



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**OBTENCIÓN PREPARATIVA Y
CARACTERIZACIÓN DE POLIFENÓLES DE
CHÍA (*Salvia Hispanica*) PARA LA
FUNCIONALIZACIÓN DE HIDROLIZADOS DE
COLÁGENO**

T E S I S

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

P R E S E N T A

ANGELICA VANESA VERA RAMOS



CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX.

2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesora. María de los Ángeles Valdivia López

VOCAL: Profesor. Juan Carlos Ramírez Orejel

SECRETARIO: Profesor. Hiram Fernando Ramírez Cahero

1er. SUPLENTE: Profesor. Roeb García Arrazola

2º SUPLENTE: Profesor. José Alfredo Vázquez Martínez

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorios 322 y 323, conjunto E, Facultad de Química, Ciudad Universitaria

ASESOR DEL TEMA:

M. en C. María de los Ángeles Valdivia López

SUPERVISOR TÉCNICO:

Dr. José Alfredo Vázquez Martínez

SUSTENTANTE (S):

Angélica Vanesa Vera Ramos

CONTENIDO

Resumen	4
Abreviaturas.	5
Introducción.	6
Objetivo General.	7
Objetivos Particulares.	7
1) Antecedentes.	
1.1 Chía.	8
1.2 Antioxidantes.	11
1.3 Alimentos funcionales.	16
2) Metodología	
2.1 Métodos.	20
2.1.1 Extracción e identificación de compuestos polifenólicos de la semilla de Chía.	20
2.1.2 Técnicas cromatográficas.	22
2.1.3 Funcionalización del Hidrolizado Proteico.	24
3) Resultados y Discusión	
3.1 Extracción de Polifenoles de Chía	28
3.2 Separación de polifenoles mediante cromatografía preparativa en columna	34
3.3 Determinación estructural de polifenoles de Chía mediante espectroscopia de RMN-H ¹ .	39
3.4 Acoplamiento de Proteína	48
Conclusiones	64
Referencias	65

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue obtener un colágeno hidrolizado funcionalizado vía enzimática a través de la unión covalente de polifenoles provenientes de un extracto de semillas de Chía. Para este estudio, se extrajeron y separaron por medio de cromatografía en columna preparativa 1.1684 mg equivalentes de ácido cafeico/g semilla de Chía (*Salvia Hispánica L.*), y se realizó su identificación por medio de espectros de RMN- H^1 para determinar el tipo de compuesto polifenólico. Una vez recuperado, se identificó Quercetina y Kaempferol en el extracto polifenólico proveniente de la semilla de Chía, y este a su vez se sometió a un acoplamiento enzimático con un hidrolizado de colágeno comercial para propiciar su acoplamiento con ciertos grupos funcionales de la proteína hidrolizada. Se evaluaron la capacidad antioxidante del hidrolizado funcionalizado y la eficiencia de esta unión con soluciones estándar de quercetina, kaempferol y ácido cafeico obteniendo rendimientos para todas las muestras de aproximadamente 99% por determinación de antioxidante remanente. Para conocer la certeza de la unión covalente entre el antioxidante y los grupos funcionales del hidrolizado proteico, se sintetizó vía química el tripéptido Boc-Hyp-Gly-Lys-OMe, que comprobó la unión covalente del polifenol al tripéptido Boc-Hyp-Gly-Lys-OMe.

ABREVIATURAS

ABTS: 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzotiazolina-6sulfanato).

AC: ácido cafeico.

AcOEt: acetato de etilo.

AGL: ácidos grasos libres.

AET: actividad equivalente de Trolox

Alfa: nivel de significancia.

ARS: Servicio de Investigación Agrícola

BHA: hidroxibutilanisol.

BHT: butilhidroxitolueno.

Boc: grupo *tert*-butiloxicarbonilo.

Cbz: grupo carboxibenzilo.

CC: cromatografía en columna.

CCF: cromatografía en capa fina.

CCP: cromatografía en capa preparativa.

CD₃OD: metanol deuterado.

CDCl₃: deuterioformo.

CDMX: Ciudad de México.

C.V.: Coeficiente de variabilidad.

D₂O: óxido de deuterio.

DH: grado de hidrólisis proteica.

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo.

E: fases recuperadas de la primera CC del extracto en éter etílico.

EAC: equivalentes de ácido cafeico.

EAG: equivalentes de ácido gálico.

EDC: N-(3-dimetilpropil)-N'-etilcarbodiimida, hidrocloreuro.

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético.

ER: equivalentes de Rutina.

FDA: Administración de Drogas y Alimentos, USA.

FP: grenetina a granel, farmacia Paris.

HPLC: cromatografía líquida de alta eficacia.

HPLC-MS: cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a espectrometría de masas.

K: kaempferol.

λ : longitud de onda.

λ max: longitud de onda máxima.

GP/GC: grenetina comercial de venta a granel.

GRAS: alimento generalmente reconocido como seguro.

kDa: unidad; kiloDalton.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

Q: quercetina.

RF: relación entre las distancias recorridas por los solutos y el eluyente en CCF.

RMN: resonancia magnética nuclear.

RMN-H¹: resonancia magnética nuclear de Hidrogeno.

M: fases recuperadas de la segunda CC del extracto en éter etílico.

MetOH: metanol.

SIAVI: Sistema de Información Comercial Vía Internet.

TBHQ: *terbutil-hidroquinona*.

TFA: ácido trifluoroacético.

THF: tetrahidrofurano.

TMS: tetrametilsilano.

U: unidad de actividad enzimática.

USA: Estados Unidos Americanos.

USD: tipo de cambio, dólar estadounidense

USDA: Departamento de Agricultura, USA.

UV: ultravioleta.

INTRODUCCIÓN

Durante la última década, la palabra antioxidante ha adquirido la misma importancia que las vitaminas, minerales y proteínas en lo que se refiere a salud preventiva. La población ya no sólo se preocupa por enfermedades infecciosas ni por deficiencias nutricionales clásicas (Nahar Z. *et al.*, 2013), sino que actualmente las preocupaciones se basan o están orientadas hacia la prevención de enfermedades degenerativas, donde los antioxidantes pueden jugar un papel fundamental. Recientemente, la Chía (*Salvia hispanica L.*) ha sido redescubierta para su estudio debido a que ofrece grandes ventajas tecnológicas y nutrimentales, de las cuales resaltan su alto contenido en fibra y ácidos grasos omega 3 y 6. Aunque la diversidad de componentes presentes en la semilla es muy variada, los antioxidantes son sin duda los más importantes. Estos antioxidantes son en su mayoría compuestos polifenólicos naturales, se encuentran tanto en forma libre (aglicona) como en unión con un azúcar (glucosilada), adquiriendo mayor solubilidad en agua (Valdivia-Lopez y Tecante , 2015), en este contexto desde los primeros estudios realizados por Taga, Miller y Pratt, (1984) hasta estudios actuales, tales como los realizados por Cotabarren., *et al.*, (2018) y Bodoira, *et al.*, (2017), donde se ha informado la presencia significativa de antioxidantes en la semilla, tales como ácido cafeico, cinámico y clorogénico, así como gran cantidad de flavonoides como la quercetina.

De igual forma, los compuestos bioactivos provenientes de fuentes naturales se prefieren por su fácil uso y sus nulos efectos secundarios para el desarrollo de alimentos funcionales o nutraceuticos (Galanakis, 2012, Galanakis, 2013), como los hidrolizados de proteína, que potencian características funcionales como la baja viscosidad, alta capacidad de dispersión y alta solubilidad en medios acuosos, que les conceden ventajas en muchos productos alimenticios respecto a las proteínas originales (Yin, Tang, Cao, Wen y Yang, 2008).

Una de las aplicaciones más importantes de los hidrolizados de proteína es su utilización como fuente de nitrógeno en dietas enterales para niños y/o adultos enfermos (Benítez, Ibarz y Pagan, 2009); así como en el tratamiento contra alergias provocadas por alimentos, mediante inmunoterapias de alérgenos específicos, reduciendo significativamente las alteraciones provocadas por las alergias (Lozano D., 2017); otro uso es como suplemento alimenticio (alimento funcional) para todo tipo de personas. La incorporación covalente de

antioxidantes a grupos funcionales presentes en los hidrolizados proteicos es una forma prometedora de brindarle mayor valor agregado a dichas aplicaciones, e incluso la implementación de esta incorporación en diversos productos comerciales, no sólo alimenticios.

Este trabajo tiene como propósito fundamental obtener hidrolizados de colágeno activos a través del acoplamiento covalente de compuestos antioxidantes provenientes de la semilla de chía, mediante una vía enzimática para evaluar su potencial uso como suplemento.

OBJETIVOS

Objetivo General

- Obtener hidrolizados de colágeno activos a través del acoplamiento covalente de compuestos antioxidantes provenientes de la semilla de Chía para evaluar su potencial uso como suplemento.

Objetivos Particulares

- Identificación y purificación de compuestos polifenólicos del extracto ácido-etanólico de semillas de Chía por medio de cromatografía en columna preparativa y espectros de RMN- H^1 , para su uso como antioxidante en la reacción de acoplamiento.
- Comprobar la unión covalente entre un polifenol (estándar de quercetina y kaempferol) y los grupos funcionales de un hidrolizado comercial de colágeno, mediante el acoplamiento enzimático de los mismos.

1) ANTECEDENTES

- 1.1 Chía

La Chía (*Salvia hispanica L.*) pertenece a la categoría de salvia de la familia Labiatae, nativa del sureste de México y del noreste de Guatemala. Es una planta subtropical que requiere menos agua en comparación con otros cultivos, por lo que se cultiva todo el año (Cahill, 2004), que incluye al menos 900 especies de semilla pertenecientes a la familia *Labiatae* (Ixtaina *et al.* 2011).

La mayoría de las semillas de Chía miden aproximadamente 2 mm de largo, tienen un color que puede variar entre negro, gris y blanquecino, son de forma ovalada y delgada (ver Figura 1.1); su contenido de humedad total es de aproximadamente 2-5% (Muñoz, Cobos, Diaz y Aguilera, 2012) y destacan entre las demás semillas por su alto nivel nutricional y valor funcional; la composición química y valor funcional de la semilla varía de acuerdo con las condiciones climáticas y la localización de la plantación (Pereira, *et al.*, 2016); ciertos estudios demuestran que la localización geográfica y clima pueden influir en la concentración nutrimental de la semilla de Chía (Ayerza, 2009).



Figura 1.1. Semillas de Chía (*Salvia Hispánica L.*)

Las semillas de chía fueron ampliamente utilizadas por tribus aztecas para usos tanto alimenticios como medicinales, e incluso en pinturas (Coates y Ayerza (h), 1996); actualmente, la semilla entera se usa para la preparación de bebidas refrescantes, el aceite se utiliza como sustituto del aceite de uso cotidiano en la cocina. La mezcla de Chía con aje

(*Coccus axin*) se emplea en las regiones del sur del país como Chiapas o Oaxaca, como laca para artesanías (Hernández y Miranda, 2008).

- 1.1.1 Composición química de la semilla de Chía.

De acuerdo con los censos de investigación realizadas por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) en 2017, la semilla de Chía aporta:

Tabla 1.1 Composición química de semilla de Chía.

	<i>g/ 100 g de semilla</i>
<i>Humedad</i>	5.8
<i>Proteína</i>	16.54
<i>Lípidos Totales</i>	30.74
<i>Carbohidratos</i>	42.12
<i>Fibra dietética total</i>	4.8

Fuente: Base de datos censo nutrimental (USDA/ARS, 2018).

Tabla 1.2 Determinación de elementos relevantes en la semilla de Chía.

	<i>mg/ 100 g de semilla</i>
<i>Calcio (Ca)</i>	631
<i>Magnesio (Mg)</i>	335
<i>Fosforo (P)</i>	860
<i>Potasio (K)</i>	407
<i>Vitamina C (ácido Ascórbico total)</i>	1.6
<i>Vitamina A (IU)</i>	54
<i>Niacina</i>	8.83

Fuente: Base de datos censo nutrimental (USDA/ARS, 2018).

*IU: Equivalente biológica de 0.3 µg de retinol.

La semilla de Chía contiene una cantidad significativa de lípidos (aproximadamente 40% del peso total), donde casi el 60% de éstos son triglicéridos con Omega-3. La fibra dietética

constituye más del 30% del peso total de la semilla, y aproximadamente el 19% son proteínas de alto valor biológico (Ixtaina *et al.*, 2011).

