



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**FUNCIONALIZACIÓN ENZIMÁTICA DE PROTEÍNAS CON
ANTIOXIDANTES**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO DE ALIMENTOS**

PRESENTA

ALEJANDRO MENDOZA CANTÚ

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX.

2020





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesora María de los Ángeles Valdivia López

VOCAL: Profesor Alejandro Rafael Zavala Rivapalacio

SECRETARIO: Profesor Federico Nieto Pineda

1er. SUPLENTE: Profesor Roeb García Arrazola

2° SUPLENTE: Profesor Jonathan Trapala Reyna

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

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

ASESOR DEL TEMA:

M. en C. María de los Ángeles Valdivia López

SUSTENTANTE (S):

Alejandro Mendoza Cantú

Índice

Resumen	5
Introducción.....	7
Objetivos	8
Objetivo General	8
Objetivos Particulares	8
1. Antecedentes	9
1.1. Semilla de Chía.	9
1.1.1. Proteínas de chía	10
1.1.2. Antioxidantes de la semilla de chía.....	11
1.2. Empaques Activos.	13
1.2.1 Empaques proteínicos.	13
1.3. Deterioro químico oxidativo: Rancidez Oxidativa.....	17
1.3.1 Actividad Antioxidante.	19
2. Metodología	20
2.1. Caracterización de la chía.	21
2.2. Elaboración de las películas funcionalizadas de chía	22
2.2.1. Extracción de mucílago de la chía	22
2.2.2. Extracción del aceite de las semillas.....	22
2.2.3. Extracción de proteína.....	22
2.2.4. Cuantificación de la proteína en el pellet	23
2.2.5. Elaboración y funcionalización de películas.....	23
2.3. Caracterización y capacidad antioxidante.	23
2.3.1. Electroforesis sds-page.....	23
2.3.2. Cuantificación de polifenoles totales.....	24
2.3.3. Capacidad antioxidante de los extractos proteínicos	25
2.4. Rendimiento de la reacción de funcionalización enzimática	25
2.4.1. Cuantificación del grupo amino libre.....	25
2.4.2. Cuantificación de quercetina por cromatografía de alta eficiencia (HPLC).....	25
2.5. Capacidad de protección	26
3. Resultados y discusión	28

3.1. Análisis proximal de la semilla de chía	28
3.2. Análisis electroforético de las fracciones de proteína de chía utilizadas en las películas	32
3.3. Evaluación cualitativa de las películas funcionalizadas.....	34
3.4. Capacidad antioxidante de la semilla de chía	36
3.5. Capacidad antioxidante de las películas de chía funcionalizadas	39
3.6. Determinación de polifenoles totales	43
3.7. Extinción del grupo amino terminal	45
3.8. Análisis cromatográfico de las proteínas de chía funcionalizadas	47
3.9. Vida de anaquel.....	52
3.9.1. Índice de peróxidos	53
3.9.2. Índice de Kreis	55
Conclusiones	58
Bibliografía	59

Resumen

En la presente investigación, se realizaron empaques activos con una capacidad antioxidante a partir de proteínas extraídas de la chía. Se enlazó el polifenol quercetina mediante una unión enzimática y, finalmente, se realizaron pruebas para determinar la efectividad antioxidante de la biopelícula.

La fracción proteínica de la chía se obtuvo por medio de una serie de extracciones alcalino-ácidas, previamente se removió el mucílago y la fracción lipídica a la chía. La fracción proteínica se funcionalizó con plastificantes para formar una biopelícula plástica. Con el propósito de estudiar las proteínas que formaban el empaque activo, posterior al proceso de remoción de mucílago y a la extracción alcalina, se realizó una prueba de electroforesis para averiguar los pesos moleculares de las proteínas que forman el empaque activo.

El concentrado proteínico se sometió a una reacción enzimática para unir químicamente la quercetina a la matriz proteínica, y posteriormente elaborar un empaque activo. A la solución proteínica funcionalizada con quercetina se le realizaron varios ensayos de actividad antioxidante. Se comparó la actividad antioxidante de las proteínas funcionalizadas con las proteínas sin funcionalizar mediante pruebas de extinción del radical ABTS y del radical DPPH. Para comprobar que la unión covalente entre la matriz proteínica de chía y la quercetina se realizó de manera exitosa, se llevaron a cabo pruebas del poder antioxidante de la película frente a radicales estándar, así como ensayos de estabilidad con variables controladas de un alimento con alto contenido lipídico. También se verificó indirectamente la unión o acoplamiento de la quercetina a las proteínas de chía mediante una prueba de polifenoles totales y del grupo amino libre (extinción del

grupo amino) e instrumentalmente con un análisis cromatográfico de HPLC (por sus siglas en inglés) para registrar la concentración de antioxidante libre.

Para la prueba de vida de anaquel y de eficiencia de la película como empaque activo, se seleccionó un producto alimenticio susceptible a la oxidación lipídica, mismo que se empacó con la biopelícula para, posteriormente, comparar su eficiencia con el mismo producto empacado con bolsas de plástico comerciales y con empaques elaborados con película de semillas de chía sin antioxidante adicionado.

Introducción.

Un camino actual en la tecnología de empaques se enfoca en el desarrollo de biopelículas a partir de materiales biodegradables y amigables con el medio ambiente, que además ofrezcan ventajas competitivas de protección de los alimentos que empacan. El desarrollo se puede realizar con biomoléculas como los polisacáridos y proteínas.

La materia prima elegida como base para el presente estudio es la semilla de chía, la cual posee una composición bromatológica excepcional por su alto contenido proteínico y propiedades funcionales que no se aprovechan al 100%, la utilización más común de esta semilla es la extracción de aceite, dejando como residuo un cascajo rico en proteínas.

Los empaques activos desarrollados a partir de proteínas tienen el potencial de ser modificados químicamente con compuestos que mejoren sus propiedades funcionales y protejan los sistemas alimentarios de una manera efectiva frente al deterioro químico o físico.

Con base en lo anterior, uno de los objetivos del presente estudio es utilizar dicho residuo como material base para elaborar un empaque activo aprovechando propiedades funcionales de sus proteínas.

En este sentido, el propósito de la presente investigación fue desarrollar una película a partir de proteínas de la chía que funcione como empaque activo alimentario con elevada capacidad antioxidante mediante la incorporación enzimática de quercetina; desarrollando una barrera resistente frente al deterioro químico oxidativo y evitando la migración del antioxidante al alimento.

Objetivos

Objetivo General

- Desarrollar un empaque activo capaz de proteger alimentos sensibles a la rancidez, acoplado quercetina como antioxidante mediante una reacción enzimática para evitar una migración no controlada del antioxidante al alimento.

Objetivos Particulares

- Conocer las fracciones proteínicas que intervienen en la formación del empaque activo, mediante el uso de electroforesis.
- Verificar que se formó la unión química entre el antioxidante y la base proteínica para asegurar que no habrá migración del antioxidante al seno del alimento.
- Evaluar la efectividad del empaque activo comparando la actividad antioxidante del mismo con un empaque formado con proteína no funcionalizada con quercetina, evaluando la extinción del radical ABTS y DPPH.
- Comprobar la efectividad de protección del empaque activo sometiéndolo a pruebas de vida de anaquel con un producto alimenticio alto en contenido lipídico.

1. Antecedentes

1.1. Semilla de Chía.

Las semillas de chía utilizadas en el trabajo de investigación son provenientes de una planta de la familia de las lamiáceas llamada *Salvia hispanica*. Es una planta originaria de México con un perfil nutricional muy atractivo debido a su alto contenido de ácidos grasos insaturados y antioxidantes.

Los principales países productores de semilla de chía son Argentina, México, Bolivia, Paraguay y Australia; las principales zonas de cultivo mexicanas están localizadas en los estados de Jalisco y Puebla. La producción mexicana ha tenido un aumento considerable en los últimos años; a partir del 2010 al presente la producción anual de chía oscila entre las 2000 y 10000 toneladas, con una producción promedio de 5000 toneladas anuales (SIAP, 2019).

Las semillas de chía son un producto rico en proteínas y fibra dietética, además de contener una cantidad considerable de ácidos grasos insaturados y antioxidantes (Valdivia-López & Tecante, 2015). Las principales razones del alza en su consumo y producción es la extracción y comercialización de su aceite y compuestos nutraceuticos, además del aumento del consumo de la semilla sin procesar. Hay un auge en el uso de la semilla en alimentos funcionales y como aditivo, por las propiedades que poseen sus componentes (Ixtaina, et. al, 2008).

1.1.1. Proteínas de chía

El contenido proteínico de la chía varía entre un 16-23% dependiendo de la variedad que se estudie, este valor es muy alto si se compara con otros granos o semillas oleaginosas, siendo ésta una de las razones para su elección como materia prima se eligió la semilla para elaborar las películas activas. Otra de las características de sus proteínas es su perfil aminoacídico completo, es decir, contiene todos los aminoácidos en una proporción equilibrada. En este sentido, la capacidad de funcionalización de las proteínas de la chía y de otras materias primas con antioxidantes depende en gran medida de este tipo de perfil, ya que la riqueza en grupos funcionales debido a la diversidad de aminoácidos da origen a un mayor número de y por lo tanto sitios probables de unión química entre el antioxidante y las proteínas.

Se tienen estudios sobre las propiedades elásticas que poseen las películas formadas con las proteínas de la semilla de chía, demostrándose en algunos de ellos un alto rendimiento de tensión, módulo de Young y fuerza de sus respectivas películas en comparación con otros empaques, por ejemplo, las películas protectoras de embutidos naturales y artificiales (Hernández, 2007). Otra propiedad estudiada de estas películas es su baja permeabilidad al oxígeno, característica que previene el contacto directo de los alimentos con este gas, alargando así su vida de anaquel, debido al retardo de reacciones de oxidación, degradación de los componentes nutrimentales del alimento y controlar el contenido de humedad del alimento.

Las proteínas de la chía forman un película plástica resistente y permeable, cuando interaccionan con plastificantes como los polioles glicerol o sorbitol (Valdivia-López & Tecante, 2015).

1.1.2. Antioxidantes de la semilla de chía.

Cabe señalar que otro de los factores considerados para el uso de semillas de chía en la elaboración de biopelículas en la presente investigación, fue la gran cantidad de antioxidantes presentes en las semillas en forma nativa, tal es el caso del ácido clorogénico, la quercetina, el kaemferol y la miricetina que no sólo se encuentran en el aceite de chía, sino también en los extractos de proteínas y pueden, por tanto, tener actividad antioxidante en las películas. (Marineli et al., 2014).

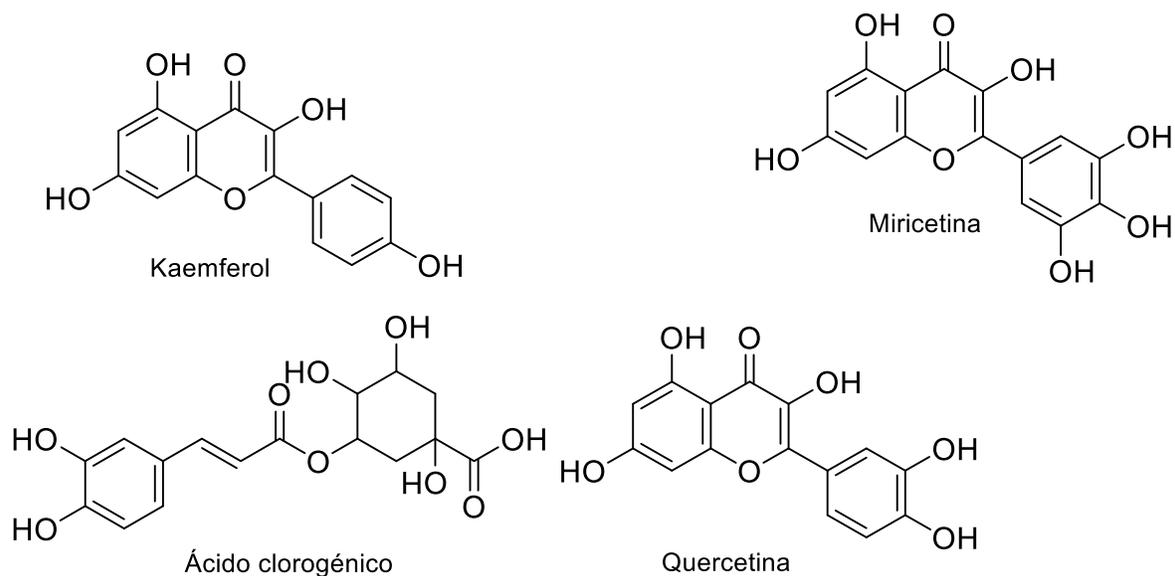


Figura 1.1 Estructura de antioxidantes encontrados en la chía

La quercetina es un antioxidante natural que pertenece a la familia de los flavonoides, grupo de moléculas con un par de anillos fenólicos unidos por un compuesto heterocíclico oxigenado oxígeno perteneciente a la familia de los piranos. La quercetina se encuentra en una gran cantidad de semillas, vegetales y frutas en forma glicosilada (Erlund, 2004). Las estructuras mencionadas se muestran en la Figura

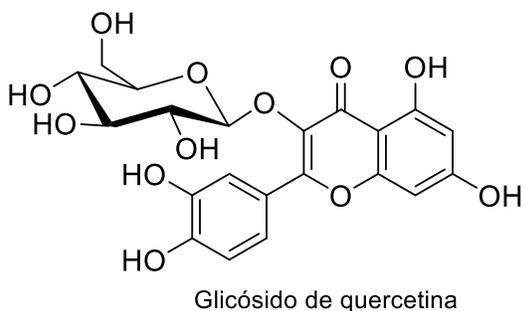


Figura 1.1 Estructura de glicósido de quercetina

También se considera que la quercetina es uno de los antioxidantes naturales más versátiles en lo que a reactividad se refiere, ya que posee dos mecanismos distintos de actividad antioxidante. Además de ser capaz de donar átomos de hidrógeno a radicales y estabilizarse por medio de resonancia, posee tres sitios activos que le permiten formar complejos con metales de transición que son pro-oxidantes, es decir, catalizadores de la oxidación lipídica. (Ghosh et al., 2015).

