



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD SUPERFICIAL DE
FRACCIONES DE PROTEÍNA DE SEMILLAS DE CHÍA
(*Salvia hispanica* L.) CON DISTINTA HIDROFOBICIDAD”**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA
I.A. ABRAHAM GARCÍA JIMÉNEZ

DIRECTORA
DRA. ANGÉLICA ROMÁN GUERRERO

ASESORES
DR. FRANCISCO CRUZ SOSA
DR. BENOÎT FOUCONNIER

Ciudad de México, 30 de julio de 2018

“La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) en el nivel de competencia internacional, referencia 001465.

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis:

“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD SUPERFICIAL DE FRACCIONES DE PROTEÍNA DE SEMILLAS DE CHÍA (*Salvia hispanica* L.) CON DISTINTA HIDROFOBICIDAD”

Que presentó

Abraham García Jiménez

Directora: Dra. Angélica Román Guerrero

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa

JURADO

Presidente: Dr. Francisco Cruz Sosa

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa

Secretario: Dr. César Pérez Alonso

Universidad Autónoma del Estado de México

Vocal: Dr. Rubén Jiménez Alvarado

Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

Vocal: Dra. Ana Guadalupe Estrada Fernández

Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

“El primer paso es establecer que algo es posible,
entonces es probable que ocurra”

-Elon Musk

**A mi querida familia,
por siempre creer en mí.**

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Angélica Román, por la confianza otorgada para la realización de este trabajo y por todo el apoyo brindado durante mi estancia en su laboratorio.

Al Dr. Francisco Cruz y al Dr. Benoît Fouconnier, por asesorar amablemente la elaboración del proyecto.

A los revisores de este documento, Dr. Francisco Cruz, Dr. César Pérez, Dr. Rubén Jiménez y Dra. Ana Estrada, por sus valiosas aportaciones para el enriquecimiento del mismo.

A todos mis compañeros de los laboratorios R-003 y W-107, por compartir sus conocimientos, pero sobre todo por brindarme su amistad y hacer más ameno el trabajo.

A todos mis amigos, por motivarme a siempre seguir adelante.

A todas las personas que de una u otra forma han influido en mi vida convirtiéndome en quien soy ahora, y cuyos nombres no alcanzaría a enlistar en este espacio.

A la Universidad Autónoma Metropolitana, mi alma máter, por la formación otorgada a lo largo de estos años, un activo de valor incalculable.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca de maestría otorgada y por el financiamiento al proyecto de Ciencia Básica número 236565.

RESUMEN

El objetivo de esta investigación consistió en caracterizar las principales fracciones proteicas presentes en las semillas de chia (*Salvia hispanica*) con el fin de analizar su desempeño como agentes con actividad superficial. Las técnicas empleadas pueden agruparse, según su propósito, en 3 distintos tipos, mismas que se realizaron en orden cronológico de acuerdo con lo siguiente: 1) caracterización fisicoquímica de las semillas de chía, 2) extracción y caracterización general de las fracciones de proteína de chía y 3) evaluación de su actividad superficial.

Los resultados obtenidos en el laboratorio mostraron que las semillas de chía poseen gran potencial para su uso en el sector biotecnológico debido a la importante cantidad de macromoléculas presentes, principalmente carbohidratos, lípidos y proteínas. El contenido de este último grupo de compuestos es de destacar, ya que fue superior a lo tradicionalmente encontrado en los cereales de mayor consumo (como el maíz, trigo, etc.), con el 20% del total del peso seco. Por su parte, los carbohidratos fueron el principal compuesto hallado en las semillas, con el 39.3% del total, mientras que el contenido de aceite se ubicó en 32.6%.

Una vez comprobado que la cantidad de proteínas presentes en las semillas era adecuada en términos de rendimiento para llevar a cabo la extracción, se procedió al fraccionamiento del *bulk* usando como criterio la solubilidad de cada fracción en distintos solventes. A partir de lo anterior, se obtuvieron 4 fracciones principales: albúminas (solubles en agua), globulinas (solubles en NaCl 1 M), prolaminas (solubles en etanol al 70% v/v) y glutelinas (solubles en NaOH 0.2% v/v). La fracción con el mayor rendimiento másico fueron las globulinas, con 53.6% del total, seguido de las albúminas con 17.9%; las glutelinas y prolaminas, por su parte, mostraron contenidos de 14.3% y 11.96%, respectivamente.

Cada fracción fue sometida a una serie de pruebas generales con el fin de caracterizar aspectos básicos de cada grupo. En primer lugar, el análisis del peso molecular mediante dispersión estática de luz reveló que las proteínas presentan masas moleculares distribuidas en un intervalo amplio, siendo las albúminas la fracción de mayor peso (954 kDa), mientras que las globulinas, con 62.1 kDa, fueron la muestra con el menor valor hallado. Un hecho significativo de esta prueba es que el presente trabajo es pionero en el análisis de proteínas derivadas de chía mediante esta técnica.

El análisis de la estructura secundaria para cada fracción reveló que en todas las muestras existe una preponderancia significativa de configuraciones de tipo flexible (como α -hélice y random coil o estructuras aleatorias), las cuales en conjunto sumaron más del 60% del total. Diversos autores han destacado previamente la importancia de este tipo de disposiciones en la estabilización de sistemas dispersos debido a su potencial para situarse en interfases, comparadas con estructuras del tipo hoja- β .

La caracterización termodinámica mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) permitió establecer conclusiones valiosas respecto a las muestras. En primer lugar, el análisis de los termogramas facilitó la

visualización de distintos subtipos de proteínas dentro de cada una de las familias principales (albúminas, globulinas, prolaminas y glutelinas), todas ellas teniendo temperaturas de desnaturalización por arriba de los 75 °C, encontrando un máximo de 122.9 °C para un subtipo de globulina. Además, todas presentaron entalpías de desnaturalización superiores a lo reportado en estudios previos. Este hecho abre la puerta a múltiples aplicaciones para estas proteínas debido al interés creciente de desarrollar materiales capaces de soportar temperaturas elevadas durante el procesamiento sin perder sus propiedades funcionales.

En la última etapa de la caracterización general se analizó la variación de la solubilidad en agua como función del pH para los 4 tipos de proteínas aisladas. Todas las muestras presentaron perfiles de solubilidad similares, con valores máximos a pH's alcalinos, mientras que los valores más bajos se observaron alrededor de pH 3, debido, muy probablemente, a la cercanía con el punto isoeléctrico. La solubilidad máxima de estas muestras se logró a pH 12, donde alrededor del 85% de globulinas se encontraban solubilizadas, mientras que las glutelinas alcanzaron un límite del 70%.

La fase final de esta investigación consistió en examinar algunos de los principales parámetros que influyen en la actividad superficial de proteínas con la intención de analizar su potencial utilización como agentes estabilizantes de sistemas emulsificados, así como para la formación y/o estabilización de espumas.

Se examinó el perfil de hidrofobicidad de cada fracción mediante cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC), método que, al igual que la técnica de DSC, permitió visualizar distintos subtipos de cada familia de proteínas. Como era de esperarse, las albúminas y globulinas presentaron una mayor proporción de subtipos hidrofílicos, mientras que en las prolaminas y glutelinas predominan aquellos de carácter hidrofóbico. No obstante, las 4 fracciones muestran un equilibrio en su nivel de hidrofobicidad, hecho que favorece significativamente la actividad superficial. Por su parte, se comprobó que la capacidad de retención de agua no forzosamente está ligada a los perfiles de solubilidad, ya que las muestras de perfil predominante hidrofóbico mostraron valores elevados en este parámetro, lo cual es evidencia clara de que ambos fenómenos, a pesar de estar influenciados por eventos similares, son funciones complejas de distintas variables.

A través del análisis del potencial zeta se comprobó que las albúminas, prolaminas y glutelinas exhiben predominantemente carga superficial negativa en un amplio intervalo de pH, de hecho, existe una tendencia clara del aumento de ésta conforme se hace más alcalino el medio, alcanzando valores máximos entre -25 y -30 mV para las glutelinas. Por otra parte, esta tendencia se muestra muy débil para el caso de las globulinas, las cuales no superaron los -5 mV en el intervalo de pH evaluado. Los puntos isoeléctricos determinados en este test concuerdan con los valores mínimos de solubilidad hallados alrededor de pH 3. La presencia de grupos ionizables en la superficie de las proteínas influye de manera significativa en el desempeño que exhibirán en los procesos de fabricación de emulsiones y espumas, dado que la repulsión electrostática es

clave para la estabilidad de la fase dispersa, además de que se ha propuesto que aquellas proteínas cercanas a su punto isoelectrico son capaces de mostrar mayor actividad superficial.

Una de las caracterizaciones más importantes consistió en estudiar la dinámica de adsorción de las proteínas en interfaces agua-aire y agua-aceite. Mediante el monitoreo de la tensión interfacial se comprobó que las 4 fracciones analizadas disminuyen de forma notable este parámetro en tiempos muy cortos. Así mismo, el análisis de los datos reveló que el fenómeno global es complejo y consta principalmente de 3 etapas: a) difusión desde el *bulk* hacia la interfase, b) adsorción y despliegue en la interfase y c) agregación y reacomodo dentro de la capa interfacial. Se calcularon las constantes dinámicas en cada etapa, en donde aquellas en las que predominó una superficie hidrofílica mostraron mejor desempeño en un sistema agua-aire, mientras que aquellas en las que el carácter hidrofóbico preveleció funcionaron de mejor manera en la interfase agua-aceite.

ABSTRACT

The objective of this research was to characterize the main protein fractions contain in chia seeds (*Salvia hispanica*) in order to analyze their performance as agents with surface activity. The techniques used can be grouped, according to their purpose, into 3 different types, which were carried out in chronological order according to the following: 1) Physical-chemical characterization of chia seeds, 2) Extraction and general characterization of chia proteins fractions and 3) Evaluation of their surface activity.

The results obtained in the laboratory showed that chia seeds have great potential for use in the biotechnology sector due to a large number of macromolecules present, mainly carbohydrates, lipids, and proteins. The content of the latter group of compounds is noteworthy since it was higher than that commonly found within the higher consumed cereals, accounting for almost 20% of the total dry weight. On the other hand, carbohydrates were the main compound found in the seeds, with 39.3% of the total, whereas the oil content was 32.6%.

Once verified that proteins content in chia seeds was adequate to carry out the extraction procedure, we proceeded to the fractionation of the bulk, using solubility in different solvents as criterion for fractionation. In this sense, 4 main fractions were obtained: albumins (soluble in water), globulins (soluble in 1 M NaCl), prolamins (soluble in 70% ethanol) and glutelins (soluble in 0.2% NaOH). Globulins was the fraction with the highest yield with 53.6% of the total, followed by the albumins with 17.9%; while glutelins and prolamins, displayed contents of 14.3% and 11.96%, respectively.

Each fraction was subjected to a series of general tests, in order to characterize basic aspects of each group. First, the analysis of molecular weights by static light scattering revealed that these proteins have molecular masses distributed over a wide range, albumins being the highest weight fraction (954 kDa), while globulins, with 62.1 kDa, they were the sample with the lowest value found. A significant fact of this test is that the present work is a pioneer in the analysis of proteins derived from chia by this technique.

On the other hand, the analysis of the secondary structure for each fraction revealed that in all samples there is a significant preponderance of flexible type configurations (α -helix and random coil), which together accounted for more than 60% of the total. Several authors have previously highlighted the importance of this type of arrangement in the stabilization of dispersed systems due to their potential to be placed in interfaces, compared with structures of the β -sheet type.

Thermodynamic characterization carried out by using differential scanning calorimetry (DSC) allowed establishing valuable conclusions regarding the samples. In the first place, the thermograms analysis facilitated the visualization of different subtypes of proteins within each of the main families (albumins, globulins, prolamins, and glutelins), all of them displaying denaturation temperatures above 75 °C, where a maximum of 122.9 °C was shown by a globulin subtype. In addition, all of them showed denaturation

enthalpies superior to those reported in previous studies. This fact opens the door to multiple applications for these proteins due to the growing interest in developing materials capable of withstanding high temperatures during processing without losing their functional qualities.

In the last stage of the general characterization, the variation of water solubility as a function of pH in the 4 types of isolated proteins was analyzed. All the samples displayed similar solubility profiles, with maximum values at alkaline pH's, while the lowest values were observed around pH 3, due, most likely, to the proximity to the isoelectric point. The maximum solubility of these samples was achieved at pH 12, where around 85% of globulins were solubilized, while glutelins reached a limit of 70%.

The final phase of this investigation was to examine some of the main parameters that influence the surface activity of proteins, in order to use them as surface agents in the stabilization of oil/water type emulsified systems, as well in the formation and/or stabilization of foams.

The hydrophobicity profile of each fraction was examined by hydrophobic interaction chromatography (HIC), a method that, like the DSC technique, allowed the visualization of different subtypes of each protein family. As expected, albumins and globulins had a higher proportion of hydrophilic subtypes, whereas in prolamins and glutelins predominates those of a hydrophobic nature. However, the 4 fractions showed an equilibrium in their level of hydrophobicity, a fact that significantly favors surface activity. On the other hand, it was found that the capacity of water retention is not necessarily linked to the solubility profiles, since the samples of predominant hydrophobic profile showed high values in this parameter, which is clear evidence that both phenomena, despite if they are influenced by similar phenomena, they are complex functions of different parameters.

Through the analysis of the zeta potential, it was found that the albumins, prolamins, and glutelins exhibit predominantly negative surface charge over a wide pH range, in fact, there is a clear tendency of the increase in this as the environment becomes more alkaline, reaching maximum values between -25 and -30 mV for glutelins. On the other hand, this tendency is very weak in the case of globulins, which did not exceed -5 mV in the pH range evaluated. The isoelectric points determined in this test agree with the minimum values of solubility found around pH 3. The presence of ionizable groups on the surface of the proteins significantly influences the performance of proteins in the manufacturing processes of emulsions and foams since electrostatic repulsion is key to the stability of the dispersed phase, in addition to that it has been proposed that those proteins near their isoelectric point are capable of showing greater surface activity. One of the most important characterizations involved in studying the protein adsorption dynamics in water-air and water-oil interfaces. By monitoring the interfacial tension, it was verified that the 4 analyzed fractions decrease this parameter in a very short time. Likewise, the analysis of the data revealed that the global phenomenon is complex and consists mainly of 3 stages: a) diffusion from the bulk to the interface, b)

adsorption and deployment at the interface and c) aggregation and rearrangement within the interfacial layer. The dynamic constants in each stage were calculated, verifying that those in which a hydrophilic surface predominated showed better performance in a water-air system, while those in which the hydrophobic character prevailed worked better in the water-oil interface.

ÍNDICE GENERAL

INDICE DE TABLAS	14
INDICE DE FIGURAS	15
1. INTRODUCCIÓN	17
2.-ANTECEDENTES	18
2.1 <i>Salvia hispanica</i> L.	18
2.2 Proteínas	20
2.2.1 Estructura	20
2.2.1.1 Aminoácidos	21
2.2.1.2 Péptidos	22
2.2.2 Fuentes principales.....	23
2.2.3 Fuentes emergentes.....	28
2.2.4 Propiedades tecno-funcionales	32
2.2.4.1 Unión de sabores.....	32
2.2.4.2 Propiedades de hidratación.....	33
2.2.4.3 Propiedades interfaciales.....	34
2.2.4.4 Factores que afectan las propiedades funcionales	35
2.3 Actividad superficial.....	38
2.3.1 Tensión interfacial.....	38
2.3.1.1. Métodos de caracterización	39
2.3.2 Origen de la actividad superficial en proteínas	45
2.3.2.1 Estructura y conformación molecular	45
2.3.2.2 Carga superficial	45
2.3.2.3 Tamaño de molécula.....	46
2.3.2.4 Hidrofobicidad	47
2.3.3 Absorción y desorción de proteínas en interfaces	47
2.4 Surfactantes y emulsificantes	49
2.4.1 Clasificación y características.....	49
2.4.3 Métodos experimentales para evaluar el desempeño de surfactantes y emulsificantes.....	50
3.-JUSTIFICACIÓN	53
4.-OBJETIVOS	54
4.1 Objetivo general	54
4.2 Objetivos particulares	54
5.-HIPÓTESIS	54
6.-MATERIALES Y MÉTODOS	55
16.1 Estrategia experimental	55
6.2 Materiales	55
6.3 Caracterización fisicoquímica de semillas de chía	56
6.3.1 Contenido de proteína total.....	56
6.3.2 Determinación de azúcares totales	57
6.3.3 Extracción y cuantificación de lípidos	57

6.3.4 Contenido de humedad.....	57
6.3.5 Determinación de cenizas.....	57
6.4 Fraccionamiento y caracterización de proteínas.....	58
6.4.1 Aislamiento y cuantificación.....	58
6.4.2 Determinación de pesos moleculares.....	58
6.4.3 Análisis de hidrofobicidad.....	59
6.4.4 Estructura secundaria.....	59
6.4.5 Caracterización termodinámica.....	60
6.4.6 Solubilidad.....	60
6.4.7 Capacidad de retención de agua y aceite.....	60
6.4.8 Carga superficial.....	61
6.4.9 Dinámica de adsorción en la interfase.....	61
6.4.10 Reología interfacial.....	61
7.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	63
.....	89
.....	89
.....	91
8.-CONCLUSIONES.....	91
9.-REFERENCIAS.....	93

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Posibles reacciones de grupos de cadenas laterales en proteínas. Los nombres hacen referencia al residuo aminoácido en la cadena polipeptídica (Walstra & Van Vliet, 2003).....	37
Tabla 2. Composición de aminoácidos presentes en las semillas de chía	64
Tabla 3. Resumen de valores obtenidos en el ajuste lineal para la determinación de pesos moleculares.	69
Tabla 4. Fracciones de proteínas de chía obtenidas mediante el uso de cromatografía de interacción hidrofóbica.....	72
Tabla 5. Rango de temperatura de desnaturalización (ΔT_d), temperatura máxima de desnaturalización (T_d) y entalpia de desnaturalización (ΔH_d) del extracto liofilizado de las fracciones proteicas de semillas de chía	77
Tabla 6. Parámetros de adsorción característicos de proteínas de chía en interfaces agua-aire y agua-aceite.	86
Tabla 7. Parámetros viscoelásticos obtenidos de las membranas formadas por fracciones de proteínas de chía.....	90

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Niveles estructurales en proteínas (Cox & Nelson, 2017).	21
Figura 2. Estructura general de un aminoácido. Esta estructura es común en todos los aminoácidos, excepto en la prolina, que posee una estructura cíclica (Cox & Nelson, 2017).	22
Figura 3. Estructura cristalina de la globulina 7S básica de la soya (<i>Glycine max</i>) (Yoshizawa et al., 2011)	28
Figura 4. Estructura cristalina de la prolegumina, un tipo de globulina 11S presente en los chícharos (<i>Pisum sativum</i> L.) (Tandang-Silvas et al., 2010).....	28
Figura 5. Esquemas de diversas técnicas experimentales utilizadas para monitorear la tensión interfacial (Drelich et al., 2006).	41
Figura 6. Análisis proximal de semillas de chía	63
Figura 7. Proporción de las fracciones proteicas presentes en semillas de chía	66
Figura 8. Ajuste de curvas para la determinación de pesos moleculares de las fracciones proteicas de semillas de chía.....	67
Figura 9. Perfil del fraccionamiento de albúminas de chía por cromatografía de interacción hidrofóbica .	70
Figura 10. Perfil del fraccionamiento de globulinas de chía por cromatografía de interacción hidrofóbica	70
Figura 11. Perfil del fraccionamiento de prolaminas de chía por cromatografía de interacción hidrofóbica.	71
Figura 12. Perfil del fraccionamiento de glutelinas de chía por cromatografía de interacción hidrofóbica.	71
Figura 13. Espectros FT-IR de proteínas presentes en las semillas de chía.....	73
Figura 14. Perfiles de deconvolución FT-IR en la región amida I para los 4 tipos de proteínas presentes en las semillas de chía.	73
Figura 15. Componentes estructurales secundarios para los 4 tipos de proteínas presentes en las semillas de chía.	74
Figura 16. Termogramas DSC de los distintos tipos de proteínas aisladas de las semillas de chía	75
Figura 17. Análisis del termograma perteneciente a la fracción albúminas mediante el ajuste de múltiples picos Gaussianos	76
Figura 18. Análisis del termograma perteneciente a la fracción prolaminas mediante el ajuste de múltiples picos Gaussianos	76

Figura 19. Análisis del termograma perteneciente a la fracción globulinas mediante el ajuste de múltiples picos Gaussianos	76
Figura 20. Análisis del termograma perteneciente a la fracción glutelinas mediante el ajuste de múltiples picos Gaussianos	77
Figura 21. Curvas de solubilidad como función del pH para las 4 fracciones de proteínas de chíá.....	78
Figura 22. Capacidad de retncion de agua (WAC) y aceite (WOC) para fracciones proteicas de semillas de chíá.	80
Figura 23. Potencial zeta como función del pH para las distintas fracciones de proteínas de chíá.	81
Figura 24. Evolución de la presión superficial a través d el tiempo para la adsorción de proteínas de chíá en un sistema agua-aire.	83
Figura 25. Evolución de la tensión interfacial a través del tiempo para la adsorción de proteínas de chíá en un sistema agua-aceite.	83
Figura 26. Evolución de la tensión interfacial a través del tiempo para la adsorción de proteínas de chíá en un sistema agua-aire.	83
Figura 27. Evolución de la presión superficial a través d el tiempo para la adsorción de proteínas de chíá en un sistema agua-aceite.	84
Figura 28. Constantes de penetración (k_p) y reacomodo (k_r) para las fracciones de proteínas de chíá en una interfase agua-aire.	84
Figura 29. Constantes de penetración (k_p) y reacomodo (k_r) para las fracciones de proteínas de chíá en una interfase agua-aceite.	84
Figura 30. Curva modelo de las pruebas de capacidad de fluencia (Creep compliance). Pérez-Orozco (2006).	87
Figura 31. Perfiles de fluencia en la interfase agua-aceite a través del tiempo para la fracción albúminas...	88
Figura 32. Perfiles de fluencia en la interfase agua-aceite a través del tiempo para la fracción prolaminas.	89
Figura 33. Perfiles de fluencia en la interfase agua-aceite a través del tiempo para la fracción gluteliinas.	91

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

La industria de los tensoactivos y emulsificantes es un sector sumamente dinámico y en constante crecimiento. Tan sólo durante el año 2012 esta industria generó alrededor de 2.1 billones de dólares en ganancias, mientras que para el presente año las estimaciones apuntan a cerca de 2.9 billones en dividendos (McClements & Gumus, 2016).

En este sentido, la investigación en la generación de materiales novedosos capaces de crear nuevas oportunidades en el mercado, así como la mejora de los ya existentes, es una actividad que ha experimentando un creciente auge en los últimos años. Paralelamente, el vertiginoso crecimiento de la población plantea serios desafíos debido a la necesidad de cubrir los requerimientos alimentarios, así como el abasto de ciertos productos comerciales que forman parte de la vida cotidiana para la sociedad. Muchos de estos productos, tanto alimenticios, de cuidado personal, cosméticos, detergentes y productos farmacéuticos constan de formulaciones que pertenecen a la categoría de los sistemas dispersos, tales como emulsiones y espumas; estos son sistemas multifásicos termodinámicamente inestables que requieren de la adición de agentes tensoactivos y/o emulsificantes para alargar su vida útil.

Algunas de las moléculas más empleadas con este fin son las proteínas, tradicionalmente obtenidas a partir de fuentes animales y, recientemente, algunas vegetales específicas, lo que aunado a la explotación desmedida de estas para aprovechar otros productos pone en serio riesgo la sustentabilidad ambiental ante la demanda mundial que aumenta exponencialmente.

También, un porcentaje importante de los emulsificantes y tensoactivos usados en el sector industrial son de origen sintético, lo que recientemente se ha convertido en un asunto de interés debido a las preferencias por parte de los consumidores, quienes demandan cada vez más productos de origen natural en las principales formulaciones que consumen.

Ante este panorama, es urgente que se apremie la investigación científica con el fin de proponer nuevos materiales que sean capaces de ofrecer alternativas viables en este sector. Bajo esta premisa, el presente trabajo puso como objetivo principal caracterizar las propiedades superficiales de las proteínas de chíá (*Salvia hispanica*) para verificar la factibilidad de su uso como estabilizantes de emulsiones tipo aceite en agua (O/W) y espumas.

CAPÍTULO 2

2.-ANTECEDENTES

2.1 *Salvia hispanica* L.

La chía (*Salvia hispanica* L.) es una planta anual de la familia *Lamiaceae* que crece en extensas áreas del oeste de México y el norte de Guatemala. Las semillas de chía, junto con el maíz, frijoles y amaranto fueron de los principales cultivos en las sociedades precolombinas (Olivos-Lugo *et al.*, 2010).

Las semillas de chía son una fuente importante de nutrientes, tales como aminoácidos esenciales y ácidos grasos poliinsaturados. De hecho, el contenido proteico en estas semillas es mayor que el de la mayoría de los cereales utilizados tradicionalmente, ya que contienen aproximadamente 19-23% (p/p), que es mayor a la presente en el trigo (14% p/p), maíz (14% p/p), arroz (8.5% p/p), avena (15.3% p/p) y cebada (9.2% p/p) (Sandoval-Oliveros & Paredes-López, 2013). Los aminoácidos esenciales como la leucina, isoleucina y valina comprenden 42.2-42.9% del total de aminoácidos presentes en dichas semillas; esta proporción es mayor que lo reportado en las semillas de oleaginosas más comunes como la soya y el girasol (Timilsena *et al.*, 2016a).

Además, las semillas de chía contienen una elevada cantidad de ácidos grasos omega 3 (p. ej. ácido α -linolénico), considerado un ácido graso esencial. Dentro de este tipo de ácidos grasos esenciales también se incluyen los omega 6 (p. ej. ácido linoleico) y omega 9 (p. ej. ácido oleico), los cuales son moléculas vitales para el organismo humano, debido a su incapacidad de sintetizarse dentro del mismo. Su presencia es fundamental para mantener la salud mental y prevención de enfermedades cardiovasculares e inflamatorias (Timilsena *et al.*, 2016b); por lo tanto, estas moléculas deben ser suministradas a través de la dieta en las cantidades necesarias. En general, alrededor del 30-40% corresponde a materia lipídica, y de esta cantidad, el 85% corresponde a ácidos grasos poliinsaturados (incluidos omega 3 y 6) (Timilsena *et al.*, 2016a).

No obstante, estos no son los únicos compuestos de interés presentes en estas semillas. En los últimos años se ha reportado la identificación de componentes de tipo flavonoide como la miricetina, quercetina, kaempferol y algunos ácidos cinámicos como el cafeico y clorogénico (cuya actividad antioxidante ha sido demostrada hace ya varios años), además de la presencia de un polisacárido con alto contenido de ácido urónico, cuya estructura química se conforma por una cadena principal de unidades β -D-xilopiranosil y α -D-glucopiranosil con ramificaciones de ácido 4-O-metil glucopiranosilurónico que se comporta como mucílago con una alta capacidad de retención de agua (Vázquez-Ovando *et al.*, 2010).

Las investigaciones que dieron lugar a los resultados mencionados anteriormente sentaron las bases para un gran número de trabajos posteriores cuyo objetivo fue analizar el papel de estas moléculas en el tratamiento de padecimientos crónicos degenerativos. Como consecuencia de ello, se demostró que algunas de las sustancias presentes en las semillas de chía poseen un amplio potencial en el tratamiento de enfermedades

cardiovasculares, obesidad, regulación del tránsito intestinal, niveles de colesterol y triglicéridos, así como en la prevención de enfermedades como diabetes tipo II y algunos tipos de cáncer (Bemelmans *et al.*, 2002; Vázquez-Ovando *et al.*, 2010; Ixtaina *et al.*, 2011; Poudyal *et al.*, 2012; Jin *et al.*, 2012). Así, a finales de los años 90's y durante la primera década del presente siglo surgieron investigaciones alrededor de todo el mundo siguiendo la misma tendencia (Vuksan *et al.*, 2007; Fernandez *et al.*, 2008; Chicco *et al.*, 2009); incluso actualmente esta línea de investigación continúa siendo muy relevante (Marineli *et al.*, 2015; Oliva *et al.*, 2013; Orona-Tamayo *et al.*, 2015).

Sin embargo, es claro que las propiedades tecnofuncionales de este grupo de moléculas no estaban siendo abordadas dentro del creciente número de investigaciones, como se demuestra en la cantidad de estudios publicados si se compara con el enfoque médico-dietético. En realidad, el análisis de las propiedades tecnológicas de las moléculas presentes en las semillas de chía comenzó hace aproximadamente 10 años. Así, en la primera etapa de esta nueva ola de investigaciones, la mayoría de los trabajos científicos trataron de establecer las características fisicoquímicas principales de los mayores componentes de las semillas de chía (Vázquez *et al.*, 2009; Capitani *et al.*, 2015; Olivos-Lugo *et al.*, 2010; Sandoval-Oliveros & Paredes-López, 2013). Posteriormente, se trabajó en la incorporación de estos compuestos con la intención de añadir alguna función particular dentro de un producto específico, como en el caso de ciertos productos alimenticios que han sido denominados alimentos funcionales (Fernandes *et al.*, 2018; Zettel & Hitzmann, 2016; Ullah *et al.*, 2018). En este mismo contexto, diversos artículos de consumo masivo como alimentos, pasando por productos de cuidado personal, hasta llegar a formulaciones farmacéuticas, pertenecen a la categoría de sistemas dispersos debido a su composición. Una de las características más notables de esta gama de productos es su estructura polifásica, lo que en muchas ocasiones involucra la incorporación de moléculas capaces de mantener la estabilidad del sistema por un cierto tiempo.

Las proteínas son compuestos capaces de anclarse en interfaces y de esta manera ayudar a mantener la integridad del sistema en cuestión al disminuir la tensión interfacial. Si bien las características superficiales de muchas proteínas han quedado elucidadas, para el caso de las proteínas vegetales, y en especial las de chía, los mecanismos involucrados en su accionar cuando son incorporadas en este tipo de productos no se ha descrito con detalle, a pesar de la existencia de reportes que describen la estabilización de emulsiones con estas moléculas. Por lo tanto, en el presente trabajo se ha profundizado en aquellas propiedades que influyen en la efectividad de un compuesto para ser considerado un buen agente superficial, y de esta manera, ofrecer una alternativa viable al uso de materiales sintéticos y/o proteínas de origen animal en la industria biotecnológica.

2.2 Proteínas

Las proteínas desempeñan un papel fundamental en los sistemas biológicos y abarcan todo tipo de funciones: estructura, transporte, motilidad, defensa, reconocimiento, almacenamiento y la función catalítica que realizan las enzimas (Gálvez *et al.*, 2013).

2.2.1 Estructura

Las proteínas son polímeros altamente complejos constituidos a partir de 20 diferentes aminoácidos, las unidades más simples de la estructura química común en todas las proteínas. Estas unidades están ensambladas a través de enlaces amida sustituidos. A diferencia de los enlaces glicosídico y fosfodiéster en polisacáridos y ácidos nucleicos, respectivamente, los enlaces amino de las proteínas son enlaces parciales dobles, los cuales promueven la complejidad estructural de estos polímeros (Damodaran, 2008). En el nivel más elemental, las proteínas contienen 50-55% (p/p) de carbono, 6-7% (p/p) de hidrógeno, 20-23% (%) de oxígeno, 12-19%(p/p) de nitrógeno y 0.2-3% (p/p) de azufre.

La estructura de una proteína posee 4 niveles de complejidad:

1. Estructura primaria. Describe simplemente la secuencia de aminoácidos en la cadena polipeptídica.
2. La estructura secundaria describe las grandes subestructuras regulares que se forman cuando la proteína se pliega. Existen dos tipos de subestructuras principales, estas son la α -hélice y la hoja- β . Ciertos aminoácidos se conocen como formadores de hélices (que incluyen, por ejemplo, metionina, alanina y leucina), estos forman espirales apretadas (α -hélices) que se pueden unir mediante bucles (secuencias cortas de aminoácidos con estructura suelta). Los puentes de hidrógeno entre el oxígeno con doble enlace de un aminoácido y el hidrógeno amino del cuarto aminoácido siguiente a lo largo de la hélice mantienen unida la estructura.

Por su parte, las hojas- β se forman cuando las cadenas lineales de aminoácidos en el polipéptido se orientan una frente a la otra en sentido paralelo (de grupo amino a carboxilo) o en direcciones opuestas (antiparalelas, una va de amino a carboxilo y la otra en sentido contrario) a medida que la cadena proteica se pliega. Los puentes de hidrógeno que se forman entre el oxígeno carboxílico y el hidrógeno amino de los aminoácidos opuestos dan rigidez a la estructura. Estas cadenas se unen en cada extremo por bucles o giros, resultando así una estructura lineal plana denominada hoja β -plegada o lámina β .

3. La estructura terciaria es la estructura final que se forma a partir de las estructuras secundarias, es la estructura tridimensional final de la proteína. Se mantiene estable mediante puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals, interacciones hidrofóbicas y puentes disulfuro. Algunas proteínas solo funcionan cuando dos o más cadenas polipeptídicas se unen para formar dímeros/trímeros, etc.,

conocidos colectivamente como oligómeros. Estos pueden estar hechos de subunidades idénticas (proteínas componentes) y llamarse homómeros, o diferentes subunidades y llamarse heterómeros.

- La disposición hecha por la formación de oligómeros se conoce como estructura cuaternaria. La figura 1 resume los niveles de complejidad existentes en una proteína.

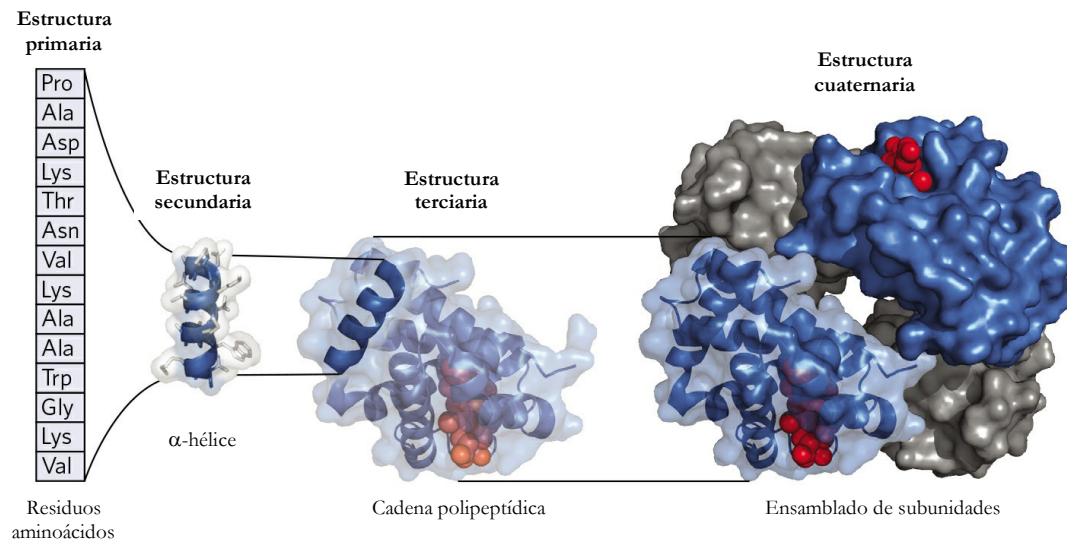


Figura 1. Niveles estructurales en proteínas (Cox & Nelson, 2017).