Desde los primeros estudios (Taga, 1984) hasta aquellos más recientes (Bodoira R *et al.*, 2017), se ha informado la presencia de antioxidantes en extractos etanólicos de la semilla, tales como ácido cafeico, cinámico y clorogénico, junto con algunos flavonoides como miricetina, quercetina y kaempferol. En la figura 1.2 se muestra la estructura base de algunos compuestos fenólicos presentes en la semilla de Chía. La actividad antioxidante de los extractos corresponde al tipo y concentración de los compuestos fenólicos que contiene la semilla dependiendo de la región y la zona de cultivo.

Trabajos recientes sobre *Salvia Hispanica L* se han enfocado en el estudio de sus componentes fotoquímicos y su extracción. Por ejemplo, Reyes-Caudillo, Tecante y Valdivia-Lopez (2008) han informado que el contenido de polifenoles en las semillas de Chía es aproximadamente de 0.89-0.92 mg EAG/g semilla; así mismo, se ha determinado que la capacidad antioxidante del aceite es relativamente baja debido a que la mayoría de los compuestos polifenólicos presentes en la semilla son de naturaleza hidrofílica (Da Silva *et al.*, 2017).

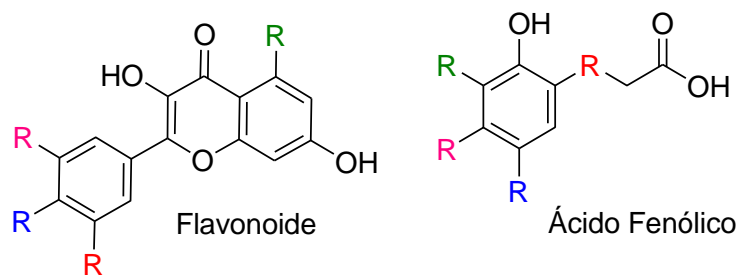
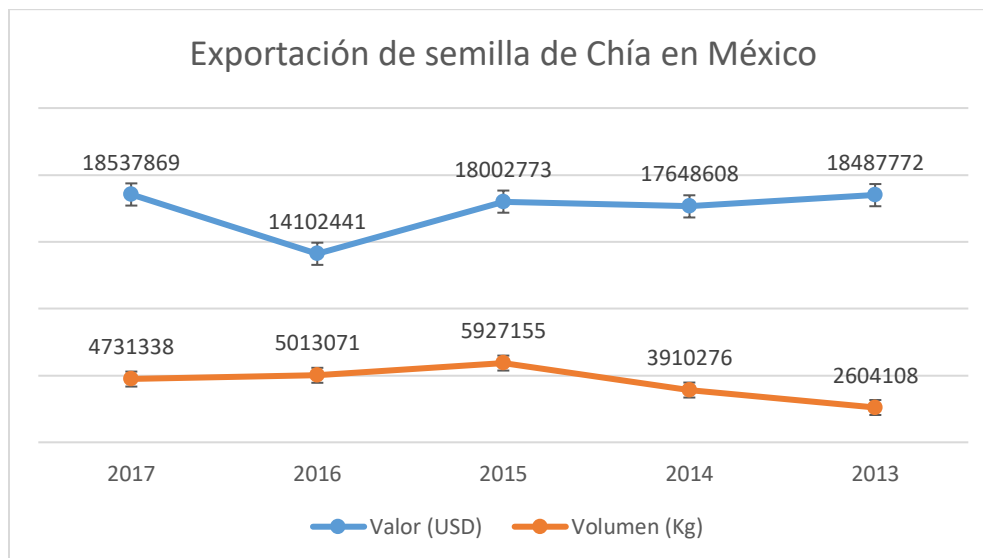


Figura 1.2 Esquema estructural de compuestos fenólicos presentes en la semilla de Chía.

Actualmente, las semillas de Chía son una fuente potencial de nutrimentos para la industria alimenticia; aunque, la semilla no es un alimento muy conocido, la producción global se ha incrementado, debido a su popularidad y a sus propiedades “saludables”. Estas semillas se utilizan como suplemento alimenticio, en barras de cereal y en galletas en USA, América Latina y Australia (Dunn , 8th February 2010). México se encuentra entre los principales

exportadores de Chía en el mundo, alcanzando alrededor de 4,731,338 kg de semilla anuales, con un valor aproximado de ingreso superior a 18,537,869 USD en 2017, ver Figura 1.3.



SIAVI, Secretaria de Economía, México 2018. Estadística anual de fracción arancelaria 12.1207.120799.12079999.

Figura 1.3 Exportación de semilla de Chía durante los últimos 5 años.

• 1.2 Antioxidantes

La oxidación es una reacción química que implica la transferencia de electrones, desde una molécula rica en electrones a otra con déficit de éstos. La molécula deficiente en electrones se denomina agente oxidante (Bargagli, 2000).

En los alimentos, el resultando de una oxidación provoca rancidez de los lípidos, degradación de vitaminas, pigmentos y aminoácidos, que conllevan una disminución de nutrimentos esenciales en la dieta. Si se permite que esta descomposición ocurra sin control en el alimento o incluso en un solo ingrediente, el consumidor puede tener riesgos y deficiencias nutritivas al consumirlo (Rumsey, 2016). Los antioxidantes juegan un papel fundamental en la reducción de los procesos oxidativos en los alimentos y en el cuerpo humano. En los productos alimenticios, los antioxidantes pueden retardar la oxidación de proteínas, la peroxidación de los mismos, la formación de productos secundarios durante la peroxidación

de lípidos, y también ayuda a la conservación de sabores, texturas y colores en los alimentos durante su almacenamiento (Sila y Bougatef, 2016).

Miembros de la Junta de Alimentos y Nutrición del Consejo Nacional de Investigación en EUA, definieron antioxidante dietético como una sustancia presente en los alimentos que disminuye significativamente los efectos adversos de las especies de oxígeno reactivo, especies de nitrógeno reactivo o ambas en la función fisiológica normal de los seres humanos (Young, Erdman y King, 1998)

Los antioxidantes naturales, se encuentran presentes en diversas frutas, verduras y semillas, protegen al cuerpo humano contra la acción negativa de los radicales, inhibiendo muchas enfermedades crónicas y previendo la oxidación de los lípidos en los alimentos. Basándose en sus mecanismos de acción, los antioxidantes se pueden clasificar en primarios y secundarios (Fennema, 2010).

Los antioxidantes primarios reaccionan con radicales alcoxilo, hidroperoxilo o peroxilo produciendo alcóxidos, hidroperóxidos, peróxidos y radicales de antioxidantes (A^*) estables y de baja energía, los cuales son significativamente menos reactivos en las reacciones de propagación (McClements y Decker, 2006); de esta forma, actúan donando radicales H^* y eliminando radicales de alta energía. Los antioxidantes primarios, como el BHA, BHT, TBHQ, tocoferoles y flavonoides, son generalmente mono o polihidroxifenoles (Fennema, 2010).

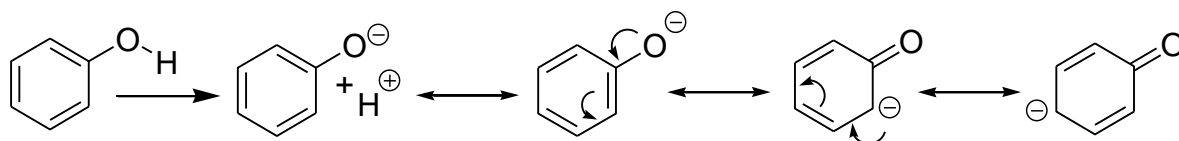
Por otro lado, los antioxidantes secundarios o sinergistas, previenen la oxidación y, en presencia de los primarios, aumentan la actividad inhibitoria. Esta clase de antioxidantes cumplen funciones como quelantes o secuestrantes de metales (EDTA, ácido cítrico y ácido fólico) y como eliminadores de oxígeno singulete (Choe y Min, 2006).

- 1.2.1 Compuestos fenólicos

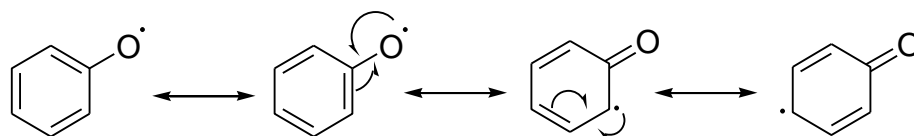
Los compuestos fenólicos son componentes importantes de muchas plantas comestibles incluyendo la soya, la canola, la linaza y la aceituna, que se utilizan como alimento o como fuente de ingredientes alimenticios (Alu'datt, Rababah, Ereifej y Alli, 2013). En la industria

alimenticia, los compuestos fenólicos se han utilizado como antimicrobianos, espesantes, agentes aromatizantes (Ayala, et al, 2011). Además, son potentes conservadores debido a su actividad antioxidante; por ejemplo, los compuestos fenólicos presentes en el té verde se utilizan para extender la vida de anaquel de las salchichas de puerco (Siripatrawan y Noipha, 2012) y prevenir la retrodegradación de almidón de arroz (Wu, Chen, Li, y Li, 2009).

Los polifenoles son antioxidantes potentes que complementan las funciones antioxidantes de algunas vitaminas y enzimas en contra del estrés oxidativo causado por el exceso de especies reactivas de oxígeno (Brand-Williams, Cuvelier y Berset, 2004). Las propiedades antioxidantes de los compuestos fenólicos se deben a la presencia de elementos estructurales aromáticos, como restos de catecol y grupos hidroxilo que están directamente involucrados en la actividad antiradical (Heim, Tagliaferro, y Bobilya, 2002). Una cualidad importante de los grupos fenólicos es su acidez, dada por la polaridad del enlace formado entre el oxígeno y el hidrógeno; la desprotonación del grupo forma el correspondiente anión fenóxido (ver Figura 1.4).



a) Formación de ión fenóxido y su deslocalización electrónica.



b) Formación de especies radicalarias a partir del radical fenóxido

Figura 1.4 a) Formación del ion fenóxido y deslocalización de los e^- desapareados.
b) Formación de especies radicalarias a partir del radical fenóxido.

Los antioxidantes fenólicos son excelentes donadores de hidrógeno o electrones y sus intermedios radicalarios son relativamente estables debido a la deslocalización por resonancia y a la carencia de posiciones para el ataque de O_2 molecular. Las hidroquinonas, por ejemplo, reaccionan con radicales hidroperoxilo, formando híbridos de resonancia estables (Fennema, 2010).

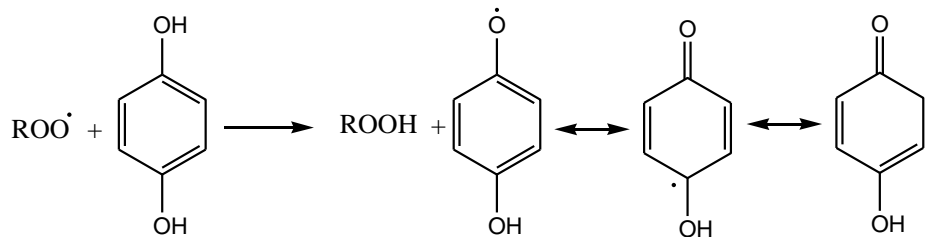
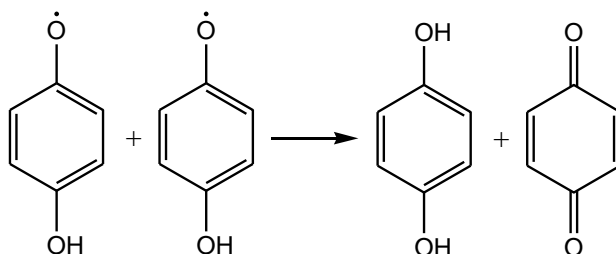
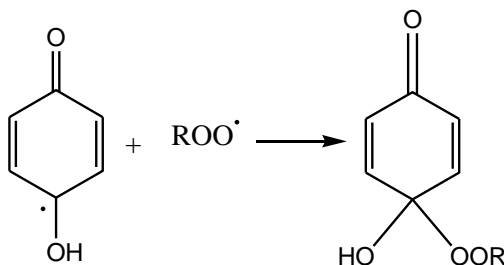


Figura 1.5 Formación de ion fenóxido por medio de hidroquinona y radical hidroperoxilo.

Los radicales semiquinona intermedios pueden sufrir diversas reacciones para formar productos más estables; pueden reaccionar entre sí para formar dímeros o dismutarse para dar quinonas y la molécula inhibidora original (Fennema, 2010).



a) Reacción de dismutación entre semiquinonas.



b) Reacción con otro radical.

Figura 1.6 Reacción de formación de quinonas a partir de radical intermedio.