Una de las desventajas de la quercetina en cuanto a su uso como antioxidante es su poca solubilidad en agua y la dificultad para incorporarse a sistemas alimentarios (Erlund, 2004). No obstante, se ha demostrado que es capaz de acoplarse a distintos tipos de proteínas, mejorando su solubilidad y su actividad antioxidante (Timilsena et al., 2016).

De acuerdo con lo anterior, la capacidad de la quercetina de acoplarse a sistemas proteínicos se divide en dos escenarios posibles de acoplamiento. En el primer caso las interacciones intra- e intermoleculares entre los segmentos no polares de la proteína y la quercetina, permiten la formación de agregados antioxidante–proteína, estabilizados por interacciones hidrofóbicas. De la misma manera, los agregados pueden estabilizarse con puentes de hidrógeno entre las proteínas y la quercetina. En el otro escenario, se plantea una unión química entre la quercetina y fracciones

de aminoácidos que permitan un enlace covalente entre el antioxidante y grupos amino libres; en este tipo de acoplamiento la quercetina no es capaz de migrar al alimento, aunque la capacidad antioxidante podría verse afectada si algunos de sus grupos fenólicos reaccionan químicamente en el enlazamiento.

1.2. Empaques Activos.

Un empaque activo es una película protectora formado a partir de materiales biodegradables como polisacáridos de origen vegetal o microbiano, proteínas de diversas fuentes o biopolímeros (Chiellini, 2008), ; los principales factores que motivan la producción de este tipo de empaques son el uso de materias primas renovables y la disminución de desechos causados por la industria de plásticos y empaques no biodegradables (Chiellini, 2008).

1.2.1 Empaques proteínicos.

Los sistemas de empaque activos son definidos por su capacidad de liberar sustancias a la matriz alimentaria que mejoren las características del producto que recubren, o por la capacidad de retener sustancias que afecten las propiedades del alimento. En el primer caso, normalmente se trabaja con matrices que liberen etanol, sustancias antimicrobianas o antioxidantes. Los sistemas diseñados para absorber sustancias son principalmente secuestrantes de oxígeno, dióxido de carbono o humedad.

Es muy importante entender el alimento que se pretende proteger con empaques activos. Entre las variables que pueden afectar la vida de anaquel de los productos se encuentran la acidez, actividad de agua, cantidad de lípidos o la presencia de compuestos antimicrobianos activos. El diseño de los empaques activos está directamente relacionado con los factores intrínsecos y, en particular, con la

reactividad de los componentes del alimento, ya que probablemente la matriz que se decida utilizar como empaque activo entrará en contacto con el alimento, por lo que su composición o propiedades pueden cambiar de manera considerable si no se diseña de forma adecuada el empaque activo.

La capacidad de funcionalización y personalización de este tipo de empaques es muy amplia. Generalmente las matrices de compuestos de origen biológico que conforman la base de los empaques tienen la capacidad de ser modificados por vías químicas, fisicoquímicas y físicas para obtener propiedades que se adecuen al producto que se pretende empacar (Siripatrawan & Vitchayakitti, 2016). Las propiedades que se pueden mejorar en los empaques activos son diversas, entre ellas se encuentran: la permeabilidad al oxígeno, actividad antimicrobiana, actividad antioxidante, permeabilidad al vapor de agua, entre otras (Kavoosi et al., 2014).

Los empaques se dividen en tres categorías dependiendo de su mecanismo de acción:

- Se puede activar el empaque adicionando agentes bioactivos a la mezcla soluble de la película, quedando solamente en forma dispersa.
- Generando una modificación en el biopolímero de la película, con la cual se enlace covalentemente una molécula bioactiva de forma. Este es el caso de la presente investigación.
- Modificando la superficie del empaque a través de una cobertura superficial del empaque mismo con una dispersión de la molécula bioactiva.(Coma, 2012).

La dispersión genera un empaque que puede permear el empaque activo al alimento; altas temperaturas pueden debilitar la estructura del empaque o deteriorar la molécula añadida. En el caso de la unión covalente de la molécula activa, las propiedades activas se mantienen más tiempo y permiten mucho mayor control sobre la actividad y concentración del agente activo. (Coma, 2012).

La permeabilidad del oxígeno al seno del alimento es uno de los principales observados en sistemas que contienen una alta cantidad de grasas insaturadas, como las nueces, semillas oleaginosas y algunos tipos de carne. La tasa de oxidación depende en gran medida de factores intrínsecos al alimento. Los empaques activos que previenen la oxidación generalmente se diseñan con la intención de liberar compuestos antioxidantes de forma paulatina al alimento, los antioxidantes más comunes en este tipo de sistemas son el el butil hidroxitolueno (BHT), butil hidroxianisol (BHA) y la ter-butil hidroxiquinona(TBHQ) cuya estructura se muestra en la figura 1.3.

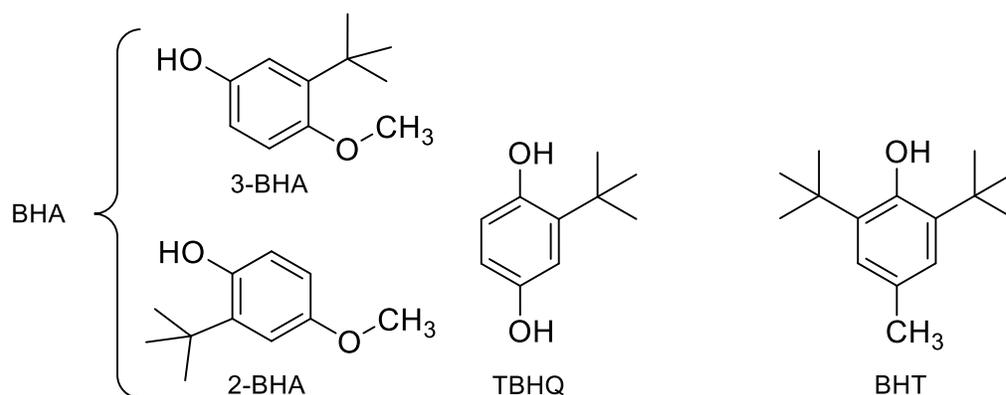


Figura 1.3 Estructura de varios antioxidantes utilizados en la industria

Una de las complicaciones que se tiene con este tipo de sistemas es la adición de un componente al alimento que no se considera en la formulación, y la naturaleza carcinogénica de dichos antioxidantes sintéticos. (Ghosh et al., 2015).

La adición de antioxidantes a la película es una de las aplicaciones más buscadas por la industria, ya que es una de las formas más efectivas de alargar la vida de anaquel de los productos alimentarios empacados. En general, para ese propósito, se trabaja con una concentración conocida del agente antioxidante, misma que resulte efectiva para retardar la rancidez de los lípidos, y que no favorezca la migración del antioxidante al seno del alimento.

La estabilidad de los empaques activos y sus propiedades dependen de muchos factores. El más importante es el material de origen, los empaques activos formados a partir de polisacáridos y biopolímeros tienen propiedades mecánicas muy atractivas y de interés comercial, pero la capacidad de funcionalizarlos no es tan amplia, ya que la estructura química de sus cadenas evita la adición de componentes al empaque.

Es importante mencionar que no se deben de confundir los empaques activos con empaques inteligentes, ya que estos últimos proporcionarían información en tiempo real del estado del alimento que están protegiendo. (Chiellini, 2008)

Las proteínas son un material recientemente utilizado en la formación de empaques activos y son valorados por su versatilidad plástica y capacidad de funcionalización. Las proteínas utilizadas en la elaboración de empaques activos generalmente tienen una gran capacidad de modificación; muchas veces se someten a procesos de alta presión o procesos químicos por medio de los cuales se logra una alteración en sus estructuras terciarias y/o secundarias que desarrollan propiedades mucho más deseables para elaborar biopelículas.

Una de las tendencias en los últimos años es la adición de sustancias que mejoren las propiedades mecánicas y fisicoquímicas de los empaques activos . La principal función de estas sustancias en el empaque activo es lograr la modificación de la estructura de la proteína o la alteración de las interacciones proteína–proteína y, para alcanzar este efecto, se emplean los plastificantes, los cuales permiten disminuir la rigidez y, por otro lado, aumenta la elongación de las películas. Estos efectos se obtienen por el incremento de las interacciones de puentes de hidrógeno que se genera en la matriz de la biopelícula.

La razón por la cual las proteínas se funcionalizan de manera relativamente sencilla es por la alta cantidad de sitios activos que poseen y por la gran variedad de grupos funcionales que tienen sus cadenas peptídicas.

La desventaja de los empaques activos elaborados a partir de proteínas es su alta higroscopicidad y baja tolerancia a temperaturas altas, lo cual impide el uso de estos empaques en zonas donde la humedad relativa es demasiado alta.

1.3. Deterioro químico oxidativo: Rancidez Oxidativa.

El propósito de este estudio es formar un empaque que sea capaz de proteger a los alimentos de la rancidez oxidativa. La rancidez oxidativa es uno de los problemas más grandes de deterioro en la industria de alimentos a nivel de seguridad y calidad. Se presenta en productos con una elevada cantidad de lípidos en su composición proximal, en especial cuando la concentración de lípidos poliinsaturados es muy elevada, lo que da pie a la formación de peróxidos de ácidos grasos, y a la subsecuente formación de productos secundarios de la oxidación (Mi, et al., 2016). La rancidez oxidativa tiene efectos a nivel sensorial por la formación de peróxidos y, sobre todo, de compuestos carbonílicos, y puede tener efectos graves en la salud

debido a que se forman compuestos carcinogénicos como el 4-hidroxinonenal y la acroleína (Ghorbani et al., 2016).

La rancidez oxidativa se lleva a cabo en un proceso de tres etapas: iniciación, propagación y terminación. La primera de ellas es consecuencia de factores intrínsecos de los alimentos, así como de factores externos como la luz o la concentración de oxígeno en la matriz alimentaria; es en esta etapa donde se generan los primeros radicales en el producto (Mi et al., 2016). En la etapa de propagación, los radicales formados en la iniciación reaccionan con el oxígeno disponible para formar peróxidos e hidroperóxidos, los hidroperóxidos no contribuyen de manera negativa al perfil sensorial del alimento, pero rápidamente son transformados en cetonas, aldehídos, y ácidos orgánicos volátiles que dan notas desagradables al producto y que son potencialmente peligrosos en términos de salud. Los productos generados en esta etapa son los utilizados normalmente para medir el grado de oxidación que posee un alimento. La etapa de terminación o finalización se caracteriza por la formación de dímeros y trímeros de radicales remanentes.

1.3.1. Actividad Antioxidante.

Una de las maneras más efectivas de retardar la rancidez oxidativa en los alimentos es con el uso de antioxidantes. Los antioxidantes son moléculas que tienen la capacidad de donar electrones a los radicales para formar especies químicas sin electrones desapareados, para que este intercambio sea posible, los antioxidantes deben formar estructuras de resonancia muy estables, capaces de distribuir la densidad electrónica entre prácticamente todos los átomos que conforman su estructura (Messina et al., 2015). Los antioxidantes de tipo fenólico solamente son efectivos al inicio de la rancidez oxidativa, retardando el mayor tiempo posible la etapa de propagación.

Los antioxidantes que se emplean más comúnmente en la industria alimentaria son BHT y BHA y la terc-butilhidroquinona (TBHQ), todos antioxidantes de origen sintético (Ghosh et al., 2015). Se ha informado que estos antioxidantes presentan actividad carcinogénica y, por lo tanto, se ha buscado la manera de reemplazarlos por antioxidantes de origen natural. Una alternativa se encuentra en el uso de antioxidantes extraídos de fuentes vegetales o producidos por métodos (Shah, Bosco, & Mir, 2014). Muchos de estos antioxidantes tienen estructura flavonoide o de ácidos orgánicos con grupos polifenólicos. Las ventajas de este tipo de antioxidantes frente a las opciones comerciales incluyen una mayor seguridad alimentaria en el producto, así como una actividad biológica más marcada y provechosa para el consumidor, pues no sólo retardan la reacción de rancidez oxidativa por eliminación de radicales, sino que en muchos casos su naturaleza anfifílica y estructura química particular les permite quelar una gran cantidad de metales de transición responsables de catalizar los procesos de oxidación. (Ghosh et al., 2015).

2. Metodología.

En la fig. 5.1 se muestra el diagrama general de trabajo empleado para el desarrollo de esta investigación.