La función de una proteína está determinada por su estructura más que por su secuencia de aminoácidos. Sin embargo, la secuencia de los aminoácidos es un factor clave para determinar la estructura final de la proteína. Una proteína sin estructura fija se dice que está en una formación de espiral al azar (*random coil*), esta tiene muy poca estructura regular y no posee actividad. Las proteínas funcionales tienen una estructura muy regulada que se mantiene unida por puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals entre aminoácidos cercanos, puentes disulfuro entre residuos de cisteína e interacciones hidrofóbicas (Malvern Instruments, 2017).

2.2.1.1 Aminoácidos

Son moléculas pequeñas con una estructura común. Poseen un átomo de carbono unido a un grupo amino y uno carboxilo, un átomo de hidrógeno y un cuarto grupo funcional (R). Este grupo funcional es variable y es el que cambia en cada uno de los aproximadamente 20 aminoácidos que los sistemas biológicos usan para construir proteínas (Malvern Instruments, 2017). Los diferentes grupos funcionales en los aminoácidos les confieren distintas propiedades. En el caso más sencillo R=H (ácido aminoacético o glicina), en los otros aminoácidos R es un resto alifático o heterocíclico, que puede ser portador de otros grupos funcionales (ver figura 2). El número total de aminoácidos existentes en la naturaleza es del orden de 200.

Los aminoácidos se clasifican desde distintos puntos de vista. No obstante, la cadena lateral de los aminoácidos es decisiva para las interacciones intra- e intermoleculares de las proteínas, por lo que se pueden clasificar así:

- a) Aminoácidos con cadena lateral sin carga y apolar: glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina.
- b) Aminoácidos con cadena lateral sin carga y polar: serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina, glutamina
- c) Aminoácidos con cadena larga cargada: ácido aspártico, ácido glutámico, histidina, lisina y arginina

Desde el punto de vista de la fisiología de la nutrición se pueden dividir en:

- a) Aminoácidos esenciales: valina leucina, isoleucina, fenilalanina, triptófano, metionina, treonina, histidina (esencial para el lactante), lisina y arginina(semiesencial).
- b) Aminoácidos no esenciales: glicina, alanina, prolina, serina, cisteína, tirosina, asparagina, glutamina, ácido aspártico, ácido glutámico (Belitz *et al.*, 2009).

2.2.1.2 Péptidos

Los péptidos se forman por unión de los aminoácidos entre sí a través de enlaces conocidos como peptídicos entre el carbono del grupo carboxilo y el nitrógeno del grupo amino; cuando se forma el enlace se libera una molécula de agua. En general, para la síntesis de péptidos es necesario bloquear los grupos que no deban reaccionar. Una vez efectuada la síntesis, los grupos protegidos deben liberarse en condiciones tales que los

enlaces peptídicos permanezcan estables.

Los péptidos son nombrados de acuerdo con el número de restos aminoácidos, de esta manera se forman di, tri, tetrapéptidos, etc. El término oligopéptidos es usado para aquellos con 10 o menos restos de aminoácidos; los péptidos de alto peso molecular se denominan polipéptidos. La transición de polipéptido a proteína no está definida claramente, pero comúnmente se asume como el límite un peso molecular aproximado de 10 kDa; es decir, se requieren cerca de 100 aminoácidos en la cadena peptídica para poder llamarla proteína. Los péptidos se hallan profundamente distribuidos, frecuentemente tienen acciones biológicas específicas (hormonas, toxinas y antibióticos peptídicos) (Belitz *et al.*, 2009).

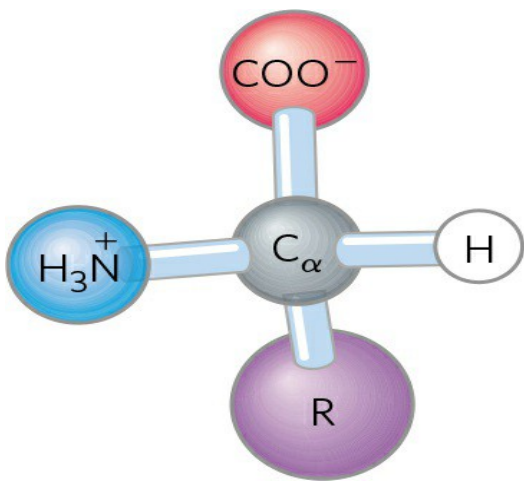


Figura 2. Estructura general de un aminoácido. Esta estructura es común en todos los aminoácidos, excepto en la prolina, que posee una estructura cíclica (Cox & Nelson, 2017).

2.2.2 Fuentes principales

Las proteínas son capaces de desempeñar diversos roles en los alimentos cuando forman parte de estructuras ingeridas como tales o al incorporarse como aditivos. Estas macromoléculas son de gran utilidad tanto en su forma nativa como modificada por procedimientos químicos o enzimáticos. Por ello, la industria biotecnológica continuamente explora la incorporación de nuevas fuentes de proteínas; este proceso depende de distintos factores, tales como la inocuidad y rentabilidad en la aplicación de estas.

Los productos animales que aportan proteínas a la dieta humana son el huevo, la leche y la carne de diversas especies, principalmente.

a) Proteínas del huevo. Su composición varía si se considera el huevo fresco o almacenado. En conjunto con los lípidos que se encuentran en el huevo proporcionan un alto valor nutritivo debido a que su perfil de aminoácidos es similar al de las proteínas de suero de leche. Se les considera alérgenos importantes, en especial las de la clara. Sun *et al.* (2004) constataron que la fracción proteica presente en la clara es altamente sensible a factores promotores de la desnaturalización, particularmente pH y tratamientos térmicos; simultáneamente exhiben gran potencial para asociarse y crear geles con variadas propiedades reológicas, comportamiento que incumbe a otras moléculas, como el tipo de azúcar existente. Asimismo, pueden formar agregados y coagular según las condiciones de pH, temperatura y sales que intervienen en este proceso y de cuyas variaciones dependerá la rigidez de los geles (Azakami *et al.*, 2005). Uno de los usos más extendidos de las proteínas de la clara es la formación de espumas, que se logra tras la desnaturalización de los polipéptidos y la formación de una interfase aire/líquido relativamente estable propia de este estado de dispersión. Los daños térmicos a las proteínas ocasionan una reducción del espumado, sobre todo si se calientan a temperaturas superiores a 60 °C, pero la adición de ciertas sales y sacarosa ejerce un efecto protector. Cuando se calienta la espuma el aire se hincha y la estructura se mantiene si las proteínas no han sufrido daño (Gálvez *et al.*, 2013).

b) Proteínas de la carne. El contenido proteico de estos tejidos es alto, cercano al 70% de la materia seca, independientemente del tipo de animal del que provengan (porcinos, vacunos, ovinos, etc.). Los tipos de proteína presentes se han clasificado en tres grandes grupos, de acuerdo con su función biológica y su solubilidad: proteínas contráctiles o miofibrilares, proteínas sarcoplásmicas o solubles y proteínas del estroma o insolubles.

Las proteínas miofibrilares son las que conforman estructuralmente el tejido muscular y, además, las que transforman la energía química en mecánica durante la contracción y relajación de los distintos músculos. Son solubles en soluciones salinas concentradas. Las proteínas sarcoplásmicas también se conocen con el nombre genérico de miógeno; son principalmente globulinas y albuminas, se

caracterizan por ser buenos agentes emulsificantes y retener una gran cantidad de agua, también tienen la capacidad de coagular y formar geles. Las proteínas del estroma o insolubles conforman el tejido conectivo fuerte en los tendones, la piel, el hueso y las capas más rígidas que envuelven y soportan los músculos.

La suavidad de la carne es una sensación que se debe básicamente a factores físicos y bioquímicos de las proteínas miofibrilares y el colágeno, los tratamientos térmicos afectan de manera distinta a cada una de estas fracciones. La composición de las fibras de los diferentes músculos esqueléticos es uno de los factores más importantes que afecta los eventos bioquímicos asociados con la conversión del músculo a carne (Gálvez *et al.*, 2013).

- c) **Gelatina.** Es una proteína derivada de la hidrólisis selectiva del colágeno, el componente orgánico más abundante en huesos y piel de mamíferos. En general, se busca obtener cadenas de alto peso molecular que faciliten la gelificación. La formación de sus geles termorreversibles se afecta con el pH, la fuerza iónica, la concentración, el punto isoeléctrico de la proteína, etc. Por su naturaleza química, esta proteína está sujeta a reacciones de deterioro, como la hidrólisis por acción de ácido, enzimas y microorganismos, que pueden destruir la estructura tridimensional que conforma el gel. Es importante recordar que por su bajo contenido de aminoácidos esenciales su calidad nutricional es baja (Gálvez *et al.*, 2013)
- d) **Proteínas de pescado.** El contenido de proteínas en los peces es muy variable (alrededor de 12-13% base húmeda), y al igual que en la carne, estas se dividen en contráctiles o miofibrilares, sarcoplásmicas o solubles y proteínas del estroma o insolubles. En estos 3 grupos, entre el 70 y 80% corresponden a globulinas, 10-20% de albuminas y entre 2-4% de queratinas y colágeno. Si se refinan las proteínas miofibrilares estas pueden formar geles entre 5 y 40 °C; sin embargo, la mayoría de las proteínas presentes en el pescado poseen baja funcionalidad; aunado a esto, existen otras limitantes importantes para su aplicación en productos específicos, tales como la alta susceptibilidad de su grasa al deterioro oxidativo y un sabor característico sumamente marcado (Park & Reed, 2015). No obstante, estudios recientes reportan que al trabajar con hidrolizados proteicos estos poseen buena solubilidad en una amplia gama de fuerzas iónicas y niveles de pH; además de que contribuyen a la retención de agua, textura y propiedades emulsificantes cuando se incorporan en alimentos. De igual manera se reportan buenas propiedades espumantes, resaltando el hecho de que los hidrolizados deben poseer un tamaño molecular óptimo para garantizar la funcionalidad (Halim *et al.*, 2016).
- e) **Proteínas lácteas.** El nivel de proteínas de la leche bovina está entre 3 y 3.5%, de acuerdo con la raza y alimentación del ganado productor. Las proteínas lácteas se agrupan en dos grandes conjuntos: las caseínas (80%) y las proteínas del suero (20%) (Gálvez *et al.*, 2013). Las caseínas son por definición

las fosfogluco proteínas que precipitan de la leche descremada a pH 4.6 y 20 °C, los grupos fosfato por lo general esterifican a los hidroxilos de las serinas. Su estabilidad en el seno de la leche se debe a su fuerte carga eléctrica negativa, que cuando se neutraliza en el punto isoeléctrico las vuelve inestables. Prácticamente todas las moléculas de caseína están asociadas entre si e integran las micelas, pero una pequeña cantidad se encuentra en solución. Existen cuatro fracciones principales que se diferencian por su movilidad electroforética: α_s , β , κ y γ . La mayoría tiene variantes genéticas en algunas razas de vacas que se designan con las letras A, B, C y D; cabe aclarar que una variante genética es una proteína que cambia su estructura primaria en solo unos cuantos aminoácidos. Las caseínas tienen varias propiedades comunes: alto contenido de ácidos glutámico y aspártico, el aminoácido prolina está distribuido de forma homogénea a lo largo de la estructura primaria y por impedimentos estéricos provoca que no se formen hélices como estructura secundaria; contiene más aminoácidos hidrófobos que hidrófilos; las caseínas α , β y γ son muy sensibles a la alta concentración de los iones calcio y precipitarían si no se contara con la caseína κ , que cumple una función protectora y estabilizadora; contienen regiones cargadas que les permite unirse electrostáticamente, presentan regiones fosforiladas que facilitan sus interacciones con calcio. Todas las caseínas tienen secciones con una hidrofobicidad alta que proviene de los aminoácidos aromáticos y alifáticos (Badui, 2013).

Las proteínas del suero son compactas, globulares, con un peso que varía entre 14,000 y 1,000,000 de Da y son solubles en un intervalo de pH muy amplio. En estado natural no se asocian con las caseínas; constan por lo menos de ocho fracciones diferentes, entre las cuales destacan la β -lactoglobulina, la α -lactoalbúmina, las inmunoglobulinas, la albúmina bovina y las proteasas peptonas. En general son muy sensibles a las altas temperaturas y en menor grado al pH ácido (contrario a lo que ocurre con las caseínas), debido a que están muy hidratadas y no tienen carga eléctrica externa; son las primeras proteínas de la leche en desnaturalizarse y su calentamiento libera grupos sulfhidrilo que reduce el potencial de oxido-reducción, lo que inhibe parcialmente las reacciones de oxidación. Contienen la mayoría de los aminoácidos y presentan un mejor balance de estos que las propias caseínas (Badui, 2013).

Respecto a las propiedades funcionales, los caseinatos son muy solubles y extremadamente estables al calor en un amplio intervalo de condiciones. Debido a su estructura anfifílica estas proteínas son útiles en procesos de emulsificación, retención de agua, como agentes espesantes, espumado y formación de geles. En el caso de las proteínas de suero la solubilidad y actividad superficial pueden verse mermadas en caso de desnaturalización; la presencia de lípidos interfiere durante el proceso de espumado. Debido a que las formas no desnaturalizadas de las proteínas del suero son solubles bajo

condiciones ácidas, pueden tener aplicaciones en formulaciones de alimentos de tipo ácido que requieran solubilidad (Damodaran *et al.*, 2008).

En el caso de las proteínas vegetales, éstas se obtienen principalmente de semillas de leguminosas, cereales, oleaginosas y, en baja proporción, de hojas verdes. Las posibilidades de aprovechamiento en la industria de alimentos dependen de su resistencia al procesamiento y de la presencia de compuestos antinutricionales en la fuente vegetal de interés. El alto número de proteínas vegetales ha llevado a diferentes esquemas de clasificación; inicialmente se agruparon en términos de su solubilidad con el procedimiento de Osborne, o según su función; los criterios más recientes son de tipo genómico (Gálvez *et al.*, 2013). Aunque existe una cantidad importante de plantas utilizables para alimentación, sólo una fracción pequeña de estas se aprovecha extensamente; sin embargo, existe la posibilidad de incrementar su valor agregado al obtener componentes específicos de interés, rubro en el que los concentrados y aislados proteicos de distintas fuentes han conseguido gran relevancia.

- a) **Proteínas de cereales.** Las proteínas de reserva más abundantes en los cereales se denominan glutelinas, con una proporción aproximada del 12%, y en menor cantidad existen las albúminas y globulinas, que sólo representan aproximadamente 15% del total, y cuyo peso molecular promedio es de 12,000 Da.

En el caso del trigo, la capacidad de esponjamiento en la elaboración del pan se debe principalmente a sus proteínas. Las glutelinas del trigo reciben el nombre de gluteninas; las prolaminas, a su vez, el de gliadinas, y ambas suman 85% de la fracción proteínica. Las gliadinas son solubles en etanol al 70% y representan 50% del total de las proteínas, se han dividido en cuatro grupos (α , β , γ y ω). Sus cadenas simples tienen estructuras primarias con diferente composición de aminoácidos y su peso molecular varía de 15,000 a 80,000 Da; su conformación se estabiliza mediante enlaces disulfuro intramoleculares. Por otro lado, se han identificado 15 gluteninas en forma monomérica con pesos moleculares que van de 12,000 a 135,000 Da y que se caracterizan por un elevado número de enlaces disulfuro que confieren gran estabilidad. Son insolubles en soluciones salinas neutras y en etanol al 70%, solubles o dispersables en ácidos y en bases débiles (Gálvez *et al.*, 2013).

- b) **Proteínas de leguminosas.** Las principales especies que se explotan son: frijol (*Phaseolus vulgaris*), chícharo (*Pisum sativum*), lenteja (*Lens culinaris*), garbanzo (*Cicer arietinum*), cacahuete (*Arachis hypogaea*), haba (*Vicia faba*) y soya (*Glycine max*). Existen, además, un gran número de especies no explotadas que podrían introducirse como alimento o sus derivados generados productos de mayor valor agregado (Gálvez *et al.*, 2013).

Las semillas de soya contienen en promedio 36-38% de proteínas. A pesar de que contienen mayor cantidad de proteínas que otras fuentes vegetales, la calidad nutricional no es comparable con las de

origen animal. Los aminoácidos con contenido de azufre son el limitante nutricional más importante. Las proteínas de soya son una mezcla polimórfica compleja de polipéptidos y como muchas especies de leguminosas contienen cuatro grandes grupos de proteínas: de almacenamiento, enzimas e inhibidores enzimáticos, estructurales y proteínas de membrana. Estos grupos a su vez consisten principalmente de globulinas (ver *Figura 3*) divididas en dos subgrupos: glicina y β -conglucina. Las globulinas de soya difieren en sus propiedades funcionales, especialmente en la gelificación; los geles obtenidos a partir de glicina son más firmes que los obtenidos con β -conglucina. La glicina es un hexámero con un peso molecular de 300-380 kDa y está formada por la asociación de seis polipéptidos ácidos y seis básicos, las subunidades ácidas tienen un punto isoeléctrico de 4.5-5.5, mientras que las básicas de 6.5-8.5. Cada subunidad está compuesta de un polipéptido ácido y un básico conectados por un puente disulfuro. Por su parte, la β -conglucina tiene un peso molecular de 150-200 kDa, es una glicoproteína y un trímero compuesto de las subunidades α , α' y β . Este complejo sufre un proceso de asociación-disociación dependiente de la fuerza iónica y el pH (Mojica *et al.*, 2015). La aplicación de proteínas de soya en productos alimentarios se ha incrementado debido a su disponibilidad, bajo costo y valor nutricional; actúan como emulsificantes macromoleculares en la formación y estabilización de diversas dispersiones alimenticias (Mojica *et al.*, 2015).

Como otras leguminosas, el chícharo es rico en proteínas, con un balance adecuado de aminoácidos, especialmente lisina. La mayoría de las proteínas de chícharo son de almacenamiento; legumina y vicilina representan alrededor del 65-80% del total extraíble. La legumina tiene regularmente una estructura hexamérica cuaternaria (ver *Figura 4*), mientras que la vicilina es un trímero con subunidades de 50 kDa y constituye alrededor del 35% del total de proteínas contenido en los chícharos. A la fecha, los productos con proteínas de chícharo son limitados en aplicaciones alimentarias. Una de las mayores limitantes es que la funcionalidad de estas proteínas como ingredientes son relativamente débiles comparadas con las de la soya. Sin embargo, es probable que esto se deba al escaso conocimiento acerca de sus propiedades estructurales y funcionales. No obstante, recientemente el interés por las propiedades tecnológicas se ha incrementado, poniendo de manifiesto que estas proteínas pueden presentar características técnicas interesantes bajo condiciones específicas; por ejemplo, Lian *et al.* (2013) mostraron que la capacidad emulsificante de estas proteínas es mejor bajo condiciones ácidas que básicas, y que el método de extracción de las mismas influye considerablemente en sus propiedades finales.

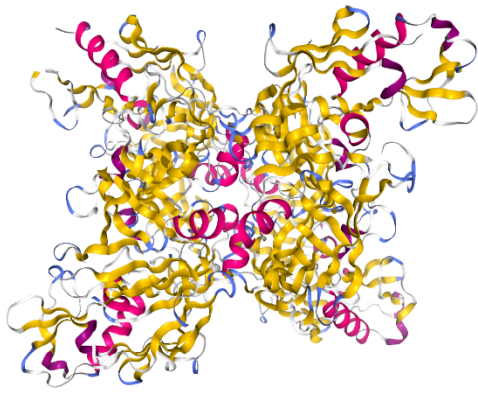


Figura 3. Estructura cristalina de la globulina 7S básica de la soya (*Glycine max*) (Yoshizawa et al., 2011)

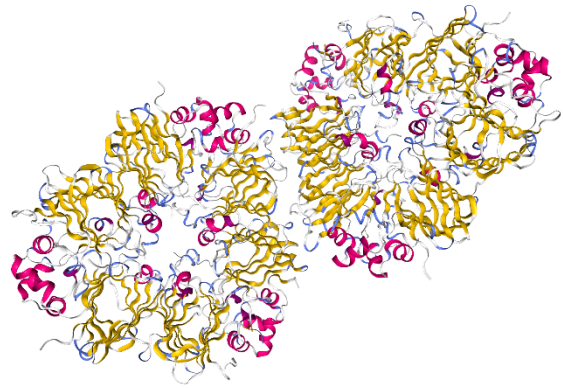


Figura 4. Estructura cristalina de la prolegumina, un tipo de globulina 11S presente en los chícharos (*Pisum sativum* L.) (Tandang-Silvas et al., 2010)

2.2.3 Fuentes emergentes

Las fuentes proteicas discutidas anteriormente son aquellas cuyo consumo masivo las ha colocado como las principales, no solo en el área alimentaria, en donde además de las características nutricionales, también se explotan sus propiedades tecno-funcionales, sino también en algunos otros sectores en los que de igual manera se aprovechan propiedades específicas de estas biomoléculas, como el sector farmacéutico, la industria de cuidado personal, el sector bioenergético, etc.

Sin embargo, ante el crecimiento exponencial de la población mundial, es imprescindible que se tomen las medidas necesarias a fin de garantizar el suministro de estas importantes moléculas en los diversos sectores que las demandan dentro de su cadena productiva. Para el año 2050, la FAO ha estimado una población mundial aproximada de 9 billones de personas, lo que irremediamente deberá traer consigo nuevos métodos de producción y optimización de los ya existentes para garantizar los requerimientos globales. En este sentido, es importante hacer notar que las proteínas de origen animal son las más demandadas a nivel mundial debido no solo a su calidad nutricional destacada, si no a las funciones específicas que aportan dentro de diversos productos industriales, como ya se ha descrito anteriormente. Sin embargo, esta situación tiene un trasfondo crítico debido a la gran cantidad de gases de efecto invernadero que se emiten a la atmósfera como consecuencia de la actividad ganadera, así como en la propia generación de los alimentos de estos animales, por lo que, de manera colectiva, la producción de proteínas animales es una actividad altamente ineficiente.

A pesar de que la investigación sobre nuevas fuentes de proteínas es un campo en constante crecimiento, es urgente redoblar los esfuerzos para explorar nuevas materias primas. El desarrollo de alternativas está encaminado a la generación de opciones más baratas, aumento de las características de salud y mayor sustentabilidad.

Un tipo de proteínas que ha cobrado relevancia en los últimos años debido a sus características son las de origen vegetal. Si bien de manera global el aporte nutrimental generalmente es de menor calidad comparadas con las de origen animal, existen ciertas especies cuyo aporte de aminoácidos esenciales ha destacado por encima de otras (Olivos-Lugo *et al.*, 2010). Las principales especies explotadas se han descrito ya en la sección anterior y actualmente se trabaja en la caracterización de nuevas proteínas vegetales que sean capaces de satisfacer las necesidades del sector industrial (Soria-Hernández *et al.*, 2015; Yoshie-Stark *et al.*, 2008; Sandoval-Oliveros & Paredes-López, 2013). Además, también se explora el uso de proteínas procedentes de desechos del sector agroindustrial, lo que disminuiría significativamente los costos de estos insumos (Gajanan *et al.*, 2016; Sagar *et al.*, 2018).

Por otro lado, diversos grupos de investigación han centrado su interés en fuentes proteínicas poco convencionales. A continuación, se mencionan algunas de ellas cuyo uso, principalmente en el área alimentaria, ha despertado gran interés en los últimos años.

- a) **Insectos.** Esta es una de las fuentes más atractivas debido a la diversidad de especies potenciales. Si bien ciertas variedades de insectos han formado parte de la dieta de algunas culturas (principalmente en Asia, África y Latinoamérica) desde hace cientos de años, la composición de estos se ha elucidado hasta hace poco tiempo e incluso en algunos casos aún no se han caracterizado por completo. De acuerdo con de Castro *et al.* (2018), las principales especies que se consumen a nivel mundial son: *Coleoptera* (31%), *Lepidoptera* (18%), *Hymenoptera* (14%), *Orthoptera* (13%) y *Hemiptera* (10%); en la mayoría de ellos, las proteínas son el principal componente, seguido de los lípidos y abundante presencia de vitaminas y minerales, dependiendo también de la fase de crecimiento en la cual son consumidos (huevos, larvas, crisálidas o adultos).

En principio todos los insectos pueden consumirse crudos, secos, triturados, texturizados, pulverizados, extruidos, o conservados mediante liofilización; las proteínas por su parte pueden ser aisladas antes de su uso final. Dado que el consumo de insectos en las culturas antiguas generalmente consistía en la captura de especies silvestres, con los riesgos sanitarios que eso implica, en la actualidad se han establecido centros de crianza para variedades específicas a fin de explorar las oportunidades que ofrecen estas especies; además, existe un obstáculo cultural para la comercialización en masa de proteínas procedentes de insectos ya que ciertas especies se pueden considerar comestibles en algunas regiones y en otras no lo son.

Spiegel *et al.* (2013) señalan que, en general, no se han reportado problemas de salud graves asociados con el consumo de insectos, al menos fuera de Estados Unidos, aunque parece ser que las proteínas procedentes de estas fuentes pueden mostrar alergenicidad cruzada con camarones y ácaros del polvo doméstico. Por su parte, otro estudio (Goumperis, 2012) destaca ciertos peligros potenciales para la

alimentación con insectos dentro de Estados Unidos, principalmente con ciertos compuestos químicos asociados con el medio ambiente o bien adquiridos por producción autónoma. Por su parte, Belluco *et al.* (2013) analizaron la seguridad asociada al consumo de insectos europeos y no europeos, concluyendo que no existen riesgos adicionales en comparación con los productos animales que se consumen habitualmente. A partir de esto, se puede concluir que los estudios relacionados con la seguridad asociada al consumo de insectos y sus derivados aún es limitada y que, en general, los riesgos potenciales dependen ampliamente del ambiente y los métodos de producción.

Atendiendo a lo anterior, en 2010 el Codex Alimentarius dictaminó que la seguridad de insectos comestibles no estaba plenamente estudiada debido a que estos son considerados alimentos indígenas tradicionales y no productos comercializables a gran escala. Sin embargo, poco a poco se ha manifestado la necesidad de establecer normativas más claras para el aprovechamiento de estos productos infrautilizados. Así, en el año 2016 la FDA estableció los requerimientos para la comercialización de insectos.

Si bien el hecho de que las proteínas sean el principal componente de los insectos presenta ventajas importantes, existen ciertas cuestiones que limitan aún el uso de estas debido a razones culturales más que a argumentos bien fundamentados. No obstante, continúa creciendo el número de investigaciones relacionadas con las aplicaciones potenciales de estas; por ejemplo, se ha determinado que diversos péptidos procedentes de insectos presentan actividad antihipertensiva, antimicrobiana y antioxidante (de Castro *et al.*, 2018; Zielińska *et al.*, 2018). Respecto a las propiedades tecnológicas de estas proteínas, se ha constatado que poseen solubilidades muy similares con algunas leguminosas, con valores mínimos alrededor de pH 3 y máximos en pH 11; además, poseen alta capacidad de retención de agua y aceite, elevada actividad emulsificante y capacidad de espumado moderada, por lo que pueden ser utilizadas en formulaciones industriales que demanden estas propiedades (Zielińska *et al.*, 2018).

Como se puede apreciar, la mayoría de estos estudios son recientes, por lo que será necesario ahondar más en esta cuestión a fin de conocer con mayor detalle las características de estas proteínas. No obstante, es claro que los insectos son una fuente proteica atractiva que muy probablemente destacará en los próximos años.

- b) **Algas.** Pueden distinguirse 2 tipos principales: las microalgas y las algas marinas (macroalgas). Las primeras son organismos unicelulares que pueden crecer en una amplia gama de condiciones ambientales, mientras que las segundas son organismos multicelulares complejos que crecen en agua salada. Cerca del 30% de la actual producción de algas en el mundo es destinada a la alimentación animal (Spiegel *et al.*, 2013). Las microalgas destinadas para el consumo humano son, principalmente:

Arthrospira, *Chlorella* spp., *Dunaliella salina* y *Aphanizomenon flos-aqua*. Algunos estudios muestran que los riesgos para la seguridad relacionados con estas algas incluyen alérgenos, toxinas, patógenos, metales pesados y pesticidas.

Por su parte, las algas marinas que son usadas para el consumo directo incluyen, entre otras: *Ulva rigida*, *Monostroma* sp., *Enteromorpha* sp., *Laminaria* sp., etc. No obstante, casi no se han realizado estudios con la extracción de proteínas a partir de estas especies para consumo humano. Bleakley & Hayes (2017) reportan que algunas especies de algas contienen niveles de proteína similares a las fuentes tradicionales como la carne, huevo, soya y leche; además, el cultivo de algas para la obtención de proteínas tiene varios beneficios respecto a las fuentes anteriores en términos de productividad y valor nutricional. Sin embargo, el uso generalizado de algas marinas y microalgas está limitado debido a una serie de factores que incluyen: acceso y derechos de cosecha, estacionalidad y ubicación geográfica de algas, así como la disponibilidad de métodos de producción escalables para el aislamiento de proteínas, etc. Los procesos actuales de aislamiento de proteínas de algas consumen mucho tiempo y son económicamente inviables.

Respecto a la calidad de las proteínas procedentes de algas, estas son reconocidas como fuentes viables ya que cumplen con la composición de aminoácidos esenciales recomendada por la FAO, no obstante, el triptófano y la lisina son aminoácidos limitantes en varios tipos de algas; también la leucina e isoleucina son encontradas en bajas concentraciones en especies de algas rojas. Aunado a esto, se cree que los fluorotaninos y el alto contenido de polisacáridos son los principales factores que afectan negativamente la digestibilidad de ciertas clases de algas (Bleakley & Hayes, 2017).

Dentro de las principales aplicaciones industriales de este tipo de proteínas destaca el cultivo de ciertas especies como complementos nutricionales, una práctica que, al igual que los insectos, data de cientos de años en algunas regiones del mundo, además del aprovechamiento de estas en formulaciones de alimentos funcionales. La alimentación animal también ha encontrado un uso para estas fuentes de proteínas, generando alimentos altamente nutritivos para diversas especies como cerdos, peces y aves de corral. Relacionado con sus propiedades tecnológicas, un grupo de glucoproteínas denominado lectinas han encontrado aplicaciones como agrupadores sanguíneos, antivirales, marcadores de ciertos tipos de cáncer y objetivos para la administración de medicamentos, todo esto debido a su alta capacidad para agregarse con alta especificidad a carbohidratos. Otro grupo importante son las ficobiliproteínas, moléculas altamente solubles en agua que han encontrado aplicaciones en el etiquetado fluorescente, citometría de flujo, microscopia de fluorescencia e inmunohistoquímica fluorescente, sin embargo, la principal aplicación de estas es como colorantes naturales para diversos productos alimenticios, así como artículos cosméticos; también varias

patentes sobre actividades benéficas para la salud han sido presentadas para aplicaciones nutraceuticas como antioxidantes, antiinflamatorias, antivirales, antitumorales, neuroprotectoras y hepatoprotectoras (Bleakley & Hayes, 2017).

2.2.4 Propiedades tecno-funcionales

La funcionalidad de una sustancia en tecnología de alimentos se define como toda propiedad, nutricional o no, que interviene en su utilización. Este comportamiento depende de sus propiedades físicas y químicas, las que se afectan durante el procesamiento, almacenamiento, preparación y consumo del alimento. Las propiedades funcionales permiten el uso de las proteínas como ingredientes en alimentos, aunque por lo general se incorporan en mezclas complejas (Gálvez *et al.*, 2013). Empíricamente las propiedades funcionales de las proteínas son una manifestación de dos aspectos moleculares: a) las propiedades hidrodinámicas, y b) las propiedades de la proteína relacionadas con su superficie. Propiedades como la viscosidad, gelificación y texturización se relacionan con las primeras que dependen del tamaño, forma y flexibilidad molecular; mientras que la humectabilidad, solubilidad, espumado, emulsificado y unión de sabores son propiedades que se relacionan con la superficie de la proteína (Damodaran *et al.*, 2008). Aunque existen diversos métodos de clasificación, de acuerdo con Cheftel *et al.*, se consideran los siguientes grupos:

2.2.4.1 Unión de sabores. Las proteínas son inodoras, pero pueden unir compuestos de sabor, y por ello modificar las propiedades sensoriales de los alimentos. Varias proteínas presentan sabores indeseables, lo que limita su uso en aplicaciones de alimentos; no obstante, la propiedad de ligar sabores que presentan las proteínas tiene aspectos deseables, porque se pueden utilizar como acarreadores de sabor o modificadores del sabor en alimentos procesados. Para que la proteína funcione como un buen acarreador de sabor, además de unir fuertemente los sabores debe poder retenerlos durante el proceso y liberarlos durante la masticación. La afinidad por los compuestos del sabor varía de acuerdo con el tipo de proteína y los cambios que sufra durante el procesamiento del alimento (Damodaran *et al.*, 2008).

El mecanismo de unión del sabor a las proteínas depende del contenido de humedad de la muestra de proteína, interacciones que normalmente no son covalentes. Las proteínas en polvo se ligan a los sabores mediante interacciones de Van der Waals, puentes de hidrógeno e interacciones electrostáticas. El atrapamiento físico entre los capilares y hendiduras de la matriz sólida del polvo puede también contribuir a las propiedades de sabor. En alimentos líquidos o con alta humedad, el mecanismo de unión al sabor primero involucra interacciones no polares del ligando con las zonas hidrofóbicas o hendiduras sobre la superficie de las proteínas. Además de las interacciones hidrofóbicas, los compuestos de sabor con cabezas polares también pueden interactuar con las proteínas vía puentes de hidrogeno e interacciones electrostáticas.

Después de la unión a las regiones hidrofóbicas de la superficie, los aldehídos y las cetonas pueden ser capaces de difundirse al interior hidrofóbico de la molécula de proteína (Gálvez *et al.*, 2013).

Los sabores volátiles interactúan con las proteínas hidratadas principalmente vía interacciones hidrofóbicas y, por lo tanto, cualquier factor que las afecte, o que afecte la hidrofobicidad de la superficie, a su vez influirá en la unión del sabor. La temperatura tiene poco efecto en el proceso de unión al sabor, al menos que ocurra un desplegamiento térmico de la proteína; esto sucede porque el proceso de asociación está impulsado por entropía y no por entalpía. Las proteínas desnaturalizadas térmicamente presentan una mayor capacidad para unir sabores; sin embargo, la constante de unión es generalmente más baja, comparada con la proteína en estado nativo. El efecto de las sales sobre la unión del sabor se relaciona con las propiedades de *salting-in* y *salting-out*, debido a que las sales que promueven la solubilización desestabilizan las interacciones hidrofóbicas y bajan la unión al sabor; lo contrario ocurre con las sales que producen *salting-out*. El pH afecta la unión del sabor porque tiene efectos sobre la conformación, lo que favorece la unión al sabor a valores de pH alcalinos más que a ácidos, ya que la proteína tiende a desnaturalizarse con mayor facilidad que en los primeros (Gálvez *et al.*, 2013).