Los fenoles monohidratados no pueden formar semiquinonas o quinonas como tales, forman intermediarios radicalarios con una moderada deslocalización por resonancia y pueden ofrecer también dificultades estéricas. Los grupos *t*-butilo reducen la iniciación de cadenas (por los radicales alcoxi) tras la donación inicial de hidrogeno (Fennema, 2010).

- 1.2.1.1 Clasificación

Los polifenoles constituyen un grupo de compuestos numerosos distribuidos ampliamente en el reino vegetal; actualmente, se conocen más de 8000 estructuras fenólicas, entre las cuales se han identificado más de 4000 flavonoides (Harborne y Willians, 2000). Aunque los polifenoles se caracterizan químicamente por su estructura fenólica, es un grupo muy diverso de productos naturales, mismo que contiene varios subgrupos fenólicos.

- 1.2.1.2 Ácidos fenólicos

Los ácidos fenólicos son compuestos polifenólicos no flavonoides que se pueden dividir principalmente en dos tipos: los derivados del ácido benzoico y aquellos del ácido cinámico (Figura 1.7). Mientras que las frutas y verduras contienen muchos ácidos fenólicos en forma libre, en los granos y semillas se encuentran en forma glicosilada, lo que hace necesaria una hidrólisis previa (ácida o alcalina) y/o por vía enzimática (Kim, Tsao, Yang y Cui, 2006).

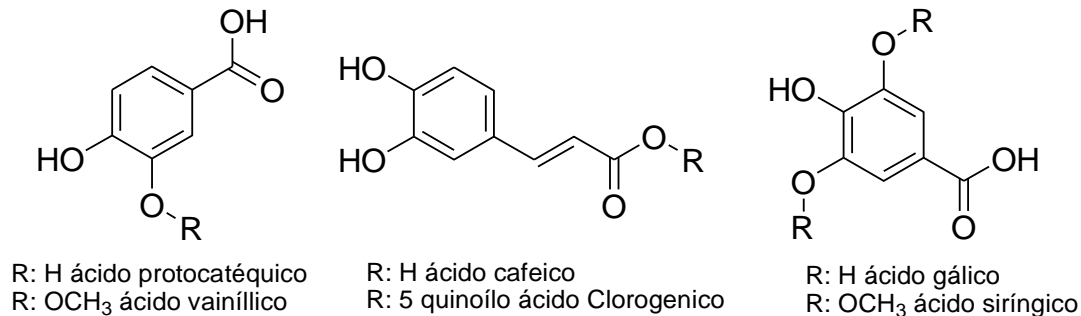


Figura 1.7 Ejemplo de estructuras químicas de ácidos fenólicos.

- 1.2.1.3 Flavonoides

Los flavonoides tienen una estructura general de anillos compuestos por 6C-3C-6C en la que las dos unidades de 6C (anillo A y anillo B) son de naturaleza fenólica (ver Figura 1.8). Debido al patrón de hidroxilación y a las variaciones en el anillo cromano (anillo C), los flavonoides se dividen en subgrupos diferentes: antiocianinas, 3-flavanoles, flavonas, flavanonas y flavonoles. Las estructuras básicas de los flavonoides son agliconas; sin

embargo, en las plantas, la mayoría de estos compuestos se encuentran glucosilados (Tsao, 2010).

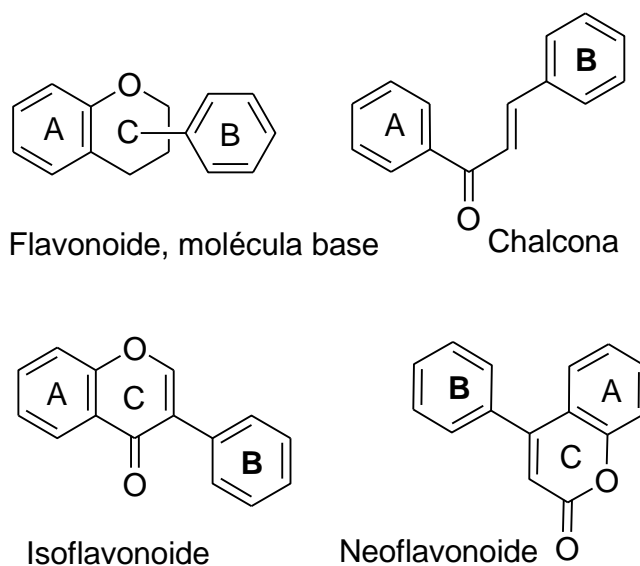


Figura 1.8 Estructuras típicas de flavonoides.

• 1.3 Alimentos Funcionales

Los alimentos funcionales han recibido gran atención en los últimos años como componentes de un estilo de vida saludable. El término "funcional" se utiliza para referirse a un alimento que se consume regularmente para proporcionar beneficios fisiológicos o para reducir el riesgo de enfermedades crónicas además de sus funciones nutrimentales básicas. Muchos alimentos nuevos contienen compuestos funcionales bioactivos, incluyendo fibra, prebióticos, probióticos, oligosacáridos, fitoquímicos, antioxidantes y otras sustancias que confieren propiedades funcionales o efectos beneficiosos sobre la salud humana (Pacheco y Sgarbieri, 2001). Los alimentos funcionales ofrecen beneficios, como la reducción del riesgo de enfermedades crónicas degenerativas (Al-Sheraji *et al.*, 2013).

- 1.3.1 Hidrolizados proteínicos

Los hidrolizados de proteínas se producen a partir de fuentes proteínicas purificadas calentadas en medio ácido y/o alcalino o, preferentemente, con la adición de enzimas proteolíticas, seguidas de procedimientos de purificación. Cada hidrolizado de proteína es una mezcla compleja de péptidos de diferente longitud de cadena con aminoácidos libres, definidos por un valor conocido como grado de hidrólisis (DH) (Grimble, 2000; Cheison *et al.*, 2017).

Los hidrolizados de proteína se utilizan debido a su fácil absorción en el cuerpo humano. Algunos estudios han demostrado que una dosis de 35 g de hidrolizado de caseína se absorbe rápidamente, y presenta aproximadamente un 30% más de eficiencia en la estimación de la síntesis de proteínas del músculo esquelético que la caseína intacta cuando se mide en un período de 6 h (Kim y Egan, 2008). Por lo anterior, la utilización de éstos ha aumentado.

- 1.3.2 Colágeno Hidrolizado

Se ha demostrado que los péptidos de colágeno, es decir aquellos productos de degradación enzimática de los colágenos, tienen varias actividades biológicas, por ello se han utilizado, por ejemplo como regeneradores de diversos tejidos (Gaffney, Edgell, Dawson, Ford y Stocker, 1996).

Los péptidos bioactivos son pequeños fragmentos de proteína muy específicos que se encuentran inactivos dentro de la proteína. La hidrólisis enzimática en proteínas libera los péptidos bioactivos, conformados aproximadamente de 2-20 aminoácidos en secuencias específicas de grupos hidrofóbicos (Pal y Suresh, 2017). El colágeno hidrolizado está compuesto por una serie de péptidos de bajo peso molecular (0,3-8 kDa), generados a partir del colágeno concentrado en los huesos, la piel y el tejido conectivo de diversos animales, principalmente bovinos. El colágeno está formado por tres cadenas polipeptídicas en hélice, con zonas telopepticas no helípticas al final de la cadena (Jhonston-Banks *et al.*, 1990).

Para propósitos industriales alimenticios, se obtiene primero la gelatina del material “crudo” por hidrólisis parcial ácida o alcalina, y posteriormente los hidrolizados de colágeno se producen por hidrólisis enzimática de la gelatina bajo condiciones controladas (Bambali *et*

al., 2007). Generalmente, las moléculas de colágeno se desnaturalizan e hidrolizan para formar gelatina (100 kDa); la gelatina puede entonces descomponerse en péptidos más pequeños utilizando enzimas específicas (proteinasas). Debido a su bajo peso molecular, el colágeno hidrolizado es fácilmente digerible, absorbido y distribuido en el cuerpo humano.

El colágeno y la gelatina se han utilizado durante mucho tiempo como alimento funcional y/o suplemento. La Administración de Drogas de los Estados Unidos (FDA) ha clasificado la gelatina, como un péptido de colágeno categoría GRASS (generalmente reconocido como seguro), basándose en los resultados de diversas investigaciones, la Organización Mundial de la Salud (OMS) han confirmado que el colágeno hidrolizado es seguro y que sólo ocasionalmente presenta efectos secundarios, tales como náuseas, flatulencia o dispepsia (Sibila, *et al.*, 2015).

2) METODOLOGIA EXPERIMENTAL

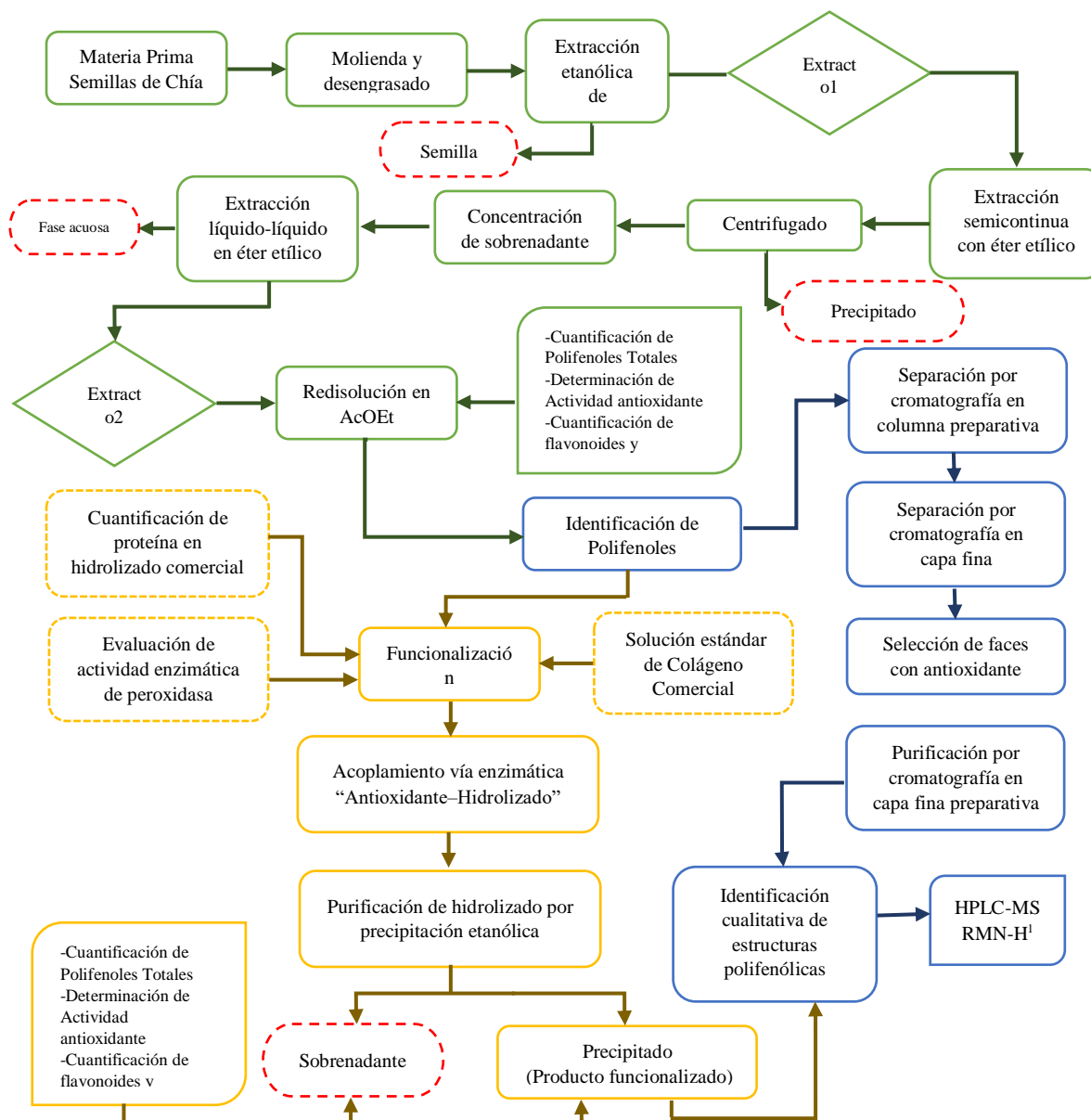


Figura 2.1 Esquema general.

➤ 2.1 Métodos. 2.1.1 Extracción e identificación de compuestos polifenólicos de la semilla de Chía.