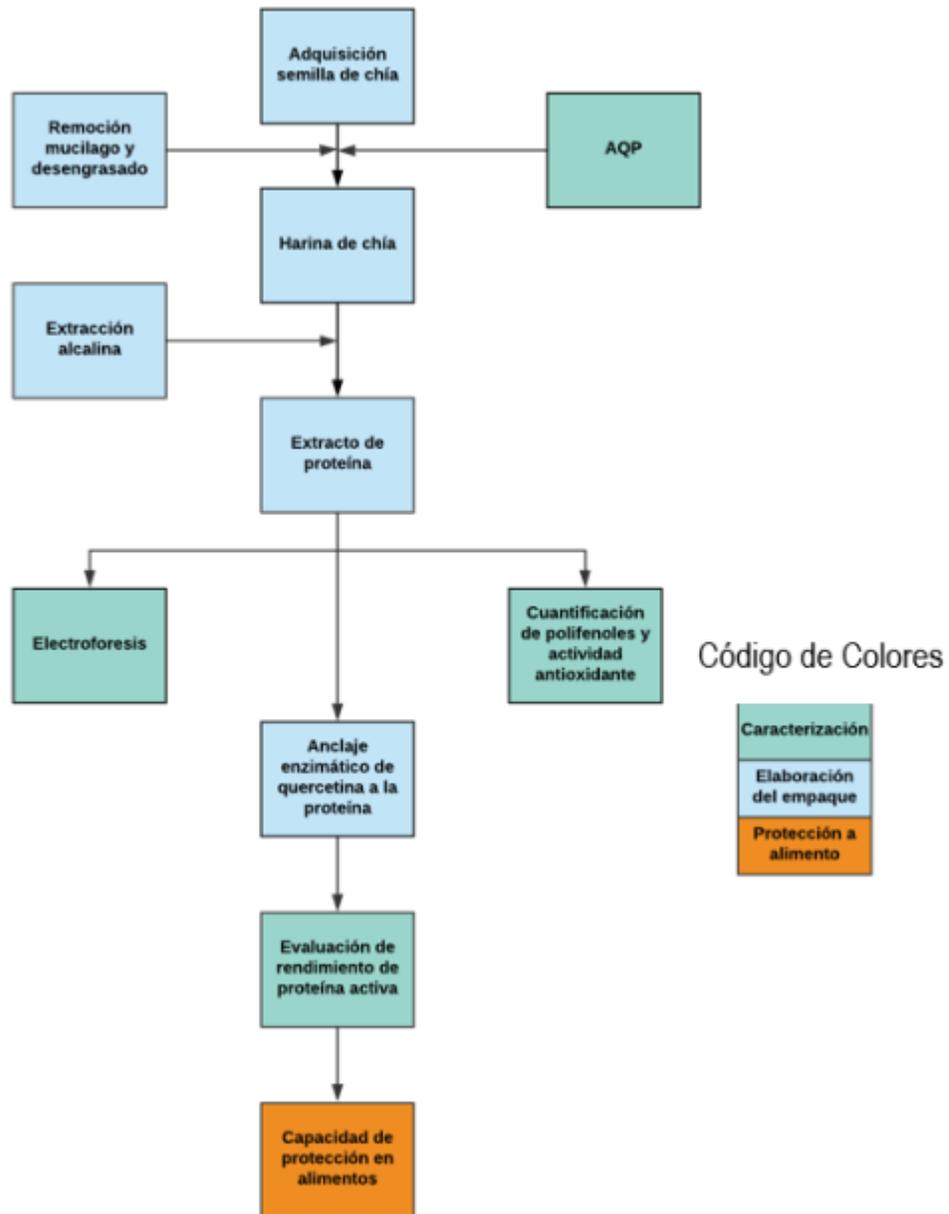


Figura 2.1 Diagrama general de trabajo

La chía empleada en esta investigación se adquirió a granel en el mercado Coapa de la delegación Tlalpan Ciudad de México.

2.1. Caracterización de la chía.

Para conocer la composición química de las semillas de chía empleadas en el estudio, se realizó un análisis químico proximal con los siguientes métodos.

Proteína (Método Kjeldahl): AOAC 920.87

Lípidos (Método Soxhlet): AOAC 920.85

Humedad (Método de secado en horno): AOAC 925.10

Cenizas: AOAC 923.03

Hidratos de Carbono: Método por diferencia

Polifenoles Totales: La determinación de polifenoles totales de la semilla de chía se realizó mediante el método de Folin Ciocalteau. (Skerget *et al.*, 2005).

Capacidad antioxidante: La capacidad antioxidante de los polifenoles de la semilla de chía se midió utilizando la capacidad secuestrante frente al radical ABTS+. (Reyes, 2006)

2.2. Elaboración de las películas funcionalizadas de chía

2.2.1. Extracción de mucílago de la chía

La extracción de las proteínas de las semillas de chía se hizo en medio acuoso, al hidratar las semillas se libera un polisacárido que interfiere con la extracción de proteína y la posterior formación de películas. El mucílago se extrajo hidratando las semillas. Las semillas se secaron y se removió el mucílago físicamente tallándolo contra una malla, siguiendo la metodología descrita por Reyes, E. (2006).

2.2.2. Extracción del aceite de las semillas

Para extraer de manera efectiva las proteínas que se encuentran en las semillas de chía se debe extraer su grasa, para este propósito se molieron las semillas y, posteriormente, se realizó una extracción de grasa continua por el método de Soxhlet.

2.2.3. Extracción de proteína

La fracción de harina rica en proteína se extrajo sometiéndola a un proceso de alcalinización-acidificación, aprovechando el punto isoeléctrico de las proteínas para su extracción. Posteriormente, se recuperó el pellet o concentrado de proteína por centrifugación y secado en estufa de vacío. (Hernández, 2007)

2.2.4. Cuantificación de la proteína en el pellet

Al pellet y al sobrenadante se les cuantificó proteína total por método de Kjeldahl y la concentración de proteína soluble por el método de Lowry. (Lowry et al., 1951)

2.2.5. Elaboración y funcionalización de películas

Se solubilizó el concentrado de proteína sometiéndolo a condiciones alcalinas, se agregó peroxidasa y 200 ppm de quercetina a la mezcla (García, 2017). Se formó la película plástica mezclando la solución proteínica con plastificantes y vertiéndola en un recipiente plano con forma circular. Se secó en estufa de vacío y se obtuvo la película. (Bamdad et al., 2006)

2.3. Caracterización y capacidad antioxidante.

Con el fin de conocer el peso molecular de las proteínas responsables de la formación de las películas, polifenoles totales y capacidad antioxidante de las películas funcionalizadas se utilizaron las siguientes metodologías.

2.3.1. Electroforesis sds-page

El peso molecular de las proteínas que forman los concentrados proteínicos fue determinado mediante una electroforesis siguiendo el método de Laemmli (He, 2011).

- Se realizó la electroforesis con un gel concentrador al 3% y un separador al 7.5% de acrilamida.
- Se estandariza la solución de proteína para inyectar 32.5 µg de proteína por pozo.

- Se mezcla la solución de proteína con la solución desnaturante de proteína y con los marcadores de color.
- Se inyecta la solución de proteína a los pocillos del gel concentrador y se conecta la caja de Bio-rad a la corriente.
- Se corre el gel a 60 V por 60-90 minutos.
- Se retira el gel y se tiñe con una solución de azul de coomassie al 1%.
- Se destiñe el gel con lavados con agua y ácido acético.
- Finalmente se lee el gel con un escáner Bio-rad.

2.3.2. Cuantificación de polifenoles totales

Se realizó la determinación de los polifenoles totales remanentes en un extracto alcohólico de la semilla de chía, en los pellets de proteína funcionalizados enzimáticamente y en los pellets sin funcionalizar. Se utilizó la metodología de Folin - Ciocalteu para realizar las mediciones.

Ácido tricloroacético en una concentración al 10% fue utilizado para precipitar la proteína de muestra del pellet proteínico diluido 1:10 en agua destilada. El sobrenadante fue filtrado y a este se le realizó la determinación por el método de Folin – Ciocalteu (Skerget *et al.*, 2005). La determinación fue interpolada utilizando una curva con ácido gálico.

2.3.3. Capacidad antioxidante de los extractos proteínicos

La capacidad antioxidante de los extractos proteínicos fue determinada cuantificando la capacidad secuestrante frente al radical ABTS y al radical DPPH. Se utilizó un estándar de quercetina como punto de comparación para medir la capacidad antioxidante de los extractos proteínicos funcionalizados y sin funcionalizar.

2.4. Rendimiento de la reacción de funcionalización enzimática.

Para conocer la efectividad del acoplamiento antioxidante – proteína en la matriz proteínica se utilizaron los siguientes análisis.

2.4.1. Cuantificación del grupo amino libre.

Debido a que la reacción de acoplamiento utiliza esencialmente los grupos amino libre de las proteínas para unir los compuestos fenólicos a la matriz proteínica, la medición de los grupos amino libre de las proteínas es un indicador efectivo de la eficiencia de la reacción enzimática. Se siguió la metodología reportada por Krasaechol *et al.*, 2008.

2.4.2. Cuantificación de quercetina por cromatografía de alta eficiencia (HPLC).

Otra de las estrategias utilizadas para conocer la efectividad de la reacción enzimática fue la medición del remanente de quercetina por cromatografía HPLC. El tratamiento de los extractos utilizados en la determinación de polifenoles se

replicó para los extractos inyectados en esta prueba; es decir se precipitó la proteína de los extractos proteínicos.

Se inyectaron las siguientes disoluciones para encontrar la quercetina remanente en los concentrados proteínicos funcionalizados.

Extracto de proteína funcionalizada con quercetina.

Extracto de proteína sin funcionalizar.

Extracto de proteína funcionalizada con quercetina posterior a la reacción de funcionalización

Estándar de quercetina a una concentración de 4ppm

Las condiciones de análisis están basadas en la metodología reportadas por Careri, *et al*, 2003 para la determinación de quercetina. Las condiciones de HPLC se reportan a continuación.

Cromatógrafo Waters

Bomba	Waters 515
Detector	Waters 2487 Dual λ Absorbance detector
Fase Móvil	Solución al 1%(v/v) de ácido acético/Acetonitrilo/isopropanol (70:22:8)
Flujo	0.2 mL/min
Columna	ACE C18-300 (ACE® HPLC Columns)

2.5. Capacidad de protección.

Finalmente se evaluó la capacidad de las películas funcionalizadas de proteger una matriz alimentaria de alto contenido lipídico. El alimento utilizado para la medición

fue semilla de chía molida, su alto contenido de ácidos grasos insaturados es óptimo para realizar pruebas que den seguimiento a la oxidación lipídica.

Se utilizaron tres tipos de empaques para comparar la capacidad de protección de las películas funcionalizadas: Película de proteínas de chía funcionalizada enzimáticamente con 200 ppm de quercetina, película de proteínas de chía sin funcionalizar y empaque de polietileno de baja densidad Ziploc®.

Se empaclaron 20 g de harina de chía en los empaques previamente mencionados. Las muestras fueron colocadas en una cámara de vida de anaquel de humedad y temperatura controlada Thermo Scientific™ Forma™ modelo 3940, las condiciones establecidas para las pruebas de vida de anaquel fueron 55 °C y humedad relativa del 50%.

Se realizaron las pruebas de Índice de Peróxidos (Kirk *et al*, 2002) e Índice de Kreis (Kirk *et al*, 2002) para evaluar el deterioro oxidativo del alimento, se determinaron los dos índices con una periodicidad de siete días por 49 días.

3. Resultados y discusión

3.1. Análisis proximal de la semilla de chía

En la Tabla 1 se muestra la composición promedio de cinco lotes de semilla de chía utilizados para elaborar las biopelículas activas. Entre los componentes, se puede notar un elevado contenido de proteína, condición óptima en la semilla para la elaboración de películas. En el caso de los hidratos de carbono, la mayoría representa la proporción de mucílago total extraído de la semilla. La composición observada en la presente investigación es congruente con estudios previamente realizados sobre la chía (Valdivia-López & Tecante, 2015).

Tabla 3.1. Análisis proximal de semilla de chía.

Componente	%
Proteína	21.67 ±0.09
Lípidos	40.88±0.06
Humedad	8.15±0.08
Cenizas	4.50±0.01
Carbohidratos totales incluyendo fibra*	24.8

*Calculados por diferencia.

El componente de mayor interés para la elaboración de las películas activas es, como se ha mencionado, el contenido de proteína. Considerando la naturaleza del proceso de extracción, que involucra una etapa de desengrasado y la eliminación del mucílago, la cantidad de proteína remanente para elaborar las películas es considerable, como lo acreditan los resultados de la Tabla 3.1. Las operaciones de desengrasado y eliminación del mucílago se posicionan entre las más aplicadas para la semilla debido a la extracción de compuestos de interés industrial encontrados en estas fracciones (Serson et al., 2012). Estas son algunas razones por las que la semilla de chía presenta un alto potencial de aprovechamiento.

