la concentración, es más difícil notar las bandas, por lo que se decidió utilizar los resultados de las bandas registradas en el carril de la concentración de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

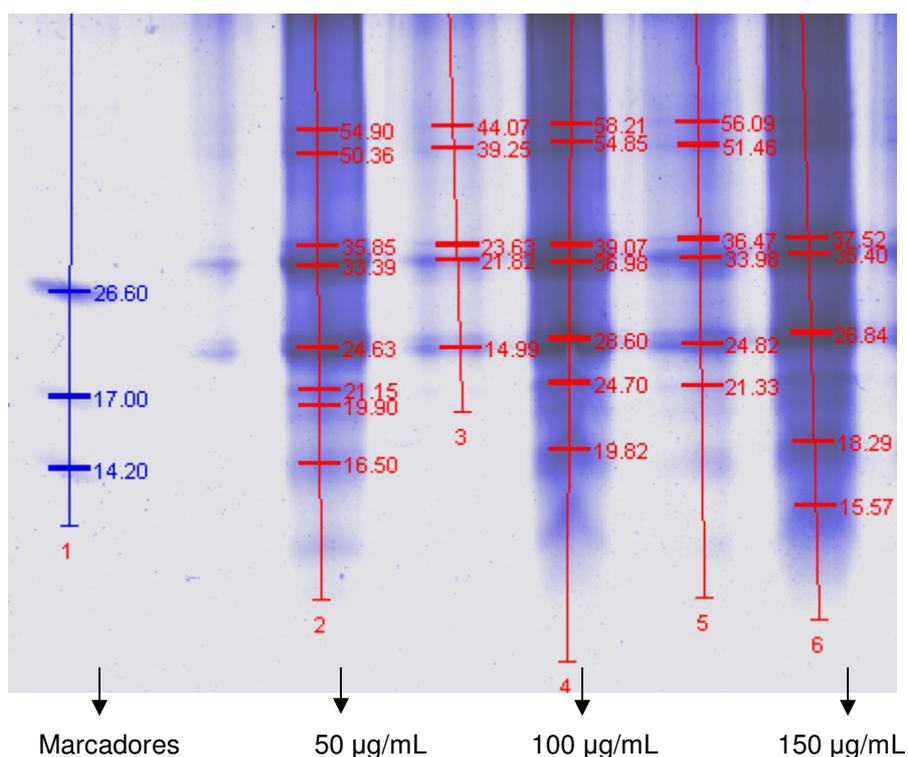


Fig. 3. Gel de electroforesis Tris-tricina, de la muestra de concentrado de proteína a distintas concentraciones.

La elaboración de los geles de Tris-tricina, se llevó a cabo, debido a que en estudios previos (Hernández 2007), se propone ésta técnica ya que resultó

más efectiva para separar con mayor resolución aquellas proteínas de bajo peso molecular de 5 a 20 kDa (Schägger y Von Jagow 1987), comparada con la técnica de SDS-PAGE.

En un gel de SDS-PAGE se registran nueve bandas, el intervalo de pesos moleculares es de entre 12 a 57 kDa, mientras que en el gel Tris-tricina se registran ocho bandas con pesos moleculares que caen dentro de un intervalo de 16 a 55 kDa.

Tabla 6. Cantidad relativa y pesos moleculares de las bandas de las fracciones proteínicas del CP.

Banda	Peso molecular (kDa)	Cantidad relativa (%)
1	54.9	2.4
2	50.4	6.7
3	35.8	3.5
4	<b>33.4</b>	<b>11.6</b>
5	<b>24.6</b>	<b>12.4</b>
6	21.1	2.4
7	19.9	3.9
8	16.5	4.3

Durante el proceso de electroforesis, las proteínas se encuentran en contacto con agentes desnaturizantes, que tienen como finalidad desdoblarse a la proteína. En la figura 3 se observa que el concentrado de proteína CP, se compone de ocho conglomerados o subunidades de proteínas. En la Tabla 6 se reporta la cantidad relativa de cada una de las fracciones así como sus pesos moleculares, en ella se observa que las fracciones que más abundan, cuyas cantidades relativas corresponden a 11.6 y 12.4%, son aquellas que tienen un peso molecular de 33.4 y 24.6 kDa, respectivamente. Los geles que

se desarrollaron por el procedimiento Tris-tricina, resultan más factibles para la separación de las proteínas.

### **3.3.1 Precipitación de proteínas con ácido tricloroacético (TCA)**

En estudios anteriores (Hernández 2007), la técnica de precipitación de proteínas con ácido tricloroacético (TCA), había resultado efectiva para la purificación de proteínas, este procedimiento consiste en la precipitación de las proteínas en pellets con 200  $\mu$ L de muestra (PET System). Debido a que las bandas de los geles anteriores se observan difusas se utilizó una técnica de precipitación de proteínas con ácido tricloroacético (TCA) al 15% con la finalidad de obtener una muestra de CP libre de impurezas (Protein precipitations procedure 2007); el precipitado resultante se secó en estufa de vacío (50 °C/12 h), a éste se le denominó CPTCA, el cual se sometió nuevamente a electroforesis y el gel resultante se muestra en la figura 4. Las condiciones de ensayo fueron las mismas, así como la dilución utilizada de 50  $\mu$ g/mL, por duplicado.

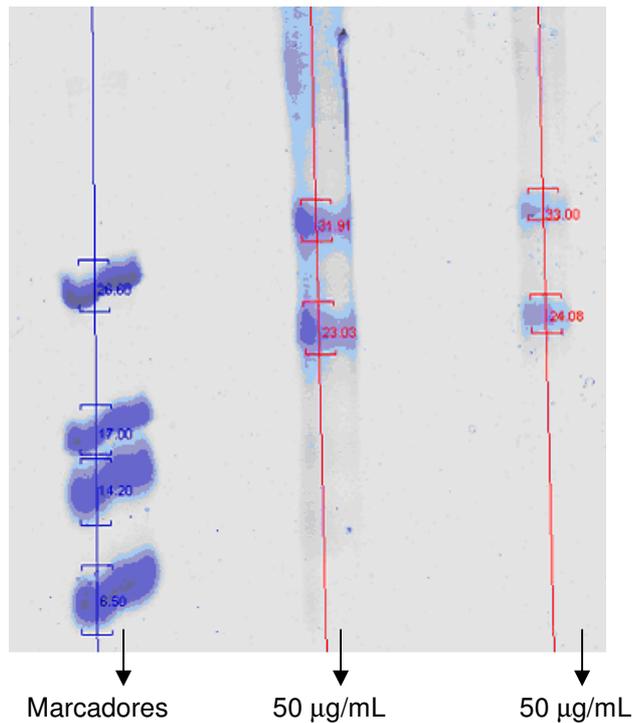


Fig. 4. Gel de electroforesis Tris-tricina de la muestra CPTCA

La figura 4 muestra sólo dos bandas con pesos moleculares que corresponden a 33.0 y 24.1 kDa. Este resultado indica que la mayoría de las fracciones de proteína se pierden durante el proceso de precipitación, posiblemente por el pH al que se trabaja que es muy ácido y las proteínas (extraídas a pH 11) no se solubilizan; de hecho el contenido de proteína soluble disminuyó desde 70 hasta 52 (g de proteína soluble/100 g de CP) aproximadamente; sin embargo se puede decir que las fracciones que se observan en este gel corresponden a las que se encuentran en mayor concentración en el concentrado de proteína (CP) reportadas en la figura 3 con pesos moleculares de 33.4 y 24.6 kDa, mismas que se presentan en la figura 4, concentración 50 µg/mL.