Las muestras de las semillas de Chía, obtenidas en la central de abastos de la CDMX, se congelaron a -18°C ; posteriormente, se molieron finamente en un molino *IKA WERKE MF 10*, a 6000 rpm. A continuación, 1 kg de polvo de Chía seca se desengrasó usando un equipo Soxhlet con 5 L de hexano (p.e. $35-60^{\circ}\text{C}$) durante 36 horas. Una vez desengrasados, 50g de harina de Chía se mezclaron con 500mL de solución metanólica de HCl 1.2M, y se dejó en agitación continua en un sistema de reflujo a 60°C por 4 horas. Con este paso, se buscó generar la mayoría de enlaces glucosídicos para obtener el mayor número de agliconas. A continuación, se obtuvo un extracto (extracto 1, Figura 2.1) que se concentró en un evaporador rotatorio (*Büchi Rotavapor R-205*), el cual se mezcló con 250 mL de éter etílico que se dejó, igualmente, en agitación continua en un sistema de reflujo a 60°C por 3 horas.

El sobrenadante se concentró en un rotavapor a 40°C hasta obtener un extracto color café oscuro; posteriormente, se realizó una extracción continua líquido-líquido del mismo utilizando 100 mL de éter etílico hasta que el disolvente aparentó poco o nulo color. Después, la fase orgánica de la extracción se evaporó en un rotavapor a 40°C y el extracto obtenido se re-disolvió en un volumen mínimo de AcOEt (5 mL).

➤ 2.1.2 Determinación de Polifenoles Totales

Se determinó el contenido de polifenoles totales utilizando el método de Folin-Ciocalteu, mediante una curva patrón de ácido cafeico ($20-500\ \mu\text{g/mL}$); que incluyo la medición espectrofotométrica de las absorbancias de las disoluciones estándar de ácido cafeico y del extracto de Chía a $\lambda=750\ \text{nm}$ en un espectrofotómetro *Perkin-Elmer Lambda 3B*, los resultados se obtuvieron como mg Equivalentes de ácido cafeico por gramo de muestra (mg EAC/ g de muestra).

➤ 2.1.3 Evaluación de la capacidad Antioxidante

Se determinó la capacidad antioxidante del extracto de Chía utilizando el efecto secuestrante de dos radicales mediante los métodos descritos enseguida:

- a) Método ABTS⁺. Según la metodología desarrollada por Re., *et al.*, (1999) y descrita por Kuskoski *et al.* (2004) el radical ABTS⁺ se obtiene de la reacción de ABTS (7 mM) con persulfato potásico K₂S₂O₈ (concentración final 2.45 mM) incubados a temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$) en oscuridad durante 16 h. Una vez formado el radical ABTS⁺ se diluye con etanol hasta obtener un valor de absorbancia comprendido entre 0,70 ($\pm 0,1$) a $\lambda_{\text{máx}}=754$ nm.
- b) Método DPPH[•]. Este método, desarrollado por Brand-Williams *et al.* (1995), se basa en la reducción de la absorbancia del radical DPPH[•] a 515 nm, utilizando antioxidantes.

En la experimentación de esta tesis, se modificó el método original y se utilizó el radical DPPH[•] a una concentración de 100 μM disuelto en metanol al 80% y a una $\lambda=517$ nm. Se añadió 0.1 mL de extracto o muestra patrón, la mezcla se homogenizó cuidadosamente, y se mantuvo en oscuridad durante 30 minutos. La concentración de DPPH[•] en el medio de reacción se calculó a partir de una curva de calibración. Los resultados se expresaron en AET, o sea, en actividad equivalente a Trolox ($\mu\text{M/g}$ de extracto o muestra). El antioxidante sintético de referencia Trolox, a una concentración de 0,08-1,28 mM en disolución de metanol al 80%, se ensayó en las mismas condiciones, expresándose los resultados en AET.

➤ 2.1.4 Determinación de Flavonoides Totales

Se cuantificó la cantidad de flavonoides totales mediante la modificación del método colorimétrico donde se forma un complejo colorido flavonoide-aluminio reportado por Chang, Yang, Wen y Chern (2002). En la presente tesis se utilizó una solución de 0.3 mg/mL de glucósido de rutina grado HPLC 95% (Sigma-Aldrich) como estándar de prueba en metanol al 80%. Para ello, se tomaron 50 μL de muestra del extracto metanólico de Chía y se adicionaron 75 μL de NaNO₂ 5% y 2.7 mL de agua destilada, la mezcla se dejó en reposo

por 5 minutos y posteriormente se adicionaron 150 μL de AlCl_3 al 10%; dicha mezcla se dejó en reposo por 10 minutos más a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se midió la absorbancia en un espectrofotómetro *Perkin-Elmer Lambda 3B* a una $\lambda=415$ nm. El contenido de flavonoides totales se reportó en mg ER (equivalentes de Rutina)/g de extracto o semilla desengrasada de Chía.

➤ 2.1.5 Determinación de Flavonoles Totales

Se cuantificó el contenido de flavonoles totales, mediante el método de Yermakov y Arasimovy (1987), utilizando como estándar una curva del glucósido de rutina grado HPLC 95% (Sigma-Aldrich, R5143), en concentración de 0.5 mg/mL en etanol al 96%. En la determinación, se mezclaron 500 μL de extracto con 1 mL de AlCl_3 al 2% y 500 μL de agua destilada, posteriormente, se adicionaron 3 mL de CH_3COONa al 5% en etanol y se mezcló de nuevo. Dicha mezcla se dejó en reposo por 1 hora a temperatura ambiente en obscuridad, para finalmente determinar la absorbancia de la muestra a 435 nm. El contenido de flavonoles totales se reportó en mg ER (equivalentes de Rutina) / g de extracto o semilla desengrasada de Chía.

➤ 2.2 Técnicas Cromatográficas

Todos los reactivos y disolventes fueron obtenidos de *Sigma-Aldrich* y se usaron sin purificación o análisis posterior. Los disolventes utilizados se destilaron antes de usarse. Los disolventes anhidros se destilaron bajo atmósfera de N_2 de la siguiente manera: tetrahidrofurano (THF) sobre sodio metálico en presencia de benzofenona, y la trietilamina (Et_3N) se destiló sobre CaH_2 . Todos los experimentos que involucraron compuestos sensibles al aire y/o humedad, se llevaron a cabo en matraces redondos secados en la estufa y provistos de un *septum* de hule, a los cuales se introdujo una aguja adaptada a un globo lleno de $\text{N}_{2(g)}$. La cromatografía en capa fina (CCF) se realizó en placas de vidrio (2 x 5 cm) recubiertas con sílica gel SIL G-50 UV254 (0.25 mm). Los compuestos fueron detectados por visualización bajo una lámpara de luz UV (254 nm) o mediante inmersión de la placa en una solución de

H₃PMO₁₂O₄₀, seguida de calentamiento. Para la cromatografía en columna (CC) se usó sílica gel (*Macherey Nagel* 230-400 mallas). Todas las mezclas de disolventes usados como eluyentes se reportaron como disoluciones v/v. Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) se obtuvieron usando los equipos *Agilent-Inova-300* y *Varian VNMRS-400*. Los disolventes usados fueron CDCl₃, CD₃OD y CF₃COOD, según se indique.

➤ 2.2.1 Separación e Identificación de Compuestos Fenólicos presentes en la Semilla de Chía

Se realizó una cromatografía preparativa en columna flash para el extracto “crudo” de polifenoles de Chía, con base en la metodología descrita por Leonard *et al.* (1998), donde se utilizó como fase estacionaria sílica 60 (0.04-0.063 nm) para cromatografía en columna y, como fase móvil, volúmenes de 300 mL de una mezcla de AcEt:hexano (2:1) y de una mezcla CH₂Cl₂:MetOH (9:1). Se recolectaron fases de aproximadamente 15 mL que posteriormente se concentraron en rotavapor para caracterizar por medio de CCF. Tomando en cuenta los resultados de la CCF empleando CH₂Cl₂: MetOH (9:1), se eligieron las fases con compuestos de mismo RF y se concentraron en una sola.

Dichas fases fueron seleccionadas conforme a los resultados observados en CCF en CH₂Cl₂:MetOH (95:5) para su cuantificación y para la purificación de los compuestos fenólicos presentes por medio de una cromatografía en capa preparativa, donde se aplicaron 200 mg de una fase seleccionada en forma vertical (por medio de un aplicador) a una placa *DC-Alufolien Kieselgel 60* (20x20 cm/0.2mm) que eluyó en una mezcla de CH₂Cl₂: MetOH (95:5), al terminar la corrida, se dejó secar la placa en campana de extracción y, posteriormente, se rasparon y recuperaron por separado los compuestos polifenólicos; cada fracción recuperada se re-disolvió y concentró en MetOH para su posterior identificación.

➤ 2.2.2 Identificación de estructuras polifenólicas, mediante Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear

Se realizó una CCF de las fracciones obtenidas mediante cromatografía preparativa en columna, de las cuales se observó la presencia de compuestos con RF similar a muestras estándar de flavonoides de interés, para los cuales posteriormente se obtendrían los espectros de RMN ^1H en los equipos *Varian Unity Inova* (300 MHz) y *Agilent MR* (400 MHz). Para ello, se disolvieron cada una de las fracciones en disolventes deuterados a 300 MHz para la caracterización de ^1H , utilizando TMS como referencia interna, y se colocó cada una en un tubo de vidrio delgado entre los polos del imán del equipo. Los datos obtenidos fueron procesados con el software *MestReNova versión 8.1*.

Los desplazamientos químicos (δ) y las constantes de acoplamiento (J) fueron determinadas asumiendo un comportamiento de primer orden. La multiplicidad de las señales se indica como: s (simple), d (doble), t (triple), c (cuarteto), q (quinteto), m (múltiple). Las constantes de acoplamiento (J) se expresan en Hz. Las señales en RMN- ^1H fueron asignadas con base en el desplazamiento químico, multiplicidad y consistencia con una serie de estructuras similares.

➤ 2.3 Funcionalización del Hidrolizado Proteico

Se llevó a cabo un procedimiento enzimático para la funcionalización del hidrolizado con un antioxidante estándar (200 ppm). El mismo tratamiento se realizó en las disoluciones estándar de hidrolizado, hidrolizado con enzima y enzima peroxidasa, para corroborar el rendimiento de la reacción.

➤ 2.3.1 Cuantificación promedio de proteína en un hidrolizado proteico.

Se determinó la concentración de proteína presente en un hidrolizado comercial de Colágeno (*Gelicart[®] Sanofi*) y un hidrolizado de grenetina (de venta a granel) utilizando el método de Lowry, método colorimétrico para proteínas, en el que a la muestra se le añade un reactivo que forma un complejo colorido con las proteínas, siendo la intensidad del color proporcional a la concentración de éstas, según la ley de Lambert-Beer $A = \epsilon \cdot l \cdot c$. donde ϵ = coeficiente molar de extinción, l = longitud de la celda, y c = concentración molar del analito.

➤ 2.3.2 Evaluación de la actividad enzimática de la peroxidasa comercial

Las peroxidasas (EC 1.11.1.7) son enzimas oxidorreductasas que catalizan reacciones bisustrato de carácter oxido-reducción (redox) de un amplio número de sustratos orgánicos e inorgánicos, utilizando la capacidad oxidante del peróxido de hidrógeno (BRENDA, 2018).

Preliminarmente, se determinó la actividad enzimática de una peroxidasa comercial (Peroxidasa de Horseradish *Sigma-Aldrich*) utilizando como sustrato guayacol (40mM), que se oxida a un complejo colorido de tetraguayacol en presencia de H₂O₂ (40mM) que se lee a $\lambda=470$ nm.

➤ 2.3.3 Acoplamiento del antioxidante, vía enzimática, a un hidrolizado proteico

Los antioxidantes que contienen grupos carboxilo libres se pueden unir a una amina primaria (procedente de algún residuo de lisina de la proteína o de un grupo amino terminal) para formar amidas usando reactivos de acoplamiento (Arizmendi, 2016). Para los antioxidantes de naturaleza flavonoide, existen evidencias experimentales de que se pueden unir covalentemente a proteínas mediante procesos radicalarios catalizados por peroxidasas, aunque no se conoce con precisión el sitio de unión entre la proteína y el antioxidante.

De acuerdo con experimentaciones basadas en la funcionalización de películas bioactivas, para esta tesis se determinó que las condiciones de concentración para el acoplamiento enzimático son las siguientes: una solución al 5% de proteína de colágeno hidrolizado reacciona con una concentración de antioxidante de 200 ppm (quercetina, kaempferol ó ácido cafeico) en una relación de 0.4 mg antioxidante/g proteína y una unidad de peroxidasa/0.5 mg antioxidante; más la adición de 30 μ g H₂O₂ (5%) / U peroxidasa cada 10 min por 1.5 horas. Las condiciones óptimas de pH y temperatura para la actividad enzimática son pH= 7 y 40°C.