2.2.4.2 Propiedades de hidratación. El agua modifica las propiedades fisicoquímicas de las proteínas. La gelificación, coagulación, emulsificación, el espumado y algunas otras propiedades dependen de las interacciones proteína-agua. Las moléculas de agua se unen a diferentes grupos en las proteínas, como los grupos cargados mediante interacciones ion-dipolo. Así mismo, se unen al esqueleto del enlace peptídico, a los grupos amida de Asn y Gln, y al grupo hidroxilo de los residuos Ser, Thr y Tyr por interacciones dipolo-dipolo, o bien una “hidratación” hidrofóbica. La mayoría de las proteínas cuentan con una monocapa de agua con actividad acuosa (A_w) de 0.05-0.03, en tanto las multicapas de agua se forman en un rango de actividad de agua de 0.3-0.7. El agua primaria se asocia primeramente con los grupos iónicos, no se congela y no toma parte en las reacciones químicas como solvente: se le denomina agua ligada o tipo I. En una $A_w=0.9$, las proteínas ligan arriba de 0.3-0.5 g agua/g de proteína. Los factores ambientales como pH, fuerza iónica, tipo de sales, temperatura y conformación de la proteína influyen sobre la capacidad de estas para ligar agua y presentan menor capacidad de hidratación en su punto isoeléctrico, en el que predominan las interacciones proteína-proteína. Por encima y por debajo del punto isoeléctrico se modifica la carga neta y pueden hincharse y unir más agua. En la mayoría de las proteínas a pH 9 y 10 se presenta la mayor capacidad por la ionización del hidroxilo de los residuos de Tyr. Arriba del pH 10 disminuyen los grupos cargados positivamente de los grupos ϵ -amino de Lys, lo que se traduce en una reducción de la capacidad de ligar agua. En una baja concentración de sales (<0.2 M) se incrementa la capacidad de ligar agua y cuando hay altas concentraciones de sales, gran parte del agua existente se liga a los iones de la sal y se deshidratan las proteínas.

A medida que la temperatura se incrementa, disminuyen los hidrógenos unidos y la hidratación de los grupos iónicos. Por tanto, una proteína desnaturalizada suele unir 10% más de agua que su equivalente en estado nativo, aunado al hecho de que se incrementa el área superficial de las proteínas, aunque también debe señalarse que se puede dar el fenómeno de agregación, con el consiguiente incremento de las interacciones proteína-proteína y por ende baja la capacidad de ligar agua.

No necesariamente existe una correlación entre la capacidad de ligar agua y la solubilidad. Las proteínas desnaturalizadas presentan baja solubilidad, a pesar de que unan la misma cantidad de agua que una proteína nativa, lo que indica que la solubilidad depende también de otros factores termodinámicos. Para las aplicaciones en alimentos la capacidad de retención de agua es más importante que la capacidad de ligarla, lo que se traduce en la capacidad de las proteínas para embeber agua y retenerla contra una fuerza gravitacional dentro de una matriz proteínica, como los geles de proteínas o en los músculos de carne o de pescado (Gálvez *et al.*, 2013).

2.2.4.3 Propiedades interfaciales. Las propiedades de actividad superficial de las proteínas no dependen solo de la relación hidrofobicidad/hidrofilicidad, sino de la conformación de la proteína. En ello se debe considerar la relación de la estabilidad/flexibilidad de la cadena polipeptídica y la adaptabilidad a los cambios en el medio ambiente, así como los patrones de distribución de los grupos hidrofílicos e hidrofóbicos en la superficie de la proteína.

Las proteínas presentan en su superficie activa tres atributos deseables: a) capacidad para adsorberse rápidamente en una interfase; b) capacidad para desplegarse rápidamente y reorientarse en una interfase, y c) capacidad para interactuar con moléculas vecinas y formar películas viscoelásticas, incluso en la interfase. El número de segmentos peptídicos (componentes de una proteína) anclados en la interfase depende, en parte, de la flexibilidad de la molécula: las que son altamente flexibles pueden realizar rápidamente cambios conformacionales, lo que a su vez facilitara la adsorción de nuevos polipéptidos.

En una interfase, las cadenas polipeptídicas asumen una o más de las tres diferentes configuraciones siguientes: lineal, lazos y colas. Las lineales están en contacto directo con la interfase, en tanto que colas y lazos están suspendidos u orientados hacia la fase acuosa. Mientras más segmentos lineales haya, más fuerte es la unión y disminuye la tensión interfacial.

La fuerza mecánica de una película de proteína en una interfase depende de las interacciones de cohesividad intermolecular, que pueden ser interacciones electrostáticas, puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas. Si ocurre polimerización interfacial de proteínas adsorbidas vía reacciones de intercambio de disulfuro-sulfhidrilo pueden aumentar las propiedades viscoelásticas. Se requiere de un balance adecuado de las fuerzas de atracción, repulsión e hidratación para formar películas viscoelásticas estables (Gálvez *et al.*,

2013). Una de las principales aplicaciones de las propiedades interfaciales de las proteínas es la estabilización de emulsiones. Estas moléculas son las preferidas como surfactantes para formular emulsiones alimenticias debido a que su superficie es activa y favorece la resistencia a la coalescencia, sin embargo, no puede utilizarse en emulsiones agua/aceite debido a que no son solubles en este último. Una gran cantidad de alimentos procesados y naturales son emulsiones, por ejemplo: leche, yema de huevo, leche de coco, leche de soya, mantequilla, margarina, mayonesa, productos untables, aderezos de ensaladas, helados, salchichas y pasteles; en todos ellos, las proteínas son importantes agentes emulsificantes (Gálvez *et al.*, 2013).

2.2.4.4 Factores que afectan las propiedades funcionales

- a) **Condiciones ambientales.** Como es sabido, la solubilidad, estabilidad conformacional y reactividad química de una proteína dependen fuertemente de diversas condiciones como temperatura, presión (si es muy alta), pH (en relación con el punto isoeléctrico), fuerza iónica (especialmente en rangos superiores a 0.5 M) y la calidad del solvente. Esto último depende de la naturaleza y concentración de pequeñas moléculas de soluto presente; generalmente las concentraciones tienen que ser altas (al menos 1 M) para causar efectos sustanciales. Estos solutos pueden ser 1) inorgánicos o sales orgánicas, donde el efecto depende particularmente de la naturaleza de la sal, 2) otros solutos que afecten sustancialmente la naturaleza del agua y 3) solventes orgánicos, como alcoholes.

Es importante mencionar que estas condiciones son importantes no sólo en la etapa en que las proteínas son agregadas con el fin de aportar alguna funcionalidad, sino que también pueden afectar en gran medida en el periodo de procesado y almacenamiento.

- b) **Pureza.** Una formulación de proteínas puede contener diversas sustancias, además de la proteína central de interés. En general, el contenido total de proteínas varía entre 60 y 98% de materia seca; las variaciones incluyen:

1) Variantes genéticas, por lo que, en principio, varía en propiedades. Además, grupos originados en la modificación postraduccional en la célula, como glúcido o fosfato, varían en número y posición.

2) En general se trabaja con mezclas de proteínas; incluso una “proteína única” contiene otras proteínas como impurezas. A menudo también están presentes algunas enzimas.

3) Las preparaciones de proteínas incluyen muchos otros componentes, siempre incluida el agua. Algunos de estos pueden afectar marcadamente las propiedades funcionales, como los compuestos fenólicos a menudo encontrados en preparaciones de origen vegetal, que pueden interactuar fuertemente con proteínas, en parte a través de enlaces covalentes. Además, los cationes divalentes se pueden asociar fuertemente con algunas proteínas y afectar su estabilidad conformacional.

Las preparaciones también pueden contener componentes reactivos, tales como azúcares reductores, lípidos oxidados, nitritos, sulfitos, etc.

c) **Cambios durante el procesado y almacenamiento.** Durante el aislamiento, purificación, concentrado y almacenado de preparaciones proteicas numerosas reacciones pueden ocurrir y las propiedades del producto final pueden depender de su historial, especialmente de la temperatura. La mayoría de las reacciones solo ocurren cuando la proteína está en solución, durante el almacenado en estado seco se producen muy pocos cambios si la actividad de agua es lo suficientemente baja; sin embargo, el proceso de secado en sí mismo puede inducir reacciones. Algunos de los cambios más importantes son:

- 1) **Proteólisis.** Los enlaces peptídicos pueden romperse, lo que altera en gran medida las propiedades. Existen numerosas enzimas que pueden hidrolizar los enlaces peptídicos, la velocidad de hidrólisis dependerá del pH y temperatura, no obstante, la mayoría de las enzimas pueden ser desactivadas mediante tratamiento térmico. Por otro lado, a muy altas temperaturas (alrededor de 120 °C), algunos enlaces pueden romperse por hidrólisis química.
- 2) **Desnaturalización de proteínas globulares.** Esto involucra desplegamiento de la cadena peptídica, por lo tanto, pérdida parcial de la estructura nativa. Algunos agentes que causan desnaturalización incluyen: temperaturas y pH's extremos, calidad del solvente, altas presiones, altas concentraciones de surfactantes o lípidos polares y adsorción sobre superficies hidrofóbicas.
- 3) **Renaturalización.** En ciertas ocasiones el proceso de desnaturalización es deseado, no obstante, la cadena polipeptídica puede replegarse, pero no en su forma nativa. Esto último se previene con algún otro cambio, que ocurre después de la desnaturalización. Se han considerado varios factores como los responsables, por ejemplo, la agregación debido a enlaces hidrofóbicos, cambios cis-trans de enlaces peptídicos (especialmente de los enlaces que implican el N de la prolina), etc. Sin embargo, ambas reacciones pueden revertirse lentamente; en consecuencia, la renaturalización generalmente se previene mediante cambios en los enlaces covalentes que se producen después de la desnaturalización.
- 4) **Reacciones de grupos de las cadenas laterales.** La *Tabla 1* presenta un panorama general de las principales reacciones que tienen lugar en los grupos de las cadenas laterales proteicas.

Tabla 1. Posibles reacciones de grupos de cadenas laterales en proteínas. Los nombres hacen referencia al residuo aminoácido en la cadena polipeptídica (Walstra & Van Vliet, 2003).

Reacción		Observaciones*
Asparagina + H ₂ O	→ Acido aspártico + NH ₄ ⁺	+++ T moderada
Glutamina + H ₂ O	→ Acido glutámico + NH ₄ ⁺	++ T moderada
Lisina + Glucosa	→ Productos de Maillard	++ T moderada
Cisteína	→ Dehidroalanina + H ₂ S	T muy alta
2 Cisteína	↔ Cistina + 2 ⁻	Alto potencial redox
R _A -S-S-R _B + R _C -S ⁻	→ R _C -S-S-R _B + R _A -S ⁻	++ Desnat. por calor
Cisteína + Dehidroalanina	→ Lantionina	T y pH elevados
Lisina + Dehidroalanina	→ Lisino-alanina + H ₂ O	T y pH elevados
Histidina + Dehidroalanina	→ Histidino-alanina + H ₂ O	T elevada
Asparagina + Lisina	→ Isopéptido + H ₂ O	T y pH elevados
Glutamina + Lisina	→ Isopéptido + H ₂ O	T y pH elevados

*El número de signos + indica la abundancia de la reacción, el resto de observaciones denotan las condiciones necesarias para que ocurra la reacción. T es la temperatura.

d) Modificación deliberada. Esto se lleva a cabo con la finalidad de alterar propiedades funcionales específicas y a menudo implica modificaciones en los grupos laterales para afectar la reactividad química, pero también puede ser útil modificar las fuerzas de interacción débiles (por ejemplo, alterando las proporciones de los grupos polares e hidrofóbicos); además, la masa molar puede modificarse mucho mediante entrecruzamientos y proteólisis.

La modificación generalmente tiene más de un efecto. A menudo, la conformación proteica, o al menos la estabilidad conformacional, es alterada. Estas modificaciones pueden realizarse mediante tratamientos químicos, enzimáticos, o por manipulación genética. La mayoría de las reacciones químicas conducen a productos bastante heterogéneos, en los cuales las modificaciones se producen hasta cierto punto por una cuestión de azar y a menudo más de un tipo de grupo lateral es reactivo. Por su parte, las reacciones enzimáticas pueden ser algo más específicas, pero aquí también se obtiene una mezcla; si se desea una preparación más homogénea, se necesita el aislamiento de especies moleculares específicas, lo que generalmente no es fácil. Otra variable es la conformación de la proteína en la etapa de modificación, por ejemplo, una proteína globular en su estado nativo es bastante resistente a la hidrólisis enzimática, y solo grupos laterales en la superficie de la molécula

pueden ser modificados. Una molécula de proteína más o menos desplegada tiende a ser mucho más reactiva, especialmente con respecto a la modificación de grupos laterales hidrófobos.

En contraste, la modificación genética conducirá, en principio, a un producto homogéneo; además, cualquier residuo de aminoácido puede eliminarse, agregarse o intercambiarse por otro. En esta etapa, esto es hecho principalmente con fines de investigación, aunque ocasionalmente se aplica para alterar las propiedades de las proteínas a granel.

Algunas modificaciones químicas y enzimáticas aplicadas en la práctica son: glicosilación, fosforilación, alteración de grupos cargados, acilación, proteólisis y entrecruzamiento (Walstra & Van Vliet, 2003)

2.3 Actividad superficial

La actividad superficial puede definirse como la capacidad de ciertos materiales para disminuir la tensión interfacial entre dos fluidos o entre un fluido y un sólido; el término “interfase” hace alusión a la frontera entre 2 fases inmiscibles. La disminución de la tensión interfacial está, desde luego, ligada a la adsorción de estos materiales en la interfase, fenómeno altamente complejo y que se abordará más adelante.

Los materiales que exhiben actividad superficial se conforman de moléculas que contienen regiones tanto polares como no polares, es decir, son anfifílicas o anfipáticas. Las proteínas, cuya estructura se ha comentado ya previamente, son sustancias poliméricas en las cuales la actividad superficial está ligada directamente a sus características estructurales, por lo que la diferencia en actividad superficial entre estas surge principalmente debido a variaciones en las mismas. Las propiedades que presumiblemente influyen en la actividad superficial están todas relacionadas fundamentalmente con la secuencia de aminoácidos, es decir, su estructura primaria, que se encuentra en función del tipo de proteínas, pero al mismo tiempo varía ampliamente entre ellas (Brash & Horbett, 1987).

2.3.1 Tensión interfacial

La tensión interfacial es una medida de la energía libre requerida para incrementar el área de una interfase en una cantidad unitaria y usualmente es reportada en unidades de J/m^2 (o N/m) (McClements, 2015). Este es un fenómeno que, en el nivel molecular, resulta de la diferencia en energía entre las moléculas en una interfase fluida cuando se compara con sus contrapartes en el *bulk*. Es igualmente correcto describirlo como una medida de cuanta energía se requiere para formar una unidad de área de interfase entre dos líquidos inmiscibles (Berry *et al.*, 2015). El origen de la tensión interfacial es el balance de las interacciones entre moléculas localizadas en la interfase. Cuando un soluto con actividad superficial está presente, la tensión

interfacial se reduce debido a que este puede ayudar a minimizar el contacto termodinámicamente desfavorable entre los distintos tipos de moléculas en la interfase (McClements, 2015).

La tensión interfacial es un concepto de suma importancia en la ciencia de coloides, describiendo fenómenos tan diversos como la formación, forma y estabilidad de gotas líquidas, el costo de energía superficial en la formación de una emulsión y la fuerza aplicada por un puente líquido capilar. La determinación de la tensión interfacial permite deducciones con respecto a la composición química de las interfaces de fluidos y la adsorción/desorción de solutos con actividad superficial. Aunado a esto, la medición de este parámetro puede aportar información valiosa sobre el emulsificante o tensoactivo en cuestión y sus propiedades interfaciales, como la concentración en exceso en la superficie, actividad superficial, concentración micelar crítica, tasas de adsorción y reología interfacial (McClements, 2015); así, el cálculo preciso de la tensión interfacial es de importancia crítica en la ciencia e industria.

2.3.1.1. Métodos de caracterización

El propósito de esta sección es presentar un panorama general sobre los distintos métodos que existen actualmente para evaluar la tensión superficial e interfacial; descripciones más detalladas pueden encontrarse, por ejemplo, en los trabajos de Rusanov *et al.*, (1996) y Adamson *et al.*, (1997). Se hace mención únicamente de los métodos tradicionalmente empleados para medir la tensión interfacial, estos son utilizados de manera cotidiana en los laboratorios de química superficial. Dicha comparación ofrece una guía para seleccionar el método experimental adecuado en el monitoreo de la tensión interfacial en sistemas líquido-fluido, incluyendo sistemas con surfactantes, líquidos viscosos o metales fundidos. La descripción de algunas técnicas emergentes, así como las ecuaciones involucradas en el cálculo de la tensión interfacial para cada una de ellas son descritas en el trabajo de Drelich *et al.*, (2006).

Antes de ahondar en ello, es preciso aclarar que estos dos conceptos en realidad se refieren al mismo fenómeno descrito previamente; sin embargo, por definición, cuando se habla de tensión superficial se hace referencia a una interfase gas-líquido, mientras que la tensión interfacial trata con una interfase líquido-líquido. Así, a partir de ahora ambos fenómenos serán incluidos bajo el término “tensión interfacial”, especificando en su momento la composición del sistema en cuestión (agua-aire, agua-aceite, etc.).

Estas cantidades son medidas usando instrumentos analíticos llamados tensiómetros; existe una amplia variedad de estos quipos capaces de proveer información acerca de las propiedades superficiales y las interfaces. Estos instrumentos difieren según el principio físico bajo el cual operan, su diseño mecánico, si las mediciones son estáticas o dinámicas y si son capaces de medir tensión superficial, interfacial o ambas. Las mediciones estáticas se llevan a cabo en superficies e interfaces que se consideran en equilibrio, mientras que las mediciones dinámicas suceden bajo condiciones de no equilibrio.

Métodos clásicos

Grupo I: Medición directa usando una microbalanza (métodos basados en la medición de una fuerza)

Para medir directamente tensiones interfaciales, una microbalanza, un plato, anillo, barra, u otra sonda de forma simple es puesta en contacto con la interfase. Si la sonda es completamente humedecida por uno de los líquidos, este se adherirá a la sonda y subirá como resultado de la fuerza capilar, incrementando el área interfacial e impulsando una fuerza que tiende a tirar de la sonda hacia el plano de la interfase. Esta fuerza restauradora está directamente relacionada con la tensión interfacial y puede medirse con una microbalanza. La fuerza (F) actuando a lo largo de la línea de contacto trifásica es exactamente igual al peso del menisco líquido que se encuentra sobre el plano de la interfaz fluido-fluido. Esta fuerza medida es usada para calcular la tensión interfacial:

$$\gamma = F/p \cos\theta$$

donde p es el perímetro de la línea de contacto trifásica y θ es el ángulo de contacto medido para el menisco líquido en contacto con la superficie del objeto (Drelich *et al.*, 2006). Las dos principales técnicas basadas en este principio son las siguientes:

a) Anillo de Du Noüy. Este método se usa comúnmente para medir tensiones interfaciales estáticas de líquidos. El aparato requerido para llevar a cabo este tipo de medición consiste en un recipiente que contiene el (los) líquido (s) para analizar y un anillo que está conectado a un dispositivo de medición de fuerza sensible. El recipiente es capaz de moverse hacia arriba y hacia abajo de forma controlada, mientras que la posición del anillo se mantiene constante. Inicialmente, el recipiente se coloca de modo que el anillo quede sumergido justo debajo de la superficie de el líquido que se analiza. A continuación, se baja el recipiente lentamente y se registra la fuerza ejercida sobre el anillo, este generalmente se fabrica de platino o aleación de platino-iridio de radio de 2-3 cm; el radio del cable varía de 1/30 a 1/60 del diámetro del anillo (McClements, 2015; Berry *et al.*, 2015).

El método del anillo de Du Nouy a menudo se usa en un modo de "desapego". El recipiente se baja hasta que el líquido que se adhiere al anillo se rompe y el anillo se separa del líquido. La fuerza ejercida sobre el anillo en el desprendimiento es aproximadamente igual a la tensión superficial multiplicada por la longitud del perímetro del anillo: $F = 4\pi R\gamma$, donde R es el radio del anillo. En la práctica, esta fuerza tiene que ser corregida, porque la tensión superficial no actúa completamente en la dirección vertical y porque parte del líquido permanece adherido al anillo una vez que se ha desprendido: $F = 4\pi R\gamma\beta$, donde β es un factor de corrección que depende de las dimensiones del anillo y la densidad de los líquidos involucrados (McClements, 2015).

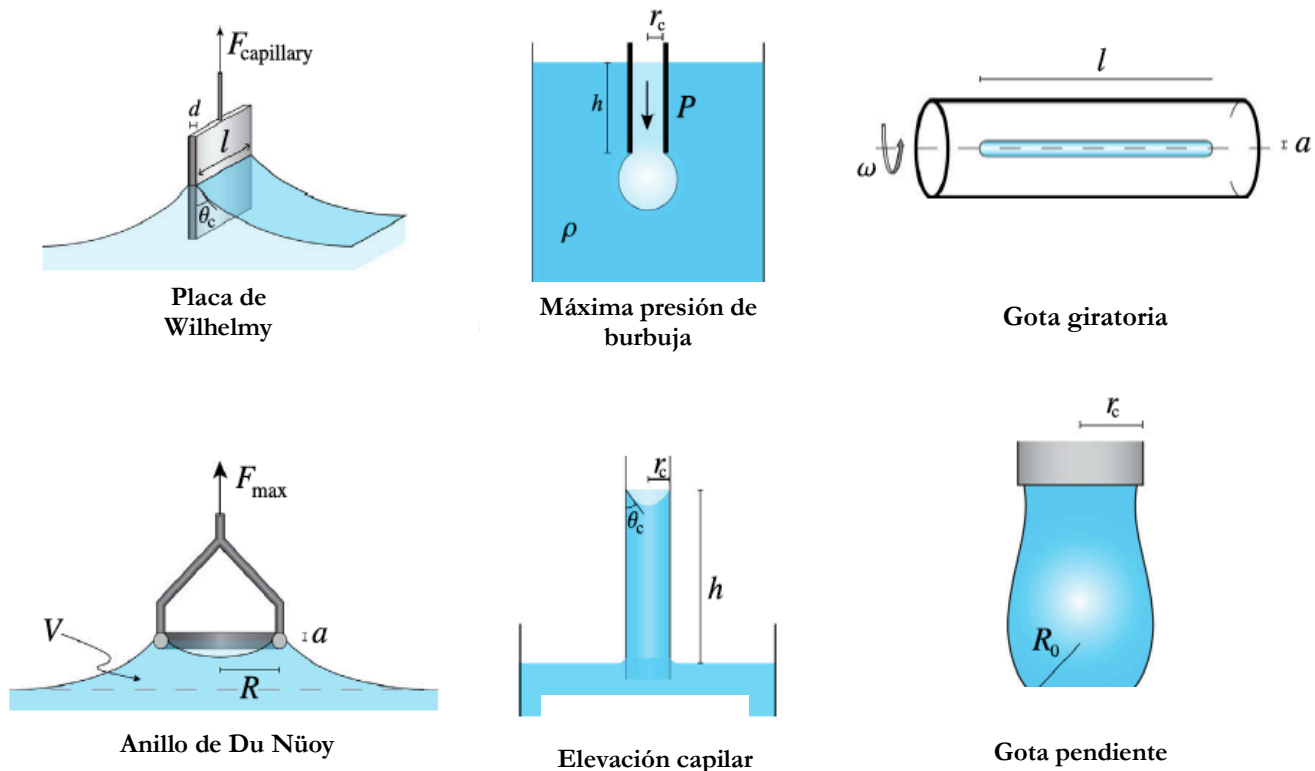


Figura 5. Esquemas de diversas técnicas experimentales utilizadas para monitorear la tensión interfacial (Drelich et al., 2006).

b) Placa de Wilhelmy. Este método se usa normalmente para determinar la superficie estática o las tensiones interfaciales de los líquidos. Sin embargo, también se puede usar para controlar la cinética de adsorción, siempre que la acumulación del emulsionante en la superficie sea lenta en comparación con el tiempo de medición, por ejemplo, para soluciones diluidas de biopolímeros. El aparato consiste en un recipiente que contiene el líquido que se analizará y una placa, que está conectada a un dispositivo de medición de fuerza sensible. El recipiente es capaz de ser movido hacia arriba y hacia abajo, mientras que la placa permanece estacionaria. El recipiente está posicionado de manera que el líquido simplemente entra en contacto con la placa, es decir, la parte inferior de la placa es paralela a la superficie de el líquido a granel. Parte del líquido sube por los bordes de la placa, ya que esto reduce la termodinámicamente desfavorable área de contacto entre la placa y el aire. La cantidad de líquido que se mueve hacia arriba de la placa depende de su tensión y densidad superficial. Si el dispositivo de medición de fuerza se pone a cero antes de llevar la placa en contacto con el líquido (para tener en cuenta la masa de la placa), entonces la fuerza registrada por el dispositivo es igual al peso del líquido que se adhiere a la placa. Este peso se equilibra con la componente vertical de la

tensión superficial multiplicada por la longitud del perímetro de la placa: $F=2(l+L)\gamma\cos\theta$; donde l y L son la longitud y espesor del plato y θ es el ángulo de contacto. Por lo tanto, la tensión superficial de un líquido puede determinarse midiendo la fuerza ejercida sobre la placa. Los platos a menudo están contruidos con materiales que dan un ángulo de contacto cercano a 0, como platino o platino-iridio, ya que esto facilita el análisis ($\cos\theta=1$). La placa Wilhelmy también se puede usar para determinar la tensión interfacial entre dos líquidos (McClements, 2015).

Grupo II: Medición de la presión capilar

Dado que la tensión interfacial siempre es positiva entre fases inmiscibles, esta siempre tiende a disminuir el área de la interfaz. Esta inclinación da lugar a una diferencia de presión entre los fluidos en ambos lados de una interfaz curva, con la presión más alta en el lado cóncavo de la interfaz. La diferencia de presión produce fenómenos tales como transporte capilar, formación de burbujas y gotas, etc. La diferencia de presión a través de una interfaz curva se puede medir de varias maneras (por ejemplo, usando un sensor de presión u observando una elevación capilar) y luego se puede usar para calcular la tensión interfacial con la ecuación de Young-Laplace si se conocen los radios de curvatura. El método más común y probablemente uno de los más antiguos en este grupo de técnicas de medición de tensión interfacial es el de la máxima presión de burbuja.

- a) **Máxima presión de burbuja.** El método se usa para medir las tensiones superficiales estáticas o dinámicas de líquidos. El aparato requerido para llevar a cabo este tipo de medición consiste en un tubo capilar vertical cuya punta está sumergida debajo de la superficie del líquido que se analiza. El gas es bombeado en el tubo, que causa un aumento en la presión y resulta en la formación de una burbuja al final de la punta. La acumulación de presión en el tubo se controla utilizando un sensor de presión dentro del instrumento. A medida que la burbuja crece, la presión aumenta hasta que alcanza un máximo cuando la burbuja se hace hemisférica y la tensión superficial actúa en una dirección completamente vertical. Cualquier crecimiento adicional de burbujas más allá de este punto causa una disminución en la presión. Finalmente, la burbuja formada se separa de la punta y se mueve a la superficie del líquido, y luego otra burbuja comienza a formarse y el proceso se repite. La presión máxima de burbuja se relaciona con la tensión interfacial usando las ecuaciones descritas por Drelich *et al.*, (2006) (McClements, 2015).

Grupo III: Análisis del balance entre las fuerzas capilares y gravitacionales

Los métodos basados en el análisis de los efectos capilares (distintos de la forma de una gota o menisco) como la elevación capilar y el volumen o peso de caída, se encuentran entre los métodos de medición de

tensión interfacial más antiguos en uso. Una variedad de modernos instrumentos han reemplazado estas técnicas en la mayoría de los laboratorios. Se proporciona una breve reseña de dos técnicas que aún podrían ser atractivas para los investigadores que tienen acceso limitado a la instrumentación moderna.

- a) **Método de elevación capilar.** La base para el método es medir la altura h del menisco en un tubo de vidrio redondo cuyo radio interior (r) es conocido r (ver ilustración 5). Para tubos de pequeño diámetro (es decir, $r \ll h$) la forma del menisco es esférica y la tensión interfacial puede ser calculada usando la siguiente ecuación: $\gamma = (\Delta \rho g h r) / (2 \cos \theta)$. Drelich *et al.*, (2006) han desarrollado ecuaciones para el caso en el que el menisco no es esférico.

Dado que los tubos de vidrio son fáciles de limpiar con ácidos, bases, y solventes orgánicos, y debido a que muchos de los líquidos humedecen perfectamente la superficie del vidrio, el término $\cos \theta$ en la ecuación anterior a menudo será igual a la unidad. El método de elevación capilar puede ser una de las técnicas más precisas utilizadas para realizar mediciones de tensión superficial. Los problemas asociados con la técnica están relacionados con la fabricación de un tubo capilar desnudo uniforme y la determinación precisa de su diámetro interno. Además, este método no es muy conveniente para medir la tensión interfacial entre dos líquidos (Drelich *et al.*, 2006)

- b) **Caída de volumen o peso.** El método de volumen de caída se usa para medir tensiones superficiales e interfaciales de líquidos por un método de separación. El líquido por analizar se bombea a través de la punta de un tubo capilar vertical cuyo extremo sobresale hacia el aire o hacia un líquido inmisible. Una gotita se desprende de la punta del tubo capilar cuando la fuerza de separación (debido a la gravedad) se equilibra con la fuerza de adhesión (debido a la tensión superficial o interfacial). Para medir la tensión superficial, la punta debe apuntar hacia abajo en el aire, mientras que para medir la tensión interfacial, la punta puede apuntar hacia arriba o hacia abajo, dependiendo de las densidades relativas de los dos líquidos que se analizan. Si el líquido en la punta tiene una densidad más alta que el medio que lo rodea, la apertura de la punta queda hacia abajo y la gota se mueve hacia esa dirección una vez que se separa. Por otro lado, si el líquido en la punta tiene una densidad menor, entonces esta queda hacia arriba y la gota se mueve en esa dirección cuando se desprende. El volumen de las gotas se puede determinar usando una jeringa graduada o pesándolas usando una balanza sensible (una vez que se conoce la densidad del líquido). Al igual que con otros métodos de desprendimiento, el área de la superficie de la gota se expande rápidamente durante el proceso, y por lo tanto, el método no es adecuado para analizar líquidos que contienen emulsionantes cuyo tiempo de adsorción es comparable al tiempo de desprendimiento. Para obtener resultados confiables, es mejor llevar la gota lentamente al proceso de desprendimiento; se ha reportado que la precisión de

esta técnica ha sido mejor que 0.1 mN m^{-1} . McClements (2015) detalla las ecuaciones para el cálculo de la tensión interfacial con este método.

Grupo IV: Análisis de gotas distorsionadas por la gravedad

La tensión interfacial hace que las interfaces se comporten como membranas elásticas que siempre tienden a comprimir el líquido. En la ausencia de otras fuerzas (por ejemplo, en gravedad cero), la superficie del líquido tiene una tendencia natural a crear formas esféricas para minimizar el área interfacial por unidad de volumen de líquido y, por lo tanto, minimizar el exceso de energía de la interfaz. La forma de una interfaz en un campo gravitacional depende de la competencia entre el capilar y la fuerza gravitacional efectiva. Las técnicas de análisis de una interfaz curva son particularmente atractivas para los investigadores porque no requieren instrumentación avanzada. La configuración experimental requiere una cámara con una lente de bajo aumento para grabar la forma de la gota. La tensión interfacial se puede calcular fácilmente a partir de las dimensiones de la gota colgante, la gota sésil o el menisco líquido extraídos de la imagen fotográfica y mediante el uso de soluciones numéricas. Los instrumentos modernos, sin embargo, usan análisis de imagen mediante software, cuya función es hacer coincidir todo el perfil de caída al mejor ajuste de la curva teórica; estos avances mejoraron significativamente la precisión de las técnicas y redujeron el tiempo de la medición, proporcionando una oportunidad para el análisis de la interfaz a través del tiempo.

- a) Método de la gota pendiente.** En un método simple, dos parámetros de la gota colgante que deben determinarse experimentalmente son el diámetro ecuatorial (D) y el diámetro (d) en la distancia D desde la parte superior de la gota. La tensión interfacial se calcula a partir de la siguiente ecuación:

$$\gamma = \Delta \rho g D^2 / H$$

La técnica de caída colgante, como otras técnicas para medir la tensión interfacial, requiere limpieza extrema para obtener buena calidad y resultados reproducibles. Aquí la aguja utilizada para suspender la gota debe limpiarse bien y se debe evitar la escalada de la interfaz sobre la superficie exterior de la aguja. Las agujas de acero inoxidable o vidrio son relativamente fáciles de limpiar con ácidos, bases, y los solventes orgánicos que se usan con mayor frecuencia en los laboratorios. Se recomienda el uso de agujas con un diámetro inferior a $0,5D$, sin embargo, el diámetro de la aguja no debe ser demasiado pequeño porque esto reduce el valor de d y, en consecuencia, la precisión de la determinación de la tensión interfacial (Drelich *et al.*, 2006).

- b) Método de gota sésil.** Este método se basa en el análisis del perfil de la gota sobre un sustrato sólido. Se recomienda que los sustratos utilizados en este método se mojen poco con la gota, es decir, debería tener un ángulo de contacto mayor de 90 grados. En un enfoque experimental simple, primero se necesita localizar el ecuador de la gota, y luego medir la altura desde la parte superior de

la gota hasta su ecuador (z_e). Para una caída sésil muy grande, una expresión analítica para la tensión interfacial es la siguiente:

$$\gamma = (\Delta \rho g z_e^2) / 2$$

Desde un punto de vista práctico, a menudo es difícil localizar con precisión el ecuador de la gota y medir z_e . Aunque la gran caída es casi plana, ubicar la parte superior de la gota a veces es experimentalmente difícil. Se debe reconocer, sin embargo, que no se requieren gotas grandes si las dependencias tabuladas de los parámetros de forma de gota se basan en el análisis de Bashford-Adams (Drelich *et al.*, 2006).

2.3.2 Origen de la actividad superficial en proteínas

2.3.2.1 Estructura y conformación molecular

El rol de la estructura proteica en la actividad superficial todavía no se comprende en su totalidad; el factor más importante aquí es la estabilidad conformacional. Dependiendo de la rigidez de la molécula y la naturaleza de la interfase, las proteínas pueden desplegarse en la capa interfacial o retener su estructura terciaria. Las proteínas con una estructura rígida mantenida por enlaces intramoleculares generalmente retienen su conformación nativa y los rearrreglos estructurales no contribuyen al proceso de adsorción. Por su parte, las moléculas proteicas más flexibles se someten a rearrreglos estructurales en la interfase y pueden ser mejores agentes superficiales que sus contrapartes rígidas debido a que es posible que se establezca un mayor contacto con la superficie o interfase y porque la ganancia de entropía configuracional favorece la adsorción.

Finalmente, las proteínas con estructura cuaternaria pueden mostrar una mayor actividad superficial en relación con las estructuralmente análogas monoméricas debido al incremento en el número de puntos de contacto con la superficie a causa de la presencia de subunidades enlazadas no covalentemente. Mediciones de la actividad superficial relativa de las subunidades de hemoglobina en comparación con el conjunto tetramérico puede proporcionar un test interesante de esta idea (Brash & Horbett, 1987; Magdassi & Kamyshny, 1996).

2.3.2.2 Carga superficial

La carga eléctrica, así como su densidad y distribución en las moléculas proteicas influyen fuertemente en la actividad superficial debido a que muchos de los aminoácidos ionizables residen en el exterior de estas. Estos aminoácidos con carga deben, por lo tanto, entrar en una alta proximidad con la superficie en el proceso de adsorción.