Se sugiere que para determinaciones posteriores se aplique una técnica de elaboración de un gel que consiste de tres partes, el gel concentrador, gel “spacer” y gel separador. El “spacer” gel se omite cuando las proteínas

menores a 5 kDa no son importantes de separar (Schägger y Von Jagow, 1987), y para este estudio dichos péptidos sí son importantes.

### **3.3.2 Elaboración de películas a partir del precipitado (CPTCA)**

A partir del precipitado CPTCA se llevó a cabo la elaboración de películas, siguiendo la técnica descrita por Bamdad (2005). La película resultó defectuosa, ya que se formó un gel espeso de color café oscuro (más intenso que el de la película de muestra CP), muy frágil, delgado, pegajoso y de aspecto viscoso, que al intentar despegar del molde se rompía totalmente. Con lo anterior, se descarta la técnica de purificación con ácido tricloroacético al 15%. Es posible que las proteínas de bajo peso molecular (5 a 20 kDa) se pierdan durante la precipitación de proteínas, ya que las bandas correspondientes no aparecen en el gel de la figura 4. En relación con lo reportado por Gennadios y Weller (1991) la purificación con TCA afecta la conformación de la proteína, impidiendo que se produzcan interacciones intermoleculares, por lo que la película no se forma. Además se demostró en estudios anteriores, que los péptidos de peso molecular menor a 5 kDa, son importantes para la formación de las películas (Hernández 2007).

### **3.4 Caracterización de los pesos moleculares de las fracciones proteínicas del CP mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) por permeación en gel**

Con el objetivo de separar las fracciones de proteínas que componen la muestra CP, así como las condiciones necesarias para dicho fin, se realizó un análisis cromatográfico de la muestra. La separación se basó en la diferencia de los pesos moleculares de las distintas fracciones, por medio de la cromatografía de permeación en gel.

Con el fin de estandarizar las condiciones de electroforesis y de cromatografía, la determinación se llevó a cabo utilizando la muestra de CP, disuelta en agua destilada a pH 7, posteriormente se agregó SDS al 4% (de acuerdo con el contenido de SDS presente en el buffer de tratamiento para electroforesis). Una vez que la muestra CP-SDS (1.6 mg/mL) fue sometida al proceso de cromatografía líquida de alta resolución se registraron tres señales, el cromatograma se muestra en la figura 5; los pesos moleculares de las señales correspondientes se muestran en la Tabla 7.

Para desdoblar y fraccionar la muestra de CP, se utilizó el detergente SDS, con una concentración de CP distinta, la figura 6 muestra el cromatograma del ensayo de la misma muestra al doble de concentración (3.2 mg/mL), en el que se observan picos con poca resolución y una línea base con interferencia, que posiblemente se deba a que la concentración de la muestra sigue siendo baja por lo que el detector no percibe las señales de todas las fracciones de las proteínas que componen el concentrado de proteína CP. Los pesos moleculares de las fracciones que mostraron señal en las figuras 5 y 6 se reportan en la Tabla 7.

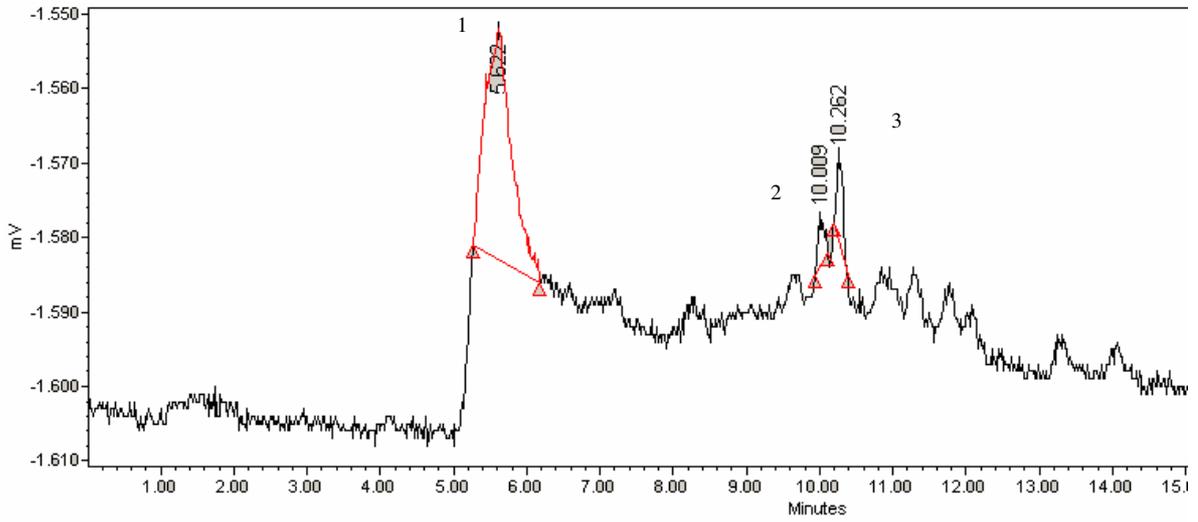


Fig. 5. Cromatograma muestra CP-SDS (1.6mg/mL, Loop 20 µL)

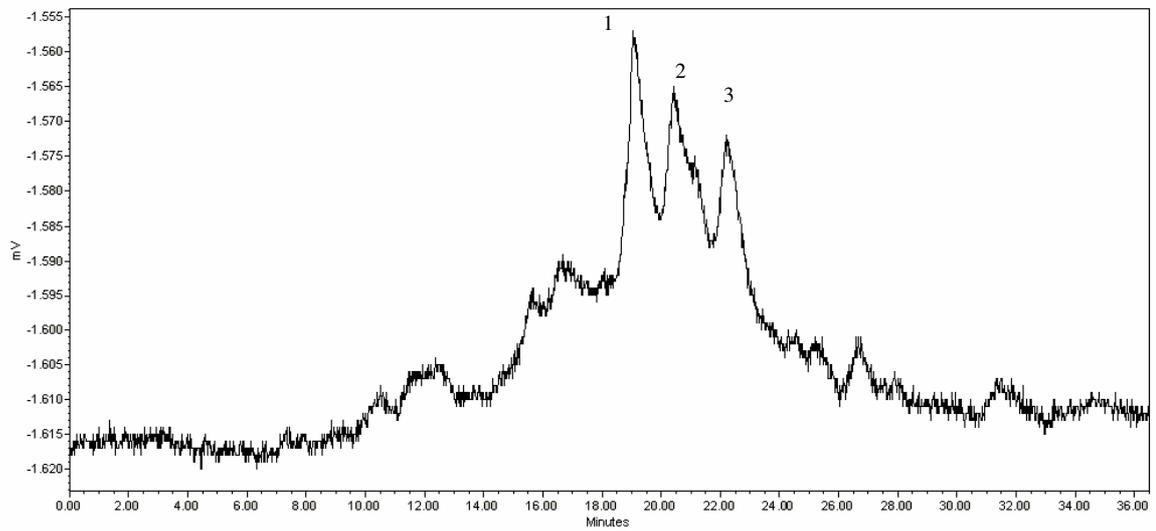


Fig. 6 Cromatograma muestra CP-SDS (3.2 mg/mL, Loop 20 µL)

Tabla 7. Resultados de la determinación de PM de las fracciones de proteína en la muestra CP

Señal	Pesos moleculares (kDa) CP-SDS (1.6 mg/mL)	Pesos moleculares (kDa) CP-SDS (3.2 mg/mL)
1	776.0	155.9
2	32.8	88.1
3	27.9	44.0

Los resultados de la Tabla 7 demuestran que el SDS funciona de una manera más eficiente al aumentar la concentración de la muestra. Para los resultados de la concentración 3.2 mg/mL, las señales registradas en la figura 6, corresponden a los siguientes pesos moleculares de: 155.9, 88.1, 44.0 kDa. Ninguna de las fracciones registradas en ésta figura corresponden a las fracciones descritas en el gel de electroforesis (figura 3).