Con base en lo anterior la disolución de hidrolizado de colágeno (5%) se sometió a agitación en un baño caliente a una temperatura promedio de 40°C por 10 minutos. Posteriormente, se añadió la solución 200 ppm de antioxidante estándar, una disolución de peroxidasa 0.4 mg/mL (Peroxidasa de Horseradish Tipi I, *Sigma-Aldrich*) y 30 μ L de H₂O₂ (5%). Se

mantuvo la agitación y dicha temperatura durante 1.5 horas agregando 1.5 μL de H_2O_2 (5%) cada 10 minutos.

➤ 2.3.4 Purificación del hidrolizado por precipitación etanólica

Se realizó una purificación del producto de la reacción de acoplamiento enzimático por medio de la precipitación de proteínas o de péptidos grandes de los hidrolizados de colágeno. Se adicionó un disolvente orgánico (etanol/acetona) para producir un precipitado, debido a que el disolvente presenta una constante dieléctrica menor a la del agua (medio de reacción), lo que produce un incremento en las fuerzas de atracción entre las cargas opuestas de las proteínas y una disminución en el grado de ionización de las cadenas laterales disminuyendo la solubilidad de éstas.

➤ 2.3.4 Comprobación de la unión enzimática hidrolizado-antioxidante

Se le determinó, tanto al sobrenadante como a la resuspensión de hidrolizado funcionalizado, la capacidad antioxidante (mediante los métodos del efecto secuestrante del radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ y DPPH^{\bullet}), la concentración de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu, y se cuantificó la proteína presente en el sobrenadante por el método de Lowry para determinar si el acoplamiento fue exitoso.

➤ 2.3.5 Síntesis de Tripéptido Boc-Hyp-Gly(Cbz)- OCH_3

La síntesis del tripéptido Boc-Hyp-Gly(Cbz)- OCH_3 se realizó mediante la adaptación del método de funcionalización peptídica en medio acuoso utilizando EDC como activador propuesta por Pu, Y., *et al.*, (2009)

▪ Etapa 1. Síntesis de Dipéptido Boc-Gly-Lys(Cbz)- OCH_3 .

Se colocó bajo una atmósfera inerte (N_2) y baño de hielo (0°C) un equivalente de Boc-Gly-OPN (Sigma-Aldrich) y un equivalente de $\text{HCl-Lys(Cbz)-OCH}_3$ (Sigma-Aldrich) en THF anhidro. Posteriormente, se añadió lentamente un equivalente de trietilamina y se dejó la reacción en estas condiciones por 24 horas. Para confirmar la aparición del producto se realizó una CCF en AcOEt:Hexano (1:1) y se procedió a concentrar a sequedad a vacío a

35°C. El producto de reacción se re-disolvió en 25 mL de AcOEt y se llevaron a cabo tres lavados de 25 mL, cada uno con diferentes soluciones: el primero con ácido cítrico 10%, el segundo con una solución saturada de NaHCO₃ y el tercero con una solución saturada de NaCl. El producto se secó con Na₂SO₄ anhidro y se concentró. El residuo se purificó mediante una cromatografía en columna flash con un volumen de AcOEt:Hexano (1:1) para recuperar el *p*-nitrofenol remanente, y con dos volúmenes de una solución AcOEt:Hexano (1:3) para recuperar el producto peptídico, mismo que se concentró y envió para identificación mediante RMN. Al tener la confirmación de la existencia del dipéptido (Boc-Gly-Lys(Cbz)-OCH₃) se procedió a la desprotección del grupo Boc-Gly, utilizando una solución de CH₂Cl₂ anhidro + TFA durante una hora en agitación.

- Etapa 2. Unión del Dipéptido Boc-Gly-Lys(Cbz)-OCH₃ a Boc-Hyp.

Se colocó nuevamente en atmosfera inerte y baño de hielo, un equivalente de dipéptido concentrado, un equivalente de Boc-Hyp-OH (Sigma-Aldrich) y un equivalente de EDC-HCl disueltos en THF anhidro. Igualmente, se añadieron lentamente dos equivalentes de trietilamina y se dejó en reacción por 24 horas. Se realizó una CCF para confirmar la aparición del producto. Dicho producto se re-disolvió en AcOEt: Agua y se llevó a cabo una separación líquido-líquido en la que se recuperó la fase orgánica, la cual se sometió a los mismos lavados y tratamientos de la etapa 1.

- Etapa 3. Desprotección de Tripéptido Boc-Hyp-Gly-Lys(Cbz)-OCH₃.

Al tener la confirmación de la existencia del tripéptido, se llevó a cabo la desprotección del grupo Cbz unido al grupo amino de la cadena residual de Lys, mediante hidrógenólisis (ruptura de enlaces por H₂) del enlace C-O a temperatura ambiente y en condiciones neutras, empleando un globo lleno de H₂ (g) en presencia de Pd/C al 10%.

3) RESULTADOS Y DISCUSIÓN

➤ 3.1 Extracción de Polifenoles de Chía

Existen diferentes métodos y técnicas cromatografías para determinar la concentración de compuestos fenólicos extraídos de matrices alimentarias, comúnmente se utilizan disolventes polares o mezclas de éstos (metanol, etanol, acetona, acetato de etilo) Kunradi, *et al.* (2011). La eficiencia de una extracción aumenta según la polaridad del disolvente empleado. Se ha demostrado que la mejor extracción de compuestos fenólicos se lleva a cabo con una mezcla metanol-agua debido a su alta polaridad (Tabart, *et al.*, 2017).

Durante esta experimentación se realizaron extracciones ácido-etanólicas (60°C/4h) y posteriores extracciones semicontinuas con éter etílico (60°C/3h) para remover el exceso de compuestos alifáticos presentes en el extracto de la semilla; dicho extracto se caracterizó de acuerdo con su contenido de polifenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu. Los resultados se expresan en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Polifenoles totales (mg EAC / g de semilla de Chía).

	<i>mg EAC / g semilla</i>
<i>Extracto en éter etílico</i>	1.242 ^a ± 0.37
<i>Extracto ácido-EtOH</i>	3.619 ^b ± 0.76

*EAC = equivalentes de ácido cafeico

*Resultados promedio de tres repeticiones ± la desviación estándar. C.V.< 5%.

*La diferencia de letras indica una diferencia significativa ($\alpha=0.05$) entre la composición de los extractos.

Se utilizó ácido cafeico como estándar de calibración debido a que es el antioxidante en mayor proporción en la semilla, por lo que su presencia reflejaría una aproximación significativa al contenido total de polifenoles. Reyes, C., *et.al.* (2008) informaron valores de 0.88-0.92^a mg EAG*/g semilla, y Marineli, R., *et al.* (2014) obtuvieron 0.92^b mg EAG*/g semilla. (*EAG equivalentes de ácido gálico) respectivos en extracto ácido metanólico.

Existe una diferencia significativa ($\alpha=0.05$) entre los valores reportados de la literatura y los de esta tesis que de acuerdo con la Tabla 3.1, cuya diferencia puede radicar principalmente

en el método de extracción y el cálculo de equivalentes; ya que en el presente trabajo se utilizó etanol a temperatura ambiente y se implementó una segunda extracción del extracto en éter etílico, y se tomó como referencia de calibración equivalentes de ácido cafeico (antioxidante en mayor concentración en el extracto). Es importante considerar, de igual manera, la concentración de polifenoles presentes en la semilla, que se ve afectada por la región geográfica en la que se siembra la Chía.

La cantidad de grupos polifenólicos presentes en el extracto es muy variada, sin embargo, uno de los principales, es el grupo de los flavonoides. La cuantificación de flavonoides (ver Tabla 3.2), se llevó a cabo por medio de una técnica colorimétrica a una absorbancia igual a 415 nm, que implica la formación de un complejo colorido Flavonoide-Aluminio Chang, *et al.* (2002), (ver Figura 3.1), donde se empleo el glucósido de rutina como antioxidante patrón ($y = 0.1372 + 0.016x, r^2=0.998$).

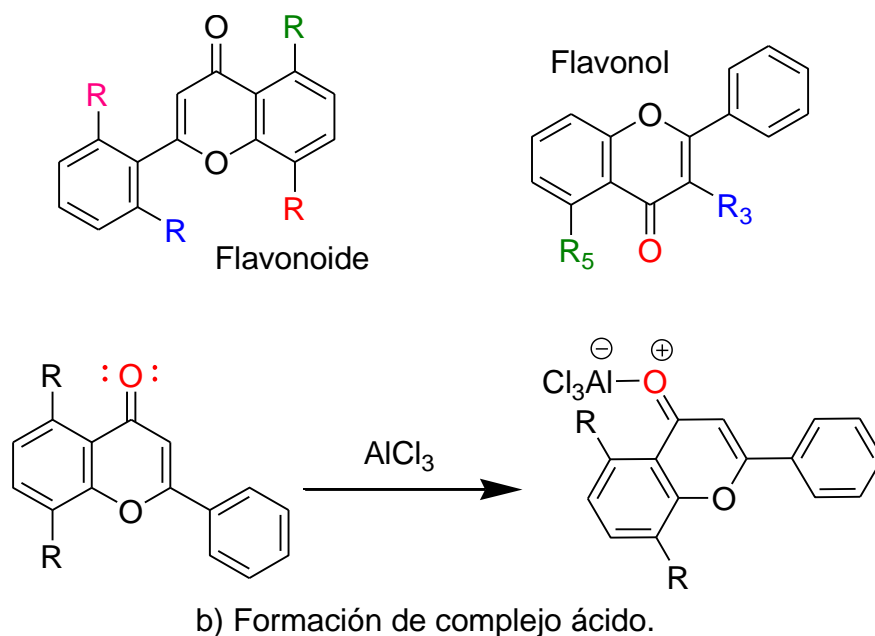


Figura 3.1. Formación de complejo ácido Al-C en flavonoides y flavonoles.

El principio de dicha técnica, se basa en que el $AlCl_3$ forma complejos ácidos estables con el C-4 del grupo ceto, con el C-3 o C-5 de los grupos hidroxilo de las flavonas y flavonoles, y también forma grupos lábiles con el grupo *o*-dihidroxílico en el anillo A o B de los flavonoides (Figura 3.1).

Tabla 3.2. Contenido total de Flavonoides y Flavonoles.

	Flavonoides (mg ER/g semilla)	Flavonoles (mg ER/ g semilla)
<i>Extracto en éter etílico</i>	0.547 ^a ± 0.098	0.133 ^b ±0.028
<i>Extracto ácido-EtOH</i>	0.763 ^b ± 0.046	0.049 ^a ± 0.019

*Cantidades reportadas en mg ER (equivalente de Rutina) / g semilla.

*Resultados promedio de tres repeticiones ± la desviación estándar. C.V.< 5%.

*La diferencia de letras indica una diferencia significativa ($\alpha=0.05$) entre la composición de los extractos.

La cantidad de flavonoles y flavonas, presentes en el extracto de Chía son de suma importancia debido a sus características estructurales y a sus propiedades secuestradoras de especies radicales (Moure, *et al.*, 2008). La cuantificación de flavonoles totales presentes en el extracto se muestra en la Tabla 3.2.

Los antioxidantes presentes en la Chía se pueden clasificar en dos grandes grupos dependiendo de su estructura química: flavonoides, con diferentes sustituyentes hidroxilo en su estructura, tales como la quercetina, y aquellos que tienen un grupo carboxilo libre, como los ácidos cafeico y gálico (Figura 3.2).