Experimentalmente, las proteínas se caracterizan por exhibir gran actividad superficial cerca del punto isoeléctrico debido a la minimización de la repulsión electrostática entre las moléculas adsorbidas de carga idéntica; este comportamiento es especialmente evidente en las superficies sin carga. Sin embargo, se ha concluido que la disminución de la adsorción a pH's lejos del punto isoeléctrico se debe a rearrreglos estructurales de las moléculas adsorbidas, más que a la repulsión electrostática.

En la adsorción en superficies iónicas el factor principal es, quizás, la carga neta opuesta a la molécula que puede contribuir a la parte entálpica de la energía libre de adsorción. Al mismo tiempo, una distribución no uniforme de partes ionizables en la superficie de una proteína pueden conducir a interacciones electrostáticas atractivas entre estas regiones y la superficie incluso cuando la carga neta de la proteína es del mismo tipo que la superficie. El rol de la carga superficial proteica es especialmente importante y probablemente predominante en interfaces con cargas iónicas fijas, como queda demostrado por la facilidad de adsorción de proteínas en matrices ionizadas. La adsorción a este tipo de superficies es fuertemente afectada por el grado de carga opuesta en la proteína y el nivel de competición proporcionado por iones con carga similar.

2.3.2.3 Tamaño de molécula

El tamaño es un factor determinante de la actividad superficial en proteínas dado que estas y otras macromoléculas forman múltiples puntos de contacto cuando se adsorben en superficies (por ejemplo, 77 puntos en el caso de moléculas de albúmina y 703 en el caso de fibrinógeno adsorbido en sílice). El anclaje multipuntual usualmente causa adsorción irreversible; las tasas de desorción son, por regla, mucho más bajas comparadas con las de adsorción y en muchos casos es casi imposible alcanzar el equilibrio al desorberse las proteínas. En otras palabras, la formación de uno o varios enlaces con la superficie incrementa la probabilidad de adsorción de sitios vecinos en la misma molécula. Por el otro lado, la desorción de una proteína requiere del rompimiento simultáneo de un gran número de enlaces y, por razones cinéticas, el equilibrio no es alcanzado; esto se debe a una diferencia considerable entre las energías de activación para los procesos de adsorción y desorción.

No obstante, el tamaño claramente no es un factor primordial en las diferencias de actividad superficial entre proteínas. Por ejemplo, a pesar de que la hemoglobina parece tener mayor superficie activa respecto al fibrinógeno, el peso molecular de la primera es aproximadamente 1/5 del segundo (65,000 y 330,000, respectivamente), mientras que, en el caso de la albúmina, el peso molecular de esta es equivalente con el de la hemoglobina, siendo la primera mucho menos activa superficialmente. Aunado a esto, se ha visto que ligeras variaciones en la secuencia de aminoácidos de la hemoglobina causan diferencias significativas en la actividad superficial, aunque estas variantes tengan el mismo peso molecular (Brash & Horbett, 1987; Magdassi & Kamyshny, 1996).

2.3.2.4 Hidrofobicidad

Las diferencias químicas que se originan debido a los contrastes en la estructura primaria son también muy importantes dado que el balance de aminoácidos polares, no polares y con carga en las cadenas laterales determina la actividad superficial de proteínas en un sistema particular. Esta naturaleza anfipática de las moléculas proteicas permite que se unan con superficies de naturaleza química distinta.

Una propiedad muy importante en este contexto es la hidrofobicidad, que influye directamente en la adsorción y reorientación de las moléculas en una interfase y en muchos casos se correlaciona con su actividad superficial. Para una superficie particular, algunas proteínas pueden tener más residuos aminoácidos que favorezcan la unión con el tipo de sitios de adsorción prevalentes en dicha superficie y, en consecuencia, se potencialice su actividad superficial. En general, la idea de que las proteínas poseen una región central hidrofóbica sugiere que aquellas con mayor grado de hidrofobicidad pueden desempeñarse de mejor manera en ciertas superficies/interfaces, en vista de la importancia de las interacciones hidrofóbicas en las interacciones proteínas-interfase.

Por último, ya que la solubilidad de una proteína en el *bulk* es una función compleja de su composición química global, y dado que la adsorción puede ser considerada como un proceso de insolubilización o separación de fases, puede ser que las diferencias en solubilidad sean importantes indicadores de diferencias en la actividad superficial. Sin embargo, tomando como ejemplo a la hemoglobina, su alto índice de solubilidad es un punto en contra de esta idea ya que esta proteína ostenta elevada actividad superficial (Brash & Horbett, 1987; Magdassi & Kamyshny, 1996).

Evidentemente, en muchos casos el efecto de cada factor difícilmente puede ser evaluado, y las diferencias en actividad superficial son funciones complejas de sus propiedades moleculares.

2.3.3 Adsorción y desorción de proteínas en interfaces

La adsorción es un fenómeno mediante el cual átomos, iones o moléculas de gases, líquidos o sólidos disueltos son atrapados o retenidos en una superficie. Las interacciones superficiales de proteínas resultan en altas concentraciones locales de las mismas alcanzando aglomeraciones más de 1000 veces mayores comparadas con la solución del *bulk*. Este mecanismo depende de la disponibilidad de las moléculas proteicas para la interacción con el sustrato, mismas que pueden unirse por uno o más de los principales mecanismos de transporte: difusión, convección térmica, flujo y transporte acoplado (como la combinación de difusión y convección). Una vez que están presentes en la superficie, las moléculas de proteína pueden interactuar con el sustrato a través de fuerzas intermoleculares, como enlaces iónicos, interacciones hidrofóbicas e interacciones de transferencia de carga. En contraste con su importancia en la estabilización de estructuras de proteínas, el enlace de hidrógeno no juega un papel importante en las interacciones proteína-superficie.

Debido a que el agua es muy efectiva para formar enlaces de hidrógeno, es tan probable que forme enlaces de hidrógeno con una superficie como lo harían los aminoácidos en la molécula de proteína. Exactamente qué fuerzas intermoleculares gobiernan la interacción proteína-superficie dependerá de la proteína y superficie particular, incluso con una solución que contiene un único tipo de proteína, la capa de proteína adsorbida es probable que sea heterogénea. A medida que las moléculas se adsorben a una superficie limpia, existen pocas limitaciones en su interacción con el sustrato, y cada molécula puede formar muchos contactos con la superficie. Conforme la superficie se ocupa, sin embargo, hay menos área disponible para la adsorción de las moléculas de proteína posteriores; en consecuencia, las moléculas en orientaciones diferentes podrían unirse a la superficie, aunque se hacen menos contactos proteína-sustrato. Las orientaciones diferentes también pueden permitir que la proteína evite o minimice las interacciones repulsivas con biomoléculas unidas previamente; además de las razones del área de contacto disponible, las proteínas pueden existir en la superficie en diferentes estados de orientación debido a la heterogeneidad de la molécula de proteína y la superficie; es posible que se necesiten diferentes orientaciones para producir funcionalidades complementarias en la superficie y en las proteínas con alta proximidad (Dee *et al.*, 2003).

Para una interfase fluido/fluido, y de acuerdo con la ecuación de Gibbs para sistemas ideales, la adsorción de moléculas clásicas con actividad superficial en interfaces fluidas decrece la tensión interfacial según lo siguiente:

$$d\sigma = -\Gamma RT d\ln C_b$$

y

$$\Gamma = (1/RT)(d\Pi/d\ln C_b)$$

donde σ es la tensión interfacial, Γ es el exceso de la sustancia con actividad superficial (concentración superficial) en la interfase, C_b es la concentración en el bulk, y $\Pi = \sigma_0 - \sigma$ es la presión superficial.

La adsorción en una interfase de fluidos puede ser descrita por 3 procesos consecutivos: 1) difusión de la molécula desde el *bulk* hacia la interfase y fijación en la misma, 2) penetración de nuevas moléculas dentro de la capa adsorbida, y 3) rearreglo molecular de las partículas adsorbidas (esta etapa es muy importante en el caso de proteínas). Para los últimos 2 procesos existen barreras de energía; si la difusión es el mecanismo limitante, la ecuación de Ward & Tordai (1946) es útil para evaluar el sistema (Magdassi & Kamyshny, 1996). La desorción es el reverso de la adsorción; las moléculas previamente unidas a una superficie se separan y vuelven a la fase masiva. Para que ocurra la desorción, todos los contactos entre la proteína y la superficie deben romperse simultáneamente. Aunque está bien caracterizado para moléculas pequeñas como gases, la desorción de proteínas es lenta o inexistente, a menos que se realicen cambios drásticos en el entorno interfacial, como un aumento de la fuerza iónica, un pH reducido y el uso de agentes caotrópicos o

detergentes, la adsorción de proteínas es en gran medida irreversible debido a la necesidad de una disociación simultánea de todas las interacciones entre molécula y superficie. La dificultad o improbabilidad de la interrupción simultánea de todos los contactos se incrementa aún más para grandes proteínas, que pueden formar un mayor número de enlaces con la superficie (Dee *et al.*, 2003).

2.4 Surfactantes y emulsificantes

Los agentes con actividad superficial o surfactantes son moléculas o iones capaces de adsorberse en interfaces. La estructura molecular de estas sustancias está compuesta por 2 partes: una porción hidrofílica, capaz de orientarse hacia el agua o a otros líquidos y sólidos relativamente polares, y una parte hidrofóbica o lipofílica capaz de orientarse hacia una fase oleosa, líquidos o sólidos no polares y/o aire.

Por su parte, un agente emulsificante es un compuesto que se concentra en la frontera de dos fases inmiscibles, usualmente agua y aceite, disminuye la energía libre interfacial, reduce la tensión interfacial entre las fases, y forma una película o barrera alrededor de las gotitas de la fase dispersa o discontinua a medida que se forman, evitando la coalescencia de estas.

2.4.1 Clasificación y características

- a) **Polímeros solubles en agua.** Pueden ser agrupados según su origen o de acuerdo con su carga eléctrica. Basados en su origen, existen 3 clases de polímeros solubles en agua: naturales (agar, pectina, polipéptidos, proteínas, etc.), derivados de celulosa o semisintéticos (metilcelulosa, carboximetilcelulosa, etc.) y sintéticos (vinilpolímeros, carbomeros y polietilenglicoles). Según su carga eléctrica se clasifican en no cargados y aniónicos, los catiónicos son poco comunes.

Algunas de sus características son: favorecer emulsiones O/W, aumentan considerablemente la viscosidad. Otras características dependen de la estructura particular de cada molécula.

- b) **Surfactantes aniónicos y detergentes.** Los primeros se clasifican en jabones “suaves” y “duros”. Los primeros son sales de ácidos grasos en el que el ion positivo es univalente, como Na^+ y K^+ , los ácidos grasos más utilizados son esteárico, palmítico, oleico y láurico. Son solubles o dispersables en agua, usualmente forman emulsiones O/W con un pH básico.

El segundo grupo son sales de ácidos grasos en el que el ion positivo es divalente o trivalente, se forman de la reacción de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ en solución de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ tópica con ácido oleico. Son solubles en aceite e insolubles en agua y forman emulsiones W/O.

Los detergentes son sales de alquilsulfatos, sulfonatos, fosfatos y sulfosuccinatos, un ejemplo es el lauril sulfato de sodio. Son muy hidrofílicos y siempre forman emulsiones O/W, son más estables en ambientes ácidos.

- c) **Surfactantes catiónicos.** Son compuestos cuaternarios de amonio, muy hidrofílicos, no son buenos emulsificantes, pero son útiles como agentes antimicrobianos.
- d) **Sólidos finamente divididos.** Estos son generalmente sólidos inorgánicos hidrófilos finamente divididos. Cuando estos sólidos se encuentran en un estado muy fino de subdivisión, tienden a no ser fácilmente humedecidos por líquidos y se orientan en las interfaces, formando una barrera a la coalescencia. Los ejemplos más comunes de este tipo incluyen a las arcillas coloidales bentonita y Veegum y los hidróxidos metálicos, como el óxido de magnesio y óxido de zinc.
- e) **Surfactantes naturales no iónicos.** Estos incluyen alcoholes de ácidos grasos, tales como alcohol estearílico y alcohol cetílico, grasa de lana o cera de lana y sus derivados, alcoholes de lana y colesterol y derivados de otras ceras naturales, tales como espermaceti y cera de ésteres de cetil0. Están disponibles como fracciones de los productos naturales o sus versiones sintéticas.
- f) **Surfactantes sintéticos no iónicos.** Estos son ésteres complejos y éster-éteres derivados de polioles, óxidos de alquileo, ácidos grasos y alcoholes grasos. La porción hidrófila de estas moléculas consiste en grupos libres hidroxilo y oxietileno; la parte lipofílica tiene hidrocarburos de cadena larga de ácidos grasos y alcoholes grasos. Aunque reciben una designación química basada en el componente primario, estos son mezclas realmente complejas de derivados estrechamente relacionados. Por ejemplo, el monooleato de sorbitán, también conocido como Span 80, es una mezcla, pero el componente principal es monooleato de sorbitán. El polisorbato 80 (Tween 80) es monooleato de polioxietileno 20 sorbitán; el 20 indica que hay aproximadamente 20 moles de óxido de etileno por cada mol de sorbitol y anhídrido de sorbitol. Los tensoactivos no iónicos comúnmente utilizados incluyen diversos Spans, Tweens, Arlacels y Myrjs.
Son compuestos neutros y estables en un amplio rango de pH, tolerantes al calor y relativamente insensibles a la presencia de altas concentraciones de electrolitos.
- g) **Tensoactivos anfotéricos o zwitteriónicos.** . Estos surfactantes pueden ser aniónicos, catiónicos o no iónicos en solución, dependiendo del pH del medio. Son generalmente ligeros, como la lecitina, lo que hace que algunos de ellos sean especialmente adecuados para su uso en productos y preparados farmacéuticos.

2.4.3 Métodos experimentales para evaluar el desempeño de surfactantes y emulsificantes

Los agentes tensoactivos, como humectantes, emulsionantes, limpiadores o agentes espumantes, asumen un papel importante en la mezcla de líquidos o cuando entran en contacto con sustancias sólidas. Las preguntas que requieren un análisis de la interfaz están asociadas con el desarrollo, la optimización y la dosificación correcta de estas moléculas. Algunas de las cuestiones que necesitan ser respondidas para entender la potencial funcionalidad de estas sustancias son: ¿cómo reduce dicha sustancia la tensión interfacial en

distintos ambientes (por ejemplo, sistemas aire-agua o aire-aceite) ?, ¿qué tan rápido actúa? ¿en qué porcentaje mejora la humectación? ¿existe una tendencia a la estabilización de espumas y emulsiones? ¿cuál es la naturaleza de la espuma y/o emulsión que se forma? Para responder estas y otras preguntas relacionadas con la funcionalidad tanto de tensoactivos como emulsificantes, algunos de los test de mayor aplicación son los siguientes:

- a) **Medición de la tensión interfacial.** Es un parámetro importante para muchos procesos. Por ejemplo, en muchos casos las superficies y partículas hidrofóbicas están mal humedecidas debido a la alta tensión superficial del agua; los tensoactivos reducen la tensión superficial y de este modo mejoran la humectación de las superficies sólidas y la dispersabilidad de los polvos. Previamente se describieron los métodos más comunes para medir este parámetro, así como las ecuaciones involucradas en el cálculo de este.
- b) **Concentración micelar crítica.** Provee información importante acerca de los surfactantes; es la concentración en la que la superficie está completamente cubierta con moléculas de surfactante. Por encima de esta concentración, se producen agrupaciones de moléculas denominadas micelas en la solución. Entre otras cosas, las micelas son responsables del efecto limpiador de un agente tensoactivo, ya que pueden incorporar y movilizar sustancias hidrófobas. La medición de la CMC permite conocer la concentración de tensoactivo en la que comienza a presentarse el efecto de limpieza. Por encima de la CMC, la tensión superficial no se reduce más cuando se agrega más surfactante. En el caso de los agentes humectantes, por lo tanto, no tiene sentido utilizar una dosis superior a la CMC por razones de costo y consideraciones ecológicas. La dosificación de un agente tensoactivo como agente humectante puede optimizarse midiendo la CMC.
- c) **Medición de la tensión interfacial entre líquidos.** Dado que emulsionantes y tensoactivos reducen la tensión interfacial entre fases que no son solubles entre sí, estos son capaces de mejorar la capacidad de mezcla. Al mismo tiempo, facilitan que se formen pequeñas gotas y actúen para estabilizar la emulsión, ya que ralentizan o evitan la fusión de las gotitas. La tensión interfacial de un líquido con respecto al agua es una medida de su hidrofobicidad. Por lo tanto, la medición de este parámetro se utiliza para garantizar la calidad de los líquidos con los que no es deseable una mezcla de fases con agua.
- d) **Tensión interfacial dinámica.** Las superficies e interfaces se forman a gran velocidad en diversas aplicaciones y procesos de producción. Sin embargo, los surfactantes y emulsificantes necesitan una cierta cantidad de tiempo para la difusión y la adsorción; por lo tanto, la tensión interfacial depende de cuánto tiempo ha transcurrido desde que se formó un nuevo límite de fase. En consecuencia, la

tensión interfacial puede ser considerablemente mayor con procesos dinámicos que en el estado estacionario, esta situación afecta significativamente la elección correcta y la dosis de un surfactante.

- e) **Medición del ángulo de contacto.** La medición del ángulo de contacto se usa para responder las siguientes preguntas: 1) el efecto sobre la humectación al agregar surfactantes y 2) humectabilidad de sólidos que contienen surfactantes.

El ángulo de contacto es una indicación del grado en que se mejora la humectación de un líquido mediante la adición de un agente tensoactivo. Las mediciones a altas o bajas temperaturas, la humedad controlada o la dinámica de dosificación flexible simulan de manera flexible las condiciones de su proceso de humectación. Dado que los sólidos se mezclan frecuentemente con surfactantes para mejorar la humectabilidad del agua (un ejemplo de esto es el uso de surfactantes para promover y acelerar la disolución de tabletas), el cambio en el ángulo de contacto con respecto al tiempo es particularmente importante para investigar el efecto del tensoactivo, esta dependencia de tiempo refleja la velocidad con la que estas sustancias se adsorben en la interfaz con el líquido y actúan para mejorar la solubilidad.

- f) **Reología interfacial.** Las investigaciones reológicas de superficie aumentan el conocimiento a detalle de los surfactantes en las siguientes áreas: 1) movilidad de los surfactantes, 2) estabilidad de la película, 3) estabilidad de la espuma y 4) estabilidad de la emulsión.

La reología interfacial investiga el cambio en la tensión superficial o tensión interfacial en función de la velocidad y el grado de cambio del área de la interfaz. Los instrumentos de reología superficial miden cantidades tales como la elasticidad de la interfaz (módulo de almacenamiento) y la viscosidad de esta (módulo de pérdida), estas cantidades permiten sacar conclusiones relacionadas con la movilidad de los tensoactivos y la estabilidad de las películas líquidas, así como de las gotas en las emulsiones. Los resultados también pueden correlacionarse con frecuencia con parámetros de espuma tales como la velocidad de drenaje y la estabilidad de la burbuja de espuma. El conocimiento de la reología interfacial aumenta la profundidad del conocimiento del comportamiento de los tensoactivos en emulsiones y espumas, esto puede contribuir a la optimización de productos y procesos en los que los surfactantes desempeñan un papel crucial.

CAPÍTULO 3

3.-JUSTIFICACIÓN

Como se ha mencionado, las semillas de chía (*Salvia hispánica L.*) poseen excelentes cualidades nutrimentales, particularmente en cuanto al aporte de ácidos grasos y aminoácidos esenciales se refiere, por lo que no es de extrañarse que la demanda de las semillas de esta planta se haya incrementado considerablemente en el mercado de alimentos funcionales en los últimos años.

Sin embargo, las propiedades tecnológicas de las proteínas nativas de la chía han sido poco estudiadas. Hasta hace poco tiempo, el enfoque que permanecía en el estudio de estas semillas era únicamente con fines nutrimentales y algunas aplicaciones ajenas al sector alimentario (pinturas, barnices, piensos para ganado, etc.). No obstante, en tiempos recientes se ha renovado el interés por las propiedades funcionales que comparten un gran número de proteínas vegetales, incluidas las de la chía, como consecuencia de la diversificación en las necesidades y exigencias de los consumidores. Particularmente el área de las emulsiones y sistemas dispersos en general ha tomado gran auge debido a la elevada cantidad de productos comerciales que caen dentro de esta categoría. El origen de los emulsificantes utilizados en este tipo de productos ha sido replanteado y en la actualidad se desea sustituir un gran número de compuestos usados como tales debido a su origen sintético. En tiempos recientes se ha desarrollado una tendencia ampliamente marcada dentro del área biotecnológica para encontrar sustitutos de origen natural a estos materiales empleados tradicionalmente, todo desarrollado a través de procesos sustentables. Este hecho, sumado al incremento exponencial del mercado de alimentos funcionales o nutraceuticos, han redireccionado a la industria con el propósito de ofertar productos novedosos y de calidad que cumplan con las expectativas de los consumidores.

De esta manera, el presente trabajo pretende analizar las propiedades superficiales presentes en las diversas fracciones proteicas de las semillas de chía. Al conjuntar tanto las propiedades funcionales y nutrimentales de este grupo de proteínas se aportan beneficios económicos significativos al proceso y se potencializa el valor de las semillas de chía.

CAPÍTULO 4

4.-OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar la factibilidad de emplear fracciones de concentrados proteicos de semilla de chía (*Salvia hispánica L.*) como agentes con actividad superficial.

4.2 Objetivos particulares

1. Aislamiento y cuantificación de proteínas presentes en las semillas de chía
2. Fraccionamiento del concentrado proteico por solubilidad y caracterización fisicoquímica de las fracciones en su forma coloidal.
3. Evaluar la actividad superficial de las fracciones proteicas.

CAPÍTULO 5

5.-HIPÓTESIS

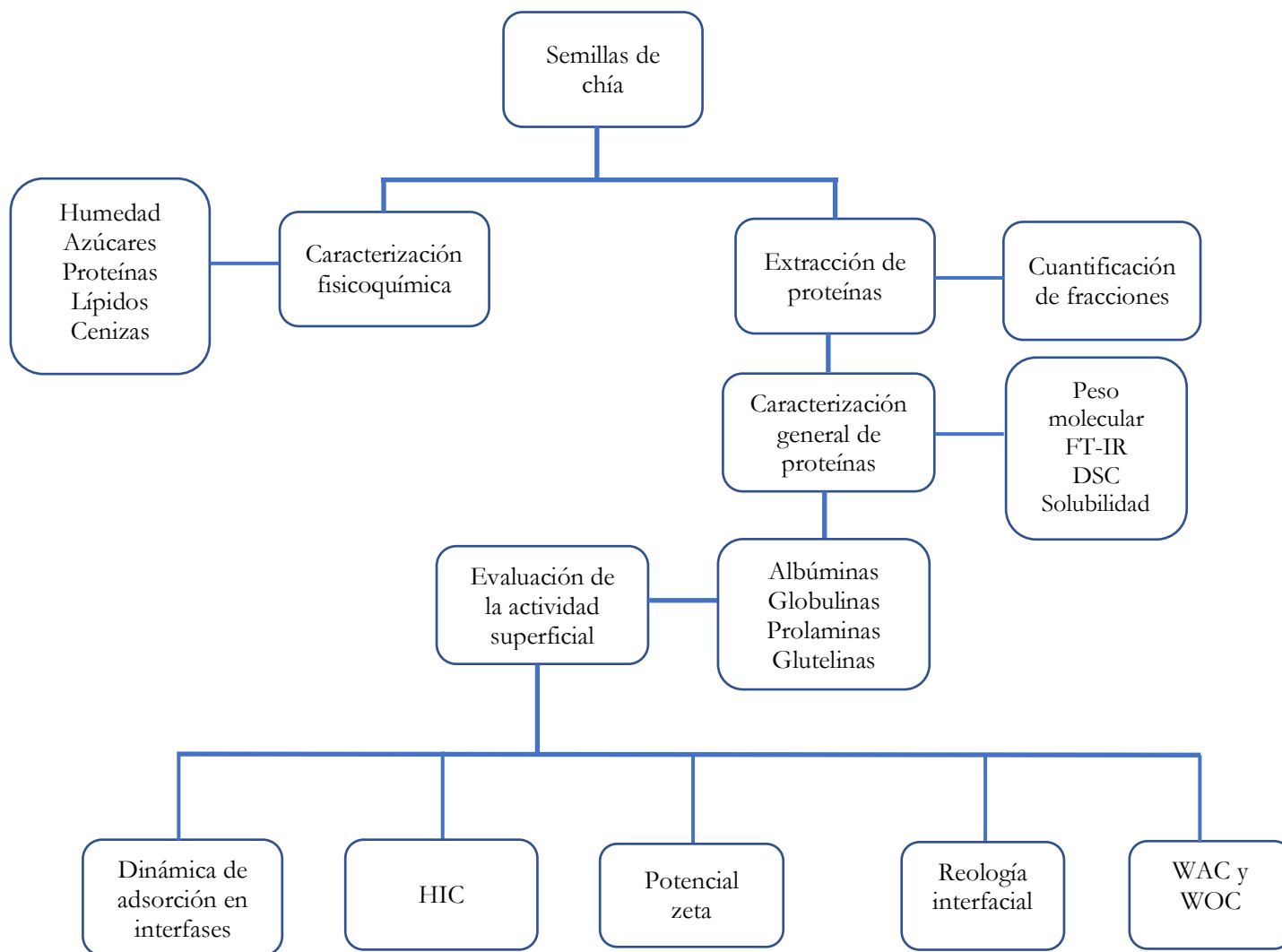
Las fracciones proteicas contenidas en las semillas de chía ostentan propiedades superficiales favorables para su uso como agentes estabilizantes de sistemas polifásicos, capaces de actuar como una fuente alterna al uso de proteínas de origen animal y moléculas de origen sintético tradicionalmente empleadas en la industria biotecnológica y así, generar productos de alto valor agregado al aprovechar tanto sus propiedades funcionales como nutrimentales.

CAPÍTULO 6

6.-MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Estrategia experimental

La estrategia experimental que se siguió fue la siguiente:



6.2 Materiales

Las semillas de chía fueron adquiridas en un mercado local de la Ciudad de México. Se utilizó agua desionizada en la totalidad de experimentos. Todos los reactivos y solventes utilizados fueron grado analítico, adquiridos según se describe a continuación:

Reactivos: mezcla reactiva de selenio para la determinación de nitrógeno según Wieninger, provisto por Merck Millipore; carbonato de sodio (NaCO_3), cloruro de sodio (NaCl) e hidróxido de sodio (NaOH) adquiridos en Tecsiquim S.A. de C.V.; tartrato de sodio y potasio ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$); sulfato de cobre

(CuSO₄) y fenol (C₆H₅OH) comprados a J. T. Baker; reactivo de Folin-Ciocalteu, sulfito de sodio (NaSO₃) y rojo de metilo (C₁₅H₁₅N₃O₂) obtenidos a través de Sima-Aldrich; fosfato de sodio dibásico (Na₂HPO₄) suministrado por Reasol S.A de C.V. y fosfato de sodio monobásico (NaH₂PO₄ · H₂O) provisto por Técnica Química S.A de C.V.

Solventes: n-hexano (C₆H₁₄), adquirido a través de J.T Baker; tolueno (C₇H₈), provisto por Técnica Química S.A de C.V. y ácido sulfúrico (H₂SO₄), ácido clorhídrico (HCl), etanol absoluto (C₂H₆O) y al 96% comprados a Tecsiquim S.A. de C.V.

Estándares: Albúmina sérica bovina y glucosa (C₆H₁₂O₆) adquiridos en Sigma Aldrich.

Otros materiales: membranas de celulosa (tamaño de exclusión de 12,400 mW), provistas por Sigma-Aldrich; filtros de nylon de 0.2 y 0.45 µm, adquiridos a través de Pall Corporation; resina Macro-Prep Methyl HIC Media (Bio-Rad), comprada a Crissof de México S. de R.L. de C.V.; aceite de canola comestible Capullo™, comprado en un mercado local; nitrógeno (N₂) y dióxido de carbono sólido (CO₂), adquirido en un negocio local de la Ciudad de México.

6.3 Caracterización fisicoquímica de semillas de chía

6.3.1 Contenido de proteína total

El contenido de nitrógeno fue determinado mediante la técnica micro-Kjeldahl, la cual permite cuantificar el nitrógeno total presente en la muestra, tanto proteico (amino y amida) como no proteico (urea y otros). Para ello, aproximadamente 0.5 mg de semillas se colocaron en un matraz micro-Kjeldahl, recubiertas por un fragmento de papel filtro, posteriormente se agregaron 10 ml de H₂SO₄ concentrado. A esta mezcla se le adicionaron 2 mg de la mezcla reactiva de selenio para la determinación de nitrógeno para posteriormente proceder a un proceso de digestión por un periodo aproximado de 5 horas. Finalmente, la solución resultante se destiló y tituló con una solución valorada de NaOH 0.1 N. El nitrógeno total se calculó mediante las siguientes ecuaciones:

$$N_2 \text{ total} = (B-A) \times N \times \text{meq} \times 100 / \text{peso de la muestra}$$

$$\text{Proteína total} = N_2 \text{ total} \times \text{FC}$$

Dónde:

A = ml de NaOH gastados en la muestra del blanco

B = ml de NaOH gastados en la muestra

N = normalidad del NaOH

meq = miliequivalentes del HCl obtenidos en la titulación

FC = factor de conversión estándar para proteínas (6.25)

6.3.2 Determinación de azúcares totales

El contenido de azúcares totales se determinó mediante la técnica de fenol-sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956). A través de este método es posible cuantificar azúcares simples, reductores, oligosacáridos, polisacáridos y sus derivados. En primer lugar, se preparó una solución acuosa de la muestra triturada, para posteriormente añadir 1 ml de esta a tubos de ensayo perfectamente etiquetados. Para cada tubo se adicionó 0.6 ml de una solución acuosa de fenol al 5%, se mezcló perfectamente y se adicionó 3.6 ml de H₂SO₄ concentrado. La mezcla se homogeneizó y permaneció en reposo a temperatura ambiente por aproximadamente 30 min., posterior a ello se determinó la intensidad del color naranja con ayuda de un espectrofotómetro a 480 nm frente a un blanco preparado de la misma manera utilizando agua. La cantidad de carbohidratos presentes en la muestra se calculó a partir de una curva patrón obtenida con glucosa sometida al mismo tratamiento en concentraciones de 10 a 100 µg/ml.

6.3.3 Extracción y cuantificación de lípidos

Se empleó una adaptación del procedimiento de Soxhlet, acoplado un sistema de reflujo para el solvente. En primera instancia, un matraz de bola con fondo plano y perlas de ebullición fue llevado a peso constante en una estufa a 90 °C. Se pesaron 20 g de semillas y se colocaron al interior del matraz, se acopló un refrigerante a la entrada del recipiente y se añadieron 200 ml de n-hexano por este conducto. Se procedió a calentar la muestra hasta 70 °C (punto de ebullición del hexano) por 4 horas circulando agua fría por el refrigerante; terminado el proceso se colectó la mezcla de solvente y extracto para ser destilada en un rotavapor. El aceite recuperado se pesó y se calculó el porcentaje de grasa, el solvente recuperado fue utilizado para una nueva carga.

6.3.4 Contenido de humedad

Para determinar el contenido de humedad presente en las semillas se utilizó la técnica de secado en estufa. Se pesaron 3 g. de muestra y se colocaron en crisoles llevados a peso constante previamente, se ubicó la muestra al interior de una estufa a 90 °C hasta alcanzar peso constante. Terminado el proceso, se retiraron los crisoles y se dejaron enfriar en un desecador a temperatura ambiente; el contenido de humedad fue determinado por la diferencia de pesos debido a la pérdida de agua durante e secado isotérmico.

6.3.5 Determinación de cenizas

Se colocó 1 g de muestra en cada uno de los crisoles llevados a peso constante previamente. Posteriormente las muestras fueron puestas en una mufla a 550 °C durante 5 h. Transcurrido este tiempo, los crisoles fueron almacenados en un desecador, permitiéndoles enfriarse y alcanzar nuevamente peso constante. La

determinación de cenizas, referida como el análisis de residuos inorgánicos que quedan después de la ignición u oxidación completa de la materia orgánica de una muestra, fue determinada por la diferencia de peso de los crisoles con las cenizas y el del crisol vacío sobre el peso de la muestra, expresándose como porcentaje.

6.4 Fraccionamiento y caracterización de proteínas

6.4.1 Aislamiento y cuantificación

Se obtuvieron 4 tipos de proteínas de chía (albúminas, globulinas, prolaminas y glutelinas) aisladas de acuerdo con el criterio establecido por Osborne (1924) y siguiendo la metodología descrita por Timilsena *et al.* (2016b) con algunas modificaciones.

En una primera etapa, las semillas de chía fueron tratadas con etanol en una proporción 1:3 y mantenidas en agitación durante 12 h. aproximadamente para remover el mucilago. Posteriormente se extrajo la materia grasa mediante una adaptación del método Soxhlet descrito previamente. Las semillas se secaron en una estufa a 50 °C por 8 horas para eliminar los restos de solvente y se molieron hasta obtener una harina fina; dicha harina se usó para hacer la extracción de las proteínas como sigue:

50 g de harina desgrasada y sin mucílago se homogenizaron con agua en una proporción 1:10 manteniendo en agitación durante 30 min., en seguida, el extracto se centrifugó a 6000 rpm por 35 minutos controlando la temperatura a 15 °C, el sobrenadante se colectó como la fracción “albúminas”. Después de esto, el residuo se trató de manera similar con NaCl 1 M, etanol al 70% y NaOH 0.2%. El sobrenadante de cada extracto se colectó por separado y se utilizaron para obtener las proteínas solubles en soluciones salinas (globulinas), alcohol (prolaminas) y álcalis diluidos (glutelinas).

Las proteínas colectadas se dializaron en un medio acuoso utilizando membranas de celulosa con un tamaño de exclusión de 12, 400 MW; terminado el proceso, fueron liofilizadas y almacenadas a temperatura ambiente. La proporción de proteínas presente en las semillas se calculó mediante el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951).

Cada una de las 4 fracciones obtenidas fue caracterizada a través de las técnicas que se describen a continuación.

6.4.2 Determinación de pesos moleculares

Se estimó el peso molecular promedio de las 4 fracciones de proteínas utilizando dispersión estática de luz mediante un equipo Zetasizer Nano ZSP (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK). Se prepararon soluciones de cada fracción a distintas concentraciones (0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 y 1 mg/ml) utilizando buffer de fosfatos (50 mM, pH 7.2) como solvente; cada dilución fue depurada a través de un filtro de nylon de 0.2 µm; se utilizó una celda de vidrio en todas las mediciones.

Para moléculas que no muestran dependencia angular en su dispersión, la relación entre la cantidad de luz dispersa y su peso molecular vienen dada por la ecuación de Rayleigh:

$$KC/R_{\theta} = (1/M + 2A_2C)$$

donde K es una constante óptica, R_{θ} es la relación de Rayleigh de la intensidad de luz dispersa a incidente, M es el peso molecular promedio ponderado, A_2 es el segundo coeficiente virial y C es la concentración de la muestra. Por lo tanto, se espera que una gráfica de KC/R_{θ} vs C sea lineal con una ordenada al origen equivalente a $1/M$ y una pendiente igual al segundo coeficiente virial. Tal representación se conoce como gráfica de Debye.