De acuerdo con la curva de calibración es posible interpolar las señales registradas para la muestra CP (1.6 mg/mL) de la figura 5, en la que se obtienen pesos moleculares de 776.0, **32.8 y 27.9** kDa.

Las fracciones de las señales 2 y 3 en la Tabla 7, presentan un peso molecular de 32.8 y 27.9 kDa que es similar al de las bandas 3 y 4 en el gel de electroforesis (figura 3) con pesos moleculares de 35.8 y 24.6 kDa, respectivamente; sin embargo el peso molecular correspondiente a la señal 1 se encuentra por encima de los pesos moleculares de las demás fracciones registradas en el gel. Esta diferencia, quizá se deba a la concentración de la muestra, ya que al ser baja las señales presentan interferencia, en la técnica cromatográfica. Otra causa es quizá el pH de trabajo, en la técnica de electroforesis el pH fue de 11 (solubilidad de proteínas de chíá) y el pH de la técnica de cromatografía fue de 7, esto por las indicaciones de la propia

columna. Por esto las proteínas se comportaron de forma diferente debido a que el pH influye en el desdoblamiento de las mismas.

Se llevó a cabo otra prueba en la que se utilizó una precolumna, con la finalidad de inyectar una mayor cantidad de muestra, la precolumna preconcentra la muestra antes de hacerla pasar propiamente por la columna, con esto la separación resulta más efectiva y los picos se resuelven de mejor manera. De la misma forma, para lograr incrementar la cantidad de proteína durante la corrida se decidió incrementar el volumen de inyección de 20  $\mu\text{L}$  a 200  $\mu\text{L}$ ; la muestra se preparó mediante la suspensión de la muestra CP en agua destilada a pH 7. La figura 7 muestra el cromatograma de dicho ensayo.

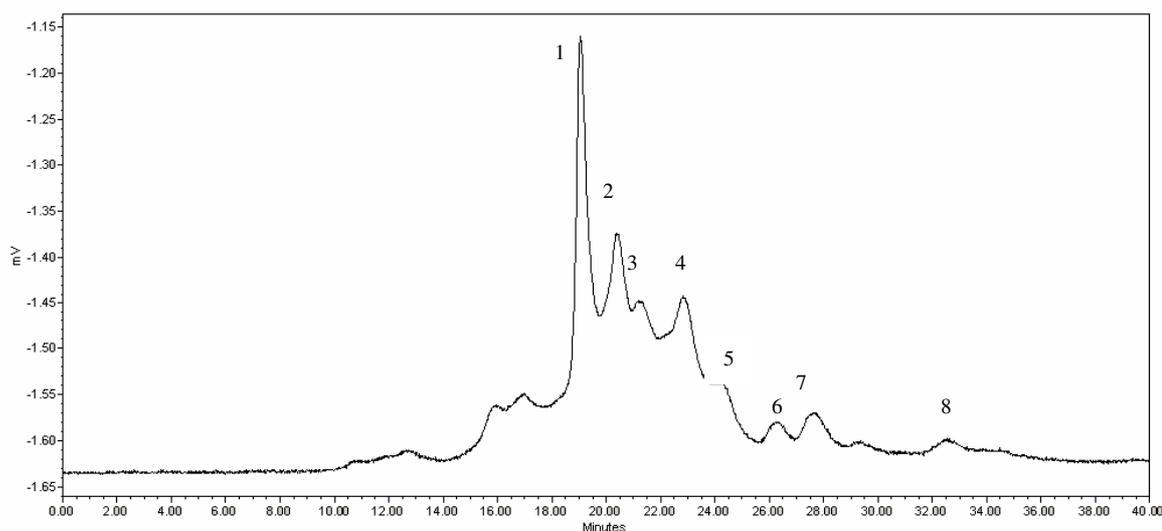


Fig. 7 Cromatograma muestra CP (3.2 mg/mL inyección 200  $\mu\text{l}$ )

En esta figura 7, se observan ocho picos con buena separación, poca interferencia y buena resolución, los pesos moleculares que corresponden a las señales del cromatograma, se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Pesos moleculares correspondientes a las señales registradas en el cromatograma

Fig. 7

Señal	Pesos moleculares (kDa) CP 3.2 mg/mL
1	163.8
2	94.3
3	66.2
4	<b>35.3</b>
5	<b>19.2</b>
6	9.0
7	7.2
8	5.0

De acuerdo con la Tabla 8, los pesos moleculares de 35.3 y 19.2 kDa, registrados de las señales 4 y 5, corresponden a las bandas 3 y 7 (33.4 y 19.9 kDa) del gel de electroforesis de la figura 3, este resultado es congruente en ambas técnicas, gracias a que la solución de proteína soluble que se sometió tanto a electroforesis como a cromatografía mostró un desdoblamiento similar en ambas técnicas; por lo tanto las condiciones de trabajo de este cromatograma son las más adecuadas.

Para llevar a cabo una mejor separación de las fracciones se decidió establecer condiciones similares a las de la electroforesis, es decir, la muestra de concentrado se sometió a una desnaturalización con SDS (Dodecil sulfato de sodio) al 4% w/v. La figura 8 muestra el cromatograma del ensayo de una muestra de concentrado de proteína y SDS al 4%, bajo las condiciones de la prueba anterior.

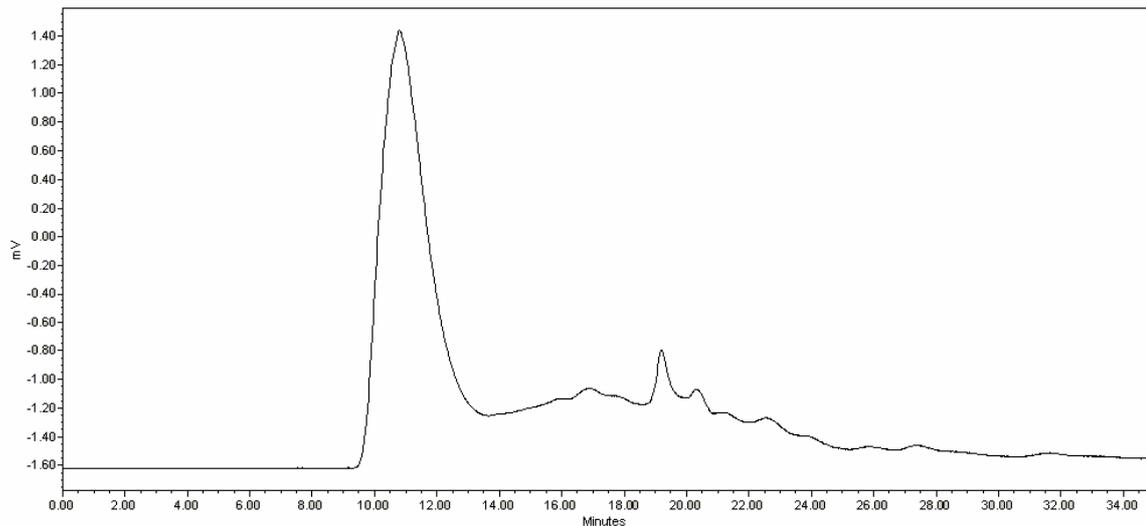


Fig. 8 Cromatograma muestra CP-SDS 3.2 mg/mL (inyección 200  $\mu$ l)

En la figura 8 se observa buena resolución de los picos, sin embargo indica que la muestra se compone principalmente de una fracción de alto peso molecular, alrededor de 700 kDa, que es similar a la señal 1 del cromatograma de la figura 5; posiblemente haya otras dos fracciones de un peso molecular más bajo, cuyas señales son bajas. Este resultado quizá se debe a que las fracciones más pequeñas se agregaron, es decir que se enlazaron a las fracciones más grandes formando una sola fracción de peso molecular muy alto (Yong y Rhee 2004). Otra de las posibles explicaciones es que en la electroforesis se requiere de un potencial eléctrico para su separación y en la cromatografía no, en ella se lleva a cabo la separación mediante el tamaño de los péptidos que pasan a través de una matriz de Sephadex.