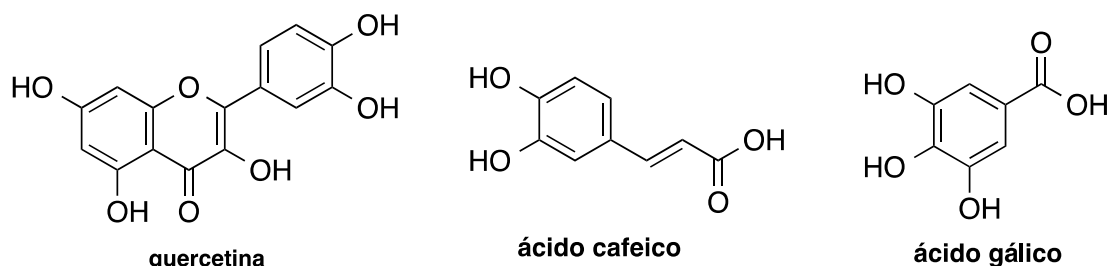
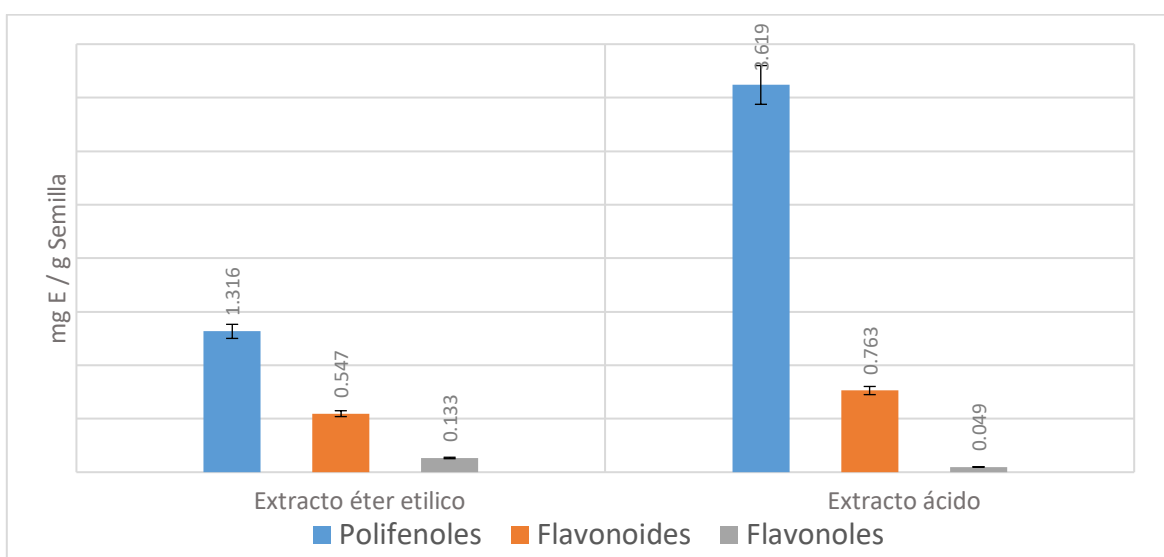


Figura 3.2. Estructuras de la quercetina, ácido cafeico y ácido gálico.

Se puede observar, en la Figura 3.3, un gráfico con las diferencias entre las concentraciones de polifenoles totales, flavonoides y flavonoles recuperados en la extracción ácido-etanólica y en la extracción con éter etílico. Mientras que el extracto recuperado de la hidrólisis ácida

presenta mayor eficiencia en la extracción de polifenoles totales (3.619 mg EAC/ g semilla contra 1.319 mg EAC/g semilla en la extracción con éter etílico); la extracción adicional con éter etílico mejora la obtención de flavonoides, ya que se recuperaron 0.763 mg EAC/g semilla, a diferencia de la hidrólisis ácida, en la cual se recuperaron tan sólo 0.547 mg EAC/g semilla, así mismo, se recuperaron 0.133 mg EAC/g semilla en la extracción de flavonoles en comparación con 0.049 mg EAC/g en la hidrólisis ácida.

Figura 3.3. Rendimientos de polifenoles, flavonoides y flavonoles entre procesos de extracción (hidrólisis ácida y extracción secundaria con éter etílico).



*Polifenoles totales (mg EAC/g semilla), flavonoides y flavonoles (mg ER/g semilla) de semilla de Chía tratada.

*Resultados promedio de tres repeticiones \pm la desviación estándar. C.V. < 5%.

*La diferencia entre colores indica una diferencia significativa ($\alpha=0.05$) entre la concentración de los extractos.

Como se observa en la Figura 3.1.3, la hidrólisis ácida etanólica en la semilla de Chía es más eficiente para la obtención de un gran número de compuestos polifenólicos, sin embargo, no es suficiente para obtener un rendimiento significativo de flavonoides y flavonoles, compuestos de interés en esta investigación. La extracción secundaria en éter etílico del extracto ácido aumentó en 13.95% la recuperación de flavonoides y en un 27.14% la recuperación de flavonoles en la semilla de Chía.

Después de la caracterización cuantitativa de polifenoles en el extracto, se determinó la capacidad antioxidante del mismo mediante los métodos del efecto “secuestrante” de radicales DPPH[•] y ABTS^{•+}. En la tabla 3.3, se muestran los valores obtenidos.

Tabla 3.3. Capacidad Antioxidante del extracto de Chía.

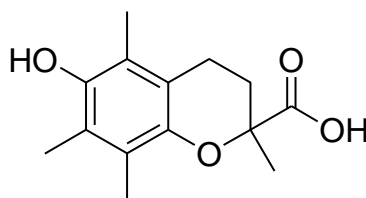
Radical ABTS⁺	Radical DPPH[•]
87.96 ^a ±2.6%	92.43 ^b ±3.2%

*Reportado en equivalentes Trolox

** Resultados promedio de tres repeticiones ± la desviación estándar. C.V.< 5%.

***La diferencia de letras indica una diferencia significativa ($\alpha=0.05$) entre el radical utilizado.

El compuesto ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2 carboxílico (Trolox, ver figura 3.4) es un análogo del α -tocoferol soluble en agua, es conocido por su alta capacidad antioxidante y, por esto, se utiliza como compuesto de referencia para la determinación de Capacidad Antioxidante expresada como equivalentes de Trolox (Oehlke *et al.*, 2011). Por esta razón, se realizaron curvas de calibración con Trolox para formar los radicales ABTS⁺ y DPPH[•].



Trolox

Figura 3.4. Estructura 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico (TROLOX).

En la experimentación, se observó que, mediante el ensayo del radical DPPH[•], se obtuvo un porcentaje de actividad antioxidante mayor que en el ensayo del radical ABTS⁺. Algunas razones de la diferencia son: la distinta longitud de onda en la que se mide cada ensayo (ABTS⁺ 734nm y DPPH[•] 517nm), debido a que desde la región del visible hay interferencias en la medición de moléculas cromóforas como antocianinas y carotenoides (Beserra-Almeida *et al.*, 2011).

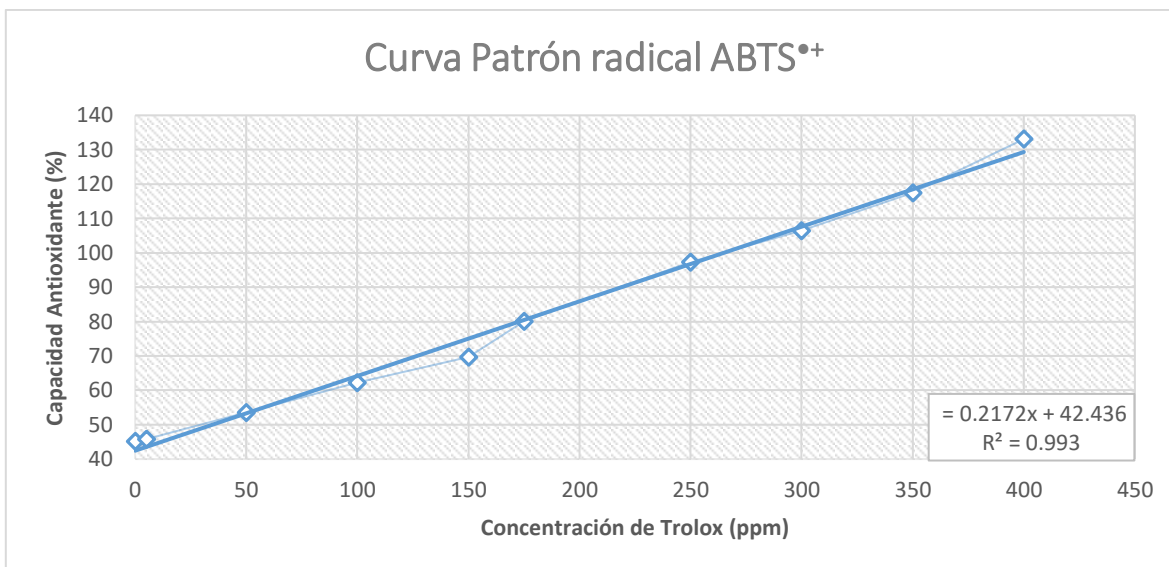


Figura 3.5. Curva Patrón de Actividad Antioxidante para radical ABTS^{•+}.

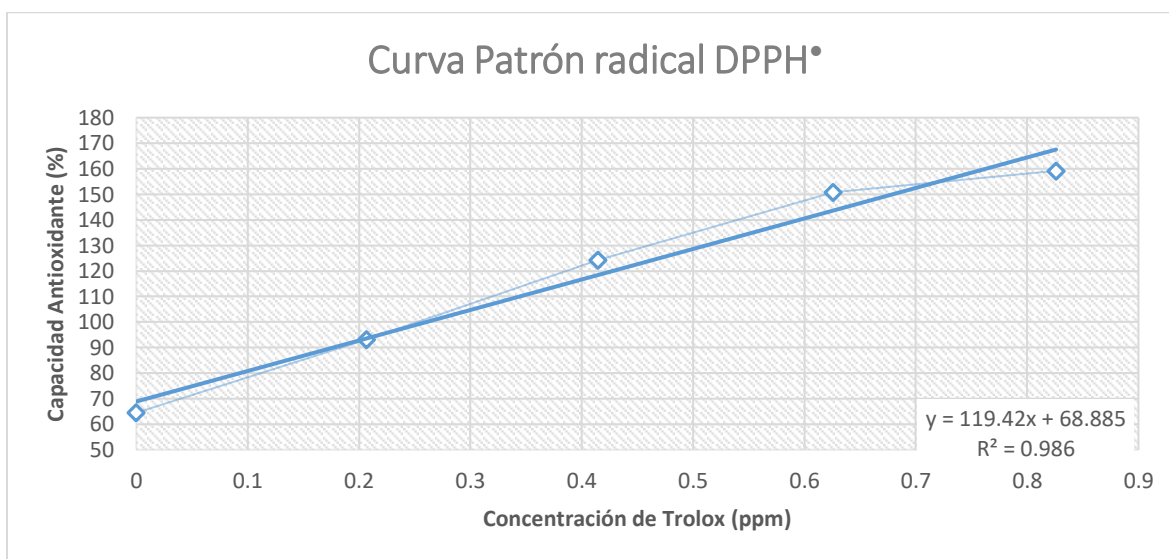


Figura 3.6. Curva Patrón de Actividad Antioxidante para el radical DPPH[•].

Otra razón de la diferencia en el porcentaje de actividad antioxidante entre ambos métodos es el mecanismo de reacción del radical DPPH[•] en presencia de antioxidantes, que está directamente relacionado con la conformación estructural de los mismos, es decir un antioxidante pequeño mejorará su capacidad antioxidante, mientras que el radical ABTS^{•+} está impedido estéricamente (Beserra-Almeida *et al.*, 2011). Sin embargo, la actividad

antioxidante de los compuestos fenólicos de la Chía en ambas pruebas corroboran que son excelentes donadores de radical H[•].

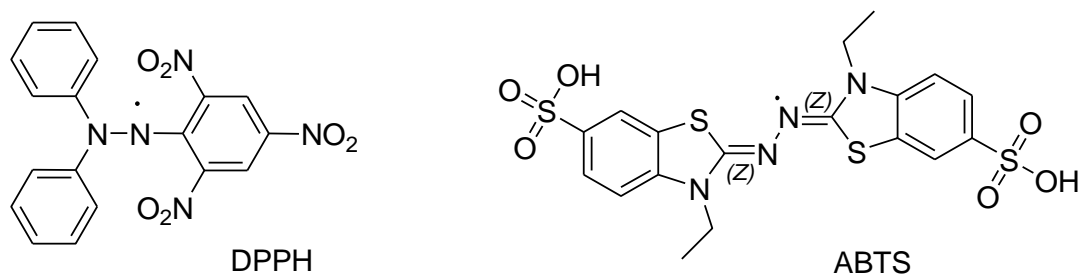


Figura 3.7 Estructura radical DPPH[•] y radical ABTS^{•+}

➤ 3.2 Separación de polifenoles mediante cromatografía preparativa en columna



Figura 3.8. Comparación por CCF del extracto crudo (extracción secundaria en éter etílico).