El mucílago es un componente nativo de la semilla de chía; es una mezcla de polisacáridos altamente higroscópicos que poseen una capacidad de retención de agua muy alta. Es necesario retirar este material para formar las películas por dos razones principales. Al absorber una gran cantidad de agua las proteínas quedan encapsuladas en el mucílago hidratado, haciendo imposible la extracción ácido – básica. La segunda es el grado de interferencia de los polisacáridos en la formación de la película al evitar la interacción de los plastificantes con las proteínas que conforman la película (Muñoz, Cobos, Diaz, & Aguilera, 2012).

La tabla composicional anterior presenta un material muy atractivo para realizar empaques activos ya que, al extraer la fracción lipídica de la semilla la fracción remanente contiene una concentración proteínica muy alta. Para que el proceso de extracción sea lo más eficiente posible, se busca iniciar con chía que contenga una fracción proteínica alta para aprovechar de la mejor manera los componentes de la materia prima base.

La remoción de la fracción lipídica de la semilla de chía se realiza para favorecer la interacción de las proteínas de la chía con los plastificantes y permitir la formación de los empaques activos (Timilsena et al., 2016).

Tabla 3.2 Rendimiento de extracción y proteína soluble en el pellet.

Rendimiento de extracción de proteína	Proteína soluble en pellet
30.65 g de proteína / 100 g de proteína desengrasada	81.918 mg/g pellet

En la Tabla 3.2 se muestra el porcentaje de proteínas de la chía extraídas y de la concentración de proteína soluble del pellet resultante. Estos rendimientos permiten la elaboración de las películas con la cantidad óptima de recurso. En otras palabras, sí se puede utilizar este material de residuo para elaborar empaques activos, ya que una elevada concentración de proteína soluble favorecerá interacciones intra- e intermoleculares con los plastificantes utilizados, dando como resultado películas resistentes y plásticas.(Bamdad et al., 2006).

Debido a la gran cantidad de proteínas contenidas en el concentrado proteínico y a las condiciones de extracción de mucílago a las cuales se sometió la semilla, se pueden esperar entrecruzamientos entre las proteínas de la chía los cuales le confieren propiedades de barrera, menor permeabilidad al vapor de agua y resistencia a la hidrólisis de las proteínas que conforman la película plástica (Lacroix, Dang Vu, 2014).

La fase crítica en el proceso de extracción de las proteínas es la remoción del mucílago, ya que debido a su hidratación el rendimiento de extracción de las proteínas disminuye significativamente y no es posible elaborar el empaque activo.

3.2. Análisis electroforético de las fracciones de proteína de chía utilizadas en las películas

Se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) para conocer el peso molecular de las proteínas de la semilla de chía implicadas en la formación de la película. En la figura 3.1 se encuentran proteínas de bajo peso molecular las bandas identificadas registran 7 y 8.5 kDa, resultados que indican que probablemente las condiciones alcalinas de extracción produjeron una disminución del peso molecular de las proteínas de chía por procesos hidrolíticos que generan los péptidos observados en el gel, hallazgos congruentes con investigaciones previas. (Capitani, Spotorino, Nolasco, & Tomás, 2012).

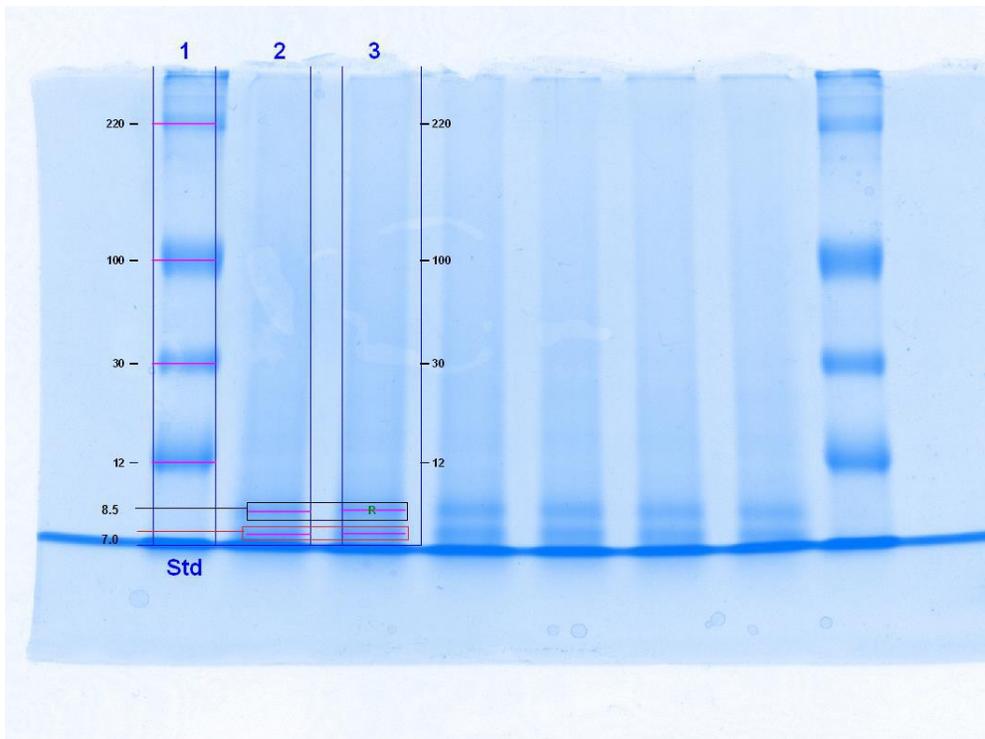


Figura 3.1. Perfil electroforético de la fracción proteínica extraída de la semilla de chía (SDS PAGE) corrida en equipo. Señales marcadas en rojo representan fracciones de 7.5 kDa y 8.5 kDa

Respecto al peso molecular, los resultados de la presente investigación son también congruentes con estudios previos de las proteínas de la semilla de chía (Hernández, 2007), por lo que se puede afirmar que el tratamiento de extracción de las proteínas de chía reduce su peso, no obstante, no hay ningún efecto asociado a la efectividad de estos biopolímeros al formar las películas y generar interacciones intermoleculares con los plastificantes.

Los estudios realizados previamente sobre empaques activos elaborados a partir de proteína de chía demuestran que el peso molecular de las proteínas capaces de formar interacciones intermoleculares con el plastificante oscila en el intervalo de 4 a 50kDa (Hernández, 2007). También se ha informado que las películas elaboradas con proteínas con pesos moleculares ubicados dentro de dicho intervalo poseen una muy baja permeabilidad al oxígeno (Hernández, 2007) Finalmente, se puede afirmar que la formación de películas, fue lograda de forma efectiva con fracciones de 7–8.5 kDa. Por otro lado, las películas elaboradas con estas fracciones también demostraron actividad antioxidante de forma nativa (Figura 3.1). Esto puede significar que las proteínas encontradas en las biopelículas presentan péptidos con actividad antioxidante o, bien, que durante el proceso de elaboración de las películas las proteínas eliminaron especies oxidantes que se encontraban de manera nativa en la semilla.

Es importante notar que no se encontró evidencia en la electroforesis de fracciones mayores a 10 kDa como en un estudio anterior (Hernández , 2007), esto puede ser debido al proceso de eliminación de mucílago, ya que, a diferencia de realizar un proceso de liofilización, en la presente investigación se optó por un secado en estufa a 55 °C por 24 horas para conseguir la inmovilización del mucílago. Probablemente, las condiciones de extracción alcalina propiciaron una hidrólisis de las proteínas presentes en las semillas, reduciendo su tamaño y peso molecular.

El procedimiento de secado por aire caliente utilizado para retirar el mucílago es relevante, ya que es un procedimiento más práctico que la liofilización para la elaboración de las películas. Las principales razones la reducción de costos y el volumen potencial de eliminación de mucílago y de extracción de proteínas, etapas esenciales en la formación de la película.

3.3. Evaluación cualitativa de las películas funcionalizadas

En la Figura 3.2, se muestra una película de chíá después de 24 horas de elaboración.



Figura 3.2 Película de chíá

Las películas formadas poseen propiedades plásticas deseables y un grado de elasticidad suficiente para el empaque y el manejo de alimentos. La reacción enzimática no causó ningún efecto aparente en la formación de la película. La alta cantidad de proteína soluble y el bajo peso molecular de éstas es una causa probable, por la cual la interacción con los plastificantes es óptima. Al comparar las películas formadas solamente por proteínas de chíá no funcionalizadas, cualitativamente no se percibe una diferencia en su apariencia.

Lin y Zhou (2018) reporta interacciones intermoleculares entre proteínas y quercetina, por lo que se esperaba una disminución en la resistencia de los empaques activos debido a la interferencia de la interacción proteína – plastificante. En un sentido prospectivo, se recomienda realizar pruebas mecánicas en las películas para evaluar de forma cuantitativa estas propiedades de las películas funcionalizadas.

3.4. Capacidad antioxidante de la semilla de chía

En la figura 3.3 se muestra actividad antioxidante de las semillas de chía estudiar la capacidad antioxidante de la materia prima base, detectándose que dicha actividad frente al radical ABTS fue muy similar a la mostrada por la quercetina comercial.

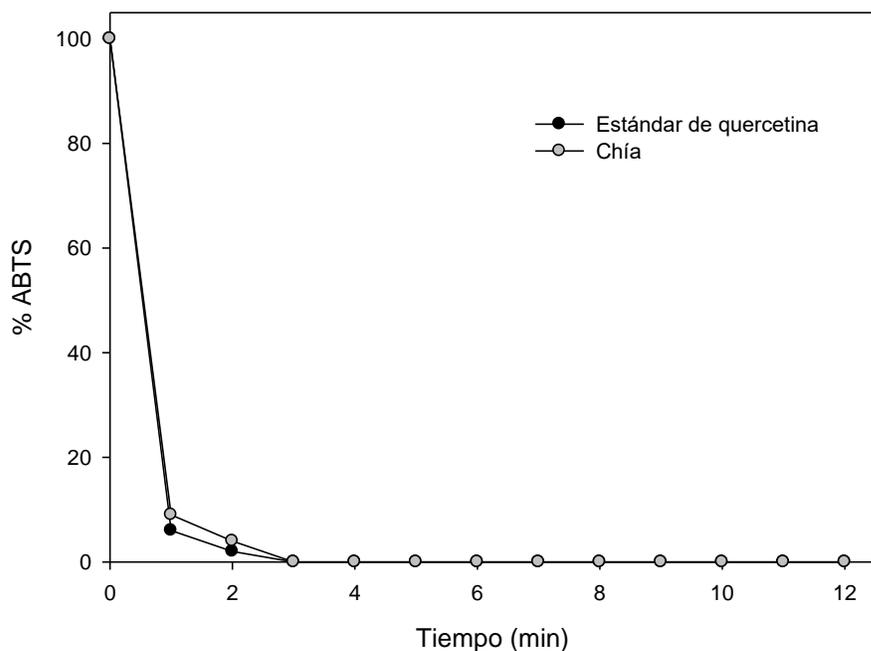


Figura 3.3 Actividad antioxidante de la semilla de chía

Esto es otra razón por la que es conveniente utilizar esta semilla para elaborar los empaques bioactivos.

Las mediciones se realizaron sobre extractos de semillas desengrasadas. Uno de los resultados esperados es que las fracciones predominantes de los extractos sean flavonoides glicosilados de moléculas como quercetina y kaempferol, y no en forma libre (*de Falco, et al., 2017*), puesto que en este caso manifestarían escasa solubilidad en extractos acuosos y mayor en fracciones lipídicas y en disolventes de

baja polaridad. La solubilidad del kaempferol en agua es de 440mg/L y la de la quercetina es de 60 mg/L. (Thanh et al., 2018).

Las especies que probablemente contribuyen a la mayor actividad antioxidante de la semilla de chía desengrasada son los derivados del ácido cafeico como el ácido clorogénico, el ácido rosmárico y el ácido ferúlico (de Falco, et al, 2017) todos encontrados en proporciones significativas en la semilla de chía. Estas moléculas de naturaleza más hidrofílica que los flavonoides son capaces de formar interacciones intermoleculares con las proteínas de manera más efectiva, probablemente teniendo un comportamiento similar a lo reportado por Izlia (2016) con proteínas de origen lácteo y quercetina y, por lo tanto, permanecer en la fracción polar utilizada en la elaboración de las películas funcionalizadas.

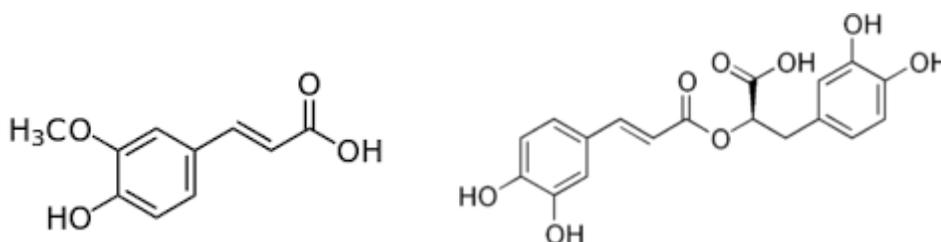


Figura 3.3.1 Estructura del ácido ferúlico y ácido rosmárico

El comportamiento de la curva de actividad antioxidante del extracto de la semilla (figura 3.3) de chía es muy similar al estándar de quercetina, por lo que se espera que la matriz proteínica aporte cierta actividad antioxidante por los polifenoles que queden atrapados en la misma

Otro factor positivo de la medición de capacidad antioxidante de la semilla de chía es que la quercetina y los antioxidantes presentes en la semilla de chía actúan de la misma manera frente al radical ABTS, lo cual representa un posible efecto sinérgico entre los antioxidantes nativos de la película y los añadidos.