Las proteínas caracterizadas por medio de la técnica de cromatografía mediante permeación en gel, muestran características de flexibilidad, capacidad de desnaturalización y desdoblamiento en cadenas extendidas, con ellas logran formar geles, por lo que tienen la capacidad de formar películas; sin embargo se ha mencionado en la literatura que no pueden fraccionarse del

todo, debido a que al ser fraccionadas buscan rápidamente la unión con otras para formar amplias redes intermoleculares entrecruzadas (Damodaran 1997).

### **3.5 Hidrólisis ácida de polisacáridos**

Debido a que la muestra CP presenta un contenido alto de carbohidratos (12.8%), se llevó a cabo una hidrólisis ácida con el objetivo de evitar la interferencia de los carbohidratos en las determinaciones de electroforesis y cromatografía, respectivamente, así como para disminuir su contenido; para ello se establecieron las mismas condiciones que se requieren para la desnaturalización de las proteínas, durante el proceso de la formación de películas, a partir de la muestra de CP. El contenido de polisacáridos se sometió a tratamiento térmico de 70 °C con agitación constante, durante 1h a pH 2.5. Se ha reportado que la digestión enzimática del contenido de fibra no es del todo posible debido a la presencia del mucílago en la muestra de CP (Reyes–Caudillo et al. 2007).

De la misma forma, se llevó a cabo la hidrólisis de polisacáridos contenidos en una muestra del mucílago aislado (liofilizado para su separación a partir de la semilla de chía), esta muestra se estableció como control, ya que el contenido de polisacáridos del CP proviene directamente de esta fuente. Cabe mencionar que el concentrado de proteína de chía CP se obtiene de la semilla de chía sin haber eliminado el mucílago.

Una vez que se llevó a cabo la hidrólisis de polisacáridos en las muestras tanto de mucílago como de CP, se determinó el contenido de azúcares reductores. Un azúcar hidrolizado, se caracteriza porque en su molécula se produce un extremo reductor, que puede medirse mediante el método de DNS. Para

comprobar la efectividad de la hidrólisis en ambas muestras, se llevó a cabo la cuantificación de los azúcares reductores; en la Tabla 9 se compara el contenido de carbohidratos solubles totales antes de la hidrólisis y el contenido de azúcares reductores tanto del control como del CP, después de la hidrólisis.

Tabla 9. Determinación de carbohidratos reductores por DNS en la muestra control y en el CP  
(g/100 g de muestra)

Carbohidratos solubles totales		Carbohidratos reductores	
Mucílago (g /100 g de mucílago)	Concentrado de proteína (g /100 g de CP)	Mucílago (g /100 g de mucílago)	Concentrado de proteína (g /100 g de CP)
5.0	12.8	0.9	1.9

En la Tabla 9 se muestran los resultados de las determinaciones de carbohidratos totales y reductores, de una muestra de CP y otra de mucílago, una vez sometidos al proceso de hidrólisis ácida. Como ya se había mencionado se esperaba hidrolizar el contenido de ácidos urónicos (AU) de las fracciones de fibra dietética soluble (FDS) y de fibra dietética insoluble (FDI), es decir 0.8 (g de AU/100 g de CP); el contenido de azúcares reductores 1.9 (g de azúcares reductores/100 g de CP) en el concentrado de proteína CP, indica que la hidrólisis resultó efectiva, es decir que además de hidrolizar la fracción de fibra antes mencionada, los polisacáridos asociados con las proteínas posiblemente se separaron de éstas una vez que se desnaturalizan las mismas, y como resultado las moléculas de carbohidratos mostraron un extremo reductor, que se determinaron por el método DNS. Por lo que se propone que la interacción que se presenta entre las moléculas de

polisacáridos y las proteínas, son del tipo de glucoproteínas, que pueden modificarse parcialmente a través de una hidrólisis ácida de polisacáridos.

El mucílago de semilla de chía, se ha propuesto que tiene una estructura de tetrasacárido, la cual contiene residuos de D-xilosa, D-glucosa y D-ácido glucurónico (Kuei-Ying et al. 1994).

El contenido de carbohidratos solubles del mucílago 5.0 (g de carbohidratos/100 g de mucílago), se aproxima al contenido de FDS de la semilla de chía, de 6.84 (g de FDS/100 g de semilla de chía) reportado por Reyes–Caudillo et al. (2007), que puede variar dependiendo de la variedad de la semilla de chía. Una vez que se somete a hidrólisis se obtiene un valor de 0.9 (g de azúcares reductores/100 g de mucílago) que corresponden a la fracción de  $AU_{FDS}$  en la semilla (Tabla 5).

Por lo anterior se puede decir que durante la extracción del CP, se obtiene una mezcla de proteínas y polisacáridos, que interactúan de tal manera que pueden llegar a formar geles, en este caso, para la formación de una película comestible.

Hay estudios (Damodaran 1997) que comprueban que la mayoría de los geles de alimentos, contienen una mezcla de diferentes proteínas o proteínas en combinación con polisacáridos. Se ha observado que en esas mezclas las interacciones moleculares de los componentes individuales, tienen gran influencia en las características de gelación. Las interacciones entre proteínas y polisacáridos pueden tener tres consecuencias, (1) la co-solubilidad – en donde no hay interacciones significativas entre las dos clases de polímeros y ambos coexisten en solución; (2) la incompatibilidad – en donde la repulsión entre los dos tipos de polímeros causa su separación en distintas fases; o (3) la

formación de un complejo – donde la atracción entre los dos polímeros causa la formación de una fase simple o un precipitado (Damodaran 1997).

Para incrementar el poder reductor de los polisacáridos se puede realizar una hidrólisis con soluciones ácidas de mayor concentración, sin embargo este proceso no es posible debido a que se puede llegar a afectar la conformación de las proteínas de manera más agresiva, evitando las interacciones proteína-proteína y provocar que las películas no se formen. Por otro lado, los métodos de hidrólisis enzimática han tenido resultados satisfactorios en diferentes investigaciones, así Chen y colaboradores (2008), encontraron que los polisacáridos de materiales lignocelulósicos incluyendo la celulosa y la hemicelulosa pueden hidrolizarse y dar lugar a monosacáridos tales como glucosa y xilosa catalizadas por enzimas hidrolíticas a partir de bacterias lignocelulósicas (Chen et al. 2008).

### **3.6 Separación de las fracciones de bajo peso molecular mediante la técnica de ultrafiltración.**

Para lograr una separación física del contenido de carbohidratos de la muestra de concentrado de proteína se llevó a cabo el método de separación llamado ultrafiltración, en el que se busca separar mediante una membrana de celulosa regenerada, aquellas moléculas que se encuentren alrededor de un peso molecular de 1 kDa; además de que su principal uso es para concentrar proteínas. De la separación de una la muestra de CP en solución (3 mg/mL), resultaron dos fracciones, la fracción que no atravesó la membrana se le llamó concentrado y la que atravesó la membrana se le llamó permeado. A cada una

de las fracciones se les determinó el contenido de carbohidratos, esto para llevar a cabo el balance de materia y comprobar que realmente se llevó a cabo la separación, los resultados se muestran en la Tabla 10.