6.4.3 Análisis de hidrofobicidad

Los 4 tipos de proteínas obtenidas se examinaron mediante cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC). Para ello, se prepararon soluciones al 0.5% (p/v) en NaCl 3 M con las muestras liofilizadas y se pasaron por un filtro de nylon (0.2 μ m); se inyectó 10 ml de cada muestra a una columna de vidrio con un diámetro interno de 2.54 cm y 50 cm de longitud conteniendo una resina Macro-Prep® Methyl HIC Media. La elución se llevó a cabo usando NaCl 3 M, 2.5, 2, 1.5, 1, 0.5 y agua, sucesivamente, con una velocidad de flujo de 0.66 ml/min. El efluente fue monitoreado a 280 nm usando un sistema cromatográfico de baja presión (Biologic LP, Bio-Rad, CA, EE. UU).

6.4.4 Estructura secundaria

Aproximadamente 3 g. de cada fracción de proteínas liofilizadas fueron analizadas mediante un espectrómetro Perkin Elmer Spectrum One FT-IR; 5 barridos independientes fueron promediados para cada muestra. La asignación de bandas a cada componente estructural secundario de las proteínas se realizó para la región amida I (1600-1700 cm^{-1}); para ello, se usó un proceso de deconvolución en los espectros con el software FT-IR Spectrum One (V3.02.01, Perkin Elmer, Inc., EE.UU.) y posteriormente se analizaron los mismos con el software Origin 7.5 (v7.5870, OriginLab Corporation, USA) para identificar los tipos de estructura secundaria presentes en las muestras mediante el ajuste de múltiples picos Gaussianos en los espectros e integrando, de acuerdo con los métodos de Jiang *et al.* (2015), Siu *et al.* (2002), Yong *et al.* (2006) y Carbonaro & Nucara (2010), con ligeras modificaciones. El área de cada pico indica la cantidad de cada componente estructural secundario (estructuras aleatorias, α -hélices, giros- β , hojas- β intramoleculares y hojas- β intermoleculares).

6.4.5 Caracterización termodinámica

Las fracciones de proteínas se dispersaron en agua dentro de tubos Eppendorff provistos de tapas herméticas para evitar la evaporación y se almacenaron durante 24 h. a temperatura ambiente para su completa hidratación. Las proporciones de agua-proteína (g/kg) requeridas se han descrito en trabajos previos (Olivos-Lugo *et al.*, 2009), quedando de la siguiente manera: albúminas 300, globulinas 400, prolaminas y glutelinas 900. Aproximadamente 5 mg de cada fracción hidratada fueron pesados dentro de charolas herméticas de acero (PEB 018-2902) y selladas. Cada una de estas charolas se colocó en un calorímetro (DSC -7 Perkin Elmer) previamente calibrado, se circuló nitrógeno para crear una atmósfera inerte y se realizó la corrida en un rango de temperatura de 20 a 150 °C. Para cada fracción se calculó el rango de temperatura de desnaturalización (ΔT_d), la temperatura máxima de desnaturalización (T_d) y la entalpía asociada al proceso (ΔH_d).

6.4.6 Solubilidad

La solubilidad de cada fracción en agua fue determinada como función del pH. En este test, 0.05 g de muestra se dispersaron en 5 ml de agua a diferentes valores de pH (2-12). Las mezclas se agitaron vigorosamente y se dejaron hidratar toda la noche a 4 °C. Las dispersiones se centrifugaron a 5000 rpm por 10 minutos manteniendo la temperatura a 4 °C. El residuo insoluble se descartó y el sobrenadante se filtró con una membrana de nylon de 0.22 μm . El contenido de proteína se cuantificó usando el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951).

6.4.7 Capacidad de retención de agua y aceite

Dado que la capacidad para retener agua y aceite influyen significativamente en el desempeño de las proteínas como estabilizantes de sistemas dispersos, se investigó el comportamiento de cada fracción siguiendo la metodología descrita por Olivos-Lugo *et al.*, con algunas modificaciones. 0.25 g de muestra se mezclaron con 2.5 ml de agua y se sometió a agitación durante 1 hr.; seguido de esto, cada muestra se mantuvo en reposo durante 25 minutos a temperatura ambiente para posteriormente centrifugar a 10,000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se colectó y pesó para calcular la cantidad de agua retenida, expresada como masa de agua (g) por masa de muestra (g) a través de la siguiente expresión:

$$\text{WAC} = (W_o - W_s) / (W_o)$$

donde W_o y W_s son las masas de agua utilizada (g) y no absorbida (sobrenadante)(g), respectivamente.

Para determinar la capacidad de retención de aceite se siguió el procedimiento anterior, reemplazando el agua por aceite de canola. El resultado se expresó como masa de aceite retenido (g) por unidad de masa de proteína.

6.4.8 Carga superficial

A través del monitoreo del potencial zeta como función del pH se determinó la carga superficial asociada a cada tipo de proteínas. Para ello, se prepararon soluciones acuosas al 1% y se almacenaron por 8 hrs a °C para su completa hidratación. El potencial zeta se determinó utilizando un equipo Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Worcestershire, UK) provisto con autotitulado y ajustando el pH de las soluciones mediante la adición de HCl 1 M y NaOH 0.75 M; para cada fracción se obtuvo el punto isoeléctrico.

6.4.9 Dinámica de adsorción en la interfase

Las fracciones de proteínas fueron solubilizadas en buffer de fosfatos (50 mM, pH 7) hasta una concentración de 1%. Se usó un medidor de ángulo de contacto óptico (OCA-20) con accesorio de caída oscilante ODG-20 (Dataphysics Instruments GmbH, Alemania) para analizar la dinámica de adsorción de cada una de las fracciones, monitoreando la evolución de la tensión interfacial a través del tiempo en interfaces agua-aceite y agua-aire durante 90 y 54 minutos, respectivamente. El aceite utilizado en este análisis fue aceite de canola filtrado (0.2 µm).

6.4.10 Reología interfacial

Las mediciones se realizaron con la ayuda de un reómetro compacto modular Physica MCR 300 (Physica Meßtechnik GmbH, Stuttgart, Alemania) equipado con un disco bicónico de acero inoxidable (radio del disco, R_b , de 15 mm y disco de doble ángulo, 2α , de 10°). Para ello, previamente se prepararon soluciones de las 4 fracciones de proteínas a una concentración de 0.5 (p/v) utilizando buffer de fosfatos (50 mM, pH 7.2) como solvente. Un recipiente de acrílico con termostato (radio interno, R_c , de 27 mm) fue colocado en la placa de medición del reómetro, posteriormente se vertieron cuidadosamente alrededor de 20 ml de solución de proteínas y el motor del equipo se accionó colocando la geometría en la superficie del medio. A continuación, la fase oleosa (aceite de canola) se vertió cuidadosamente con ayuda de una pipeta Pasteur a través de las paredes del recipiente hasta formar una capa sobre la solución de proteínas.

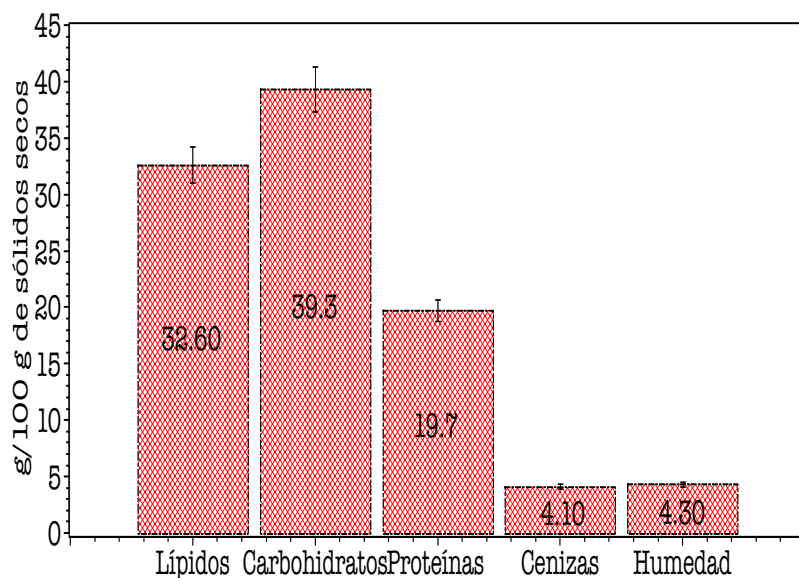
Las propiedades viscoelásticas interfaciales estáticas (creep compliance) se calcularon sometiendo los films de proteínas a valores constantes de estrés de corte interfacial ($\sigma^{int} = 0.5 \mu\text{N}/\text{m}$) durante 15 minutos, después de los cuales se retiró dicho esfuerzo y se continuó monitoreando la atenuación en el estrés del film por 15

minutos más. Se graficó el porcentaje de deformación del material como función del tiempo cada 2 s. con el software nativo del equipo.

CAPÍTULO 7

7.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

a) Caracterización fisicoquímica de semillas



^aLos valores representan la media \pm SD de tres determinaciones

Figura 6. Análisis proximal de semillas de chía

La figura 6 presenta los resultados obtenidos en el análisis proximal de semillas de chía. Se aprecia claramente que los carbohidratos son el principal componente en dichas semillas (39.3%), mientras que la materia inorgánica constituye el menor porcentaje en las mismas (4.1%). Los resultados obtenidos concuerdan con los reportados previamente por Sandoval-Oliveros & Paredes-López (2013), así como por Olivos-Lugo *et al.*, (2009), a pesar de que en estos trabajos se cuantificó por separado la fibra dietética y los azúcares simples. El contenido de aceite también es de resaltar, ya que es superior a las cantidades

reportadas para las principales semillas de interés comercial, como la soya (24%) y el algodón (22-24%) (Ayerza, 1995). En cuanto al contenido de proteínas se refiere, se constató que las semillas de chía poseen una cantidad similar a las lentejas (23%) y garbanzos (21%), pero en mayor proporción (19.7% en el presente análisis) respecto a los cereales de mayor consumo, tal y como se ha reportado en trabajos previos (Ayerza & Coates, 2005; 2011). Así mismo, en estudios anteriores con estas semillas (Sandoval-Oliveros & Paredes-López, 2013; Olivos-Lugo *et al.*, 2009) se reportaron rendimientos superiores al 20% para este componente (22.7% y 24.6 %), demostrando así que las cantidades obtenidas pueden variar significativamente en función de las condiciones de producción, almacenamiento postcosecha y la metodología utilizada durante el proceso de extracción, por lo que, para maximizar el rendimiento de alguno de los componentes de interés, es necesario evaluar con detenimiento cada una de estas etapas.

Continuando con la fracción proteica, previamente se ha discutido también la distribución de aminoácidos presentes en las semillas de chía. La tabla 2 presenta una vista comparativa de los resultados obtenidos por Sandoval-Oliveros & Paredes-López (2013) y Olivos-Lugo *et al.*, (2009). Existe una diferencia palpable entre ambos trabajos, a pesar de que en los dos casos las determinaciones se hicieron en la harina desgrasada de las semillas. Es muy probable que el proceso de extracción y preparación de las muestras influya directamente

Tabla 2. Composición de aminoácidos presentes en las semillas de chíca

Aminoácido	Contenido (mg/g de proteína cruda) en harina desgrasada	
Asp	47.3 ± 0.9 ^b	61.3 ± 8.8 ^c
Glu	70.8 ± 1.1	123 ± 3.3
Ser	26.2 ± 0.3	39.1 ± 0.75
Gly	22.8 ± 0.7	34.9 ± 6.7
Arg	42.3 ± 0.4	80.6 ± 2.5
Ala	26.8 ± 0.3	39.4 ± 4.12
Pro	19.9 ± 0.7	32.9 ± 2.17
His ^a	13.7 ± 0.1	21.0 ± 0.6
Thr ^a	18.0 ± 0.2	28.2 ± 1.5
Val ^a	28.5 ± 0.4	45.5 ± 1.4
Met + Cys ^a	27.7 ± 0.5	21.0 ± 1.96
Ile ^a	24.2 ± 0.4	34.1 ± 3.17
Leu ^a	41.5 ± 0.6	54.4 ± 6.0
Phe + Tyr ^a	38.8 ± 0.5	54.2 ± 2.2
Lys ^a	29.9 ± 0.5	37.1 ± 5.18

^aaminoácidos esenciales

^bresultados obtenidos por Sandoval-Oliveros & Paredes-López (2013)

^cresultados obtenidos por Olivos-Lugo et al., (2009)

en la composición de aminoácidos detectada. La misma tabla indica que existe una cantidad elevada de aminoácidos

aromáticos (Phe y Tyr) y azufrados (Met y Cys), así como presencia considerable de treonina e histidina. Además, se detectó un alto porcentaje de ácidos glutámico y aspártico, que es típico en semillas con abundante presencia de globulinas (como se detalla en la siguiente sección); estos dos últimos poseen un grupo R con carga neta negativa a pH 7. La abundancia de aminoácidos azufrados sugiere que pueden estar íntimamente ligados en la estabilización de la estructura terciaria y cuaternaria de estas proteínas; por su parte, la presencia de altos niveles de ácido glutámico ha sido de interés en la industria biotecnológica debido a su potencial para estimular los sistemas nerviosos e inmunológico en humanos (Sandoval-Oliveros & Paredes-López (2013); Olivos-Lugo *et al.*, 2009).

En cuanto a la distribución de aminoácidos según su polaridad, en ambos estudios se comprobó que existe un balance adecuado entre aquellos de carácter polar y no polar o alifático. Así, Sandoval-Oliveros & Paredes-López (2013) determinaron que alrededor del 53.5% corresponden al primer tipo (polares), mientras que un 46.5% al segundo (no polares y aromáticos). Por su parte, Olivos-Lugo *et al.*, (2009) mencionan una proporción de 55.7% para aminoácidos de carácter polar, y un 44.3% para aquellos no polares. Desde

luego, esta situación posee implicaciones altamente relevantes en el desarrollo de sistemas dispersos, puesto que según el tipo, número y posición de los aminoácidos en la cadena polipeptídica se determinan las propiedades moleculares, fisicoquímicas y funcionales de las proteínas. En consecuencia, estas se comportan como moléculas anfífilas capaces de anclarse, por ejemplo, a interfaces agua-aire o agua-aceite y así, coadyuvar en la estabilización de espumas y emulsiones. El balance relativo de grupos polares y no polares expuestos en sus superficies gobierna la actividad superficial de estas moléculas. Si la hidrofobicidad de la superficie es demasiado baja, entonces la fuerza motriz para la adsorción de las proteínas no será suficiente para superar la pérdida de entropía asociada con la adsorción; por el contrario, si la hidrofobicidad superficial

es demasiado alta, entonces las proteínas tienden a agregarse, se vuelven insolubles en agua y pierden su actividad superficial. En consecuencia, un nivel óptimo de hidrofobicidad es requerido para que una proteína pueda actuar como un adecuado agente superficial.

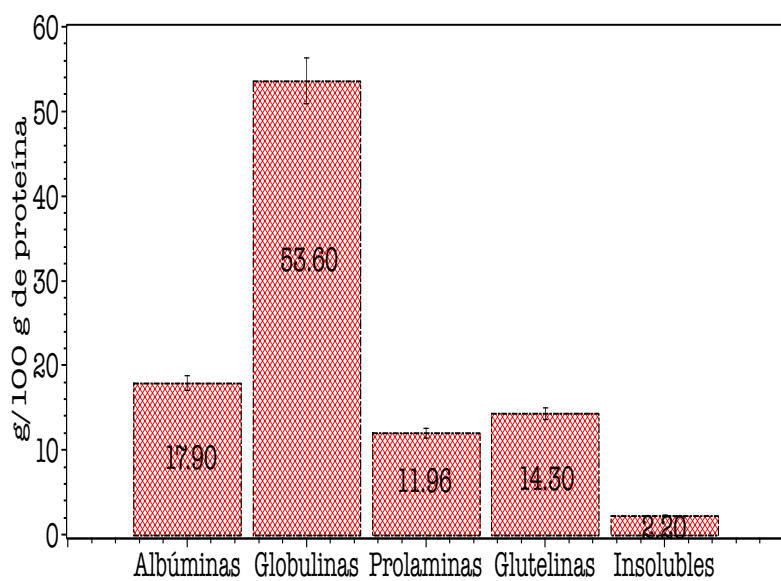
En cuanto a la naturaleza eléctrica de los aminoácidos presentes en las semillas de chía, es posible apreciar que existe un equilibrio entre aquellos con carga positiva y negativa, destacando la arginina y lisina en el primer tipo y el ácido glutámico dentro de los que poseen carga negativa a pH 7. En general, muchas proteínas tienen una mezcla de aminoácidos aniónicos, neutrales y catiónicos a lo largo de la o las cadenas polipeptídicas, lo que determina sus características eléctricas bajo distintas condiciones de pH. Las cualidades eléctricas de una proteína tienen una gran influencia en sus propiedades funcionales en emulsiones; en particular la repulsión electrostática juega un rol crítico en la prevención de la agregación de gotas de aceite recubiertas de proteína. En adición, las interacciones electrostáticas tienen un impacto en la estabilidad de emulsiones frente a la oxidación lipídica ya que las superficies de gotas aniónicas pueden atraer metales de transición catiónicos que catalizan la oxidación de lípidos al interior de las gotas. La distribución de las cargas en la superficie de proteínas también es importante debido a que influyen en la adsorción de otras especies cargadas, por ejemplo, otros biopolímeros cargados pueden adsorberse a las gotas cargadas de manera similar si tienen regiones suficientemente grandes de carga opuesta (McClements & Gumus, 2016).

En consecuencia, los resultados obtenidos proyectan a las semillas de chía como una fuente importante de proteínas, que, en conjunto con su alto contenido de aceite y fibra, la convierten en una alternativa altamente viable en la búsqueda de nuevos materiales dentro de la industria.

b) Fraccionamiento y caracterización de proteínas

1.- Aislamiento y cuantificación

La *figura 7* presenta las proporciones obtenidas para cada tipo de proteína aislada a partir de la harina desgrasada de las semillas de chía. Como se aprecia, las globulinas (solubles en NaCl 1 M) constituyen más del 50% del total, mientras que las prolaminas (solubles en etanol al 70%) conforman la menor fracción dentro del *bulk* proteico. Al igual que en la sección anterior, se detectó que la relación entre las condiciones de extracción (temperatura, pH, tiempo, velocidad de centrifugado, etc.) influyen drásticamente en los resultados conseguidos; no obstante, estos son consistentes con los reportados previamente por Timilsena *et al.*, (2016b) y Sandoval-Oliveros & Paredes-López (2013). El procedimiento que se utilice para obtener cada fracción de proteína puede afectar las propiedades de estas, por ejemplo, la habilidad para desnaturalizarse, la formación de complejos, degradación de aminoácidos, participación en reacciones de Maillard y reducción en la digestibilidad de aminoácidos, lo cual directa o indirectamente influirá en sus características funcionales.



^aLos valores representan la media \pm SD de tres determinaciones

Figura 7. Proporción de las fracciones proteicas presentes en semillas de chíá

En un estudio reciente (Coelho & Salas-Mellado, 2018) se analizaron las repercusiones que tiene el método de extracción en el rendimiento y propiedades funcionales de cada tipo de proteína de chíá. Contrastando un método similar al empleado en el presente trabajo (añadiendo un paso previo de solubilización alcalina y posterior precipitación isoeléctrica) versus un fraccionado en seco, se constató que el tratamiento químico fue el más efectivo al incrementar la cantidad de proteínas extraídas, teniendo a las glutelinas (solubles en NaOH 0.2%) como la principal fracción colectada con rendimientos superiores al 60%. Por su parte, Timilsena *et al.*, (2016b)

siguieron la misma metodología de extracción descrita aquí, pero utilizando soluciones distintas para cada extracción, lo cual culminó en una variación significativa de los rendimientos para cada una de las fracciones. Con base en ello, se puede inferir que, independientemente del historial de las semillas previo a la extracción, es posible optimizar las condiciones de proceso a fin de maximizar el rendimiento de una fracción determinada según los objetivos de la investigación.

Las implicaciones de los resultados conseguidos en el presente análisis son muy valiosas, ya que permiten vislumbrar aplicaciones potenciales para cada fracción, conociendo de antemano las condiciones bajo las cuales fueron obtenidas. Por ejemplo, dado que las globulinas son capaces de solubilizarse en soluciones salinas, es probable que este tipo de proteínas sean poco susceptibles a condiciones donde la fuerza iónica sea considerable, además de que, quizás sus propiedades funcionales, y en específico las superficiales, encuentren un amplio campo de aplicación en productos industriales en donde es común encontrar una fase acuosa con presencia de sales, particularmente NaCl; una situación similar podría darse con la fracción albúminas debido a su relación con los sistemas acuosos.

En este mismo orden de ideas, las prolaminas, a pesar de ser la fracción con el menor rendimiento, pueden ser capaces de aportar propiedades viscoelásticas interesantes, como se ha verificado en los productos de panificación; las elevadas cantidades de prolina y ácido glutámico de igual manera son aspectos sobresalientes. La clasificación actual para este grupo de proteínas se basa en las relaciones estructurales, lo que permite tener diferentes grupos y subgrupos; así mismo, la composición de aminoácidos y secuencias específicas son

muy variables, por tal motivo ha sido difícil definir propiedades específicas para todas las proteínas pertenecientes a este grupo.

Por su parte, las glutelinas son un tipo de proteínas más complejas. Una de sus principales ventajas es que no solo son capaces de solubilizarse en medios alcalinos, sino también en ambientes ácidos (pH 2), por lo que se puede esperar un adecuado desempeño en formulaciones con pH muy bajo, como bebidas, aderezos, etc. Además, en conjunto con las prolaminas, aportan propiedades reológicas interesantes como viscosidad y elasticidad.

Determinación de pesos moleculares

Para cada una de las 4 fracciones de proteínas colectadas, el peso molecular absoluto se calculó mediante el uso de dispersión estática de luz. Esta técnica permite hacer estimaciones mucho más rápidas comparada con algunas de las metodologías tradicionalmente empleadas, como la cromatografía de filtración en gel y la electroforesis en gel de poliacrilamida, además de que la preparación de las muestras es económica y estas no se destruyen durante la corrida. A la fecha, no existen reportes de la utilización de esta técnica en la caracterización de proteínas de chíá, no obstante, se ha ensayado este procedimiento en la caracterización de formulaciones farmacéuticas, principalmente anticuerpos.

La *figura 8* muestra las curvas obtenidas en las mediciones, la línea punteada representa el ajuste lineal para cada fracción, mientras que la *tabla 3* resume los valores obtenidos para estas.

Es posible apreciar que existe una diferencia notable entre cada muestra, siendo las albúminas la fracción con el mayor peso molecular (954 kDa), mientras que las globulinas presentan el peso molecular más pequeño, con 62.1 kDa; por su parte, las prolaminas y glutelinas exhiben valores intermedios entre las anteriores, con

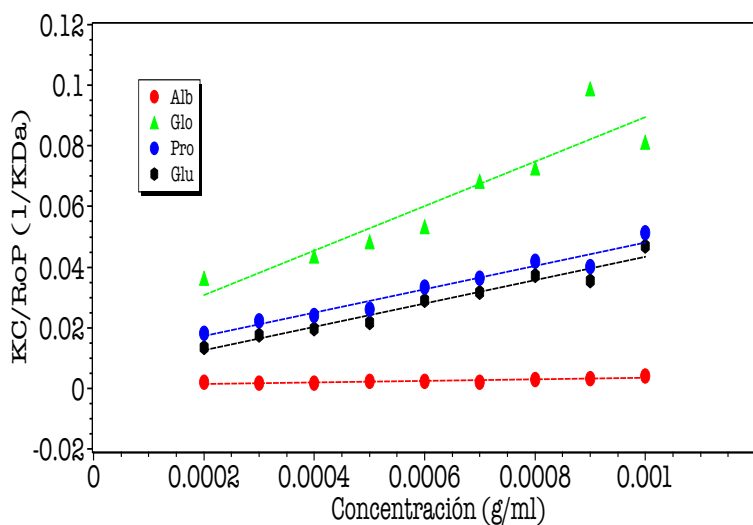


Figura 8. Ajuste de curvas para la determinación de pesos moleculares de las fracciones proteicas de semillas de chíá.

106.1 y 207.2 kDa, respectivamente. En estudios previos se han reportado resultados considerablemente distintos respecto a los hallados en nuestro laboratorio, todos ellos utilizando electroforesis (SDS-PAGE) para el análisis. Bushway *et al.* (1984) realizaron una de las primeras caracterizaciones del peso molecular de proteínas de semillas de chíá, sus resultados indicaron la presencia de 10 fracciones, donde aquellas que predominaban tenían pesos moleculares entre 14.8, 22.6 y 30.8 kDa. Utilizando la misma técnica, Timilsena *et al.*,

(2016b) identificaron 7 bandas principales entre 10-75 kDa en condiciones nativas, mientras que en un ambiente reductor, bandas más prominentes fueron visibles entre 25-37 kDa.

Por otra parte, Sandoval-Oliveros & Paredes-López (2013) fraccionaron el total de proteínas de las semillas siguiendo el mismo criterio descrito en el presente trabajo, para posteriormente analizar la distribución de pesos moleculares de cada porción también por electroforesis. Estos autores describen que tanto las albúminas como las globulinas mostraron un gran número de bandas en un amplio rango de pesos moleculares, sin embargo, en las albúminas no se observaron bandas con alta intensidad, mientras que las globulinas presentaron 7 bandas entre 18 y 35 kDa; con las prolaminas solo se obtuvo bandas visibles hasta que se precipitó la fracción con ácido tricloroacético, al final fue posible apreciar 3 bandas con pesos moleculares entre 25 y 33 kDa. Por último, con las glutelinas se apreciaron 4 bandas con pesos moleculares entre 20 y 30 kDa, muy parecidas a las globulinas.

Los valores de peso molecular significativamente menores obtenidos en estos trabajos, aunado al gran número de fracciones halladas es un indicador claro de que el procedimiento utilizado permitió visualizar distintos subtipos de proteínas dentro de cada una de las fracciones principales (albúminas, globulinas, prolaminas y glutelinas), y no solo eso, es muy probable que bajo condiciones reductoras haya sido posible elucidar incluso algunas subunidades de cada subtipo de proteína presentes en la muestra. Sin embargo, dado que en algunas de las investigaciones se trabajó directamente con soluciones del grueso de proteínas sin llevar a cabo un fraccionamiento previo como en nuestro caso, la identificación de los componentes se vuelve muy complicada; aunado a esto, la calidad de resolución en las bandas fue bastante pobre, hecho que puede conducir a confusiones durante el proceso de identificación.

A pesar de que la técnica SDS-PAGE es bastante sensible para la determinación de pequeñas cantidades de proteína y sus pesos moleculares, el procedimiento es complicado, indirecto y consume demasiado tiempo (Ye, 2006). En contraste, la metodología propuesta en el presente trabajo permitió llevar a cabo mediciones más rápidas sin sacrificar el rigor del análisis al separar previamente el grueso de proteínas en función de su solubilidad, lo que facilitó la posterior determinación. Para nuestro caso, los elevados pesos moleculares obtenidos respecto a los trabajos mencionados anteriormente sugieren que cada muestra analizada corresponde a un complejo dentro del cual existen diversos subtipos de proteínas, generalmente estos últimos han sido clasificados en función del coeficiente de sedimentación en gel de sacarosa. Los subtipos de globulinas vegetales (la principal fracción hallada en las semillas de chíá) son los que se han clasificado con mayor detalle, principalmente a partir de la soya, con 2 tipos principales: las globulinas 7S, con pesos moleculares entre 150 y 190 kDa, de constitución trimérica y cuyas subunidades no pueden formar enlaces disulfuro; y las globulinas 11S, oligómeros hexaméricos de entre 50 y 60 kDa cuyas subunidades interactúan por enlaces no covalentes.

Dado que el peso molecular de las proteínas y en general de cualquier polímero es un indicador directo del desempeño y actividad del producto, la comprensión de este y otros parámetros moleculares es clave para controlar el desempeño del producto en una amplia gama de áreas de aplicación.

En la formación y estabilización de espumas y emulsiones, el peso molecular del emulsificante o tensoactivo utilizado juega un papel crucial. En las primeras etapas de la formación de estos sistemas, las proteínas deben situarse rápidamente en la interfase para disminuir la tensión interfacial y así lograr gotas pequeñas de la fase dispersa; dado que este fenómeno es gobernado principalmente por un proceso de difusión, es muy probable que aquellos agentes superficiales con el menor peso molecular se desplieguen a mayor velocidad y sean más efectivos. No obstante, existe evidencia que sugiere que probablemente existen parámetros de mayor relevancia vinculados a esta etapa, ya que algunas moléculas con pesos moleculares grandes fueron capaces de disminuir de manera más efectiva la tensión interfacial en un estudio reciente (Cuevas *et al.*, 2016).

Por otro lado, el espesor de la capa interfacial tenderá a incrementarse conforme se incremente el peso molecular de la proteína, pero también dependerá de su conformación (globular o flexible; las proteínas de reserva de fuentes vegetales generalmente corresponden a estructuras de tipo globular). Así, las proteínas con alto peso molecular y estructuras extendidas a menudo son mejores previniendo la agregación mediante la generación de fuertes repulsiones estéricas. Sin embargo, las proteínas globulares tienden a exponer grupos no polares cuando son sometidas a temperaturas por arriba del punto de desnaturalización, lo que puede incrementar la hidrofobicidad superficial de las gotas; como resultado, la atracción hidrofóbica entre las mismas se vuelve más fuerte y puede conducir a la agregación si ninguna fuerza repulsiva (como la electrostática, véase la sección "potencial zeta") operante en el sistema es lo suficientemente fuerte para contrarrestar el efecto.

Tabla 3. Resumen de valores obtenidos en el ajuste lineal para la determinación de pesos moleculares.

Fracción	Valores de ajuste			
	Mw (kDa)	A ₂ (ml-mol/g ²)	r ²	Ec. de la recta
Albúminas	954 ± 224	0.00117 ± 2.47e-4	0.761	y = 2.332x + 0.001049
Globulinas	62.1 ± 21.3	0.0367 ± 0.00613	0.856	y = 73.36x + 0.01611
Prolaminas	106.1 ± 36.2	0.0258 ± 0.00459	0.957	y = 38.716x + 0.009425
Glutelinas	207.2 ± 61.1	0.0194 ± 0.00153	0.958	y = 38.72x + 0.004826

Análisis de hidrofobicidad

Las figuras 9-12 presentan los perfiles de hidrofobicidad que se obtuvieron al analizar las 4 muestras de proteínas mediante cromatografía de interacción hidrofóbica. Esta técnica permitió separar a las proteínas con base en su hidrofobicidad superficial mediante la adsorción de estas a la superficie débilmente hidrofóbica de la resina en una solución intensamente salina, y su posterior elución mediante un gradiente negativo de NaCl. Las curvas en color negro representan la absorbancia medida por el equipo a 280 nm, mientras que aquellas en color verde representan la conductividad de la fase móvil al salir de la columna. Para cada muestra se detectaron 3 fracciones que eluyeron a distintos tiempos; en el caso de albúminas y globulinas se puede notar que las 2 principales abandonaron la columna muy al inicio de la corrida, donde la mínima

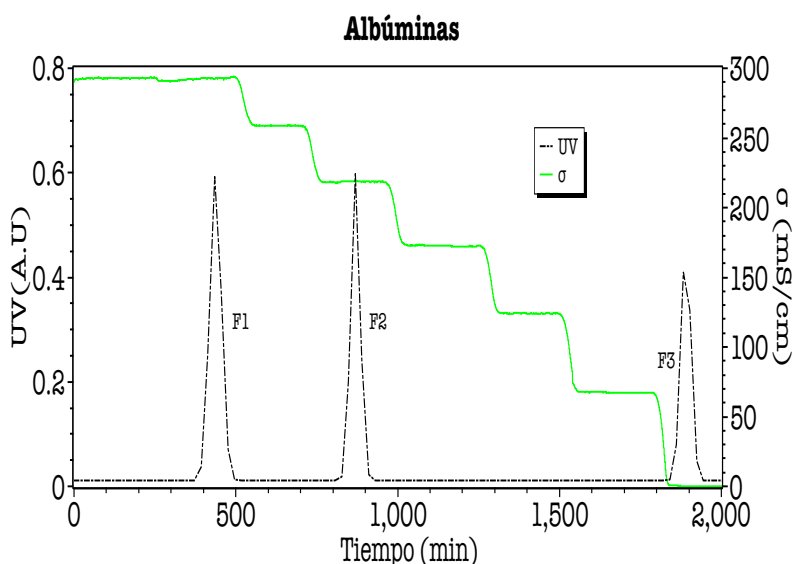


Figura 9. Perfil del fraccionamiento de albúminas de chíca por cromatografía de interacción hidrofóbica

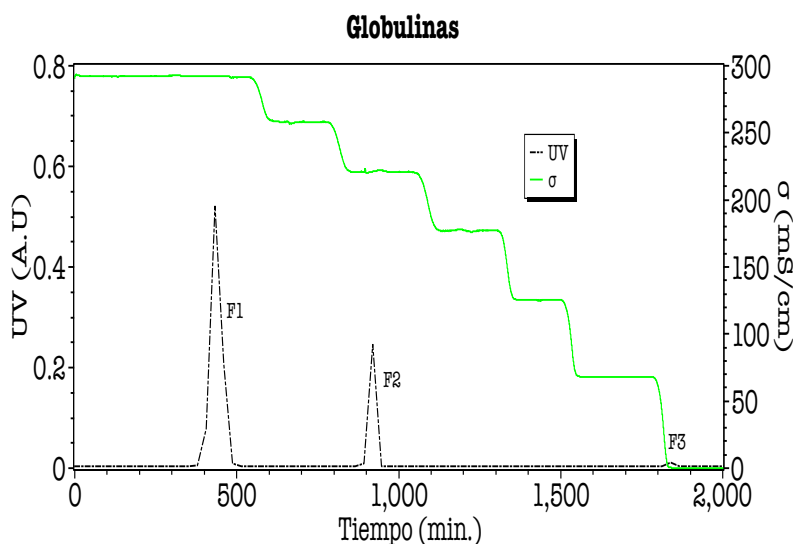


Figura 10. Perfil del fraccionamiento de globulinas de chíca por cromatografía de interacción hidrofóbica

concentración salina de la fase móvil fue 2 M.

Estas fracciones son altamente hidrofílicas, dado que no fueron capaces de establecer interacciones de carácter hidrofóbico con la resina y, en consecuencia, evacuaron la columna rápidamente; para los 2 tipos de proteínas, estas fracciones representan más del 70% del total de la muestra (ver tabla 5). A su vez, tanto en las albúminas como en las globulinas se hizo visible una tercer fracción, la cual eluyó al final del proceso donde la fase móvil consistió exclusivamente de agua, lo que indica que estas porciones corresponden a moléculas altamente hidrofóbicas. Para el caso de las albúminas dicha fracción fue más notable, representando 26.6% del total de la muestra.

En el caso de prolaminas y glutelinas se aprecia un comportamiento distinto. Al igual que en la situación anterior, 3 fracciones fueron identificadas para cada muestra, sin embargo, la naturaleza de estas fue ligeramente más hidrofóbica comparada con las anteriores. El grupo principal eluyó con una fase móvil de concentración 2 M en las prolaminas, mientras

que en el caso de glutelinas esta consistió de NaCl 1.5 M, representando el conjunto más hidrofóbico detectado en todo el experimento; estas fracciones representan más del 80% de la muestra analizada. También, 2 porciones de naturaleza altamente hidrofílica fueron detectadas en ambas muestras, mismas que eluyeron recién iniciada la corrida, donde la fase móvil consistió de NaCl 3 M.