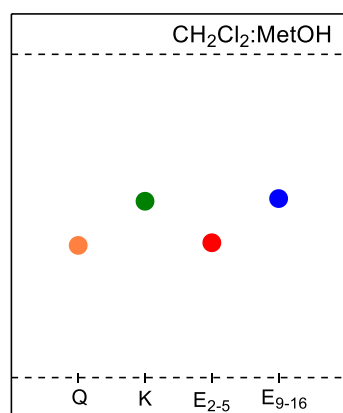
*Donde Q= estándar de quercetina,

Se realizó una cromatografía en columna flash al extracto de la semilla tratado con éter etílico utilizando un volumen de AcOEt-Hexano (2:1) y dos volúmenes de CH₂Cl₂-MetOH (9:1) como fase móvil, y sílica 60 (0.04-0.063 nm) para cromatografía en columna como fase estacionaria, se colectaron en total 32 fracciones de 10 mL cada una. Para verificar la separación de polifenoles presentes en el extracto, se realizó una cromatografía de capa fina (1:1 CH₂Cl₂:MetOH) y se utilizaron soluciones estándar (200 ppm) de ácido cafeico, kaempferol, quercetina y ácido Gálico.

De las fracciones recolectadas, se decidió mezclar las fracciones con R_f similares entre sí, bajo el supuesto de que un solo compuesto tiene el mismo R_f. En la tabla 3.4, se muestran los R_f para dichas fracciones de extractos de éter, así como el del estándar de quercetina y kaempferol (ambos de Sigma-Aldrich).

Las fracciones E (de una primera extracción en éter etílico) se identificaron por RMN- H^1 , sin embargo, en una segunda extracción se recolectaron cuatro fracciones (M), y debido a que los RF's de éstas no son singulares (ver Figura 3.9) se procedió a una segunda purificación de la muestra (M₂ y M₃) por cromatografía de capa preparativa y a la cuantificación de polifenoles, flavonoides, flavonoles, así como a medir la capacidad antioxidante de cada fracción.

Tabla 3.4. Rf obtenidos por CCF de los compuestos separados del extracto por extracción secundaria en éter etílico, comparados contra estándares eluidos en la fase móvil de CH₂Cl₂:MetOH (95:5) de diferentes fracciones colectadas.



	<i>CH₂Cl₂:MetOH</i>
<i>Quercetina (Q)</i>	0.41
<i>Kaempferol (K)</i>	0.55
<i>Fracción E₂₋₈ (E₂₋₈)</i>	0.42
<i>Fracción E₉₋₁₆ (E₉₋₁₆)</i>	0.55

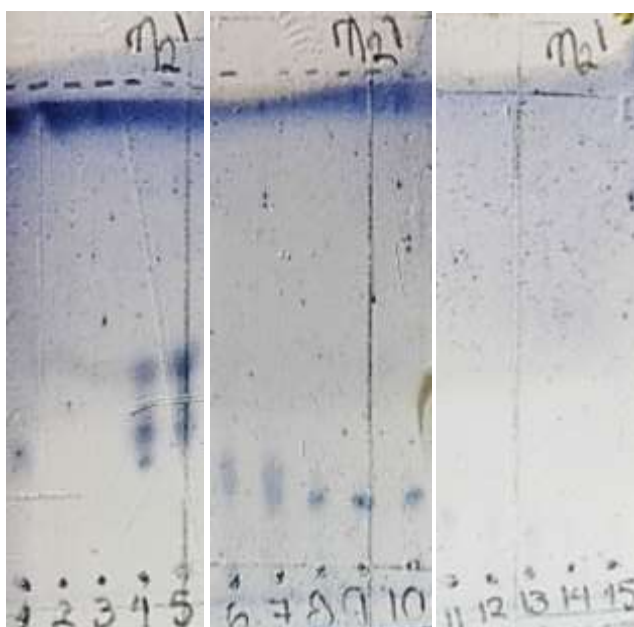


Figura 3.9. Comparación por CCF de fracciones M₂ purificadas mediante CCP.

*Serie de fracciones eluidas en CH₂Cl₂:MetOH (96:4).

Figura 3.10. Comparación por CCF de fracciones M del extracto obtenido con éter etílico.

*Fracciones eluidas en CH_2Cl_2 :MetOH (96:4). Donde K= estándar de kaempferol, $m_{\#}$ = número de fracción M, Q= estándar de quercetina y Cf= estándar de ácido cafeico.

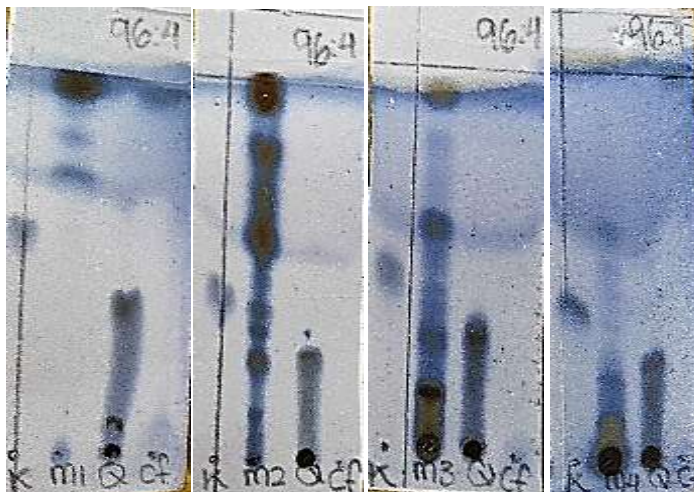
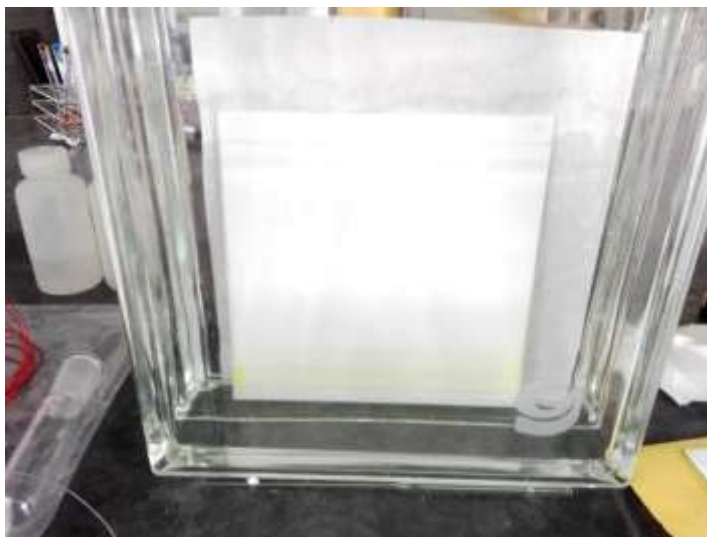


Figura 3.11. Sistema de elución en la Cromatografía por Capa Fina Preparativa de la fase M_2 .

*Fracciones eluidas en CH_2Cl_2 :MetOH (96:4).



La técnica de cromatografía en capa preparativa (CCP) es análogo a la CCF, ya que permite purificar suficiente cantidad de compuesto para un posterior análisis. Lo anterior, debido a que el grosor de la fase estacionaria (generalmente sílica) es mayor que el de una placa normal (0.5 a 2 nm), permitiendo recuperar el analito por raspado de la placa.

La CCP permitió la recuperación de las fracciones M_2 y M_3 , que presentaron un alto contenido de polifenoles, flavonoides y flavonoles en la cuantificación de cada fase recuperada (ver Tabla 3.5). Por su evidente contenido de polifenoles, se emplearon para utilizar una CCF en la que se empleó una mezcla de disolventes CH_2Cl_2 -MetOH (96:4).

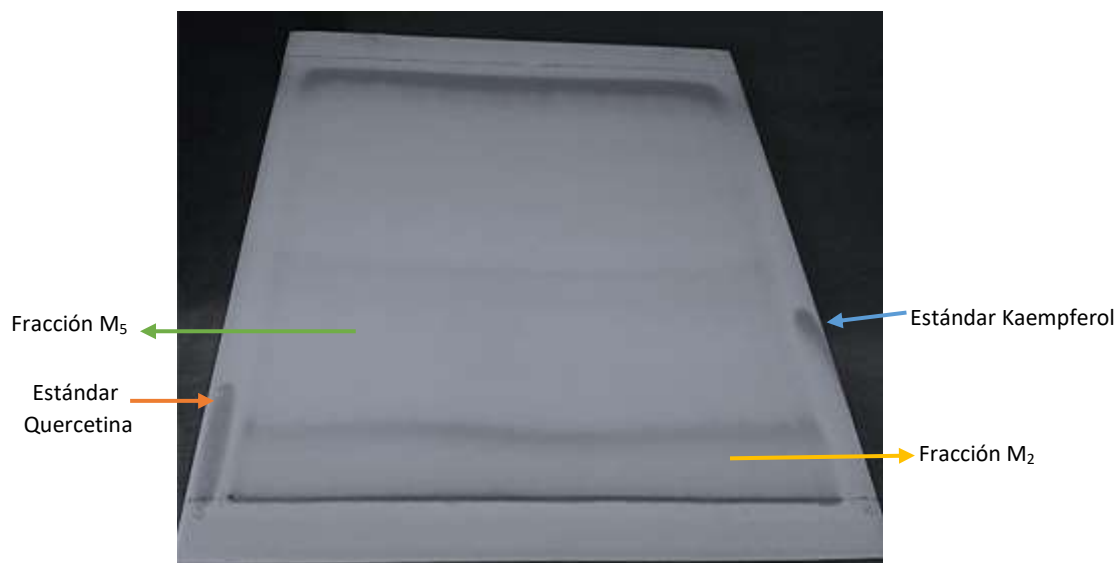


Figura 3.12 Revelado de CCP por medio de luz UV, de la fracción M₂ recuperada.

*Fracciones eluidas en CH₂Cl₂:MetOH (96:4).

*Imagen con contraste de color.

Se utilizaron 245 mg de la fracción M₂ y 275 mg de la fracción M₃ corrida en una placa *DC-Alufolien Kieselgel 60* (20x20 cm./0.2mm) en un medio CH₂Cl₂:MetOH (95:5). En estas condiciones se recuperaron 10 fracciones de cada extracto. Para cada uno se cuantificaron polifenoles, flavonoides y flavonoles, y se evaluó su capacidad antioxidante (ver tabla 3.6 y 3.7).

Tabla 3.5. Contenido total de polifenoles, flavonoides, flavonoles y capacidad antioxidante de fracciones M recuperadas de extracto en éter etílico.

<i>Fracción</i>	Polifenoles Totales (mgEAC/g semilla)	Flavonoides (mgEAC/g semilla)	Flavonoles (mgEAC/g semilla)	Capacidad Antioxidante (%)
<i>M</i> ₁	0.027	60.30	35.99	21.9
<i>M</i> ₂	0.035	61.00	100.07	76.96
<i>M</i> ₃	0.052	68.85	81.19	21.39
<i>M</i> ₄	0.037	288.3	48.37	22.33

*Resultado promedio de tres análisis a la misma muestra.

**% capacidad antioxidante reportado en equivalentes Trolox.

Tabla 3.6 Contenido total de polifenoles, flavonoides, flavonoles y capacidad antioxidante de fracciones M₂ recuperadas por CCP.

Fracción	Polifenoles Totales (µgEAC/g semilla)	Flavonoides (mgEAC/g semilla)	Flavonoles (mgEAC/g semilla)	Capacidad Antioxidante (%)
<i>M₂-1</i>	11.0	5.05	730.84	4.69
<i>M₂-2</i>	8.29	5.93	621.14	12.30
<i>M₂-3</i>	4.16	2.56	158.00	17.52
<i>M₂-4</i>	7.20	8.33	115.80	0.06
<i>M₂-5</i>	3.27	3.00	171.86	19.09
<i>M₂-6</i>	8.18	3.89	168.3	18.87
<i>M₂-7</i>	8.02	93.2	68.93	4.85
<i>M₂-8</i>	36.0	27.3	240.9	3.20
<i>M₂-9</i>	0.65	7.17	46.04	3.10
<i>M₂-10</i>	5.97	156.2	665.0	4.06

*Resultado promedio de tres análisis a la misma muestra.

**% capacidad antioxidante reportado en equivalentes Trolox.

Tabla 3.7 Contenido total de polifenoles, flavonoides, flavonoles y capacidad antioxidante de fracciones M₃ recuperadas por CCP.

Fracción	Polifenoles Totales (µgEAC/g semilla)	Flavonoides (mgEAC/g semilla)	Flavonoles (mgEAC/g semilla)	Capacidad Antioxidante (%)
<i>M₃-1</i>	24.2	197.24	128.87	91.4
<i>M₃-2</i>	0.92	0.093	76.96	38.34
<i>M₃-3</i>	0.82	0.011	70.09	26.91
<i>M₃-4</i>	0.06	0.066	57.16	92.95
<i>M₃-5</i>	3.00	13.85	46.61	31.29
<i>M₃-6</i>	5.29	0.308	49.35	20.5
<i>M₃-7</i>	1.34	8.76	127.57	7.82
<i>M₃-8</i>	18.69	45.81	10.63	13.46
<i>M₃-9</i>	5.35	0.234	17.99	23.78
<i>M₃-10</i>	12.00	1.17	28.96	11.89

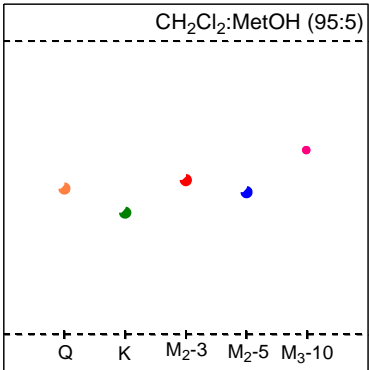
*Resultado promedio de tres análisis a la misma muestra.