Por otro lado, se determinó el contenido de proteína soluble, para verificar el contenido de la misma y comprobar que el método de ultrafiltración y/o hidrólisis ácida, no afectara la muestra, los resultados se muestran en la Tabla 10 respectivamente.

Tabla 10. Comparación del contenido de carbohidratos y proteína antes y después de la hidrólisis

(g de componente/ 100 g de muestra)	Concentrado de proteína	Concentrado	Permeado
Contenido de carbohidratos totales	12.8	8.4	6.4
Contenido de proteína soluble	70.8	67.9	5.8

Para llevar a cabo el balance de materia, haciendo uso de los valores de proteína soluble presentados en la Tabla 10, se utilizó la siguiente fórmula:

$$0.708 (MF) = 0.679 (MC) + 0.058 (MP)$$

Donde MF es la masa alimentada; MC la masa del concentrado y MP la masa del permeado.

De acuerdo con el balance de carbohidratos en relación a los valores de la Tabla 10, se observa que el contenido total de carbohidratos que se obtiene en el concentrado y en el permeado es de 0.012 g carbohidratos, un valor menor que 0.019 g de carbohidratos, que es el contenido inicial de carbohidratos en la muestra CP. Por otro lado el valor del contenido de proteína corresponde en el permeado y en el concentrado a 0.083 g de proteína, comparado con el inicial de 0.10 g de proteína, es muy próximo. En ambos balances de materia

existe la pérdida de masa, ya que la masa que inicialmente se sometió a ultrafiltración no se obtiene en la suma de las masas del concentrado y del filtrado.

Para que el método de ultrafiltración se considere efectivo, basado en el balance de materia, debe cumplirse la fórmula, es decir que el contenido de los componentes presentes en la alimentación, debe ser igual al contenido de los componentes presentes en el concentrado y en el permeado. La pérdida de masa se puede atribuir a la manipulación de la muestra, sin embargo el orden de magnitud es el mismo en ambos balances por lo que se considera efectivo el método, que se deba quizá a la propia manipulación de la muestra de CP. Otra posible causa es que durante la recuperación del concentrado (muestra a la que se le denominó (CPUF)), se perdió cierta cantidad de masa.

### **3.6.1 Caracterización de pesos moleculares del concentrado (CPUF), mediante la técnica de electroforesis**

En esta etapa el concentrado (CPUF) se sometió al procedimiento de electroforesis, esto para comprobar la efectividad de la separación de las fracciones de bajo peso molecular mediante la ultrafiltración, el procedimiento fue el mismo que se menciona anteriormente, de Tris-Tricina (figura 3).

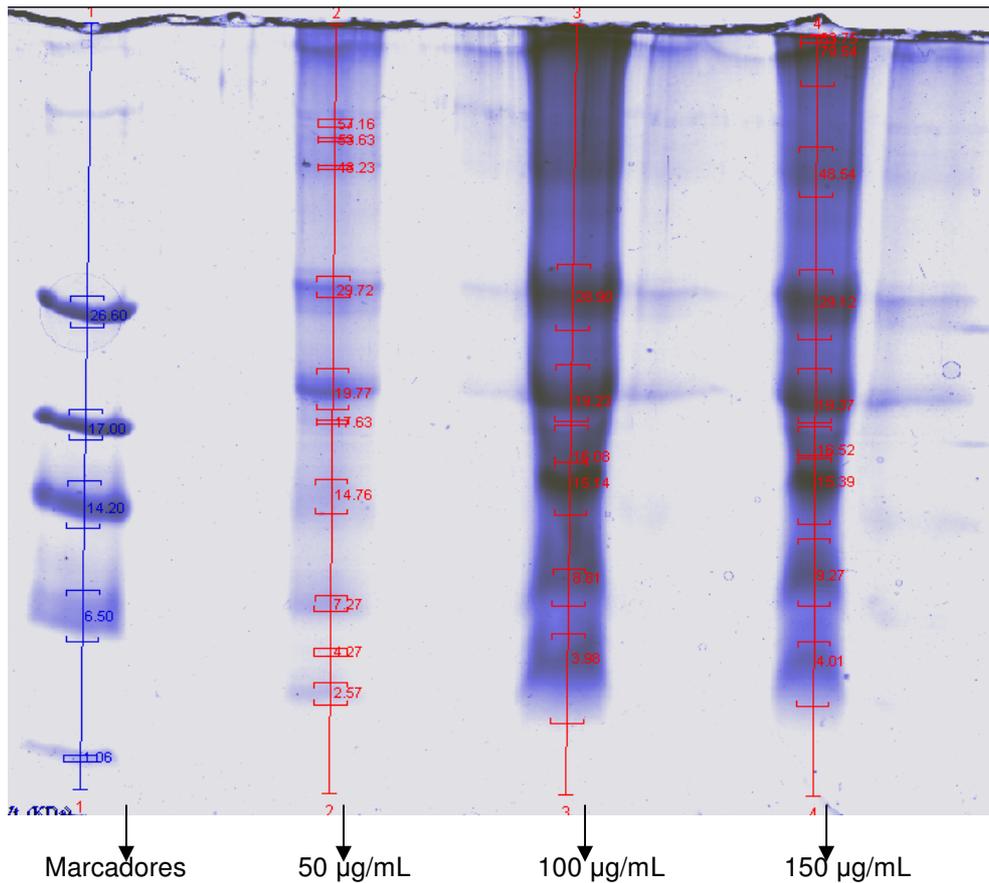


Fig. 9. Gel de electroforesis Tris-tricina del permeado de concentrado de proteína (CPUF)

La figura 9 muestra el gel de electroforesis a distintas concentraciones, los resultados que se reportaron, son los que corresponden a la concentración de 50 µg/mL; en el se observan bandas más marcadas, comparadas con las de la figura 3, se observa un mayor número de bandas, se registraron diez bandas con pesos moleculares de 57.2, 53.6, 48.2, 29.7, 19.8, 17.6, 14.8, 7.3, 4.3, 2.6 kDa. También se observa que la membrana cumplió con su función, ya que no dejó atravesar moléculas con peso molecular mayor a 1 kDa.

Comparando los pesos moleculares de la figura 9 con los de la figura 1, se observa que las fracciones de las proteínas se separan mejor cuando se someten a un proceso de hidrólisis ácida, de hecho se resuelven las bandas de pesos moleculares bajos, esto se debe quizá a la separación de los

carbohidratos y a la vez se confirma la posibilidad de la asociación de ciertas moléculas de polisacáridos con las proteínas que al ser hidrolizados liberan a las fracciones de las proteínas y se observan en el gel. Este hecho confirma la efectividad de la hidrólisis ácida como parte del proceso de purificación de la muestra de proteínas.

Comparando los mismos pesos moleculares del gel con los pesos moleculares del cromatograma de la figura 7, son más congruentes entre sí y se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11. Comparación de PM de las técnicas de cromatografía y electroforesis de una muestra de CP y CPUF

Señal	Peso molecular kDa (CP <sub>HPLC</sub> )	Peso molecular kDa (CPUF <sub>Tris-tricina</sub> )
1	163.8	57.2
2	94.3	53.6
3	66.2	48.2
4	35.3	29.7
5	<b>19.2</b>	<b>19.8</b>
6	9.0	17.6
7	<b>7.2</b>	14.8
8	<b>5.0</b>	<b>7.3</b>
9		<b>4.3</b>
10		2.6

Las fracciones más similares son la señal 5, 7 y 8 del CP<sub>HPLC</sub>, con las señales 5, 8 y 9, las demás son aproximadas a excepción de la primera que, como ya se había sugerido la posibilidad de unión de fracciones de pesos moleculares bajos con pesos moleculares altos, es la razón por la que difieren unas de otras.