Los resultados obtenidos corresponden a semillas de chía desengrasadas, esto es un buen indicio de la viabilidad de la semilla para formar el empaque, ya que una cantidad considerable de antioxidantes son retenidos por la semilla.

3.5. Capacidad antioxidante de los extractos de proteína antes y después de su funcionalización

En las Figuras 3.3 y 3.4 se observa un análisis de la actividad antioxidante cuando se compara la solución proteínica funcionalizada con quercetina y la solución proteínica sin funcionalizar. Como es esperado, los extractos de proteína funcionalizados con quercetina presenta una mayor actividad antioxidante en las dos pruebas: tanto con ABTS como con DPPH. Aunque, la disminución de polifenoles totales en las películas es considerable por el proceso de extracción al cual fueron sometidas (figura 6.5) aún se detectan compuestos polifenólicos que son capaces de aportar una cierta actividad antioxidante.

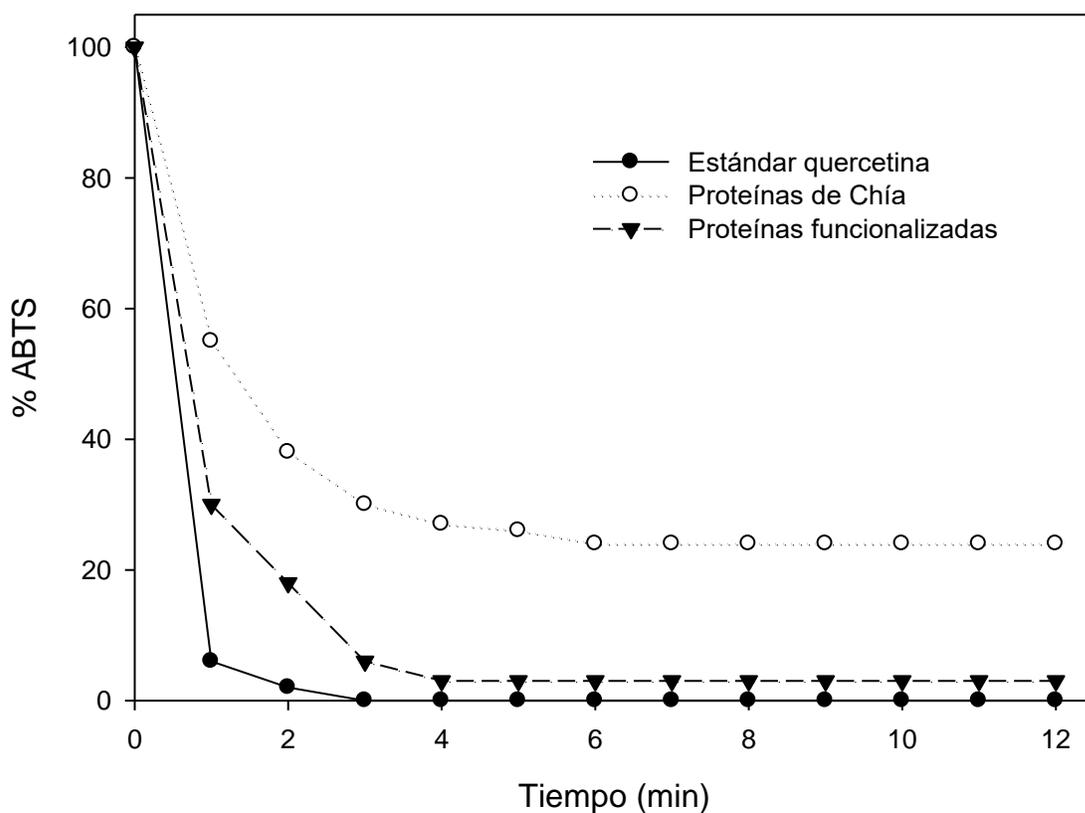


Figura 3.3 Capacidad secuestrante del radical ABTS de las películas de chía

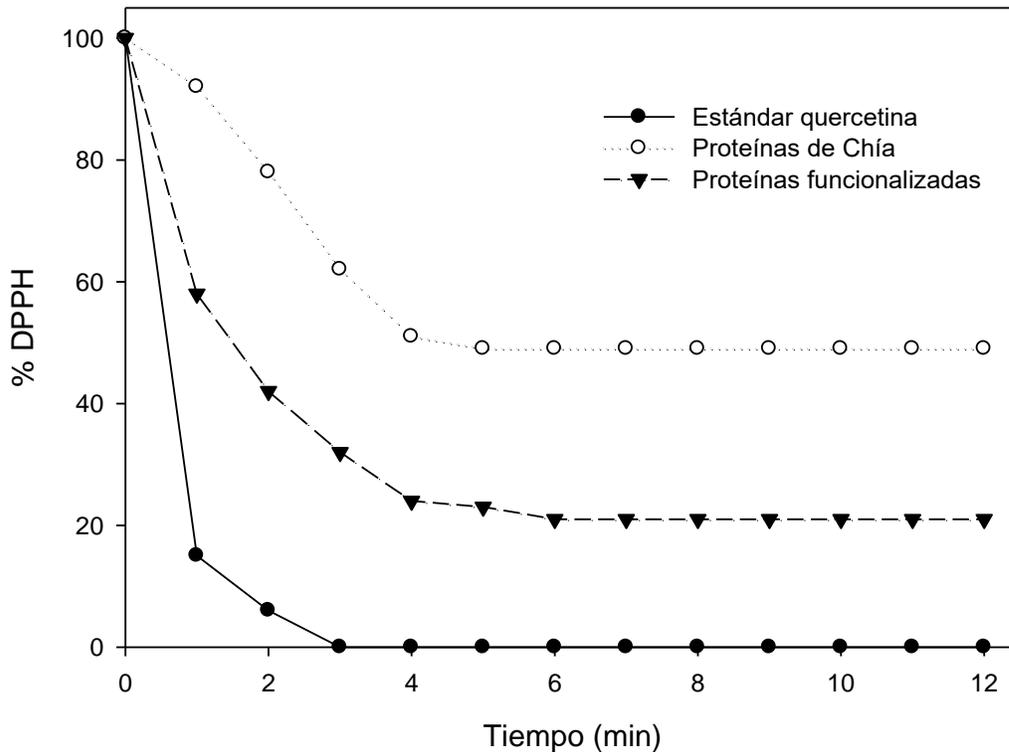


Figura 3.4 Capacidad secuestrante frente al radical DPPH de las películas de chía

La capacidad antioxidante nativa asociada a las películas se deriva de compuestos antioxidantes específicos de la semilla de chía que no fueron removidos ni el proceso de desengrasado ni durante en la extracción proteínica. También se espera que estos compuestos hayan quedado atrapados en la matriz proteínica, por lo que deben de ser capaces de formar interacciones por puentes de hidrógeno e interacciones polares con las proteínas y péptidos (Wang & Wang, 2015). Los antioxidantes esperados en esta fase son el ácido clorogénico, la quercetina, el kaempferol y la miricetina; ya que estos compuestos tienen un carácter polar y/o son encontrados de forma glicosilada en la semilla de chía (de Falco, *et al*, 2017). Probablemente, los flavonoides remanentes fueron capaces de interactuar con la proteína debido a que la mayoría de estos se encuentran glicosilados de manera

nativa en la semilla, propiedad que les permitió establecer un número considerable de grupos polares de residuos de aminoácidos de las proteínas.

Cabe mencionar que la reacción enzimática que cataliza la formación de un enlace covalente entre las proteínas de la chía y la quercetina, agregada en una concentración de 200 ppm, así como diversas interacciones intermoleculares entre el flavonoide y los residuos de aminoácidos pueden limitar la actividad antioxidante, pues esta última se redujo en comparación con el patrón de quercetina (Figuras 3.3 y 3.4), lo que, además, constituye un indicio indirecto de que la funcionalización de la quercetina es efectiva. También puede haber un efecto de interacción con otros antioxidantes que la solución proteínica contenga de forma nativa lo cual generaría anclajes con los antioxidantes que quedaron atrapados en el pellet proteínico, formando interacciones ácido clorogénico – proteína, kaempferol – proteína, miricetina – proteína, etc. (Wang & Wang, 2015) La actividad antioxidante total de estos polifenoles disminuiría ya que se utiliza un hidroxilo donador de electrones para formar la interacción proteína - antioxidante.

Otra de las razones por las cuales se puede explicar una actividad antioxidante relativamente alta para los empaques bioactivos es su alta concentración de proteína de bajo peso molecular, ya que se sabe que algunos péptidos vegetales de bajo peso molecular tienen una actividad antioxidante elevada (Alu'datt et al., 2016).

La distinta capacidad secuestrante frente a los radicales se puede deber a la interacción que tienen los antioxidantes nativos de la chía con el radical ABTS y con el radical DPPH (Floegel, *et al.*, 2011) y a la diferencia de solubilidad entre los disolventes utilizados para cada prueba. En el caso del estándar, se nota un comportamiento similar, pero las películas, al tender a interactuar mejor en sistemas polares debido a las proteínas que contienen, sí presentan tendencias distintas entre los dos radicales probados. Las curvas de extinción de los dos sistemas estudiados son mucho más pronunciadas y tienen un porcentaje de extinción final mayor al reaccionar con el radical ABTS.

Se nota de igual manera el estado de sinergia entre los dos sistemas que presentan actividad antioxidante, probablemente la adición de quercetina que es un polifenol presente de manera natural es un factor que ayuda al desarrollo de esta actividad en la película.

3.6. Determinación de polifenoles totales

Después de confirmar la actividad antioxidante de las soluciones de proteína funcionalizadas, se hicieron pruebas para verificar la efectiva formación de un enlace químico entre las proteínas de la chía y la quercetina, en este caso mediante una reacción enzimática. La primera prueba consistió en la medición de los polifenoles totales en los extractos acuosos de las soluciones formadoras de película, y dio información sobre cuántos polifenoles quedaron enlazados en la matriz de proteína.

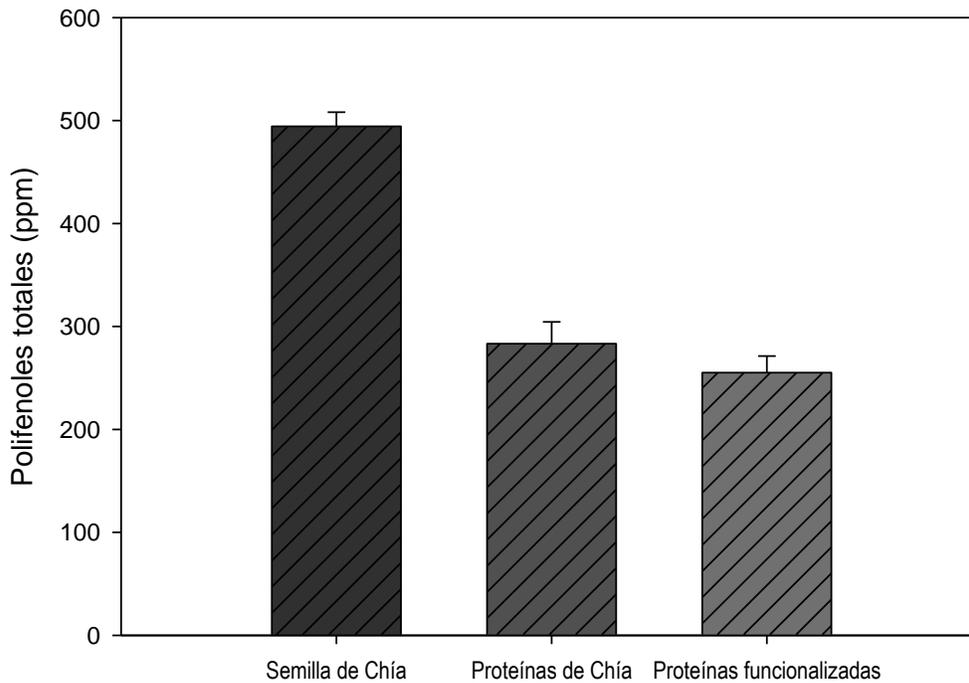


Figura 3.5 Polifenoles totales de las películas de chía

En la Figura 3.5 se compara la concentración de polifenoles totales de cinco lotes de semilla de chía, de proteínas de esta sin funcionalizar, y de proteínas de chía funcionalizadas. Esta medición es un indicador de la proporción de compuestos fenólicos con actividad antioxidante que se mantienen en la matriz proteínica

después del proceso de elaboración de las biopelículas. De esta manera, aun después de que la chía fue sometida a una extracción de grasa con hexano como disolvente y a una remoción del mucílago, más del 50% de los polifenoles nativos aún se encontraban en la proteína, una observación que también es congruente con las pruebas de capacidad antioxidante previamente realizadas.

La Figura 3.5 muestra igualmente una disminución considerable en la concentración de antioxidantes totales entre la proteína funcionalizada y la no funcionalizada, aun cuando en el primer caso se agregaron 200 ppm de quercetina. Este resultado que sugiere que la reacción enzimática se llevó a cabo acoplado efectivamente al antioxidante dando como consecuencia una menor concentración de polifenoles libres.