Con base en estos hechos, es claro que existe una clara conexión entre el tipo de solvente utilizado en la extracción y el grado de hidrofobicidad asociado a cada tipo de proteínas. Así mismo, presentamos evidencias que confirman los trabajos previos llevados a cabo por Sandoval-Oliveros & Paredes-López (2013), así como por Olivos-Lugo *et al.*,(2009) en donde se reporta una distribución homogénea a nivel global entre

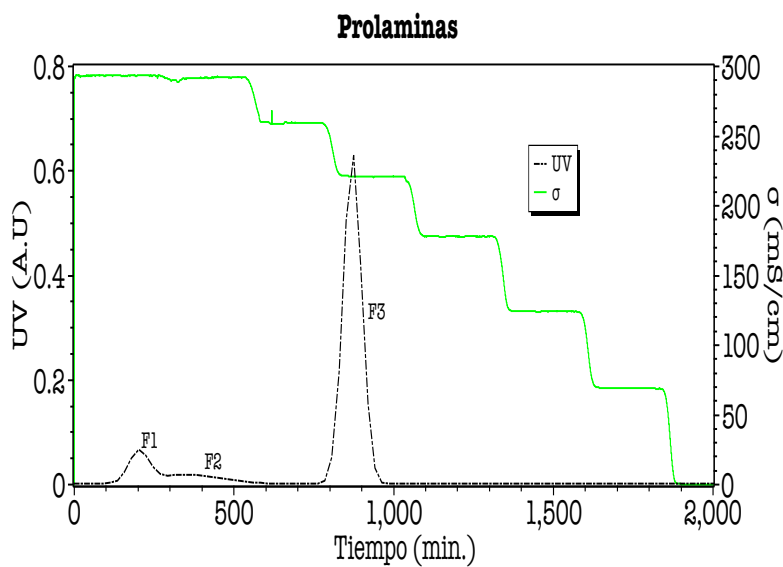


Figura 11. Perfil del fraccionamiento de prolaminas de chíca por cromatografía de interacción hidrofóbica.

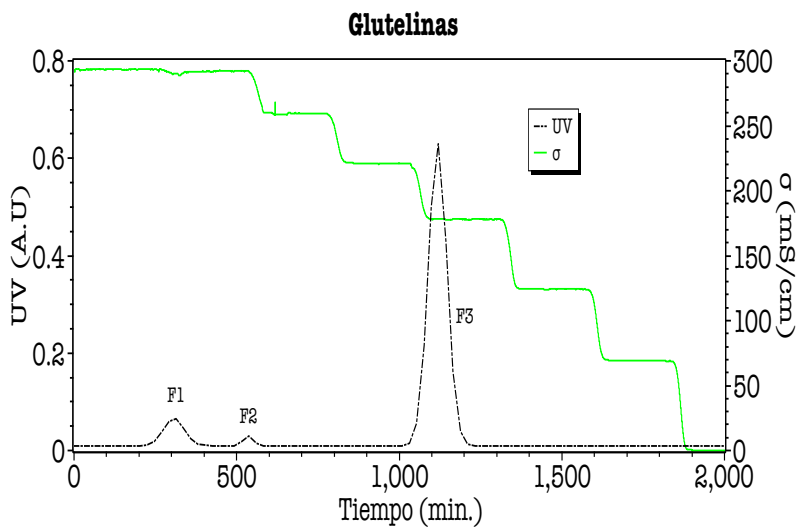


Figura 12. Perfil del fraccionamiento de glutelinas de chíca por cromatografía de interacción hidrofóbica.

aminoácidos de carácter polar y no polar presentes en las proteínas de chíca. Así, el grado de hidrofobicidad de las principales fracciones proteicas analizadas quedó de la siguiente manera: albúminas < globulinas < prolaminas < glutelinas.

A pesar de que la técnica utilizada en el presente trabajo es una de las de mayor uso, existen otros procedimientos que han encontrado amplia aceptación para el análisis de hidrofobicidad en diversos materiales. Timilsena *et al.*, (2016b) analizaron la hidrofobicidad superficial de proteínas de chíca a través del método ANS (ácido 8-anilino-1-naftaleno sulfónico); este forma un conjugado con grupos hidrofóbicos de las proteínas expuestos en la superficie, con el consiguiente aumento en la intensidad de fluorescencia del ANS, el desplazamiento azul de los máximos de fluorescencia proporciona la medida de la superficie hidrofobicidad superficial. Sus resultados indican que estas moléculas presentan una mayor exposición de grupos hidrofóbicos a pH 3, y decrecen significativamente conforme se hacía más alcalino el medio.

Tabla 4. Fracciones de proteínas de chíca obtenidas mediante el uso de cromatografía de interacción hidrofóbica.

Proteínas	Fracción	Datos de ajuste		
		Área (%)	R ²	Iteraciones
Albúminas	1	40.704	0.938	17
	2	32.682		
	3	26.612		
Globulinas	1	69.441	0.922	9
	2	29.996		
	3	1.561		
Prolaminas	1	8.315	0.993	29
	2	8.565		
	3	83.119		
Glutelinas	1	9.035	0.986	18
	2	1.618		
	3	89.345		

Previamente se describió cómo influye el grado de hidrofobicidad de las proteínas en la estabilización de espumas y emulsiones (ver sección *Caracterización fisicoquímica de semillas*), solo basta añadir que este fenómeno interviene directamente en las interacciones intermoleculares proteína-proteína, proteína lípido y proteína-aire, y es importante dado que en los sistemas dispersos la adsorción inicial es afectada directamente por este tipo de interacciones. A pesar de que los requerimientos moleculares de proteínas en la estabilización de espumas y emulsiones es muy similar, ciertas variaciones pueden observarse en ambos sistemas debido, principalmente, al hecho de que la tensión interfacial aire-agua es mucho más grande comparada con una interfase agua-aceite. En este sentido, la capacidad

emulsificante de proteínas muestra una correlación positiva con su hidrofobicidad superficial, pero tal correlación no se observa con su capacidad espumante; más bien, esta última exhibe una correlación positiva con la hidrofobicidad promedio de proteínas. Mientras que la hidrofobicidad superficial se refiere al cambio en energía libre por la unión de elementos no polares a parches hidrofóbicos o cavidades en la superficie de las proteínas, la hidrofobicidad promedio se refiere al cambio promedio de energía libre para la transferencia de cadenas laterales de aminoácidos desde un disolvente no polar al agua. Parece ser que debido a que la energía libre interfacial en un sistema agua-aceite es menor que en uno de tipo aire-agua, las proteínas pueden desnaturalizarse solo de forma limitada en el primero y, por lo tanto, la hidrofobicidad de la superficie se vuelve crucial para el anclaje de proteínas en la interfaz. Sin embargo, en una interfaz agua-aire, de alta energía libre, las proteínas se desnaturalizan en mayor medida, exponiendo residuos hidrofóbicos enterrados a la interfaz. Por lo tanto, aunque los parches hidrofóbicos superficiales facilitan el anclaje inicial de la proteína, las propiedades de la proteína desplegada en lugar de la proteína nativa dictan el comportamiento de la proteína en la interfaz aire-agua. Esta parece ser la razón de la correlación positiva entre la hidrofobicidad promedio y la capacidad de formación de espuma (McClements & Gumus, 2016).

Por lo tanto, a partir de los resultados obtenidos, se puede teorizar que las muestras con mayor nivel de hidrofobicidad superficial (prolaminas y glutelinas) probablemente tengan un mejor desempeño en la

estabilización de emulsiones debido a su rápido anclaje en la interfaz, mientras que aquellas con tendencia hidrofílica (albúminas y globulinas) quizás se desempeñen de mejor manera como estabilizantes de espumas.

Estructura secundaria

El análisis de la estructura secundaria mediante espectroscopia FT-IR, específicamente dentro de la región amida I, reveló que los arreglos tipo α -hélices representan la mayor proporción en todas las fracciones analizadas; en conjunto con las distribuciones de patrón aleatorio (random coil) constituyen más del 50% para las 4 fracciones. Por su parte, las estructuras de tipo hoja β (intermoleculares e intramoleculares) no

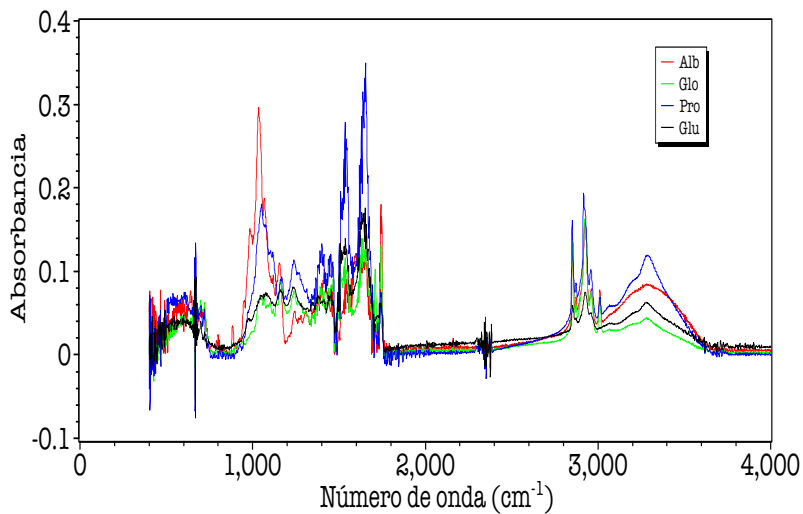


Figura 13. Espectros FT-IR de proteínas presentes en las semillas de chía.

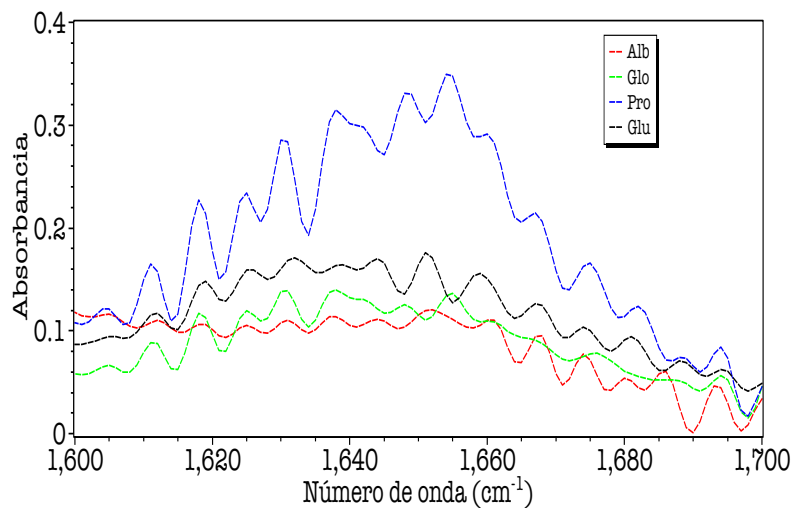


Figura 14. Perfiles de deconvolución FT-IR en la región amida I para los 4 tipos de proteínas presentes en las semillas de chía.

superan el 20% del total (ver ilustración 15).

El estudio del tipo de disposiciones secundarias presentes en las proteínas tiene importantes implicaciones, no solo dentro de la estabilización de sistemas dispersos, si no en diversas áreas del sector biotecnológico. En este sentido, cabe destacar que los aspectos estructurales que pueden explicar la estabilidad de proteínas de chía en el procesamiento térmico, digestión gastrointestinal, así como en el desplegamiento de las mismas dentro de una interfase no han sido investigados.

Para entender el impacto del tipo de estructura secundaria presente en las proteínas dentro de la estabilización de espumas y emulsiones, es importante mencionar que tradicionalmente se ha asociado la presencia de α -hélices, random coil y giros β con una alta estabilidad de estos productos. De acuerdo con Damodaran (2008), este tipo de arreglos constituyen estructuras altamente flexibles que son capaces de desplegarse de mejor manera en las interfaces comparadas con las disposiciones tipo hoja β con estructura más rígida, tal y como se ha reportado en trabajos

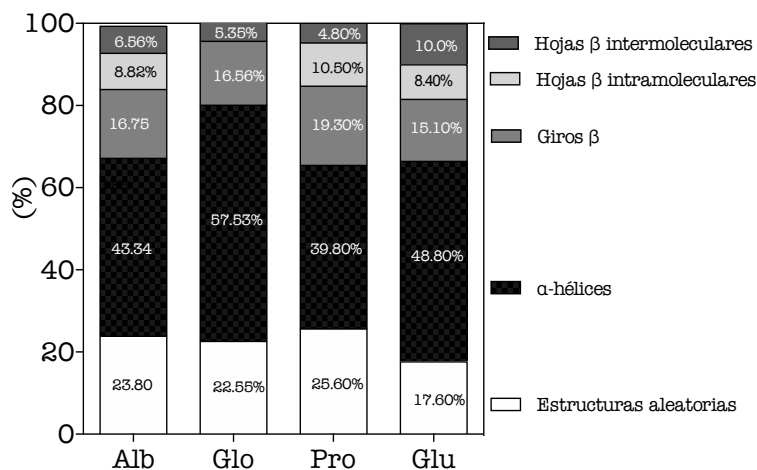


Figura 15. Componentes estructurales secundarios para los 4 tipos de proteínas presentes en las semillas de chíá.

previos para otras fuentes de proteínas vegetales con altas proporciones de este mismo tipo de configuraciones (Jiang *et al.*, 2015).

En estudios previos (Damodaran, 2008), se ha descrito que la propiedad individual más importante que afecta la actividad superficial de proteínas es su flexibilidad molecular, es decir, la capacidad innata de una proteína para experimentar un cambio de conformación rápido cuando se transfiere de un ambiente a otro. Investigaciones sobre varias proteínas no relacionadas han demostrado que la actividad

superficial dinámica de las proteínas, es decir, el cambio instantáneo en la presión superficial por miligramo de proteína durante la adsorción desde la fase masiva a la interfaz aire-agua, se correlaciona positiva y linealmente con la compresibilidad adiabática (es decir, la flexibilidad molecular) de las proteínas (Razumovsky y Damodaran, 1999). La flexibilidad molecular es una manifestación de la suma de todas las interacciones positivas y negativas, así como de las fuerzas estéricas dentro de una molécula de proteína, y representa la susceptibilidad de la conformación de una proteína a un entorno alterado. El cambio rápido de conformación en una interfaz es esencial para que la proteína reoriente sus residuos hidrófobos e hidrofílicos hacia fases oleosas, gaseosas y acuosas, y también para maximizar la exposición y la partición de estos residuos entre las 2 fases. Una proteína altamente rígida no puede disminuir la tensión interfacial incluso en una condición de monocapa saturada porque dicha proteína continuará permaneciendo en el estado gaseoso; una transición desde una fase gaseosa superficial a una fase expandida líquida a través de las interacciones proteína-proteína que demandan el despliegue de esas son esenciales para la reducción de la tensión interfacial.

No obstante, parece ser que la formación de estructuras de tipo hoja β antiparalelas, específicamente de tipo intermolecular, son importantes posterior a la adsorción de las proteínas globulares en una interfase aceite-agua. Lefèvre & Subirade (2003) monitorearon los cambios conformacionales de algunas proteínas después de formada la interfase mediante espectroscopia FT-IR y microscopía electrónica, sus resultados revelaron que este tipo de disposiciones se debieron a la autoagregación de proteínas, lo que condujo a la formación de membranas continuas y homogéneas que recubrieron los glóbulos de aceite haciendo más estable el sistema.

A manera de conclusión, solo resta mencionar que es importante conocer no solo el tipo de disposiciones nativas presentes en una proteína, sino que, además, el monitoreo de los cambios conformacionales posterior al proceso de adsorción permitirá obtener una mejor visión del papel de cada tipo de estructura secundaria en particular. Así mismo, en la sección anterior se mencionó que para la estabilización de emulsiones por proteínas, la hidrofobicidad superficial jugaba un papel clave, pero para el caso de espumas se volvía apremiante la necesidad por conocer su disposición configuracional. Pues bien, con el presente análisis hemos proporcionado evidencia de que los 4 tipos de proteínas presentes en las semillas de chía poseen estructuras altamente flexibles, lo cual es un importante parámetro que sugiere un alto potencial para la estabilización de emulsiones y espumas.

Caracterización termodinámica

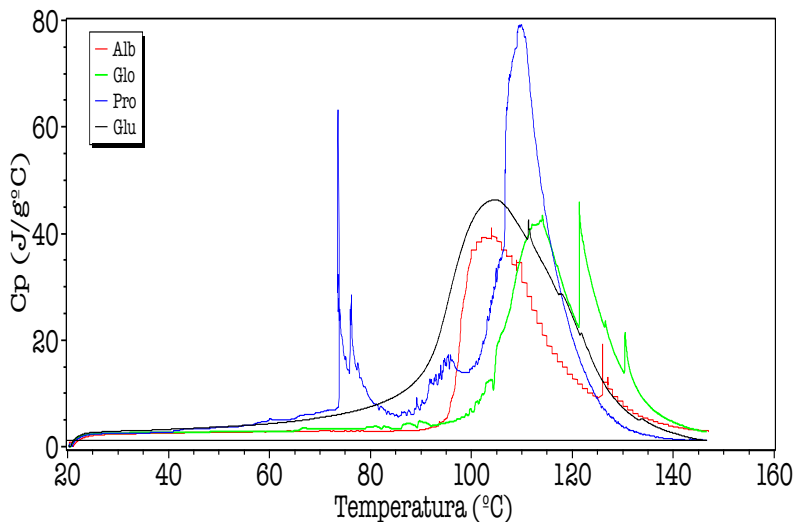


Figura 16. Termogramas DSC de los distintos tipos de proteínas aisladas de las semillas de chía

La ilustración 16 presenta los termogramas crudos de cada fracción obtenidos mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC). Esta es una técnica primaria para la medición de las propiedades térmicas de materiales que permite establecer una conexión entre la temperatura y ciertas propiedades físicas de las sustancias; es el único método para la determinación directa de la entalpía (ΔH) asociada con el proceso de interés. Como se aprecia, en la mayoría de las muestras se obtuvo más de una señal, sin embargo, estas no se encontraban del todo definidas, razón por la

cual fue necesario realizar un tratamiento posterior de los datos. Las figuras 17-20 representan los resultados que se consiguieron al analizar los anteriores gráficos mediante un ajuste de múltiples picos Gaussianos. De acuerdo con este estudio, y de forma similar al HIC, se observa que para cada una de las muestras (excepto glutelinas) fue posible identificar diversos subtipos de proteínas, con temperaturas de desnaturalización (T_m) distribuidas dentro de un rango considerable, y donde una fracción de prolaminas fue la que mostró la menor temperatura de desnaturalización (75.5 °C), mientras que, en el caso contrario, un tipo de globulinas fue la más estable, con una temperatura de desnaturalización de 122.9 °C (ver tabla 5). Respecto a los valores de ΔH asociados con el proceso de desnaturalización, de igual manera estos abarcan un intervalo considerable,

Albúminas

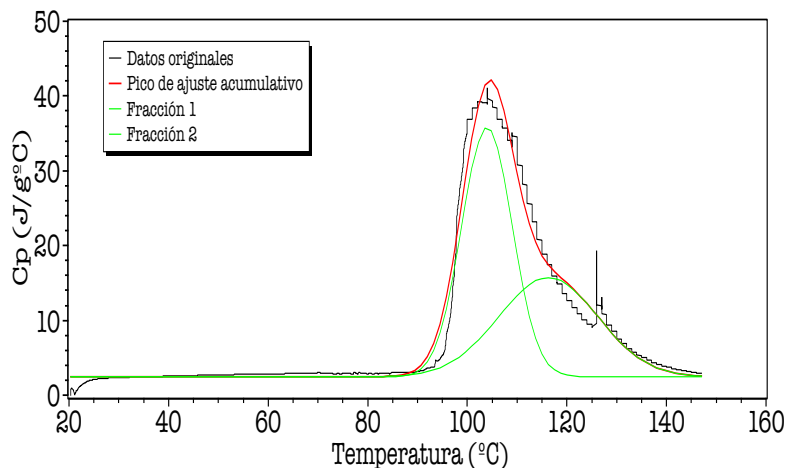


Figura 17. Análisis del termograma perteneciente a la fracción albúminas mediante el ajuste de múltiples picos Gaussianos

Globulinas

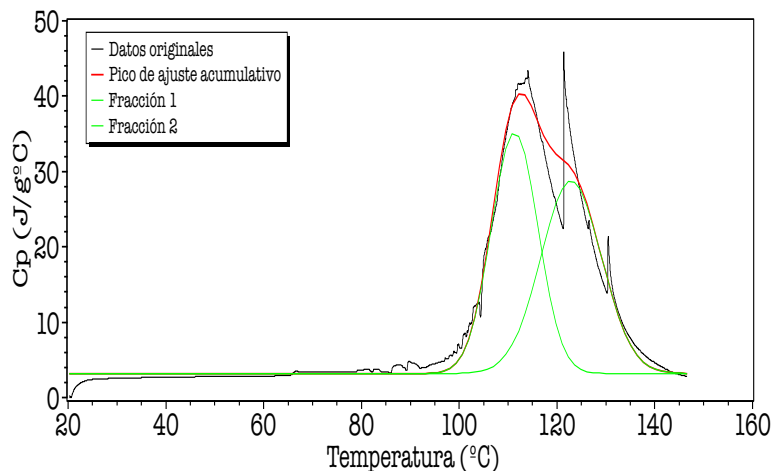


Figura 19. Análisis del termograma perteneciente a la fracción globulinas mediante el ajuste de múltiples picos Gaussianos

Prolaminas

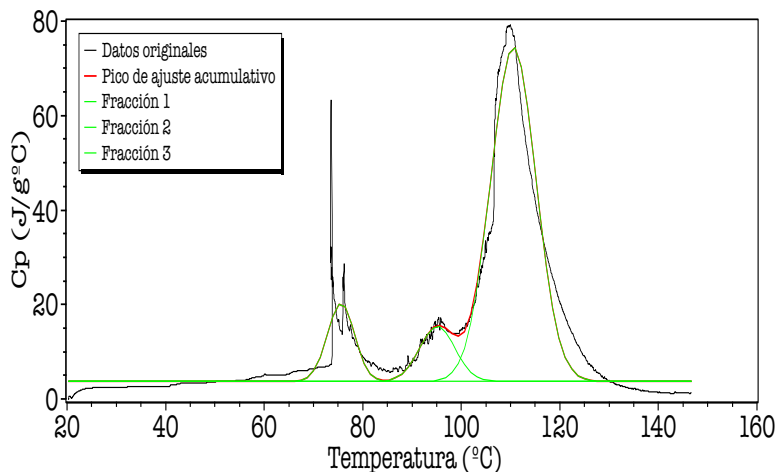


Figura 18. Análisis del termograma perteneciente a la fracción prolaminas mediante el ajuste de múltiples picos Gaussianos

con valores superiores a los 100 J/g y un máximo de 1454.3 J/g para las glutelinas. Para todas las muestras se observaron señales endotérmicas, lo cual indica que el proceso de despliegue demanda energía para poder llevarse a cabo. Es posible apreciar también que existe una correlación positiva entre el grado de hidrofobicidad de cada tipo de proteína y el valor de ΔH ; las elevadas entalpías asociadas al proceso sugieren que las interacciones débiles, principalmente fuerzas hidrofóbicas, son muy importantes en la estabilización de este tipo de proteínas. El mecanismo de desnaturalización inducido por la temperatura es altamente complejo; los puentes de hidrogeno, interacciones electrostáticas y fuerzas de van der Waals son de naturaleza entálpica y exotérmica, por lo tanto, se desestabilizan a alta temperatura, pero se estabilizan a baja; en contraste, las interacciones hidrofóbicas son impulsadas por la entropía, así que son endotérmicas y se estabilizan a altas temperaturas, pero se desestabilizan a bajas. Así, el cambio en entalpía es el resultado de la combinación de eventos exotérmicos (tales como la rotura de puentes de hidrógeno) y los procesos endotérmicos, que incluyen la agregación de proteínas y la ruptura de interacciones hidrofóbicas (Olivos-Lugo *et al.*, 2013). En trabajos previos con proteínas de chíá (Sandoval-Oliveros & Paredes-López, 2013; Olivos-Lugo *et al.*, 2010; López *et al.*, 2018) se observaron valores de T_m muy similares a los obtenidos en nuestro laboratorio, no obstante, los datos correspondientes a ΔH son notablemente

menores comparados con los recabados en esta investigación. Es probable que en nuestro caso se haya presentado un fenómeno de agregación entre proteínas como consecuencia de la interacción entre fuerzas atractivas hidrofóbicas y repulsivas electrostáticas, lo que elevó significativamente los valores de T_m y ΔH de las fracciones detectadas; las interacciones proteína-proteína en solución siguen 3 principales vías: separación de fases, interacción sinérgica y agregación, donde las interacciones sinérgicas pueden generar mejores productos con una estructura uniforme comparados con aquellos de cada material por separado. En

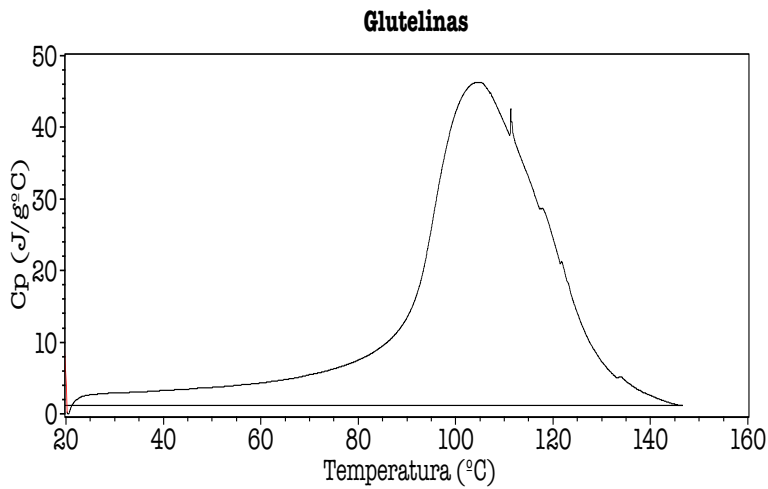


Figura 20. Análisis del termograma perteneciente a la fracción glutelinas mediante el ajuste de múltiples picos Gaussianos

Tabla 5. Rango de temperatura de desnaturalización (ΔT_d), temperatura máxima de desnaturalización (T_d) y entalpía de desnaturalización (ΔH_d) del extracto liofilizado de las fracciones proteicas de semillas de chía

Tipo de proteína	Fracción	ΔT_d (°C)	T_d (°C)	ΔH_d (J/g)
Albúminas	1	90-117	103.959	421.964
	2	92-141	116.258	330.785
Globulinas	1	97-124	111.348	380.152
	2	107-141	122.902	396.815
Prolaminas	1	68-82	75.559	114.736
	2	86-105	95.137	105.206
	3	95-125	110.564	816.547
Glutelinas	1	20.28-146.7	104.6	1454.30

contraste con proteínas en las que la actividad biológica es importante y la agregación tiene consecuencias negativas, en el caso de sistemas dispersos, parece ser que el fenómeno tiene aspectos positivos, además de la ventaja de la alta estabilidad térmica. De acuerdo con Lin *et al.*, (2017), las interacciones entre proteínas en las interfaces agua-aire y agua-aceite pueden mantener la estabilidad de espumas y emulsiones, respectivamente, mientras que las interacciones en solución son esenciales para la formación de geles y películas; así mismo, la utilización de proteínas con diferentes estructuras como emulsificantes es una manera simple de mejorar la estabilidad de emulsiones.

Otra posible causa del fenómeno detectado se deba, quizás, a la eliminación incompleta de moléculas de mucílago presentes en las semillas de chía al inicio del proceso, lo que originó interacciones polisacárido-proteína, creando así estructuras altamente estables. Timilsena *et al.*, (2016c) y de Campo *et al.*, (2017) han reportado valores de T_m alrededor de 236 °C para el mucílago de chía, lo que pudo impulsar la elevación de los valores detectados por el equipo; sin embargo, dado que en el presente experimento se utilizaron temperaturas máximas de 160 °C, fue imposible

detectar señales pertenecientes al mucílago. Esta hipótesis parece tomar fuerza si se observan los valores de peso molecular obtenidos para las 4 fracciones, en especial para las albúminas, en las que se aprecia una desviación significativa respecto a los datos tradicionalmente reportados para este tipo de proteínas, así como en comparación con el resto de las fracciones evaluadas. Tomando en cuenta que esta fracción (albúminas) fue extraída en un ambiente acuoso, y aunado al hecho de la alta hidrofiliicidad del mucílago, parece lógico que una pequeña porción de esta última molécula se encuentre mezclada con las proteínas.

En conclusión, a través del análisis termodinámico se comprobó que las proteínas presentes en las semillas de chía poseen elevadas temperaturas de desnaturalización; además, para lograr el desplegamiento de estas es necesario proporcionar una alta cantidad de energía al sistema. Se teorizó acerca de la presencia de aglomerados proteicos e interacciones carbohidratos-proteínas que, aunado a lo anterior, potenciarían la actividad superficial de estas fracciones. Análisis más detallados serán necesarios para confirmar o descartar esta cuestión.

Solubilidad

La solubilidad es una de las propiedades más importantes debido a que repercute directamente en otros atributos funcionales de las proteínas como el color, textura y en las propiedades sensoriales de los productos que las contienen. La capacidad de estabilizar sistemas dispersos no es ajena a esta situación, ya que generalmente es un prerrequisito; las proteínas menos solubles o altamente hidrofóbicas pueden precipitar en la interfase y por lo tanto causar inestabilidad en espumas y emulsiones (Damodarn, 2005); al mismo

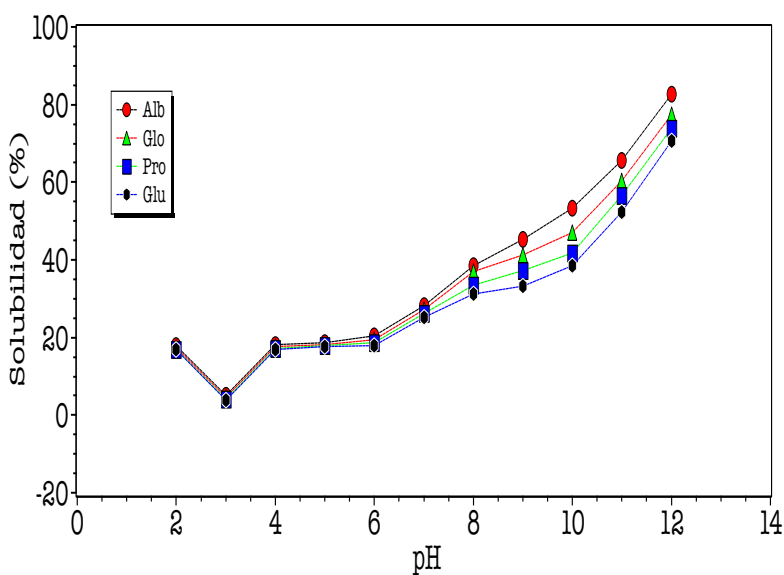


Figura 21. Curvas de solubilidad como función del pH para las 4 fracciones de proteínas de chía.

tiempo, el aumento de las concentraciones de proteína soluble puede conducir a una mejor formación de las gotas en la fase dispersa de emulsiones y añadir estabilidad contra el cremado (Hailing & Walstra, 1981), de aquí que el correcto desempeño de estas moléculas está íntimamente ligado a este parámetro.

Previamente se ha descrito ya que la solubilidad de proteínas depende de la composición, peso molecular y características superficiales de los aminoácidos que las conforman, así como de factores ambientales tales como el pH, temperatura y fuerza iónica (Timilsena *et al.*, 2016b)

En el presente trabajo se analizó el papel del pH en la solubilidad de fracciones proteicas de semillas de chíá. Se comprobó que estas moléculas presentan perfiles de solubilidad muy similares entre sí, siguiendo modelos típicamente reportados para proteínas de fuentes vegetales (Ge *et al.*, 2000; Aluko & Monu, 2003; Liang & Tang, 2013). En ambientes ácidos, las 4 muestras exhibieron valores de solubilidad semejantes, alcanzando un valor mínimo alrededor de pH 3, debido, quizás, a la cercanía con el punto isoeléctrico, provocando que se redujeran las interacciones proteína-agua y se potencializaran las de tipo proteína-proteína; así mismo, conforme el medio se hizo más alcalino, las diferencias de solubilidad se hicieron más visibles, logrando valores máximos cercanos al 80%. El comportamiento de todas las fracciones mostró una correlación positiva con el grado de hidrofobicidad superficial, mismo que se hizo más notorio alrededor de pH 6 en adelante; así, la fracción albúminas fue la más soluble a pH 12, mientras que las glutelinas resultaron ser las menos solubles.

En estudios previos, las proteínas de chíá mostraron perfiles de solubilidad muy similares a los reportados en este trabajo (Timilsena *et al.*, 2016b; Vásquez-Ovando *et al.*, 2013). Complementariamente, Timilsena *et al.*, (2016b) monitorearon la influencia de la temperatura y la fuerza iónica en la solubilidad de estas proteínas. Sus resultados indican que la presencia de NaCl 1M en el medio puede potencializar el grado de solubilidad, particularmente de las globulinas (solubles en NaCl 1 M); sin embargo, si la concentración de sal es mayor a este valor, la solubilidad puede disminuir drásticamente, muy probablemente debido al efecto “*salting out*”. Respecto a la temperatura, se pudo observar que en todos los casos los valores de solubilidad se incrementan conforme aumenta la temperatura, particularmente hasta los 70 °C, después de lo cual permanece constante, esto indica que cuando la temperatura aumenta por debajo del punto de desnaturalización, la interacción proteína-agua se incrementa sin inducir el despliegue irreversible de la proteína. Esta hidratación mejorada a temperaturas elevadas resulta en una mayor solubilidad.

A manera de conclusión, se puede decir que los patrones de solubilidad hallados en este trabajo son aceptables, considerando que solo el 17.9% de las proteínas son hidrosolubles (albúminas). Así mismo, es importante apuntar que la funcionalidad de estas moléculas podría estar restringida a un intervalo de pH.