### 3.6.2 Caracterización de los pesos moleculares del concentrado (CPUF) mediante HPLC.

Se llevó a cabo el ensayo de la muestra CPUF, la muestra sólida (32 mg), fue disuelta en 10 mL de agua (pH 7). La dispersión se filtró y se hizo pasar por la columna BIOSEP-SEC-2000 y la precolumna, con un volumen de inyección total de 200  $\mu$ L.

La muestra del hidrolizado de concentrado de proteína fue sometida a las mismas condiciones de la muestra de CP, con un buffer de fosfatos como fase móvil. La figura 10 muestra el ensayo del concentrado de proteína hidrolizado en el que se observa que los picos resultan juntos, en el que no se aprecian del todo bien.

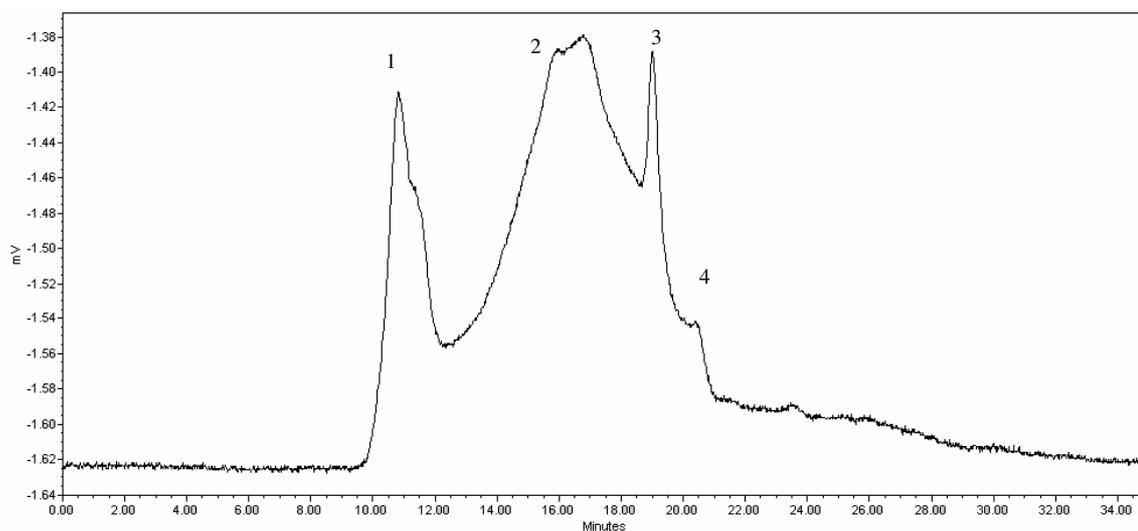


Fig. 10 Cromatograma muestra CUF 3.2 mg/mL (200  $\mu$ L)

Las señales de la figura 10, se observan muy juntos muestran los pesos moleculares reportados en la Tabla 12.

Tabla 12. Resultados de los pesos moleculares correspondientes a las señales de la figura 8.

Señal	Peso molecular kDa
1	4566.7
2	583.4
3	167.6
4	91.8

Ninguno de los pesos moleculares corresponde con los registrados en el gel de electroforesis de la figura 9, por lo que se procedió a llevar a cabo un tratamiento de la muestra que consiste en agregar SDS al 4%, con el fin de desnaturalizar las fracciones y separarlas mediante la cromatografía.

En el cromatograma de la figura 11 se eluyó una muestra del concentrado de proteína hidrolizado con SDS al 4%. Se observa una señal mayoritaria con un peso molecular de 3657 kDa aproximadamente, las demás bandas no se observan del todo bien, sin embargo los pesos moleculares correspondientes se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13. Resultados de los pesos moleculares correspondientes a las señales de la figura 9.

Señal	Peso molecular kDa
1	3657.6
2	1256.8
3	825.0
4	292.2
5	161.1
6	97.1

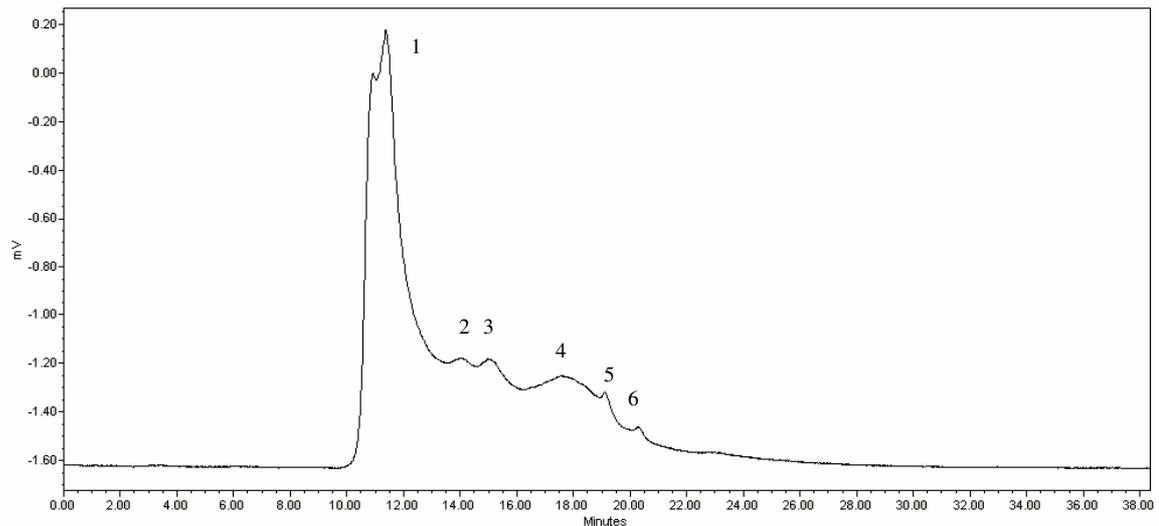


Fig. 11 Cromatograma muestra CUF-SDS 3.6 mg/mL (200  $\mu$ L)

El tratamiento anteriormente sugerido no fue efectivo para la separación de las fracciones de proteína de la muestra, por lo que, no se recomienda para determinaciones posteriores. El tratamiento más efectivo para la separación fue que corresponde a la figura 7, en que la muestra de CP se hace pasar por la columna en solución a pH 7, y sin ningún otro reactivo que pueda desnaturalizarla.

Cabe mencionar que durante la ultrafiltración el concentrado (CPUF) mostró una apariencia de sol, con un color café más intenso, que pudo ser provocado por que el CP estuvo disuelto en solución alcalina (proceso que antecede a la formación de la película) y a su vez sometido a un proceso térmico (desnaturalización parcial de proteínas), que al concentrarse es decir, eliminando agua durante la ultrafiltración, formó un sol.

Como ya se había mencionado la gelación de las proteínas consiste en la agregación ordenada de moléculas desnaturalizadas, para dar origen a una red continua. Se ha observado que la gelación se ve influida, entre otras circunstancias por el calentamiento, el pH, la fuerza iónica y la concentración

proteínica (Damodaran 1997), condiciones que fueron favorecidas durante la obtención del concentrado (apartado 2.8). La desnaturalización parcial o completa es necesaria para la gelación de hecho una proteína completamente desnaturalizada casi siempre forma precipitados insolubles a causa de enlaces de puentes de hidrógeno o interacciones hidrofóbicas entre cadenas de proteína desdobladas. Una completa desnaturalización de proteínas probablemente dará geles sólo en presencia de solventes tales como urea, que previenen enlaces no covalentes entre cadenas. Durante la desnaturalización mediante calor, la concentración de la proteína es importante; altas concentraciones probablemente dan precipitados, y bajas concentraciones dan probablemente geles (Damodaran 1997).