Al respecto, es importante notar que, además de los polifenoles agregados a la solución formadora de películas, los antioxidantes nativos también reaccionan vía enzimática con los residuos de aminoácidos de las proteínas de chía (Wang & Wang, 2015). Esto es un hallazgo esperado, ya que muchos antioxidantes provenientes de la chía son flavonoides y pueden acoplarse a las proteínas de esta semilla.

3.7. Extinción del grupo amino

La Figura 3.6 muestra la concentración del grupo amino de las proteínas no funcionalizadas y de las proteínas funcionalizadas enzimáticamente, obtenida mediante la prueba de extinción del grupo amino, para cinco lotes de películas.

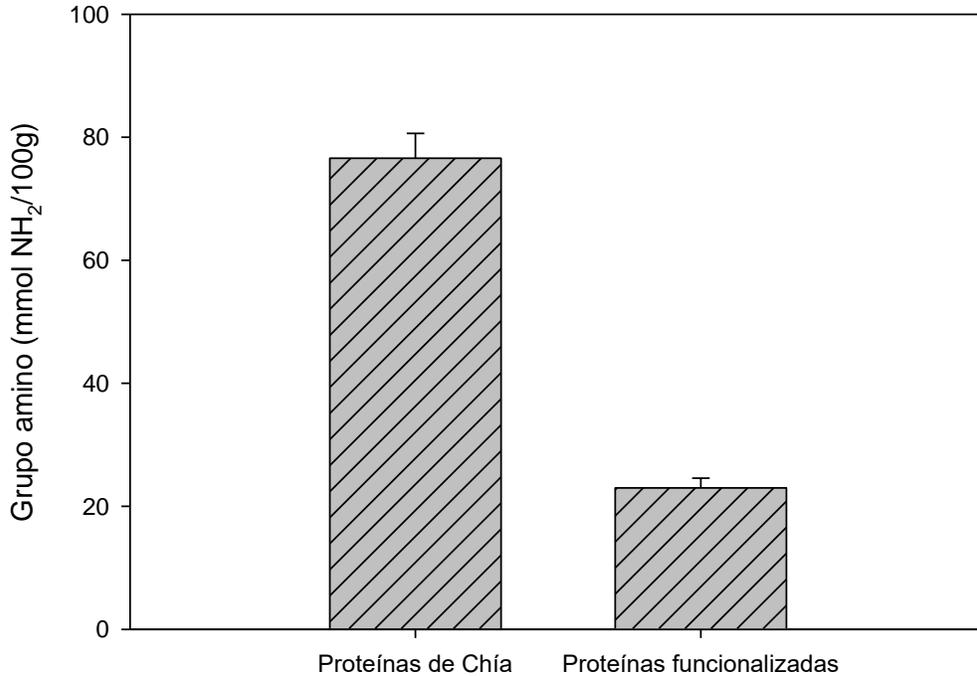
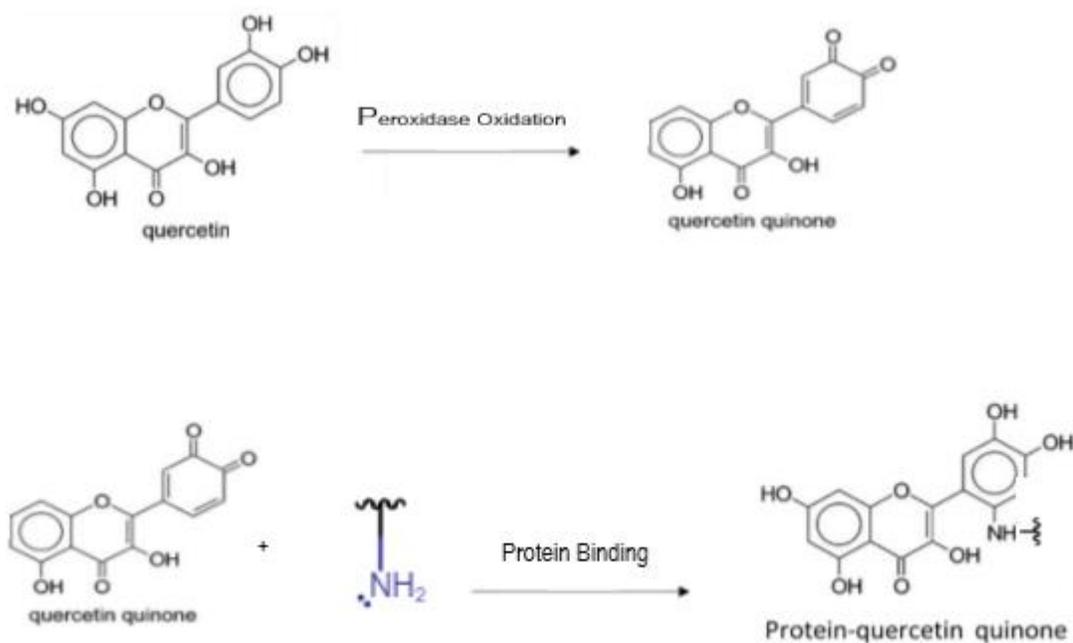


Figura 3.6 Extinción del grupo amino de las películas funcionalizadas

Los resultados de la prueba de extinción del grupo amino proporcionan otro indicio de la eficiencia de la reacción enzimática, debido a que la reacción de acoplamiento quercetina-proteína involucra la modificación química de los grupos amino libres provenientes de los residuos terminales de las cadenas proteínicas y del ϵ -amino del aminoácido lisina, entre los más reactivos. El mecanismo de reacción que se propone para explicar el acoplamiento enzimático requiere la presencia de grupos amino libres para acoplarse al antioxidante.



ç

Figura 3.6.1 Ejemplo de mecanismo de reacción de acoplamiento quercetina - proteína

De acuerdo con la Figura 3.6, el grado de sustitución o modificación del grupo amino libre obtenido en la reacción de acoplamiento varía entre el 65 y 70 %, lo cual da un indicio favorable de que, efectivamente, la reacción sí se llevó a cabo en la matriz proteínica con las condiciones de trabajo establecidas. Es importante mencionar que con esta prueba no se puede determinar exactamente el rendimiento referido a la quercetina, ya que, como se observa en los resultados anteriores (figura 3.5), la reacción no es específica y acopla diversos polifenoles que se encuentren en el medio de reacción.

Como se observó anteriormente en la figura 3.1, las proteínas involucradas en la reacción de acoplamiento quercetina-proteína son de bajo peso molecular. En ese

sentido, la interacción de los compuestos fenólicos está más favorecida con proteínas de bajo peso molecular en comparación con cadenas de mayor menor peso (Alu'datt et al., 2016). El impedimento estérico causado por las cadenas largas propias de las proteínas de alto peso molecular es una de las razones más probables por las que no se generan interacciones favorables con los compuestos polifenólicos.

3.8. Análisis cromatográfico de las proteínas de chía funcionalizadas

El análisis cromatográfico se realizó para confirmar el acoplamiento de la quercetina con los residuos de aminoácidos de las soluciones proteínicas formadoras de películas. La estrategia consistió en precipitar la proteína de las soluciones para, posteriormente, inyectar la solución acuosa remanente. En el caso de un acoplamiento exitoso, los cromatogramas no mostrarían la señal de quercetina en el sobrenadante de las proteínas formadoras de películas a las que se agregaron 200 ppm del antioxidante, mientras que se registraría dicha señal en el caso de acoplamientos no exitosos. Los resultados de este experimento no hicieron más que corroborar esta hipótesis, como se observa en las figuras subsecuentes (figura 3.7 - 3.9). El resultado es una serie de cromatogramas que mostraron la aparición de la señal de quercetina en el caso que no interactúe con la proteína. Y en el caso contrario la ausencia de la señal demuestra que se acopló al sistema proteínico y por lo tanto se encuentra en el precipitado de proteína.

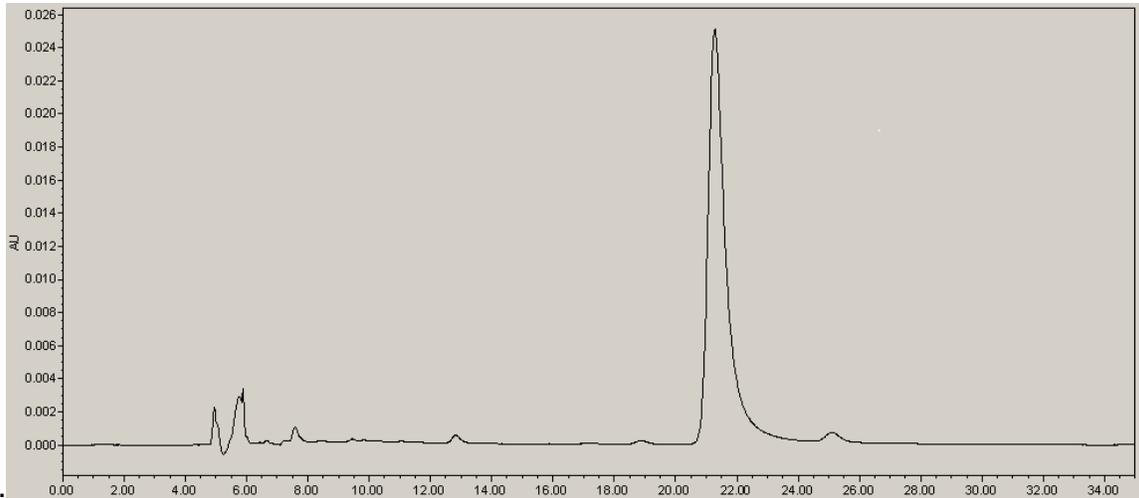


Figura 3.7 Estándar de quercetina

El cromatograma de la Figura 3.7 muestra al estándar de quercetina. El tiempo de retención de la quercetina es ≈ 22 min, resultado que es consistente con el encontrado en estudios anteriores utilizando las mismas condiciones experimentales (Careri, et al. 2003). Por lo que, se pudo asegurar que la aparición o no de la señal en cromatogramas posteriores daría una estimación confiable del resultado del acoplamiento enzimático de la quercetina.

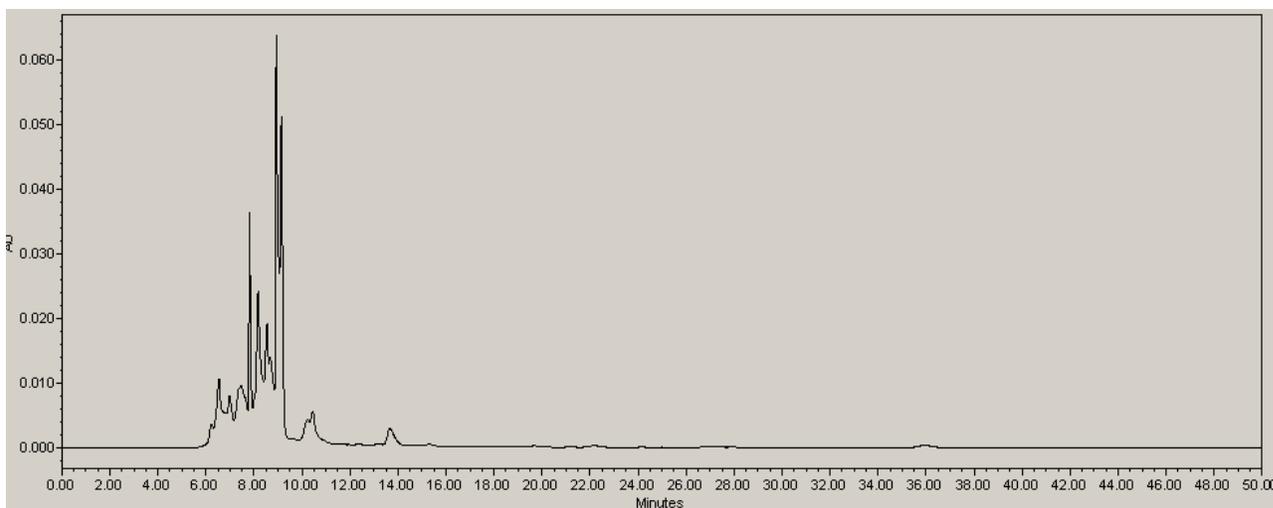


Figura 3.8 Cromatograma de la solución proteínica remanente

El análisis cromatográfico de las soluciones remanentes de las proteínas de chíá se realizó para constatar la ausencia de compuestos que pudieran interferir con la determinación de quercetina no acoplada, siendo la zona de mayor interés la que se encuentra entre los minutos 20 y 24.

En el cromatograma de la Figura 3.8 se aprecia que la solución proteínica remanente no presenta una concentración detectable de quercetina ni de moléculas que interfieran en la detección de esta, por lo tanto, es probable que esta molécula no sea uno de los polifenoles que aporten actividad antioxidante intrínseca al concentrado proteínico o pellet. Se observa que la mayoría de los compuestos detectados en este cromatograma tienen tiempos de retención mucho menores que el de quercetina.

Se utilizó cromatografía de fase inversa para la separación de quercetina, observándose que, debido a su carácter hidrofóbico y a la naturaleza apolar de la columna cromatográfica, presentaba un elevado tiempo de retención.