Capacidad de retención de agua y aceite

La capacidad de retención de agua (WAC) se define como la cantidad de agua retenida por las proteínas hidratadas después de que se ha aplicado una fuerza externa, mientras que la capacidad de retención de aceite (WOC) es la unión de moléculas lipídicas por medio de las cadenas proteicas laterales no polares (Olivos-Lugo *et al.*, 2010). Para las 4 fracciones se han obtenido valores de retención de agua (WAC) y aceite (WOC) muy similares a los reportados previamente para proteínas de chíá y ligeramente superiores cuando se

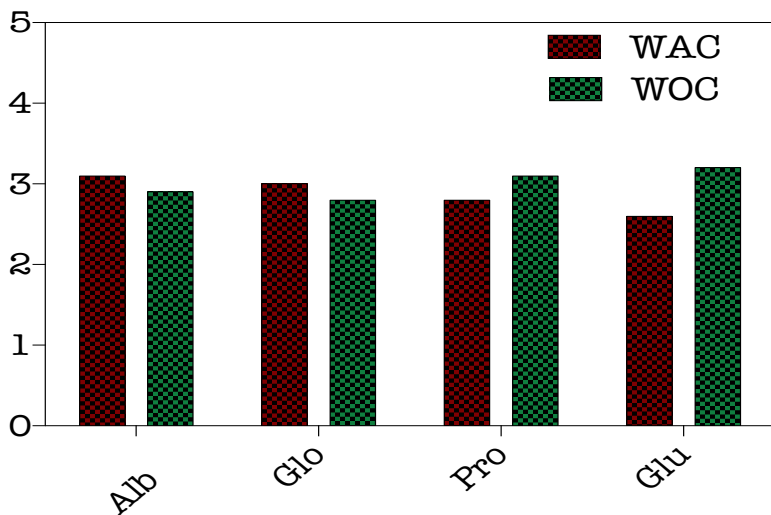


Figura 22. Capacidad de retención de agua (WAC) y aceite (WOC) para fracciones proteicas de semillas de chíca.

comparan con otras fuentes vegetales, como el frijol (Ragab *et al.*, 2004). La fracción albúminas mostró el mejor desempeño para atrapar agua de acuerdo con el test empleado; por el contrario, la fracción glutelinas es la que mejores resultados mostró cuando se emplea aceite de canola. Este hecho está íntimamente al grado de hidrofobicidad superficial de cada fracción, manteniendo así una correlación positiva con este parámetro; también, se ha descrito que la conformación molecular juega un papel importante en esta cuestión. Se sabe que las

moléculas de agua se unen a diferentes grupos en las proteínas, como los grupos cargados mediante interacciones dipolo-dipolo, así mismo, son capaces de anclarse al esqueleto del enlace peptídico, a los grupos amida de *Asn* y *Gln*, y al grupo OH de los residuos *Ser*, *Thr* y *Tyr* por interacciones dipolo-dipolo. Para el caso de la unión a los residuos no polares es posible que se genere una interacción dipolo-dipolo, o bien, una “hidratación hidrofóbica”. Los factores ambientales como el pH, fuerza iónica, tipo de sales, temperatura y conformación de la proteína influyen sobre la capacidad de esta para ligar agua y aceite, presentando menor capacidad cerca del punto isoelectrico, en el que predominan las interacciones proteína-proteína; por encima y por debajo del punto isoelectrico se modifica la carga neta y pueden hincharse y unir más agua, algo similar a lo visto con los perfiles de solubilidad previamente. Sin embargo, es de suma importancia dejar en claro que no existe una correlación estricta entre la capacidad para ligar agua y la solubilidad, por ejemplo, las proteínas desnaturalizadas presentan una solubilidad pobre a pesar de que unan la misma cantidad de agua que una proteína nativa (Gálvez *et al.*, 2013). Dado que para la estabilización de emulsiones y espumas es primordial que las proteínas sean capaces de establecer interacciones favorables con ambas fases que conforman el sistema, este test permite, de manera simple y rápida, aportar una visión general de cómo interactúan estas moléculas con cada líquido; no obstante, una mejor caracterización podría hacerse variando ciertos parámetros como la fuerza iónica, temperatura y pH, a fin de optimizar la aplicación de estos productos.

Carga superficial

Los datos obtenidos en la medición del potencial zeta (ζ) para las 4 fracciones proteicas en función del pH se presentan en la ilustración 23. Se aprecia que, dentro del rango de pH evaluado, predomina una carga neta

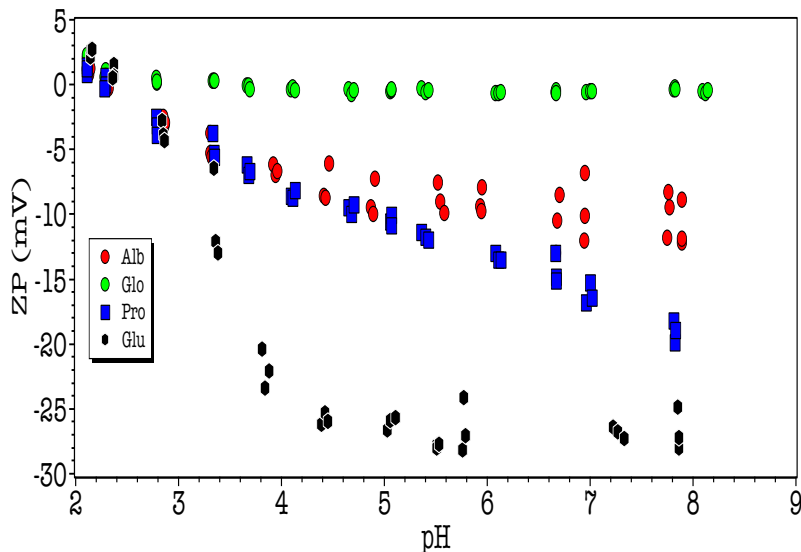


Figura 23. Potencial zeta como función del pH para las distintas fracciones de proteínas de chíá.

negativa, misma que se hace más grande conforme el medio se torna más alcalino. Esta tendencia se hace más notoria en la fracción glutelinas, mientras que las globulinas fueron la fracción con la carga más pequeña a lo largo de todo el experimento.

La carga superficial de las proteínas se atribuye principalmente a los grupos ionizables superficiales o cercanos a la superficie. ζ refleja el grado de estabilización electrostática entre las partículas coloidales, lo que influye mucho en las propiedades funcionales tales como solubilidad y

características emulsionantes, dado que se busca que una vez adsorbidas en la interfase, estas moléculas sean capaces de generar una fuerte repulsión electrostática; por lo tanto, el pH es quizás el parámetro que más influye en este sentido. López *et al.*, (2018) y Timilsena *et al.*, (2016b) reportaron valores de ζ ligeramente mayores para concentrados de proteínas de chíá. Comparadas con otras fuentes vegetales, los valores de ζ son muy similares; por ejemplo, Shevkani *et al.*, (2014) reportaron valores de ζ cercanos a -40 mV para suspensiones proteicas de amaranto en agua.

Uno de los usos más populares para los valores de ζ es relacionarlo con la estabilidad del coloide en cuestión. Existen directrices que clasifican a las dispersiones según estos datos de acuerdo con lo siguiente: $\pm 0-10$ mV (altamente inestable), $\pm 10-20$ mV (relativamente estable), $\pm 20-30$ mV (moderadamente estable) y $> \pm 30$ (altamente estable); desafortunadamente, la realidad es más compleja que eso. Si bien los valores del potencial zeta si proporcionan indicaciones sobre la estabilidad del coloide, no se refleja el panorama completo. Según la teoría más aceptada (DLVO, nombrada así por Derjaguin, Landau, Verwey y Overbeek) la estabilidad del coloide depende del balance de fuerzas entre aquellas atractivas (de van der Waals) y fuerzas de repulsión electrostáticas como consecuencia de la existencia de una doble capa eléctrica. A pesar de que los valores de ζ proporcionan información sobre las fuerzas de repulsión electrostáticas, no aportan ninguna idea acerca de las fuerzas atractivas de van der Waals; por lo tanto, no es raro encontrar coloides estables con bajo ζ y viceversa. Un punto importante a tener en cuenta es que la fuerza de atracción de van der Waals depende de la constante de Hamaker, que se corresponde indirectamente con la diferencia entre el índice de refracción de la partícula y el dispersante. Por lo tanto, si la constante de Hamaker es baja, las fuerzas atractivas de van der Waals también se vuelven débiles y entonces una repulsión electrostática suave reflejada por un bajo ζ (por ejemplo, 10-15 mV) puede ser suficiente para garantizar la estabilidad del coloide. Cabe señalar que las

interacciones estéricas también pueden contribuir a la estabilidad del coloide; por ejemplo, algunas emulsiones agua en aceite son altamente estables a pesar de tener bajo potencial zeta (Bhattacharjee, 2016). Paralelamente, esta prueba nos permitió estimar los puntos isoeléctricos de cada muestra, es decir, el valor de pH en el que la carga neta de la molécula es 0. Albúminas, prolaminas y glutelinas mostraron comportamientos muy similares entre sí, con valores de 2.34, 2.41 y 2.46, respectivamente; por su parte, el punto isoeléctrico de las globulinas se ubicó en 3.56. Estos resultados están en excelente concordancia con lo exhibido en la prueba de solubilidad descrita previamente, en donde las 4 fracciones mostraron el menor valor alrededor de este rango de pH.

Las repercusiones de estos hallazgos para la actividad superficial de estas proteínas son muy importantes. En primera instancia, parecería que su uso como estabilizantes de sistemas dispersos se podría ver comprometido, dado que muchas de las formulaciones comerciales poseen valores de pH significativamente ácidos y esto causaría la precipitación de las moléculas, con una consecuente pérdida de la estabilidad del sistema en cuestión; no obstante, se ha visto que muchas proteínas exhiben gran actividad superficial cerca del punto isoeléctrico. Aunque al principio se pensó que esto podría parecer extraño, dos efectos pueden explicar la observación. Primero, considérese 1 ml de una solución que contiene 1 mg de una proteína de 50 kDa; con tantas moléculas en solución (aproximadamente 10^{13}), estas no solo interactuarán con la interfase, sino también entre sí (dado que se sabe que no hay relaciones con la interfase de forma aislada), por lo que, en el punto isoeléctrico, la repulsión electrostática reducida entre las moléculas adsorbentes no cargadas puede permitir que se unan más proteínas. Una segunda explicación se refiere a las alteraciones en la estructura de la proteína debido a los cambios en la carga de aminoácidos. Si la conformación se altera, podrían aparecer diferentes aminoácidos en la superficie de la proteína, lo que podría cambiar la forma en que la molécula se ancla a la interfase (Dee *et al.*, 2003).

Dinámica de adsorción en la interfase

Las ilustraciones 25 y 26 muestran la evolución de la tensión interfacial (γ) a través del tiempo para los sistemas agua-aceite y agua-aire, respectivamente; en todos los casos, γ decrece progresivamente con el tiempo de adsorción, mostrando perfiles similares para los 4 tipos de proteínas evaluados. La tensión interfacial medida en ausencia de proteínas fue 73 mNm^{-1} y 29 mNm^{-1} para los sistemas agua-aire y agua-aceite, respectivamente.

Del análisis de las curvas obtenidas se aprecia como la caída inicial de γ fue sustancial durante los primeros minutos, esto implica que el suministro de moléculas de proteína hacia la interfase por difusión fue suficientemente alto para favorecer la formación de una monocapa después de pocos minutos como

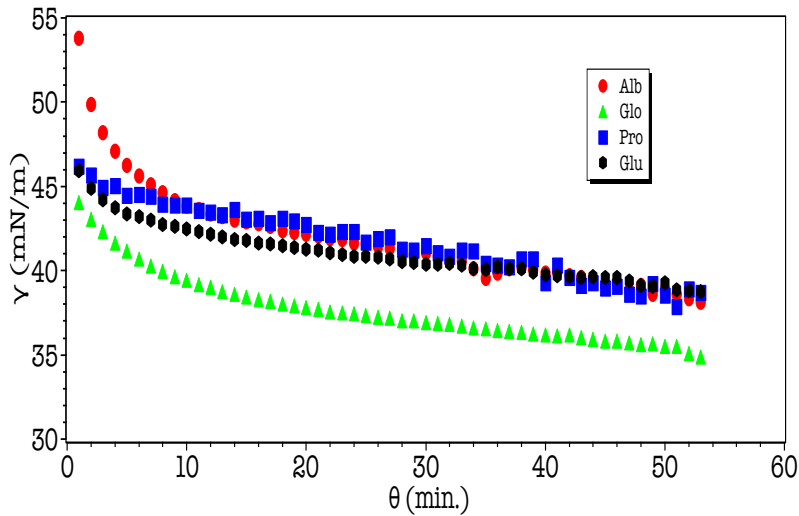


Figura 26. Evolución de la tensión interfacial a través del tiempo para la adsorción de proteínas de chíá en un sistema agua-aire.

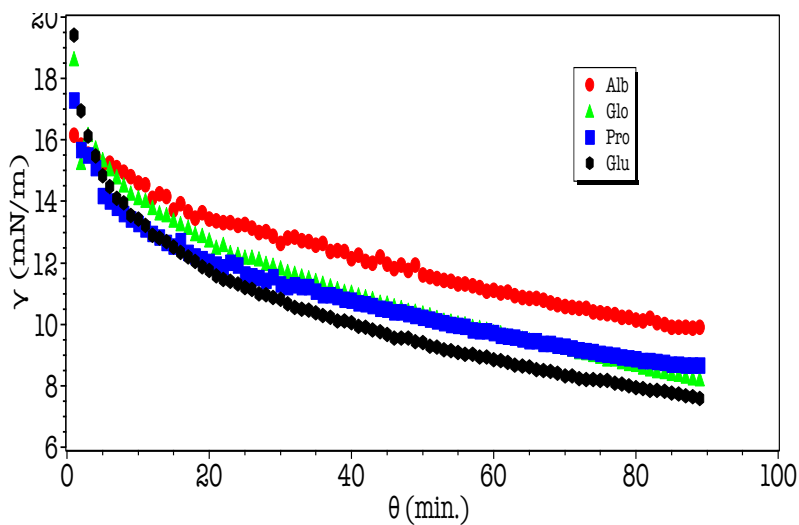


Figura 25. Evolución de la tensión interfacial a través del tiempo para la adsorción de proteínas de chíá en un sistema agua-aceite.

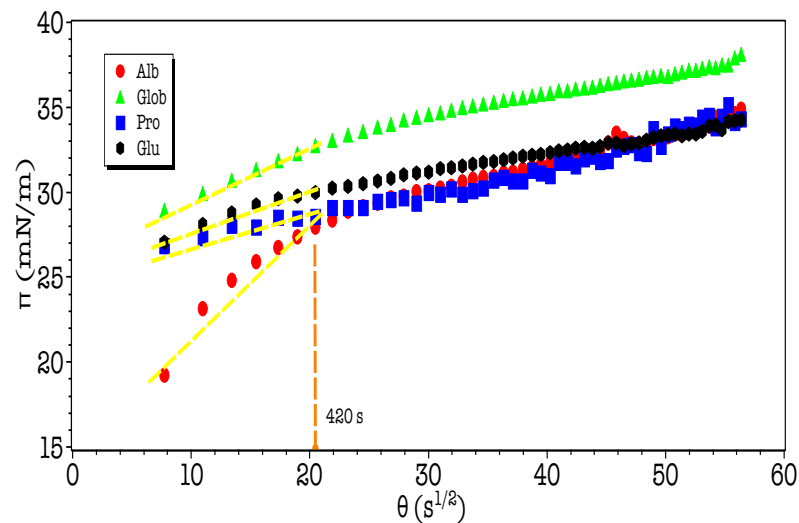


Figura 24. Evolución de la presión superficial a través del tiempo para la adsorción de proteínas de chíá en un sistema agua-aire.

consecuencia de la naturaleza anfifílica de las mismas (Damodaran & Song, 1988; Tang & Shen, 2014; Cuevas-Bernardino *et al.*, 2016).

Es probable que la disminución progresiva de la tasa de adsorción sea resultado del reacomodo de las proteínas en la interfase, tal como se ha descrito en trabajos previos para otras moléculas con actividad superficial (Cuevas-Bernardino *et al.*, 2016; Vernon-Carter & Sherman, 1981).

Cuando el suministro de proteínas por difusión hacia la interfase es lo suficientemente alto, las nuevas moléculas que arriban compiten por el espacio disponible. Bajo estas condiciones, estas no se situarán en su forma más ventajosa debido a la incapacidad para desplegarse, provocando que la mayor parte quede proyectada hacia la fase continua y haciendo de la reconfiguración un proceso lento. Las etapas que comprenden el proceso global han sido descritas previamente (MacRitchie, 1990; Perez *et al.*, 2009; Camino *et al.*, 2011), e incluyen: a) difusión de las proteínas desde el *bulk* hacia la interfase, b) adsorción (penetración) y despliegue en la interfase, y c) agregación (reacomodo) dentro de la capa interfacial, formación de multicapas e incluso gelificación interfacial.

A partir de las mediciones de la dinámica de adsorción, los parámetros cinéticos pueden ser estimados. Para esto, es conveniente definir una nueva magnitud denominada presión superficial (π). Los valores de π representan la diferencia entre la tensión superficial medida sin la adición

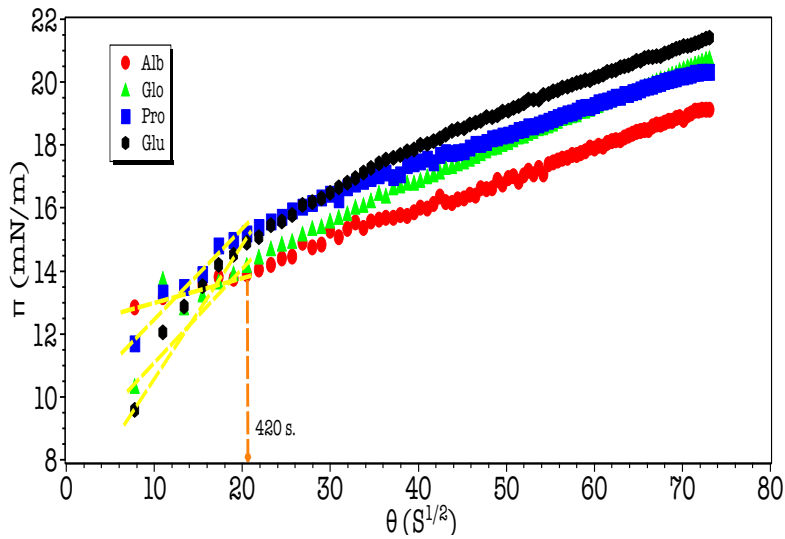


Figura 27. Evolución de la presión superficial a través del tiempo para la adsorción de proteínas de chíca en un sistema agua-aceite.

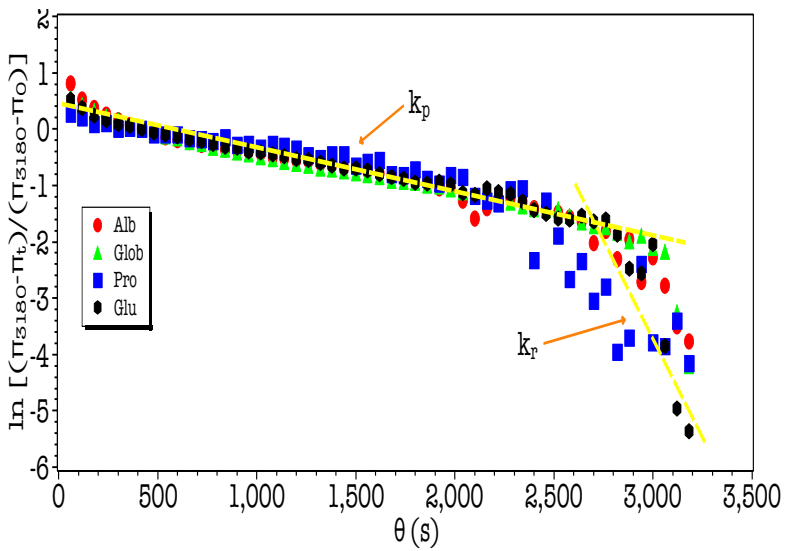


Figura 28. Constantes de penetración (k_p) y acomodación (k_r) para las fracciones de proteínas de chíca en una interfase agua-aire.

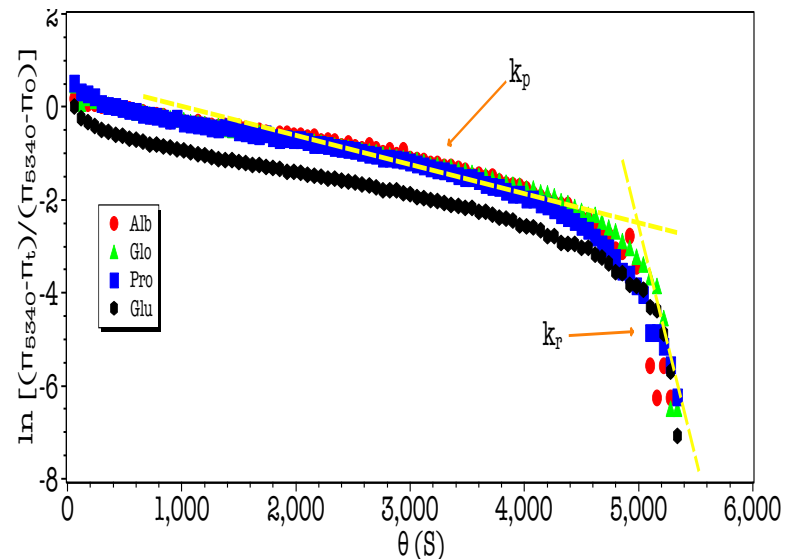


Figura 29. Constantes de penetración (k_p) y acomodación (k_r) para las fracciones de proteínas de chíca en una interfase agua-aceite.

del agente superficial (γ_s) y aquella registrada una vez que se ha incorporado la molécula de interés (γ_p), es decir, $\pi = \gamma_s - \gamma_p$.

Durante la primera etapa, a presiones superficiales relativamente bajas, cuando la difusión es el mecanismo dominante, una forma modificada de la ecuación de Ward y Tordai puede ser usada para correlacionar el cambio en la presión superficial a través del tiempo (Ward & Tordai, 1946):

$$\pi = C_0 K T (D_{\text{diff}} \theta / 3.14)^{1/2}$$

donde C_0 es la concentración inicial de proteína en la fase acuosa, K representa la constante de Boltzmann, T la temperatura absoluta, D_{diff} el coeficiente de difusión y θ el tiempo de adsorción. Si la difusión en la interfase controla el proceso de adsorción (en ausencia de convección), la fuerza impulsora es el gradiente de concentración, por lo que la representación de π vs $\theta^{1/2}$ será lineal y la pendiente de esta curva será la constante de difusión (Xu & Damodaran, 1994; Tang & Shen, 2014; Cuevas-Bernardino *et al.*, 2016, Camino *et al.*, 2010); de hecho, en reportes previos (Perez *et al.*, 2009) se ha indicado que la adsorción inicial de las proteínas en la interfase es el paso más importante en la formación de espumas.

A partir de las ilustraciones 24 y 27 es posible apreciar que los valores de π se incrementaron progresivamente con el tiempo de adsorción en ambos sistemas estudiados, no obstante, después de un tiempo considerable, la tasa de adsorción

decrece significativamente debido a la presencia de barreras de presión superficial y electrostáticas (Graham & Philips, 1979; Tang & Shen, 2014), observándose que para los 4 tipos de proteínas ensayadas en una interfase agua-aire el cambio fue más notorio respecto al sistema agua-aceite.

A tiempos muy cortos, la tasa de adsorción fue sumamente elevada para ser detectada bajo las condiciones estudiadas, por lo que solo se registraron los últimos instantes del proceso de difusión, algo que también ha sido observado en la formación de *films* con proteínas de suero (Pérez *et al.*, 2009) y globulinas de soya (Patino *et al.*, 2004) en interfaces agua-aire. Así, para facilitar el análisis, se definió el punto en el que existe un cambio de pendiente en las curvas (420 s. en ambos sistemas) como un indicador de la constante de velocidad de difusión aparente (k_{dif}^0), como se detalla en la tabla 6.

Para monitorear los mecanismos que tienen lugar después del breve periodo controlado por difusión (penetración, desplegamiento y rearreglo estructural de las proteínas en la interfase) se utilizó la siguiente ecuación fenomenológica de primer orden propuesta por Graham & Phillips (1979):

$$\ln [(\pi_f - \pi_0)/(\pi_i - \pi_0)] = -k_i\theta$$

donde π_f , π_0 y π_i son las presiones superficiales al final del proceso de adsorción, a cualquier tiempo θ y al tiempo inicial, respectivamente, mientras que k_i es la constante de velocidad de primer orden. En la práctica, esta ecuación usualmente se compone de 2 o más regiones lineales, la primer pendiente es tomada como la constante de penetración de primer orden (k_p), mientras que la siguiente indica la constante de rearreglo molecular para las proteínas adsorbidas. Las figuras 28 y 29 ilustran el proceso seguido, los datos recabados del análisis de las 4 fracciones en la interfase agua-aire y agua-aceite se muestran en la tabla 6. Con base en estos resultados, es posible apreciar que las muestras presentan comportamientos significativamente distintos según el ambiente en el que se encuentran. En la etapa inicial, todas las muestras mostraron tasas de difusión elevadas comparadas con otras moléculas, como pectinas (Cuevas-Bernardino *et al.*, 2016), pero muy similares respecto a otras proteínas (Tang & Shen, 2014), esto a pesar de poseer elevados pesos moleculares. Uno esperaría que aquellas moléculas con gran masa molar fueran menos efectivas que sus contrapartes más pequeñas en esta etapa del proceso, como se ha verificado para la adsorción de surfactantes, sin embargo, este hecho sugiere que existe una fuerza impulsora capaz de compensar el alto peso molecular de estas proteínas y fomentar su rápido transporte hacia la interfaz mediante difusión; esta potencia fue proporcionada muy probablemente por el adecuado balance de hidrofobicidad y el tipo de estructura predominante. Nuestros resultados indican que existió una correspondencia entre el nivel de hidrofobicidad superficial y el tipo de sistema con el que se mostró mejor desempeño, así, las albúminas fueron las de mejor comportamiento en la interfaz agua-aire, mientras que las glutelinas hicieron lo propio en una agua-aceite.

Para las dos etapas siguientes del experimento, esta correlación se mantuvo. Los valores de k_p están asociados con una barrera energética que obstaculiza la penetración y despliegue en la interfase, mientras que k_r está asociada con la reconfiguración de las moléculas dentro de esta. Se comprobó que en aquellas muestras en las que los valores de k_{dif}^0 fueron más grandes, el proceso de penetración y despliegue también sucedió más rápido respecto a las demás; esta misma tendencia fue observada en la etapa final del procedimiento para ambos sistemas estudiados. Con base en ello se concluye lo siguiente:

- 1) Las proteínas de chíá son capaces de anclarse rápidamente en interfaces agua-aire y agua-aceite, disminuyendo rápidamente la tensión interfacial y ayudando a estabilizar la fase dispersa de espumas y emulsiones.
- 2) El proceso global del anclaje de estas proteínas consta de 3 etapas claramente definidas: a) difusión de las proteínas desde el *bulk* hacia la interfase, b) adsorción (penetración) y despliegue en la interfase, y c) agregación (reacomodo) dentro de la capa interfacial, formación de multicapas e incluso gelificación interfacial.
- 3) El estudio del proceso dinámico de adsorción de proteínas de chíá realizado en el presente trabajo es pionero en su tipo, ampliando el panorama relacionado con la estabilización de sistemas dispersos por este grupo de moléculas.

Tabla 6. Parámetros de adsorción característicos de proteínas de chíá en interfaces agua-aire y agua-aceite.

Fracción	Interfase agua-aire		
	k_{dif}^0 (mNm ⁻¹ s ^{-0.5})	$k_p \times 10^4$ (s ⁻¹)	$k_r \times 10^4$ (s ⁻¹)
	(RL) ^a	(RL) ^a	(RL) ^a
Albúminas	0.6474 (0.94)	8.0 (0.95)	37 (0.78)
Globulinas	0.2987 (0.99)	8.0 (0.98)	-
Prolaminas	0.1413 (0.92)	6.0 (0.95)	30 (0.75)
Glutelinas	0.2273 (0.96)	7.0 (0.98)	-
Fracción	Interfase agua-aceite		
	k_{dif}^0 (mNm ⁻¹ s ^{-0.5})	$k_p \times 10^4$ (s ⁻¹)	$k_r \times 10^4$ (s ⁻¹)
	(RL) ^a	(RL) ^a	(RL) ^a
Albúminas	0.0817 (0.96)	5.0 (0.95)	66 (0.86)
Globulinas	0.2972 (0.94)	5.0 (0.98)	58 (0.80)
Prolaminas	0.2646 (0.95)	6.0 (0.96)	48 (0.95)
Glutelinas	0.3929 (0.94)	6.0 (0.97)	69 (0.80)

^a Coeficiente de correlación en el ajuste lineal

Reología interfacial

La capacidad de fluencia es una herramienta reológica que estudia las propiedades de flujo de los materiales viscoelásticos. Cuando un material se somete a una fuerza repentina, la respuesta a esta deformación expuesta en las curvas obtenidas de estas pruebas se caracteriza por una curva exponencial de primer orden, la cual puede ser subdividida en tres regiones características (figura 30):

- La región de fluencia instantánea J_0 (A– B), en la cual las bandas de las moléculas adsorbidas en la interfase son sujetadas a un estiramiento elástico. Si la deformación no continúa después de este punto, la recuperación de la estructura en la película es completa.
- La región de fluencia de relajación o retardo J_R (B–C), en la cual las uniones entre las moléculas adsorbidas son rotas y reformadas.
- La región de fluencia Newtoniana J_N (C–D). En este punto, las uniones de las moléculas adsorbidas en la interfase son rotas, el tiempo requerido para su reestructuración es mucho mayor que el tiempo de análisis del experimento, por lo que se establece un perfil de flujo en la interfase.

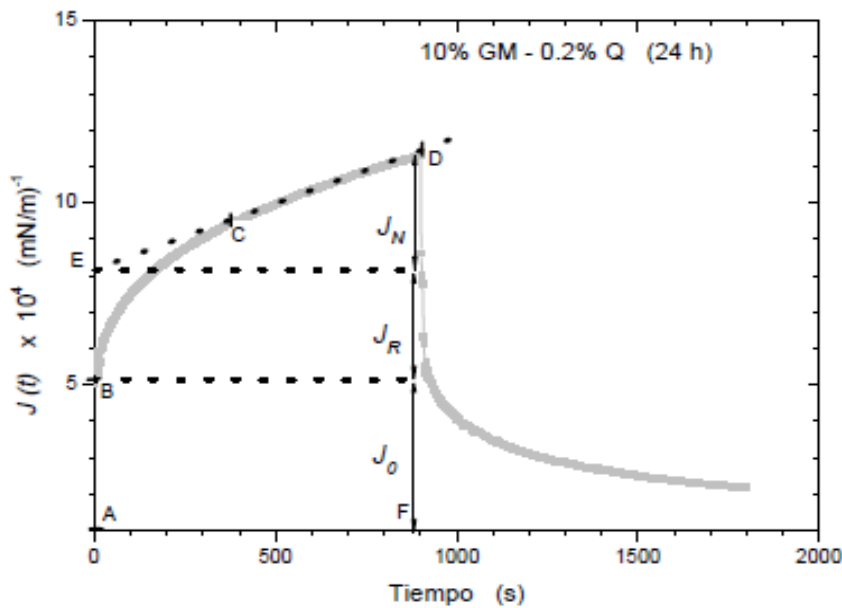


Figura 30. Curva modelo de las pruebas de capacidad de fluencia (Creep compliance). Pérez-Orozco (2006).

Para el análisis de las propiedades de capacidad de fluencia, se utilizó el modelo que contempla un tiempo de relajación (región de relajación):

$$J(t) = J_0 + J_m (1 - e^{-t/\lambda_m}) + J_N$$

Donde:

$J_0 = 1/E_0$ es evaluado directamente del gráfico y corresponde a la intersección de la curva con el eje de las coordenadas adyacentes (punto B).

$J_N = t / \eta_N$ donde η_N es la viscosidad interfacial newtoniana y es evaluada gráficamente mediante la relación de los segmentos AF/ED.

Los parámetros J_m y t_m son determinados mediante el ajuste de la ecuación anterior a los datos experimentales (Román-Guerrero, 2012).

En el presente trabajo se monitoreó la capacidad de reestructuración de la membrana interfacial agua-aceite estabilizada por las 4 fracciones proteicas de semillas de chía a distintos tiempos después de haber creado la interfase (1, 2, 3 y 4 hrs.). Los resultados obtenidos se presentan a continuación; los gráficos y valores correspondientes a la fracción globulinas no fueron incluidos dado que esta no presentó un comportamiento de reestructuración bajo ninguna condición de tiempo. De la misma manera, en la tabla 7 solo se reportan los valores para las condiciones en las que hubo reestructuración para el resto de las fracciones.

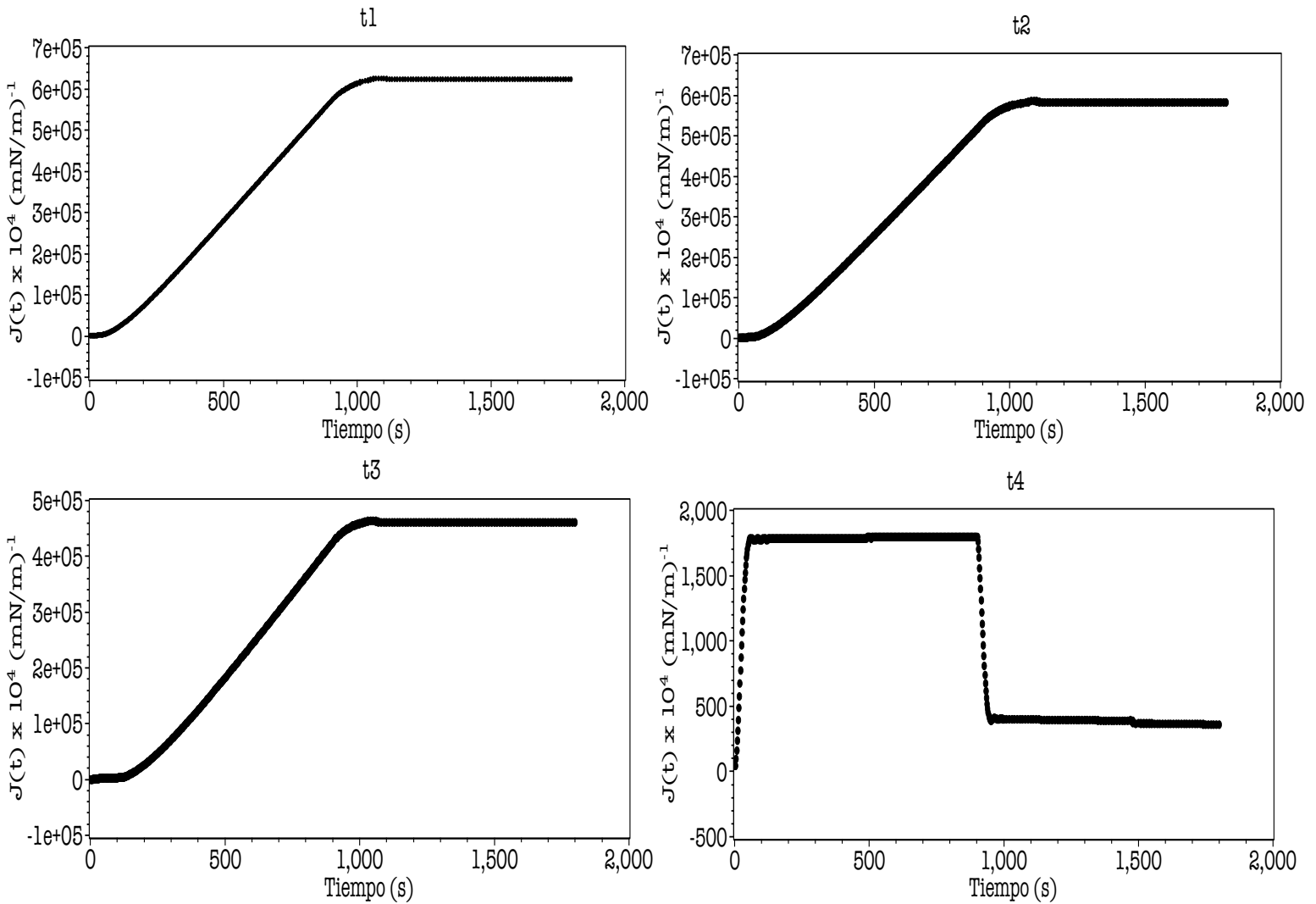


Figura 31. Perfiles de fluencia en la interfase agua-aceite a través del tiempo para la fracción albúminas.