Por lo anterior, las fracciones de proteínas del CPUF son menores en número, ya que formaron algunos conglomerados entre ellas mismas, haciendo más difícil su separación al someterse a la técnica cromatográfica, por lo que sólo se observan picos débilmente resueltos y un menor número de los mismos, figuras 10 y 11, respectivamente.

### **3.6.3 Elaboración de películas a partir del concentrado**

Una vez efectuada la ultrafiltración de la muestra de CP hidrolizada, la fracción del concentrado (CPUF) se separó, se sometió a un secado en estufa de vacío a 50 °C por toda una noche, y posteriormente se formó la película con el sólido seco y un plastificante que fue glicerol en una concentración de 50% (w/w), basado en los estudios de Hernández (2007).

Como se mencionó anteriormente, la primera etapa de la formación de un gel proteico la constituye la desnaturalización y la segunda consiste en la agregación de las moléculas desnaturalizadas. Las características del gel vienen dadas por el tipo y naturaleza de los enlaces cruzados, intra o intermoleculares, implicados en su formación. Estos enlaces pueden ser covalentes o no covalentes; entre los enlaces no covalentes implicados, se encuentran puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas, y entre los covalentes se encuentran los puentes disulfuro. Los puentes disulfuro contribuyen a la formación inicial y a la ordenación de la red del gel, en tanto que los no covalentes participan en la estabilización

- **Enlaces no covalentes.** Son enlaces débiles, pero le confieren gran fuerza a la red.

- Electrostáticos: dependen del pH y la concentración de sal.

- Puentes de hidrógeno y fuerzas hidrofóbicas son muy dependientes de la naturaleza del agua como solvente. Por que el agua actúa como donador y aceptor de hidrógeno.

- **Enlaces covalentes**

- Enlaces disulfuro. Entre los residuos de cistina, que estabiliza la estructura de muchas proteínas; son de gran fuerza pero se rompen mediante compuestos reductores y agentes oxidantes como peróxidos (Damodaran 1997).

El resultado fue la formación de la película de color caramelo, que tardó en formarse una noche, por lo que se comprueba que la hidrólisis no afecta la formación de la película. En la figura 12 se muestra la fotografía de una película formada a partir del CPUF.



Figura 12. Fotografía de una película de CPUF de chíá.

La comparación de la elaboración de películas a base de un CPUF, con las películas elaboradas a partir de un CP, consiste principalmente en la pureza de las proteínas que como ya se había mencionado, el tratamiento de hidrólisis ácida que antecede a la ultrafiltración es eficaz para purificarlas y se corrobora con el gel de electroforesis. En apariencia ambas películas son similares, excepto por la diferencia en el color, la película CPUF es de un café aún más oscuro.

El color caramelo o café de las películas es porque los enlaces covalentes entre proteínas también pueden ser formados mediante la reacción de Maillard. Las reacciones de Maillard son una serie de reacciones complejas entre compuestos amino y carboxilo. Cuando las proteínas son sometidas a calentamiento con azúcares reductores se forman enlaces covalentes, que contribuyen a la formación de red de geles. Al mismo tiempo, hay una caída de pH que pueden contribuir a la gelación. No está completamente claro cómo los

carbohidratos contribuyen a la gelación; se esperaría que los residuos de azúcares incrementaran la solubilidad de proteína y los largos carbohidratos adjuntos se esperaría incrementaran el potencial de enlace (Damodaran 1997). De acuerdo con los estudios de Zhang y colaboradores (2007), el método de pretratamiento para la extracción del concentrado de proteína para la formación de películas, influye en las propiedades mecánicas, así como en la tonalidad de la película, aquellos tratamientos ácidos exhiben películas transparentes, mientras los tratamientos con álcalis, exhiben colores oscuros (Zhang et al. 2007).

En estudios previos (Hernández 2007) se ha demostrado la formación de películas a partir de CP, este concentrado muestra un contenido de carbohidratos, difícil de eliminar, y que pueden ayudar a formar la red proteínica que da lugar a la película. Cuando los polímeros pueden formar redes de forma independiente, se dan tres formas de estructura extremas:

1. Redes interpenetradas, donde los dos polímeros se enlazan de forma mutua.
2. Red de fase-separada, en la que el dominio de A se encuentra contenido en la dominio de B.
3. Red complementada o copulada, en la que la mínima zona de unión involucra ambos polímeros (Damodaran 1997).

La forma en la que se pueden mezclar ambos sistemas poliméricos se muestra en la figura 13.

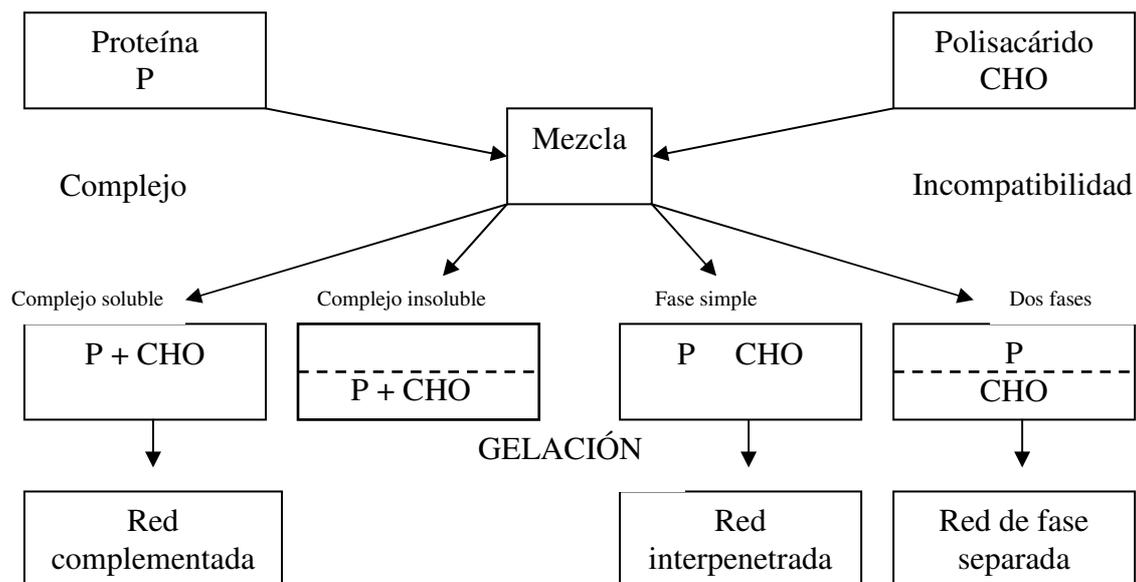


Fig. 13. Posibles interacciones de proteínas y polisacáridos, sus consecuentes mezclas para la formación de geles (Damodaran, 1997).

La posible interacción de sistemas es la que forma una red complementada, ya que en apariencia el gel se muestra totalmente uniforme y le antecede un complejo soluble.

La estructura lineal de algunos polisacáridos le brinda resistencia, flexibilidad y transparencia a sus películas (Tharanathan 2003).

Estas películas muestran ciertas propiedades mecánicas, que en comparación con los plásticos comerciales para el empaque de alimentos, son más efectivas para el incremento en la vida de anaquel de una matriz alimentaria (Alvarado 2008), entre las que se encuentran, la permeabilidad al vapor de agua y la permeabilidad al oxígeno.