Es probable que los compuestos que aportan la mayor cantidad de actividad antioxidante a la película no funcionalizada sean los antioxidantes con grupos funcionales más polares, como el ácido clorogénico y el ácido cafeico. Esta explicación es consistente con las condiciones de extracción de la proteína de chía y de la elaboración de la biopelícula. Los compuestos con carácter más hidrofóbico, como la quercetina, kaempferol o la miricetina, son probablemente removidos durante el proceso de desengrasado, ya que se encuentran principalmente en la fracción oleosa de la semilla. (Marineli et al., 2014).

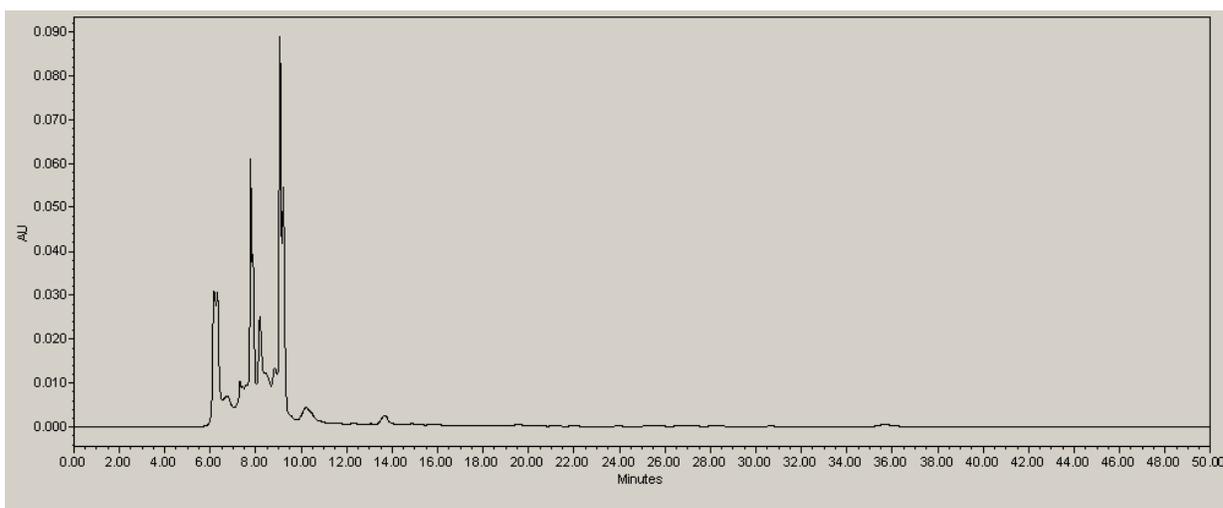


Figura 3.9 Proteína de chía funcionalizada

El cromatograma de la proteína de chía no funcionalizada es prácticamente idéntico al de la proteína funcionalizada, no se detectó ninguna señal entre los 20 y 24 minutos; que son el tiempo de retención esperado de la quercetina. Esto confirma que la quercetina añadida a la solución funcionalizada quedó atrapada en la proteína y no dejó remanentes en la solución acuosa.

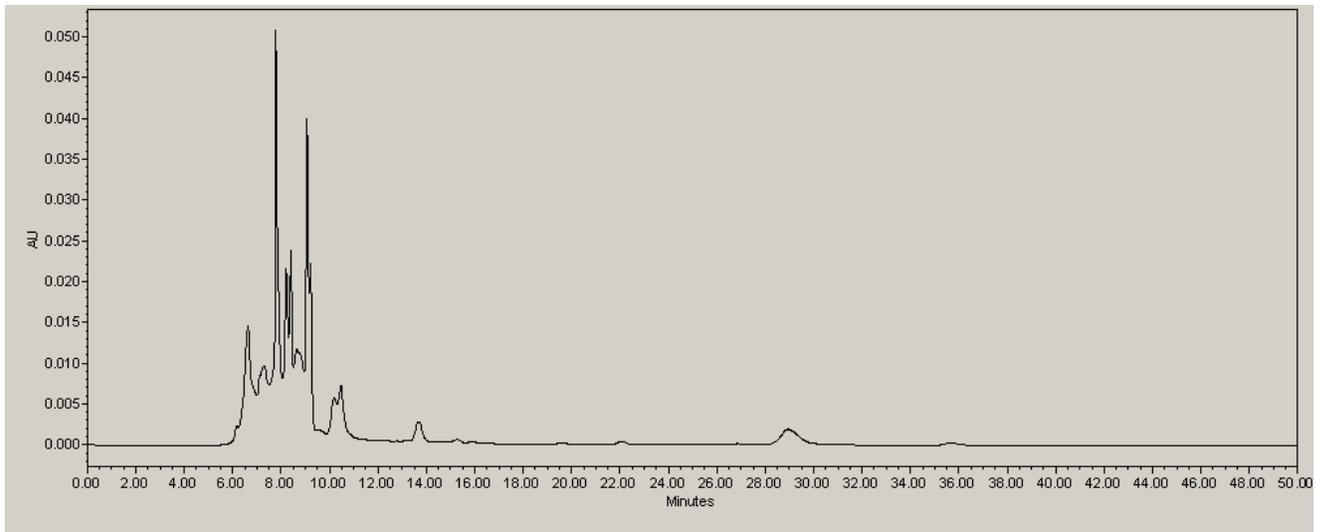


Figura 3.10 Proteína de chía funcionalizada con quercetina añadida

Finalmente, se agregó quercetina a una concentración de 4 ppm a las proteínas funcionalizadas, y se inyectó la solución acuosa remanente de la precipitación de dichas proteínas. La aparición del pico cromatográfico de quercetina (≈ 22 min), mostrado en la Figura 3.10, evidencia que la incorporación física no ocasiona la retención del antioxidante incorporado por parte de las proteínas.

3.9. Vida de anaquel

Una vez que se confirmó que la reacción de acoplamiento enzimático se llevó a cabo, con los métodos previamente analizados, se determinó la efectividad de las películas funcionalizadas con antioxidante frente a un sistema alimentario real. Para este propósito, se seleccionaron semillas de chía molidas debido a su alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados, los cuales son muy propensos a oxidarse. Así, las películas de chía se compararon tanto con películas de la misma semilla sin funcionalizar como con bolsas de polietileno de baja densidad marca Ziploc®.

La evaluación de biopelículas o empaques activos sin funcionalizar permitió determinar la actividad antioxidante de las proteínas de chía, así como propiedades de barrera como la permeabilidad al oxígeno constituyentes de la película

La protección física de las semillas a lo largo de toda la prueba fue efectiva, las películas no sufrieron problemas estructurales ni de barrera al ser colocadas en la cámara de vida anaquel. La prueba tuvo una duración de 49 días.

Debido a que las pruebas de anaquel se realizaron bajo condiciones aceleradas, se utilizaron dos métodos químicos que permitieran obtener resultados en el menor tiempo posible y con una interpretación cuantitativa de estos. Por esto, se decidió utilizar el índice de peróxidos y el índice de Kreis.

3.9.1. Índice de peróxidos

Con la finalidad de observar la evolución de las primeras etapas de la oxidación de las grasas, ya que mide los peróxidos e hidroperóxidos que se generan conforme pasa el tiempo.

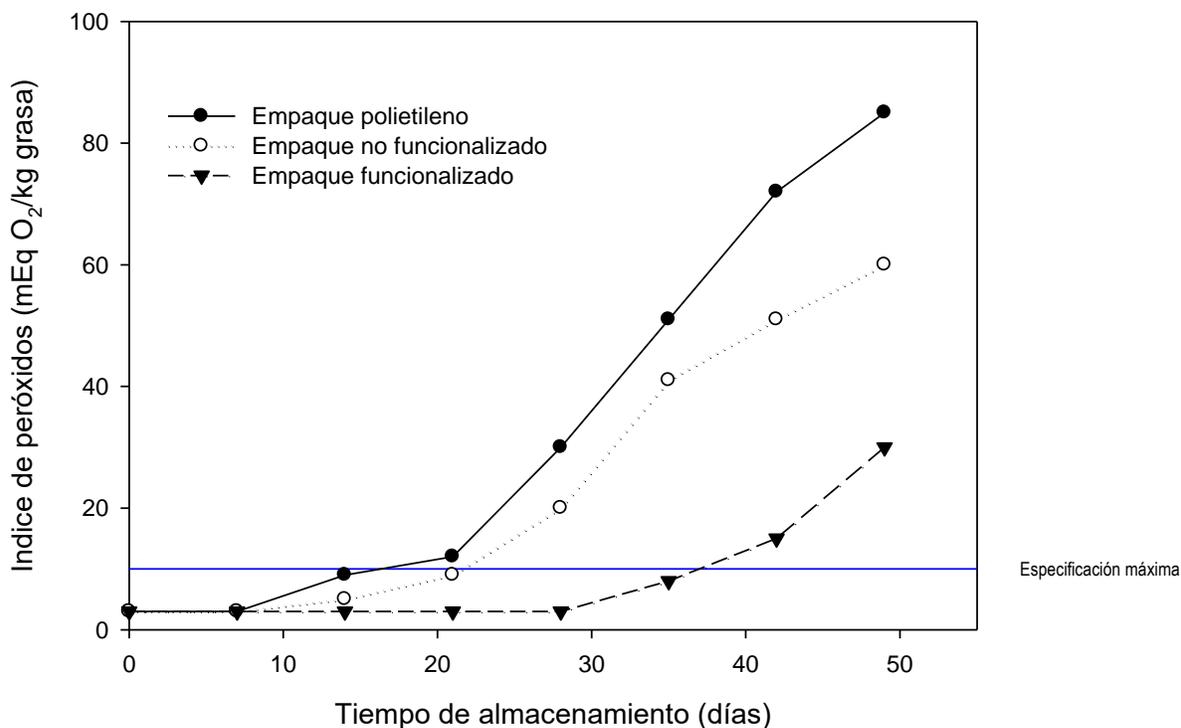


Figura 3.11 Curva de peróxidos

De acuerdo con la Figura 3.11, el índice de peróxidos permite observar las etapas de iniciación entre el día de inicio de la prueba y el día 21 para los empaques no funcionalizados y el día 35 para empaque funcionalizado y propagación de la rancidez oxidativa del día 21 al día 49 en los empaques no funcionalizados y en el día 42 para el empaque funcionalizado. A este respecto, se puede decir que mientras el índice de peróxidos se mantenga constante, la rancidez oxidativa no evoluciona, sin embargo, una vez que se presenta un cambio en la pendiente de la línea de índice de peróxidos, comienza la etapa de propagación y, por tanto, la rancidez oxidativa (Robertson, 2010).

El objetivo de los empaques protectores de alimentos frente al proceso de oxidación es mantener el índice de peróxidos constante y retardar el cambio de pendiente el mayor tiempo posible.

Se puede notar en la Figura 3.11 que el empaque funcionalizado retarda la propagación al menos 14 días más que el empaque sin quercetina añadida. También se detecta un efecto significativo de retraso de la fase de propagación por el empaque funcionalizado después del cambio de pendiente, ya que los valores del índice de peróxidos no suben de manera tan drástica como en los otros dos empaques.

El efecto antioxidante de la película se puede explicar por interacciones antioxidante-radical que se llevan a cabo en la superficie del alimento protegido, evitando la propagación y la migración de las especies radicales al seno del alimento. (Lin & Zhou 2018)

El registro de un índice de peróxidos constante en las matrices alimentarias puede también explicarse por eventos como la descomposición de los peróxidos generados en las primeras fases de la propagación, mecanismo que, probablemente, es responsable de mantener sin modificaciones aparentes la concentración de peróxidos después del cambio de pendiente en el día 35 (Marineli et al., 2014)..

El acoplamiento enzimático también previene la migración de los antioxidantes al alimento, evitando que el alimento adquiriera características no deseadas. La prueba se llevó a cabo a 55°C con 50% de humedad relativa Sin embargo, el empaque probablemente aumente su efectividad de manera considerable si se somete a pruebas de vida de anaquel en condiciones de almacenamiento normales.(Robertson, 2010).