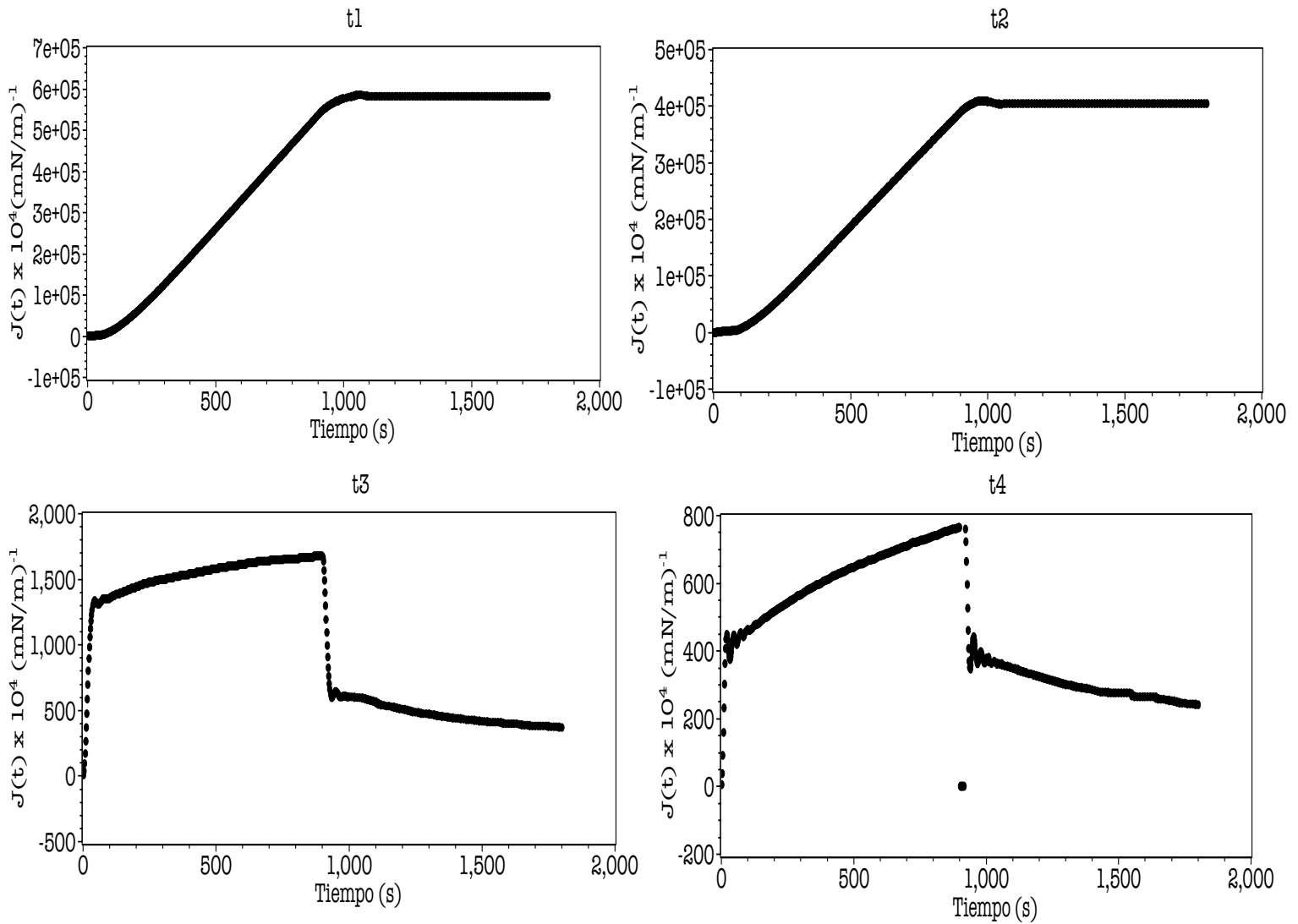


Figura 32. Perfiles de fluencia en la interfase agua-aceite a través del tiempo para la fracción prolaminas.

El análisis de los parámetros viscoelásticos provee información muy útil acerca del comportamiento de cada fracción dentro de la interfase. Los valores obtenidos para la fluencia interfacial instantánea (J_0) están directamente relacionados con la deformación reversible como consecuencia de la fuerza aplicada, lo que produce incrementos en el valor de E_0 ; esta variable describe, a su vez, la fuerza elástica de los enlaces que conforman la estructura interfacial de las películas formadas. Los valores más grandes fueron obtenidos para las fracciones prolaminas y glutelinas, mientras que el menor se observó en las albúminas a la cuarta hora de formada la interfase.

Por otro lado, los valores obtenidos para la fluencia de retardo (J_m y λ_m) son un indicativo de que los procesos de ruptura y reestructuración de los enlaces en la interfase no ocurren con la misma frecuencia. En general,

Tabla 7. Parámetros viscoelásticos obtenidos de las membranas formadas por fracciones de proteínas de chíá.

Muestra	$J_0 \times 10^4$ (mN/m) ⁻¹	$J_N \times 10^4$ (mN/m) ⁻¹	$\eta_N \times 10^4$ (mNs/m) ⁻¹	λ_m (s)	$J_m \times 10^4$ (mN/m) ⁻¹	$E_0 \times 10^{-4}$ (mN/m)
Alb4	40.347±0.38	3.80±0.45	136.45±0.55	364.12±5.65	12.25±0.45	0.024±0.53
Pro3	6.305±0.49	5.70±0.17	156.90±0.26	432.03±7.03	14.86±0.32	0.158±0.21
Pro4	6.181±0.33	4.30±0.18	174.34±0.79	549.06±4.98	17.93±0.67	0.161±0.24
Glu2	6.858±0.56	5.92±0.20	130.56±0.65	416.34±6.30	15.74±0.56	0.145±0.22
Glu3	6.305±0.24	4.59±0.18	166.92±0.12	538.45±2.01	17.72±0.54	0.158±0.34
Glu4	6.181±0.56	4.28±0.29	187.23±0.23	594.10±3.56	19.34±0.11	0.161±0.12

cuanto más grande sean los valores de λ_m , la deformación de la película interfacial ocurrirá más lentamente. En consecuencia, se puede apreciar que todas las muestras presentan comportamientos similares en este sentido, con valores mayores conforme transcurre más tiempo de formada la interfase, lo que favoreció la generación de películas altamente estructuradas al final del experimento.

Por otra parte, los valores obtenidos para J_N explican el tiempo que requieren los enlaces de las membranas formadas para restablecerse después de que se ha aplicado una fuerza. Para todas las muestras se aprecia que existieron periodos muy cortos para lograr la reconformación, particularmente para prolaminas y glutelinas, en donde no se aprecia una diferencia significativa. Es muy probable que las albúminas formen una estructura mucho más compleja comparada con las otras dos fracciones, lo cual podría estar influida directamente por el peso molecular medido para esta muestra; en consecuencia, el proceso de recuperación hacia su estructura inicial consume más tiempo.

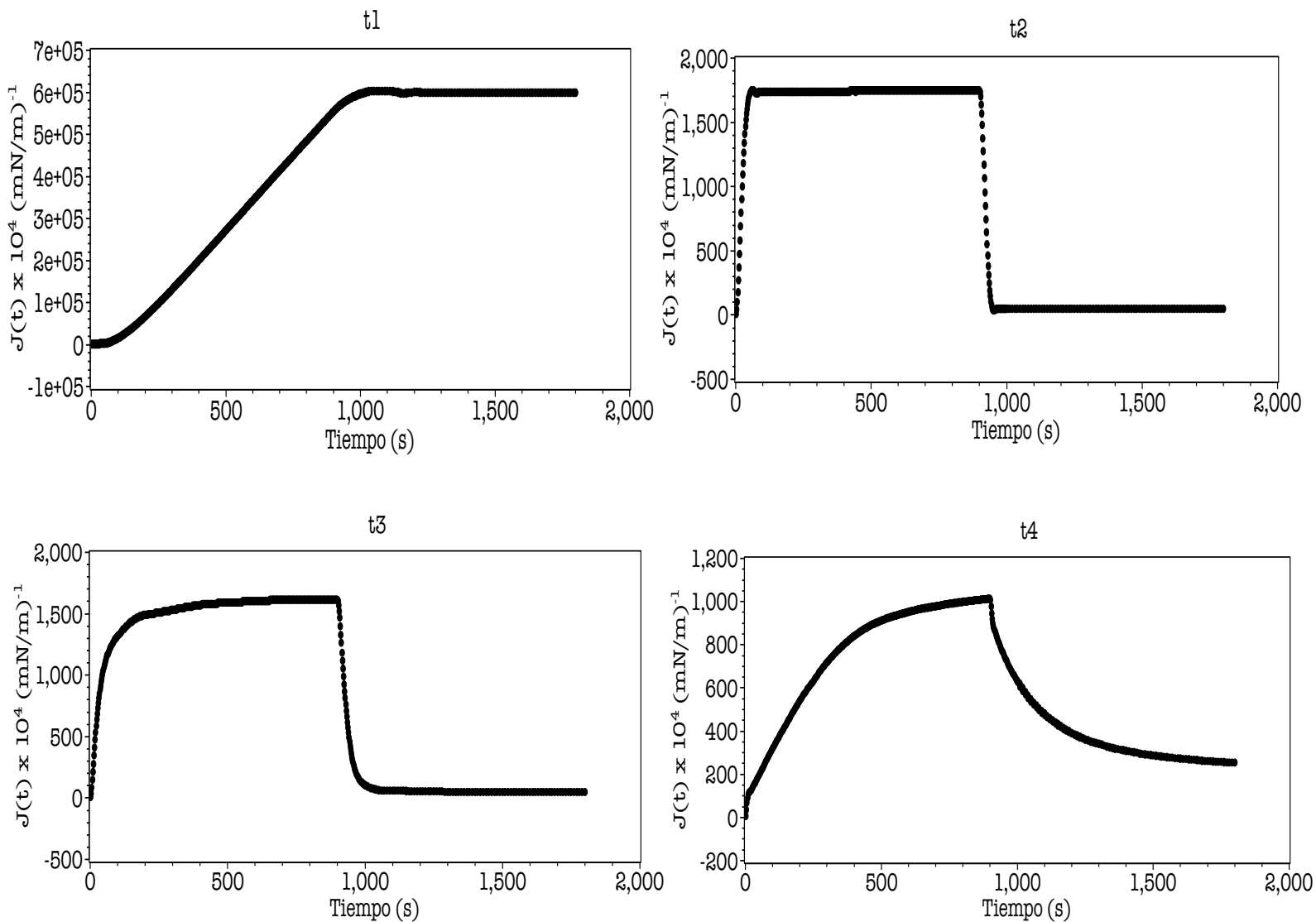


Figura 33. Perfiles de fluencia en la interfase agua-aceite a través del tiempo para la fracción glutelinas.

8.-CONCLUSIONES

Las semillas de chía contienen una cantidad de proteínas superior respecto a las fuentes vegetales tradicionalmente empleadas, de estas, las globulinas son la principal fracción presente en las mismas.

Hemos presentado evidencia que indica que estas proteínas son una alternativa viable para su uso como agentes estabilizantes de espumas y emulsiones, basados principalmente en las siguientes características:

- 1) Poseen un adecuado balance de hidrofobicidad, requisito importante para la estabilización de espumas y emulsiones.

- 2) El tipo de estructura predominante en las 4 fracciones corresponde a disposiciones de alta flexibilidad, lo cual ha demostrado ser un atributo destacado debido a la facilidad para acoplarse a interfaces agua-aire y agua-aceite.
- 3) Poseen alta estabilidad térmica, muy superior respecto a otras fuentes proteicas de amplio consumo, lo cual abre la puerta para su explotación en diversos ámbitos del sector biotecnológico.
- 4) Tienen buena capacidad para retener agua y aceite, lo cual indica que son capaces de interactuar de forma adecuada con estas 2 fases. A pesar de que poseen baja solubilidad a pH's ácidos, diversos estudios han indicado que este hecho puede favorecer la actividad superficial.
- 5) Con el análisis de la dinámica de adsorción y reología interfacial, estudios pioneros para este grupo de proteínas, se ha verificado que estas moléculas son capaces de disminuir rápidamente la tensión interfacial y formar una membrana alrededor de la fase dispersa, capaz de resistir perturbaciones mecánicas del medio después de cierto tiempo de haber creado la interfase.

A pesar de que las pruebas realizadas en este trabajo proyectan a estas proteínas como una fuente interesante en el sector de los tensoactivos y emulsificantes, es de suma importancia correlacionar los datos aquí recabados con la estabilidad de espumas y emulsiones, con lo cual quedaría plenamente constatada la efectividad de estas moléculas.

9.-REFERENCIAS

- Adamson, A.W.; Gast, A.P. *Physical Chemistry of Surfaces*, 6th Ed.; John Wiley & Sons, Inc.: New York, 1997.
- Aluko, R., & Monu, E. (2003). Functional and bioactive properties of quinoa seed protein hydrolysates. *Journal of Food Science*, 68, 1254–1258.
- Ayerza, R., & Ayerza (h), R. (1995). Oil content and fatty acid composition of chia (*salvia hispanica* L.) from five northwestern locations in Argentina. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 72(9), 1079-1081.
- Ayerza, R.; Coates, W. (2005). Ground chia seed and chia oil effects on plasma lipids and fatty acids in the rat. *Nutrition Research*. (N.Y.), 25, 995–1003.
- Ayerza, R.; Coates, W. (2011). Protein content, oil content and fatty acid profiles as potential criteria to determine the origin of commercially grown chia (*Salvia hispanica* L.). *Industrial Crops and Products*., 34, 1366–1371.
- Badui D., S. (2013). Leche. En: *Química de los Alimentos* (611-639). Ciudad de México, México: Pearson.
- Belluco, S., Losasso, C., Maggioletti, M., Alonzi, C. C., Paoletti, M. G., & Ricci, A. (2013). Edible insects in a food safety and nutritional perspective: A critical review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(3), 296-313.
- Bhattacharjee, S. (2016). DLS and zeta potential – what they are and what they are not? *Journal of Controlled Release*, 235, 337-351.
- Bleakley, S., & Hayes, M. (2017). Algal proteins: Extraction, application, and challenges concerning production. *Foods*, 6(5), 33.
- Brash, John L. & Horbett, Thomas A. & American Chemical Society. Division of Colloid and Surface Chemistry. & American Chemical Society. Meeting 1986 : Anaheim, Calif). (1987). *Proteins at interfaces: physicochemical and biochemical studies*. Washington, DC : American Chemical Society
- Belitz, H. -, Grosch, W., & Schieberle, P. (2009). *Food chemistry* (4a rev. and extend ed.). Berlin: Springer.
- Bemelmans, W. J., Broer, J., Feskens, E. J., Smit, A. J., Muskiet, F. A., Lefrandt, J. D., . . . Meyboom-de Jong, B. (2002). Effect of an increased intake of alpha-linolenic acid and group nutritional education on cardiovascular risk factors: The mediterranean alpha-linolenic enriched groningen dietary intervention (MARGARIN) study. *American Journal of Clinical Nutrition*, 75(2), 221-227.
- Berry, J. D., Neeson, M. J., Dagastine, R. R., Chan, D. Y. C., & Tabor, R. F. (2015). Measurement of surface and interfacial tension using pendant drop tensiometry. *Journal of Colloid and Interface Science*, 454, 226-237.
- Bushway, A., Wilson, A., Houston, L., & Bushway, R. (1984). Selected properties of the lipid and protein fractions from chia seed. *Journal of Food Science*, 49(2), 555–557.
- Camino, N. A., Sánchez, C. C., Rodríguez Patino, J. M., & Pilosof, A. M. R. (2011). Hydroxypropylmethylcellulose at the oil–water interface. part I. bulk behaviour and dynamic adsorption as affected by pH. *Food Hydrocolloids*, 25(1), 1-11.

- Capitani, M. I., Corzo-Rios, L. J., Chel-Guerrero, L. A., Betancur-Ancona, D. A., Nolasco, S. M., & Tomás, M. C. (2015). Rheological properties of aqueous dispersions of chia (*salvia hispanica* L.) mucilage. *Journal of Food Engineering*, 149, 70-77.
- Carbonaro, M., & Nucara, A. (2010). Secondary structure of food proteins by fourier transform spectroscopy in the mid-infrared region. *Amino Acids*, 38(3), 679-690.
- Cheftel, J., CUQ, J., Lorient, D., & López Capont, F. (1989). *Proteínas alimentarias: Bioquímica - propiedades funcionales valor nutricional - modificaciones químicas*. Zaragoza, España: Acribia.
- Chicco, A. G., D'Alessandro, M. E., Hein, G. J., Oliva, M. E., & Lombardo, Y. B. (2009). Dietary chia seed (*salvia hispanica* L.) rich in α -linolenic acid improves adiposity and normalises hypertriacylglycerolaemia and insulin resistance in dyslipaemic rats. *British Journal of Nutrition*, 101(1), 41-50.
- Coelho, M. S., & Salas-Mellado, Myriam de las Mercedes. (2018). How extraction method affects the physicochemical and functional properties of chia proteins. *Lwt-Food Science and Technology*, 96, 26-33.
- Cox, Michael & Nelson, David. (2017). *Lehninger Principles of Biochemistry* (7a ed.) New York, USA: W.H Freeman
- Cuevas-Bernardino, J. C., Lobato-Calleros, C., Román-Guerrero, A., Alvarez-Ramirez, J., & Vernon-Carter, E. J. (2016). Physicochemical characterisation of hawthorn pectins and their performing in stabilising oil-in-water emulsions. *Reactive and Functional Polymers*, 103, 63-71.
- Damodaran, S. (2005). Protein stabilization of emulsions and foams. *Journal of Food Science*, 70(3), R54-R66.
- Damodaran, S., Parkin, K. L., & Fennema, O. R. (2008). *Fennema's food chemistry* (4th ed.). Boca Raton, FL: CRC/Taylor & Francis.
- Damodaran, S., & Song, K. B. (1988). Kinetics of adsorption of protein at interface: role of protein conformation in diffusional adsorption. *Biochimica et Biophysica Acta*, 954, 253e264.
- de Campo, C., dos Santos, P. P., Costa, T. M. H., Paese, K., Guterres, S. S., Rios, A. d. O., & Flôres, S. H. (2017). Nanoencapsulation of chia seed oil with chia mucilage (*salvia hispanica* L.) as wall material: Characterization and stability evaluation. *Food Chemistry*, 234, 1-9.
- de Castro, Ruann Janser Soares, Ohara, A., Aguilar, Jessika Gonçalves dos Santos, & Domingues, M. A. F. (2018). Nutritional, functional and biological properties of insect proteins: Processes for obtaining, consumption and future challenges. *Trends in Food Science & Technology*, 76, 82-89.
- Dee, K. C., Puleo, D. A. and Bizios, R. (2003). Protein-Surface Interactions. En: *An Introduction To Tissue-Biomaterial Interactions* (eds K. C. Dee, D. A. Puleo and R. Bizios).
- Drelich, J., Fang, C., White, C.L. (2006). Measurement of interfacial tension in fluid–fluid systems, *Encyclopedia of Surface and Colloid Science*, second ed., vol.4, CRC Press, Boca Raton
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28, 350–356.

- Fernandes, S. S., & Mellado, Myriam de las Mercedes Salas. (2018). Development of mayonnaise with substitution of oil or egg yolk by the addition of chia (*salvia hispânica L.*) mucilage. *Journal of Food Science*, 83(1), 74-83.
- Fernandez, I., Vidueiros, S., Ayerza, R., Coates, W., & Pallaro, A. (2008). Impact of chia (*Salvia hispanica L.*) on the immune system: Preliminary study. *Proceedings of the Nutrition Society*, 67(OCE1), E12.
- Gajanan, P. G., Elavarasan, K., & Shamasundar, B. A. (2016). Bioactive and functional properties of protein hydrolysates from fish frame processing waste using plant proteases. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(24), 24901-24911.
- Gálvez M., A., Flores A., I., y Farrés González S., A. (2013). Proteínas. En: *Química de los Alimentos* (95-221). Ciudad de México, México: Pearson.
- Ge, Y., Sun, A., Ni, Y., & Cai, T. (2000). Some nutritional and functional properties of defatted wheat germ protein. *Journal of the Agricultural and Food Chemistry*, 48, 6215–6218.
- Goumperis T. 2012. Insects and food security: food/feed safety considerations. Assessing the potential of insects as food and feed in assuring food security. *Technical Consultation Meeting*, 23–25 January 2012. Rome: FAO.
- Graham, D. E., & Philips, M. C. (1979). Proteins at liquid interfaces: I. Kinetics of adsorption and Surface denaturation. *Journal of Colloid and Interface Science*, 70, 403-414.
- Hailing, P.J. & Walstra, P. (1981). Protein-stabilized foams and emulsions, *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 15:2, 155-203
- Halim, N. R. A., Yusof, H. M., & Sarbon, N. M. (2016). Functional and bioactive properties of fish protein hydrolysates and peptides: A comprehensive review. *Trends in Food Science & Technology*, 51, 24-33.
- Ixtaina, V. Y., Martínez, M. L., Spotorno, V., Mateo, C. M., Maestri, D. M., Diehl, B. W. K., . . . Tomás, M. C. (2011). Characterization of chia seed oils obtained by pressing and solvent extraction. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(2), 166-174.
- Jiang, Z., Sontag-Strohm, T., Salovaara, H., Sibakov, J., Kanerva, P., & Loponen, J. (2015). Oat protein solubility and emulsion properties improved by enzymatic deamidation. *Journal of Cereal Science*, 64, 126-132.
- Jin, F., Nieman, D. C., Sha, W., Xie, G., Qiu, Y., & Jia, W. (2012). Supplementation of milled chia seeds increases plasma ALA and EPA in postmenopausal women. *Plant Foods for Human Nutrition*, 67(2), 105-110.
- Lefèvre, T., & Subirade, M. (2003). Formation of intermolecular β -sheet structures: A phenomenon relevant to protein film structure at oil–water interfaces of emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 263(1), 59-67.
- Liang, H., & Tang, C. (2013). pH-dependent emulsifying properties of pea [*pisum sativum*] proteins. *Food Hydrocolloids*, 33(2), 309.

- Lin, D., Lu, W., Kelly, A. L., Zhang, L., Zheng, B., & Miao, S. (2017). Interactions of vegetable proteins with other polymers: Structure-function relationships and applications in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 68, 130-144.
- López, D. N., Ingrassia, R., Busti, P., Bonino, J., Delgado, J. F., Wagner, J., . . . Spelzini, D. (2018). Structural characterization of protein isolates obtained from chia (*salvia hispanica* L.) seeds. *Lwt Food Science and Technology*, 90, 396-402.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, L., Randall, R. J., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193, 275.
- MacRitchie, F. (1990). *Chemistry at interfaces*. San Diego, CA: Academic Press.
- Magdassi, S., & Kamyshny, A. (1996). Introduction: Surface Activity and Functional Properties of Proteins. En: *Surface Activity of Proteins: Chemical and Physicochemical Modifications*. Magdassi, S.(ed.). Nueva Yor, USA: Marcel Dekker Inc.
- Malvern Panalytical. An Introduction to Proteins in 30 minutes. Nota técnica. Malvern Instruments. 2017
- Marineli, R. d. S., Moura, C. S., Moraes, É. A., Lenquiste, S. A., Lollo, P. C. B., Morato, P. N., . . . Maróstica, M. R. (2015). Chia (*salvia hispanica* L.) enhances HSP, PGC-1 α expressions and improves glucose tolerance in diet-induced obese rats. *Nutrition*, 31(5), 740-748.
- McClements, D. *Food Emulsions: Principles, Practices, and Techniques* (edn 3), CRC Press, Boca Raton, FL (2015)
- McClements, D. J., & Gumus, C. E. (2016). Natural emulsifiers — biosurfactants, phospholipids, biopolymers, and colloidal particles: Molecular and physicochemical basis of functional performance. *Advances in Colloid and Interface Science*, 234, 3-26.
- Mojica L., Dia V. y Gonzalez E. (2015). Soy proteins. En: *Applied food protein chemistry* (141-192). Chichester, UK: Wiley-Blackwell.
- Oliva, M. E., Ferreira, M. R., Chicco, A., & Lombardo, Y. B. (2013). Dietary salba (*salvia hispanica* L) seed rich in α -linolenic acid improves adipose tissue dysfunction and the altered skeletal muscle glucose and lipid metabolism in dyslipidemic insulin-resistant rats. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 89(5), 279-289.
- Olivos-Lugo, B. L., Valdivia, M.A. & Tecante, A. (2010). Thermal and Physicochemical Properties and Nutritional Value of the Protein Fraction of Mexican Chia Seed (*Salvia hispanica* L.). *Food science and technology international*, 16, 89-96.
- Orona-Tamayo, D., Valverde, M. E., Nieto-Rendón, B., & Paredes-López, O. (2015). Inhibitory activity of chia (*salvia hispanica* L.) protein fractions against angiotensin I-converting enzyme and antioxidant capacity. *LWT - Food Science and Technology*, 64(1), 236-242.
- Osborne, T. B. *The Vegetable Proteins*; Longmans: Green, NY, 1924.
- Park J. y Reed Z. (2015). Seafood proteins and surimi. En: *Applied food protein chemistry* (393-426). Chichester, UK: Wiley Blackwell.

- Patino, J. M. R., Sánchez, C. C., Ortiz, S. E. M., Niño, M. R. R., & Añon, M. C. (2004). Adsorption of soy globulin films at the air-water interface. *Industrial Engineering and Chemistry Research*, 43, 1681-1689.
- Perez, A. A., Carrara, C. R., Sánchez, C. C., Santiago, L. G., & Rodríguez Patino, J. M. (2009). Interfacial dynamic properties of whey protein concentrate/polysaccharide mixtures at neutral pH. *Food Hydrocolloids*, 23(5), 1253-1262.
- Pérez-Orozco, Juan Pablo. (2006). Estudio de la adsorción competitiva entre polielectrolitos y tensoactivos: efecto en la microestructura, propiedades reológicas interfaciales y estabilidad de las emulsiones W1/O/W2. (Tesis de doctorado—Universidad Autónoma Metropolitana—Iztapalapa, México). [En línea]. Disponible en <http://tesiuami.izt.uam.mx/uam/aspum/presentatasis.php?recno=12815&docs=UAMI12815.pdf>. [Consulta: 06 de junio de 2018].
- Poudyal, H., Panchal, S. K., Waanders, J., Ward, L., & Brown, L. (2012). Lipid redistribution by α -linolenic acid-rich chia seed inhibits stearoyl-CoA desaturase-1 and induces cardiac and hepatic protection in diet-induced obese rats. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 23(2), 153-162.
- Ragab D.M., Babiker E.E. and Eltinay A.H. (2004). Fractionation, solubility and functional properties of cowpea (*Vigna unguiculata*) proteins as affected by pH and/or salt concentration. *Food Chemistry* 84: 207-212.
- Razumovsky, L., & Damodaran, S. (1999). Surface Activity—Compressibility relationship of proteins at the Air—Water interface. *Langmuir*, 15(4), 1392-1399.
- Román-Guerrero, Angélica. (2012). Estudio cinético termodinámico de la interacción intermolecular de antocianinas con goma de mezquite y sus fracciones (Tesis de doctorado—Universidad Autónoma Metropolitana—Iztapalapa, México). [En línea]. Disponible en <http://tesiuami.izt.uam.mx/uam/aspum/presentatasis.php?recno=12815&docs=UAMI12815.pdf>. [Consulta: 18 de enero de 2018].
- Rusanov, A.I.; Prokhorov, V.A. *Interfacial Tensiometry*; Elsevier: Amsterdam, 1996.
- Sagar, N. A., Pareek, S., Sharma, S., Yahia, E. M., & Lobo, M. G. (2018). Fruit and vegetable waste: Bioactive compounds, their extraction, and possible utilization: Fruit and vegetable waste. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(3), 512-531.
- Sandoval-Oliveros, M. R., & Paredes-López, O. (2013). Isolation and characterization of proteins from chia seeds (*salvia hispanica* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(1), 193.
- Shevkani, K., Singh, N., Rana, J. C., & Kaur, A. (2014). Relationship between physicochemical and functional properties of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) protein isolates. *International Journal of Food Science and Technology*, 49, 541–550.
- Siu, N., Ma, C., Mock, W., & Mines, Y. (2002). Functional properties of oat globulin modified by a calcium-independent microbial transglutaminase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(9), 2666-2672.
- Soria-Hernández, C., Serna-Saldívar, S., & Chuck-Hernández, C. (2015). Physicochemical and functional properties of vegetable and cereal proteins as potential sources of novel food ingredients. *Food Technology and Biotechnology*, 53(3), 269-277.

- Spiegel, v. d., M., Noordam, M. Y., & Fels-Klerx, v. d., H.J. (2013). Safety of novel protein sources (insects, microalgae, seaweed, duckweed, and rapeseed) and legislative aspects for their application in food and feed production. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(6), 662-678.
- Tandang-Silvas, M. R. G., Fukuda, T., Fukuda, C., Prak, K., Cabanos, C., Kimura, A., . . . Maruyama, N. (2010). Conservation and divergence on plant seed 11S globulins based on crystal structures. *BBA - Proteins and Proteomics*, 1804(7), 1432-1442.
- Tang, C., & Shen, L. (2014). Dynamic adsorption and dilatational properties of BSA at oil/water interface: Role of conformational flexibility. *Food Hydrocolloids*, 43, 388-399.
- Timilsena, Y. P., Adhikari, R., Barrow, C. J., & Adhikari, B. (2016a). Microencapsulation of chia seed oil using chia seed protein isolate-chia seed gum complex coacervates. *International Journal of Biological Macromolecules*, 91, 347-357.
- Timilsena, Y., Adhikari, R., Barrow, C., & Adhikari, B. (2016b). Physicochemical and functional properties of protein isolate produced from australian chia seeds. *Food Chemistry*, 212, 648-656.
- Timilsena, Y. P., Wang, B., Adhikari, R., & Adhikari, B. (2016c). Preparation and characterization of chia seed protein isolate–chia seed gum complex coacervates. *Food Hydrocolloids*, 52, 554-563.
- Ullah, R., Nadeem, M., Imran, M., Taj Khan, I., Shahbaz, M., Mahmud, A., & Tayyab, M. (2018). Omega fatty acids, phenolic compounds, and lipolysis of cheddar cheese supplemented with chia (*salvia hispanica* L.) oil. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42(4), n/a.
- Vázquez, O.A., Rosado, R.G., Chel, G.L., & Bentancur, A.D. (2009). Physicochemical properties of a fibrous fraction from chia (*salvia hispanica* L.). *LWT - Food Science and Technology*, 42(1), 168-173.
- Vázquez-Ovando, J., Rosado-Rubio, J., Chel-Guerrero, L., & Betancur-Ancona, D. (2010). Dry processing of chia (*salvia hispanica* L.) flour: Chemical characterization of fiber and protein. *CyTA - Journal of Food*, 8(2), 117-127.
- Vázquez-Ovando, A., Betancur-Ancona, D., & Chel-Guerrero, L. (2013). Physicochemical and functional properties of a protein-rich fraction produced by dry fractionation of chia seeds (*salvia hispanica* L.). *CyTA - Journal of Food*, 11(1), 75-80.
- Vernon-Carter, E.J & Sherman, P. (1981) Rheological properties and applications of mesquite tree (*Prosopis juliflora*) gum. 3. The influence of mesquite gum on the interfacial tension between oil and water, *Journal of Dispersion Science and Technology*, 2 (1981) 381–396.
- Vuksan, V., Whitham, D., Sievenpiper, J. L., Jenkins, A. L., Rogovik, A. L., Bazinet, R. P., . . . Hanna, A. (2007). Supplementation of conventional therapy with the novel grain salba (*salvia hispanica* L.) improves major and emerging cardiovascular risk factors in type 2 diabetes: Results of a randomized controlled trial. *Diabetes Care*, 30(11), 2804-2810.
- Walstra, P. & Van Vliet, T., (2003). Functional properties. En: *Industrial Proteins in Perspective*, vol. 4 (9-30). Oxford, UK: Elsevier Science B.V.

- Ward, A. F. H., & Tordai, L. (1946). Time-dependence of boundary tensions of solutions I. the role of diffusion in time-effects. *The Journal of Chemical Physics*, 14(7), 453-461.
- Xu, S., & Damodaran, S. (1994). Kinetics of adsorption of proteins at the air-water interface from a binary mixture. *Langmuir*, 10(2), 472-480.
- Ye, H. (2006). Simultaneous determination of protein aggregation, degradation, and absolute molecular weight by size exclusion chromatography–multiangle laser light scattering. *Analytical Biochemistry*, 356(1), 76-85.
- Yong, Y. H., Yamaguchi, S., & Matsumura, Y. (2006). Effects of enzymatic deamidation by protein-glutaminase on structure and functional properties of wheat gluten. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(16), 6034-6040.
- Yoshie-Stark, Y., Wada, Y., & Wäsche, A. (2008). Chemical composition, functional properties, and bioactivities of rapeseed protein isolates. *Food Chemistry*, 107(1), 32-39.
- Yoshizawa, T., Shimizu, T., Yamabe, M., Taichi, M., Nishiuchi, Y., Shichijo, N., . . . Hashimoto, H. (2011). Crystal structure of basic 7S globulin, a xyloglucan-specific endo- β -1,4-glucanase inhibitor protein-like protein from soybean lacking inhibitory activity against endo- β -glucanase. *FEBS Journal*, 278(11), 1944-1954.
- Zettel, V., & Hitzmann, B. (2016). Chia (*Salvia hispanica* L.) as fat replacer in sweet pan breads. *International Journal of Food Science & Technology*, 51(6), 1425-1432.
- Zielińska, E., Karaś, M., & Baraniak, B. (2018). Comparison of functional properties of edible insects and protein preparations thereof. *Lwt Food Science and Technology*, 91, 168-174.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

Folio 00255

Matrícula 2161801434

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD SUPERFICIAL DE FRACCIONES DE PROTEÍNA DE CHÍA (Salvia hispanica L) CON DISTINTA HIROFOBICIDAD

En la Ciudad de México, se presentaron a las 11:00 horas del día 30 del mes de julio del año 2018 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DR. FRANCISCO CRUZ SOSA
- DR. RUBEN JIMENEZ ALVARADO
- DRA. ANA GUADALUPE ESTRADA FERNANDEZ
- DR. CESAR PEREZ ALONSO


Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA
DE: ABRAHAM GARCIA JIMENEZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:


APROBAR

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.




ABRAHAM GARCIA JIMENEZ
ALUMNO

REVISÓ




LIC JULIO CESAR DE LARA ISSASI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISION DE CBS




DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTE



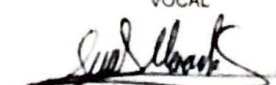
DR FRANCISCO CRUZ SOSA

VOCAL



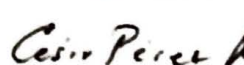
DR RUBEN JIMENEZ ALVARADO

VOCAL



DRA ANA GUADALUPE ESTRADA FERNANDEZ

SECRETARIO



DR. CESAR PEREZ ALONSO