Las propiedades mecánicas de las película a base de proteínas son mejores que las de polisacáridos debido a que las proteínas poseen una estructura

única (basada en 20 monómeros) que le confiere mayores posibilidades de propiedades funcionales en especial un alto potencial de enlace intermolecular (Ou et al. 2005).

## CONCLUSIONES

- El concentrado de proteína presenta un alto contenido de carbohidratos solubles, que provienen principalmente del mucílago residual.
- El contenido de fibra dietética del concentrado de proteína indica que éste se compone principalmente de celulosa, hemicelulosa y lignina.
- Los polisacáridos presentes en el concentrado de proteína pueden ser parcialmente hidrolizados mediante el uso de soluciones ácidas.
- El concentrado de proteína está conformado de ocho conglomerados de proteína, de acuerdo con la técnica de electroforesis, que presentan pesos moleculares de 16.5 a 54.9 kDa.
- El concentrado de proteína está conformado de ocho conglomerados de proteína, según la técnica de cromatografía mediante permeación en gel, que presentan pesos moleculares de 4.9 a 163.8 kDa.
- Existen diferencias entre los pesos moleculares obtenidos de ambas técnicas debido a que las condiciones de preparación de la muestra, de cada una de los métodos son distintas.
- El concentrado de proteína hidrolizado y concentrado mediante ultrafiltración se compone de diez fracciones de proteína, según la técnica de electroforesis, cuyos pesos moleculares son: 2.6 a 57.2 kDa.
- El concentrado de proteína hidrolizado y concentrado mediante ultrafiltración mantiene la funcionalidad necesaria para elaborar películas.
- Es posible romper algunas interacciones entre moléculas de polisacáridos unidos a proteínas mediante una hidrólisis ácida de polisacáridos.

- Las fracciones de bajos pesos moleculares son las más importantes para la formación de las películas, fracciones por debajo de 20 kDa.
- Las fracciones de proteína que se encuentran en mayor concentración son las que poseen un alto peso molecular, de entre 40-20 kDa.

## BIBLIOGRAFÍA

- ✓ Andrews A. T. *Electrophoresis*. Clarendon Press Oxford, 2a. Edición, Nueva York, Pág 10-50, 1986.
- ✓ AOAC, 1995. Method official 981.10. Crude protein in meta. Block digestión method. Official methods of analysis of AOAC international, 16° edition. Cunnif P.
- ✓ Ayerza R. y Coates W., 2004. *Semillas de chíá: nueva fuente natural de ácidos grasos omega-3, antioxidantes y fibra dietética*. Southwest center of natural Products Research & Comerziolization, Office of arid Land Studies, The University of Arizona.  
<http://eatchia.crosswinds.net/chiasourcesp.htm>. consulta 10 marzo de 2008.
- ✓ Badui D.S. *Química de los alimentos*. Prentice Hall, 3ª. Edición, México D.F., Pág. 180-187, 1993.
- ✓ Bamdad F., Goli A.H., Kadivar M., 2006. *Preparation and characterization of proteinous film from lentil (Lens culinaris) Edible film from lentil (Lens culinaris)*. Food Research Internacional 39: 106-111.
- ✓ Beltrán-Orozco y Romero. *La chíá como alimento milenario*.  
<http://www.alfa-editores.com/historico/alimnaria/Sep%20Oct%202003%20IA%20La%20Chia%20Alimento%20Milenario.pdf>. Consulta 13 febrero de 2007.
- ✓ Bourtoom T., Chinnan M.S., Jantawat P, y Sanguandeeikul R., 2006. *Effect of plasticizer type and concentration en the properties of edible film from water-soluble fish proteins in surimi wash-water*. Food Science and Technology International 12: 119-126.

- ✓ Chen M., Zhao J., Xia L., 2008. *Enzymatic hydrolysis of maize straw polysaccharides for the production of reducing sugars*. Carbohydrate Polymers 71: 411-415.
- ✓ Damodaran S., Paraf A. *Food proteins and their applications*. Marcel Dekker, Inc. 1ª Edición, Nueva York, Capítulos 2, 4, 6 y 18, 1997.
- ✓ Dubois M., Gilles K.A., Rebers, P.A. & Smith, F., 1956. *colorimetric method for determination of sugars and related substances*. Analytical Chemistry, 28:3: 350-356.
- ✓ Fennema O.R. *Food Chemistry*. Marcel Dekker, Inc., 3ª. Edición, España. pág 388-394, 1996.
- ✓ Gennadios A. y Weller C.L., 1990. *Edible films and coatings from wheat and corn proteins*. Food Technology 42: 63-69.
- ✓ Gennadios A., Hanna M.A., y Kurth L.B., 1997. *Application of edible coatings on meats, poultry and seafoods: A review*. Lebensm.-Wiss u. Technology, 30: 337-350.
- ✓ Hernández J.G. *Proteínas de Chía (Salvia Hispánica), estudio para evaluar sus propiedades como formadoras de películas*. Tesis Licenciatura, UNAM, México D.F., 2007.
- ✓ Kuei-Ying L., James R.D., y Roy L.W., 1994. *Structure of chia seed polysaccharide exudate*. Carbohydrate polymers 23: 13-18.
- ✓ Lowry H., Rosebrough N.J., Lewis-Farr A. & Randall R.J., 1951. *Protein measurement with the folin phenol reagent*. Journal of Biological Chemistry, mayo 28: 265-275.
- ✓ Mahamadou E.G., Shi-Ying x., Zhang W., 2007. *Whey protein isolate-based edible film as affected by protein concentration, glycerol ratio and*

- pullulan addition inflim formation*. Journal of Food Engineering, 83: 521-530.
- ✓ Mañas E., Bravo L., & Saura-Calixto F., 1994. *Source of error in dietary fibre analysis*. Food Chemistry, 50: 331-342.
  - ✓ Nielsen S. *Food Análisis*. Kluwer Academic/ Plenium Publishers. 3<sup>a</sup> Edición, NY. Pág. 247-268, 2003.
  - ✓ Olivos L.B. *Estudio de las propiedades térmicas funcionales y nutritivas de la fracción proteínica de la semilla de Chía*. Tesis Licenciatura, UNAM, México D.F., Pág. 14-17, 26-28, 2005.
  - ✓ Ou S., Wang Y., Tang S., Huang C., Jackson M.G., 2005. *Role of ferulic acid in preparing edible films from soy protein isolate*. Journal of Food Engineering 70: 205-210.
  - ✓ Protein Precipitations Procedure.  
[http://www.biochem.uwo.ca/wits/bmsl/protein\\_precipitation\\_procedures.pdf](http://www.biochem.uwo.ca/wits/bmsl/protein_precipitation_procedures.pdf). Consulta 18 de octubre de 2007.
  - ✓ Reyes-Caudillo E., Tecante A., Valdivia-Lopez 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.
  - ✓ Schägger Herman y Von Jagow Gebhard, 1987. *Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the Separation of proteins in range from 1 to 100 kDa*. Analytical Biochemistry 166: 368-379.
  - ✓ Tharanathan R.N., 2003. *Biodegradable Films and composite coatings: past, present and future*. Trends in Food Science & Technology 14: 71-78.
  - ✓ Willard H. *Análisis Químico cuantitativo*. Editorial Marin, traducción, México. Pág 305-315, 1991.

- ✓ Yong C. S. y Rhee C., 2004. *Mechanical properties and water vapor permeability of edible films made from fractionated soy proteins with ultrafiltration*. Food Science and Technology 37: 833-83.
- ✓ Zhang S., Wang Y., Herring J.L., Oh H., 2007. *Characterization of edible film fabricate with channel catfish (*Ictalurus punctatus*) gelatin extract using selected pretreatment methods*. Journal of Food Science, 72: 498-503.