3.9.2. Índice de Kreis

A la par, se realizó el seguimiento de la oxidación midiendo el índice de Kreis. Este parámetro, proporciona información sobre la de aldehídos, provenientes la descomposición de peróxidos e hidroperóxidos en un alimento, y mide la etapa media-avanzada de la rancidez-oxidativa. Los resultados se muestran en la figura 6.12

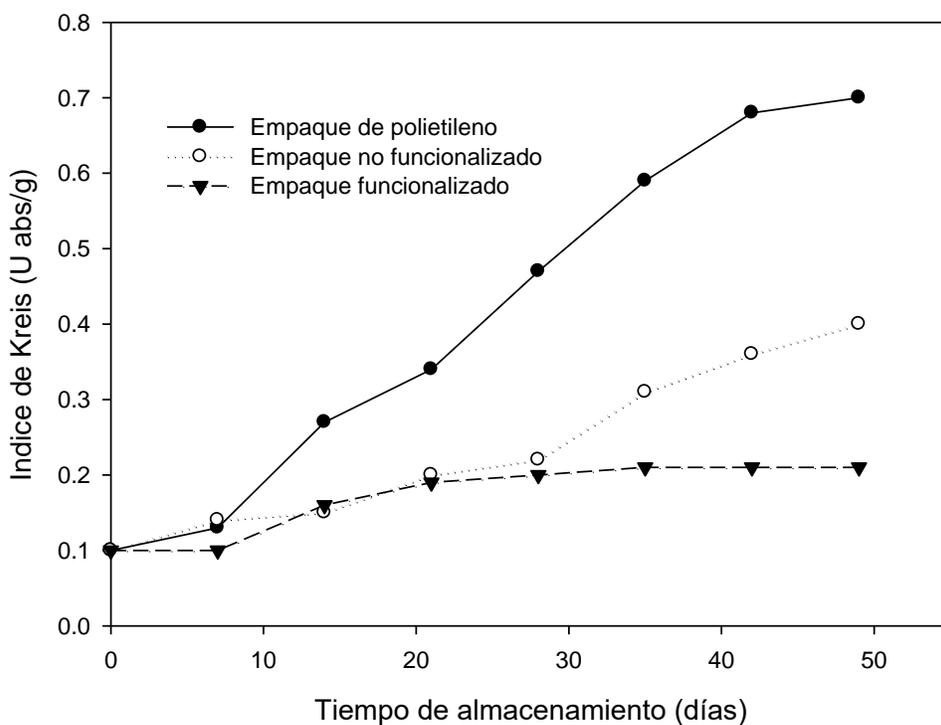


Figura 3.12 Curva de índice de Kreis

La Figura 3.12 muestra un comportamiento similar al de la curva de peróxidos, es decir, mientras la pendiente sea menos pronunciada, la tasa de formación de aldehídos es menor.

La capacidad de los empaques activos elaborados a partir de las proteínas de chíá de retardar la formación de productos de la rancidez oxidativa avanzada es notable comparada con el efecto de bolsas de polietileno de baja densidad.

El cambio de pendiente en los empaques funcionalizados ocurrió una semana después, retrasando una semana la formación de peróxidos e hidroperóxidos en el alimento. Los empaques formados a partir de las proteínas de chíá presentan una opacidad considerable. Figura 3.12 la disminución de la entrada de la luz solar puede ser un factor que se explica por la coloración de las películas.

La característica común de los dos empaques que probablemente influya de mayor manera en la retardación de la rancidez oxidativa y en el control de la formación de compuestos de las etapas avanzadas de rancidez, es la cantidad y variedad de polifenoles que quedan remanentes, integrados químicamente en la película y la actividad antioxidante nativa de las proteínas que conforman las películas.

Los tres factores previamente mencionados demuestran un efecto sinérgico logrado solamente por el empaque activo. Se recomienda elaborar un estudio posterior que estudie las tres variables de manera independiente para obtener una ponderación aproximada de las variables que afectan de manera más significativa la capacidad antioxidante de las películas y la concentración óptima de quercetina que se debe de agregar a la película.

El empaque funcionalizado y el empaque sin funcionalizar muestran un comportamiento similar, aunque una vez que la gráfica cambia de pendiente, el índice peróxidos es mucho menor para el empaque funcionalizado. Esto significa que el empaque funcionalizado es capaz de controlar de manera mucho más efectiva la propagación de la oxidación y, una vez que se forman radicales de

peróxido, puede evitar que la rancidez del alimento se propague de manera acelerada.

El efecto del empaque funcionalizado se debe a que la quercetina unida químicamente a la proteína del empaque es también capaz de secuestrar especies oxidantes como el radical hidroxilo (Lin & Zhou, 2018). La concentración utilizada de quercetina en la elaboración de las biopelículas (200 ppm) fue suficiente para que se notara de manera relevante su actividad antioxidante.

La prueba de peróxidos y de Kreis muestran que, aunque el empaque de proteína de chía sí tiene un efecto en la protección de los alimentos contra la oxidación, el empaque funcionalizado ofrece una protección mucho mayor y previene la etapa de propagación de manera más efectiva, un efecto esencial para retrasar la oxidación en los alimentos.

Conclusiones

- Se desarrolló, a partir de proteínas de semillas de chía desengrasada, un empaque funcionalizado con actividad antioxidante. El proceso de funcionalización enzimática asegura que el empaque retenga los antioxidantes en la matriz proteínica y disminuya la posible migración de antioxidante al alimento.
- El empaque funcionalizado es capaz de proteger al alimento en condiciones de vida de anaquel controladas y tiene una capacidad mayor de detener el proceso de oxidación de un alimento con alto contenido lipídico que un empaque no funcionalizado y uno elaborado de polietileno de baja densidad.
- La disminución de polifenoles totales aun cuando se agregó una concentración de 200 ppm de quercetina a la biopelícula evidencia la probable formación de enlaces químicos entre antioxidante y proteína derivada por la acción enzimática.
- La extinción del grupo amino y la desaparición de la señal de quercetina dan confirmación adicional de que la reacción enzimática se llevó a cabo de manera adecuada.
- La proteína funcionalizada reacciona de manera positiva a las pruebas más comunes de actividad antioxidante (ABTS* DPPH), además tiene una respuesta mayor comparado con un empaque no funcionalizado.

Bibliografía

- Alu'datt, M. H., Rababah, T., Alhamad, M. N., Gammoh, S., Ereifej, K., Kubow, S., & Alli, I. (2016). Characterization and antioxidant activities of phenolic interactions identified in byproducts of soybean and flaxseed protein isolation. *Food Hydrocolloids*, 61, 119–127. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.05.002>
- Bamdad, F., Goli, A. H., & Kadivar, M. (2006). Preparation and characterization of proteinous film from lentil (*Lens culinaris*): Edible film from lentil (*Lens culinaris*). *Food Research International*, 39(1), 106–111. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2005.06.006>
- Capitani, M. I., Spotorno, V., Nolasco, S. M., & Tomás, M. C. (2012). Physicochemical and functional characterization of by-products from chia (*Salvia hispanica* L.) seeds of Argentina. *LWT - Food Science and Technology*, 45(1), 94–102. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.07.012>
- Careri, M. A. C., Orradini, C. L. C., Lviri, L. I. S. A. E., Parma, S., Area, P., & Metodologie, I. (2003). *Direct HPLC Analysis of Quercetin and trans - Resveratrol in Red Wine , Grape , and Winemaking Byproducts*. (22), 5226–5231.
- Chiellini, E. (2008). *Environmentally compatible food packaging. Environmentally compatible food packaging*. <https://doi.org/10.1533/9781845694784.3.396>
- Coma, V., (2012). *Antimicrobial and antioxidant active. Advances in meat, poultry and seafood packaging*. Woodhead Publishing Limited. <https://doi.org/10.1533/9780857095718.4.477>
- Erlund, I. (2004). Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition Research*, 24(10), 851–874. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2004.07.005>

- de Falco, B. De, Amato, M., & Lanzotti, V. (2017). Chia seeds products : an overview. *Phytochemistry Reviews*, 16(4), 745–760. <https://doi.org/10.1007/s11101-017-9511-7>
- Floegel, A., Kim, D. O., Chung, S. J., Koo, S. I., & Chun, O. K. (2011). Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(7), 1043–1048. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2011.01.008>
- Fu, Z. F., Tu, Z. C., Zhang, L., Wang, H., Wen, Q. H., & Huang, T. (2016). Antioxidant activities and polyphenols of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) leaves extracted with solvents of various polarities. *Food Bioscience*, 15, 11–18. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2016.04.004>
- García, B. (2017) Acoplamiento via enzimática de quercetina a proteínas de semillas de cártamos y girasol, y su aplicación en el desarrollo de películas activas. Tesis UNAM
- Ghorbani Gorji, S., Smyth, H. E., Sharma, M., & Fitzgerald, M. (2016). Lipid oxidation in mayonnaise and the role of natural antioxidants: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 56, 88–102. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.08.002>
- Ghosh, N., Chakraborty, T., Mallick, S., Mana, S., Singha, D., Ghosh, B., & Roy, S. (2015). Synthesis, characterization and study of antioxidant activity of quercetin-magnesium complex. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 151, 807–813. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2015.07.050>
- He, F. (2011). Laemmli-SDS-PAGE. *Bio-101*: e80
- Hernández, G. (2007). Proteínas de Chía (*Salvia Hispanica*): Estudio para valorar sus propiedades como formadoras de películas. UNAM Tesis

- Ixtaina, V. Y., Nolasco, S. M., & Tomás, M. C. (2008). Physical properties of chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. *Industrial Crops and Products*, 28(3), 286–293. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2008.03.009>
- Izlia J. Arroyo-Maya, José Campos-Terán, Andrés Hernández-Arana, David Julian McClements (2016). Characterization of flavonoid-protein interactions using fluorescence spectroscopy: Binding of pelargonidin to dairy proteins. *Food Chemistry* 216, 431-439. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.06.105>
- Kirk, R., Swyer, R. & Egan, H. 2002 *Composición y Análisis de Alimentos de Pearson*. Segunda Edición. México CDMX: Compañía Editorial Continental S.A. de C.V.
- Lacroix, M., Dang Vu, K. (2014). Edible Coating and Film Materials: Proteins 11. 277–304.
- Kavoosi, G., Rahmatollahi, A., Mohammad Mahdi Dadfar, S., & Mohammadi Purfard, A. (2014). Effects of essential oil on the water binding capacity, physico-mechanical properties, antioxidant and antibacterial activity of gelatin films. *LWT - Food Science and Technology*, 57(2), 556–561. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.02.008>
- Krasaechol, N., Sanguandeeikul, R., Duangmal, K., & Owusu-apenten, R. K. (2008). Food Chemistry Structure and functional properties of modified threadfin bream sarcoplasmic protein. 107, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.03.075>
- Lin, J., & Zhou, W. (2018). Role of quercetin in the physicochemical properties ,

- antioxidant and antiglycation activities of bread. *Journal of Functional Foods*, 40(November 2017), 299–306. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.11.018>
- Lowry, H., Nira, J., Lewis F., Randall, R. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. Department of Pharmacology, Washington University School of Medicine
- Marineli, R. da S., Moraes, Érica Aguiar, Lenquiste, S. A., Godoy, A. T., Eberlin, M. N., & Maróstica, M. R. (2014). Chemical characterization and antioxidant potential of Chilean chia seeds and oil (*Salvia hispanica* L.). *LWT - Food Science and Technology*, 59(2P2), 1304–1310. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.04.014>
- Messina, C. M., Bono, G., Renda, G., La Barbera, L., & Santulli, A. (2015). Effect of natural antioxidants and modified atmosphere packaging in preventing lipid oxidation and increasing the shelf-life of common dolphinfish (*Coryphaena hippurus*) fillets. *LWT - Food Science and Technology*, 62(1), 271–277. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.01.029>
- Mi, H. bo, Guo, X., & Li, J. rong. (2016). Effect of 6-gingerol as natural antioxidant on the lipid oxidation in red drum fillets during refrigerated storage. *LWT - Food Science and Technology*, 74, 70–76. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.07.029>
- Muñoz, L. A., Cobos, A., Diaz, O., & Aguilera, J. M. (2012). Chia seeds: Microstructure, mucilage extraction and hydration. *Journal of Food Engineering*, 108(1), 216–224. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.06.037>
- Reyes, E. (2006). La Chía (*Salvia hispánica*): fuente de fibra dietética total con propiedades funcionales y antioxidantes. UNAM Tesis
- Robertson, G. L. (2010). *Food Packaging and Shelf Life - A Practical Guide*.
- Serson, W., Amery, M. A. L., Patel, S., Phillips, T., & Hildebrand, F. (2012). Chia (*Salvia hispanica* L) Research. *NSRI Research*, 12, 278–287. Retrieved from http://www.nsrinews.com/nsriChia_research.html
- Shah, M. A., Bosco, S. J. D., & Mir, S. A. (2014). Plant extracts as natural

antioxidants in meat and meat products. *Meat Science*, 98(1), 21–33.
<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.03.020>

Siripatrawan, U., & Vitchayakitti, W. (2016). Improving functional properties of chitosan films as active food packaging by incorporating with propolis. *Food Hydrocolloids*, 61, 695–702. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.06.001>

SIAP(2019). Estadística de Producción Agrícola 2019.
<http://infosiap.siap.gob.mx/gobmx/datosAbiertos.php>

Škerget, Mojca & Kotnik, Petra & Hadolin, Majda & Hraš, Andreja & Simonič, M. & Knez, Željko. (2005). Phenols, proanthocyanidins and their antioxidant activities. *Food Chemistry*. 89. 191-198. [10.1016/j.foodchem.2004.02.025](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.02.025).

Thanh, T., Nguyen, H., Yu, S., Kim, J., & An, E. (2015). Enhancement of quercetin water solubility with steviol glucosides and the studies of biological properties. *Food Chemistry*, 176, 437–449.

Timilsena, Y. P., Adhikari, R., Barrow, C. J., & Adhikari, B. (2016). Physicochemical and functional properties of protein isolate produced from Australian chia seeds. *Food Chemistry*, 212, 648–656.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.06.017>

Valdivia-López, M. Á., & Tecante, A. (2015). Chia (*Salvia hispanica*): A Review of Native Mexican Seed and its Nutritional and Functional Properties. *Advances in Food and Nutrition Research*. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2015.06.002>

Wang, Y., & Wang, X. (2015). Binding, stability, and antioxidant activity of quercetin with soy protein isolate particles. *Food Chemistry*, 188, 24–29.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.127>