**% capacidad antioxidante reportado en equivalentes Trolox.

El contenido de polifenoles totales, flavonoles y flavonoides cuantificado en cada fracción y el valor de Rf obtenido por CCF en un sistema CH₂Cl₂-MetOH (95:5), permitió decidir que las fracciones M₂-3, M₂-5, M₂-7 y M₃-10 fueran analizadas por HPLC-M (ver figuras 3.15, 3.16 y 3.17, respectivamente), como herramientas para ilustrar sus estructuras y obtener sus pesos moleculares. En la tabla 3.8 se muestran los valores obtenidos de Rf para dichas fracciones, así como los RF del posible compuesto que podrían contener.

Tabla 3.8. Valores Rf obtenidos por CCF de las fracciones M₂ y M₃ del extracto en éter etílico, eluidos en fase móvil CH₂Cl₂-MetOH (95:5).

<i>Analito</i>	Rf
<i>Quercetina</i>	0.5
<i>Kaempferol</i>	0.41
<i>M₂-3</i>	0.52
<i>M₂-5</i>	0.48
<i>M₃-10</i>	0.62



- 3.3 Determinación estructural de polifenoles de Chía presentes en el extracto éter etílico

Los núcleos de átomos en los cuales al menos un protón o un neutrón son impares, poseen una propiedad mecánico-cuántica llamada espín nuclear, y se comportan como pequeños imanes. Ejemplos de tales átomos incluyen ¹H, ¹³C, ¹⁵N, ¹⁹F y ³¹P. La Resonancia Magnética Nuclear (RMN) es la absorción selectiva de ondas de radio de alta frecuencia por ciertos núcleos atómicos que tienen espín nuclear y que son sometidos a un campo magnético fuerte estacionario adecuado. La absorción selectiva de energía se conoce como resonancia, y proporciona información valiosa para la elucidación estructural de compuestos orgánicos.

Se obtuvieron los espectros de RMN-H¹ de las fracciones aisladas por cromatografía en columna de sílica de gel y por cromatografía en placa preparativa del extracto de la semilla

de Chía en un equipo Varian Unnity Inova (300 MHz) con tetrametilsilano (TMS) como referencia interna.

Uno de los criterios que permite calificar como aromático a un compuesto cíclico insaturado consiste en determinar la región del espectro en la que absorbe energía. Esta absorción de energía se gráfica, y la posición de las señales (resonancias) respecto a una referencia (TMS) proporciona información que permite su clasificación. En los espectros de RMN- H^1 , se pueden observar los valores de desplazamiento químico (δ) en el eje horizontal, en partes por millón (ppm), Dichos valores resultan de la fuerza de campo efectivo de los núcleos de H, debido a que cada hidrógeno es electrónicamente diferente en cada molécula y tiene una absorción única. La mayoría de los compuestos aromáticos presentan señales características en la región comprendida entre 6 y 8 partes por millón (ppm) respecto al TMS (Hans, J. 2017).

Se utilizaron dos diferentes disolventes en el análisis de las fracciones; el primero es metanol deuterado (CD_3OD), que al entrar en contacto con la muestra intercambia el deuterio por protones de la misma en pequeña proporción, este disolvente residual presenta señales en 4.87 y 3.31 ppm. Razón por la cual en los espectros mostrados a continuación (Figura 3.13 y 3.14) se observan señales en aproximadamente 4.5-5 y en 3.25-3.5 ppm. El segundo disolvente residual es deuterocloroformo ($CDCl_3$) que generalmente muestra un pico en 7.26 ppm. Para el caso particular de los polifenoles, aparecen dos señales características con intensidad relativa de 2:1; una señal en campo bajo asignada a los átomos de hidrógeno del anillo aromático del polifenol con un desplazamiento químico entre 6-8 ppm.

En los espectros mostrados a continuación (Figura 3.13 y 3.14), se observan componentes no deseados, como grasa u otros compuestos alifáticos que no se lograron retirar del todo en las extracciones. Estas señales aparecen en el intervalo de 0 a 5 ppm; algunos ejemplos son las resonancias de $CH_3=0.88$ ppm o CH_2 en 1.29 ppm.

Respecto a las fracciones E_{2-8} y E_{9-16} recuperadas de la primera extracción del extracto crudo en éter etílico se observan señales en los espectros de RMN- H^1 con un desplazamiento químico entre 7 y 8 ppm (ver Figura 3.13 y 3.14), valores que indican la presencia de compuestos aromáticos. Sin embargo, la concentración de polifenoles extraídos en la semilla

no es suficiente para asegurar el tipo particular de antioxidante, por lo que no se logró una identificación precisa del antioxidante en cuestión.

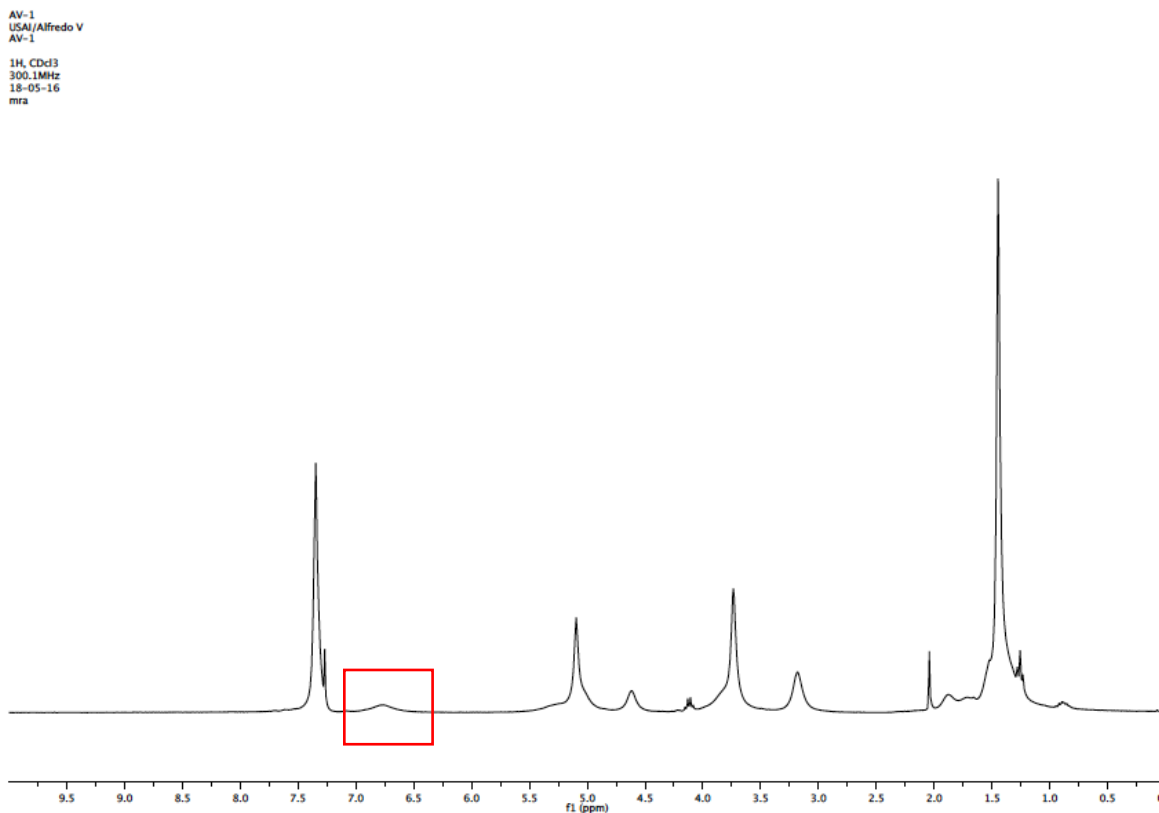


Figura 3.13. Espectro de fracción E_{2.8} del extracto crudo en éter etílico por espectroscopia de RMN-H¹.

*En el espectro se encuentran señales (recuadro rojo) con un desplazamiento químico entre 6.5 y 7 ppm, características de un compuesto aromático en un espectro de RMN-H¹; se observa además una señal en 7.26 ppm proveniente de deuterocloroformo residual (CDCl₃). Sin embargo, la concentración de compuestos aromáticos (polifenoles de interés) no es suficiente para determinar de qué compuesto se trata, solo podemos confirmar la presencia de compuestos aromáticos en este extracto.

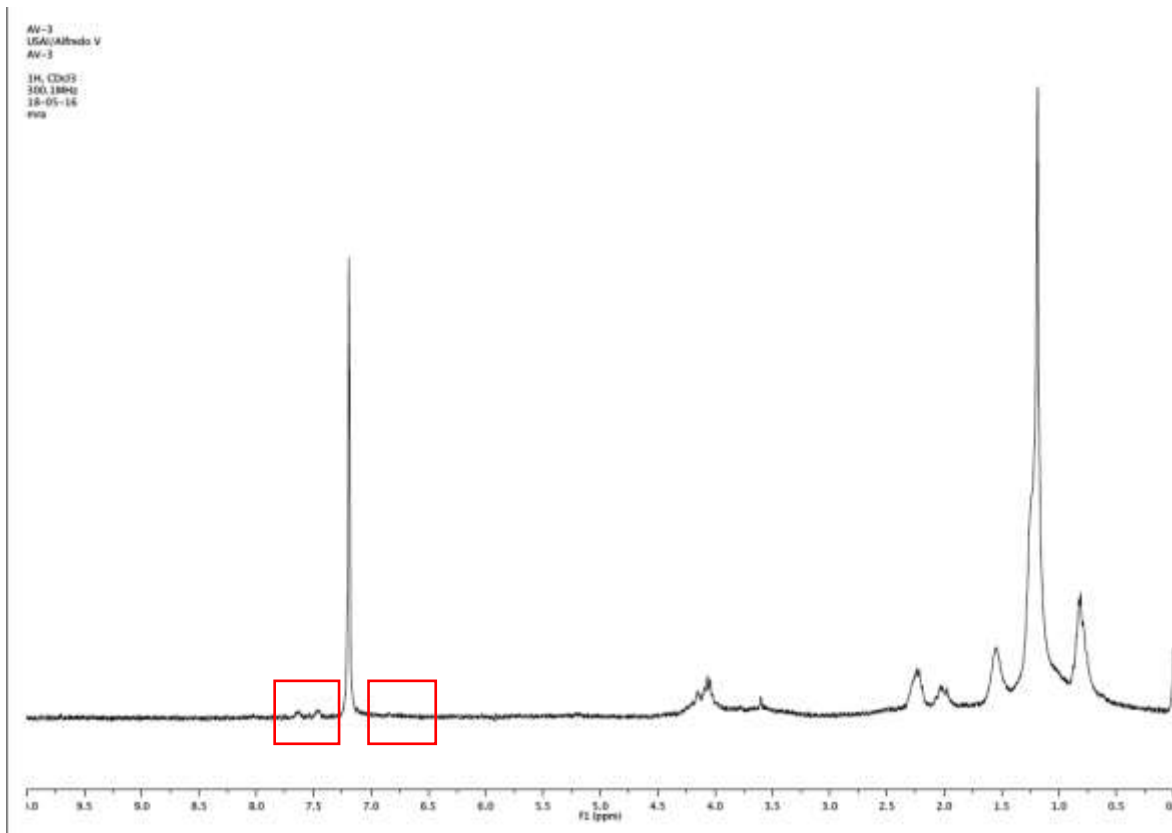


Figura 3.14. Espectro de la fracción E₉₋₁₆ del extracto crudo en éter etílico por espectroscopia de RMN-¹H.

*En este espectro se pueden apreciar señales características de un compuesto aromático aproximadamente en 6.8 ppm y entre 7.3-7.8 ppm, que podrían ser características de quercetina, y la señal característica del deuterocloroformo residual (CDCl₃) en 7.26 ppm. La concentración de compuestos aromáticos en el extracto no es suficiente para determinar el tipo particular de polifenol que se esperaba, sin embargo, podemos confirmar la presencia de compuestos aromáticos en este extracto.

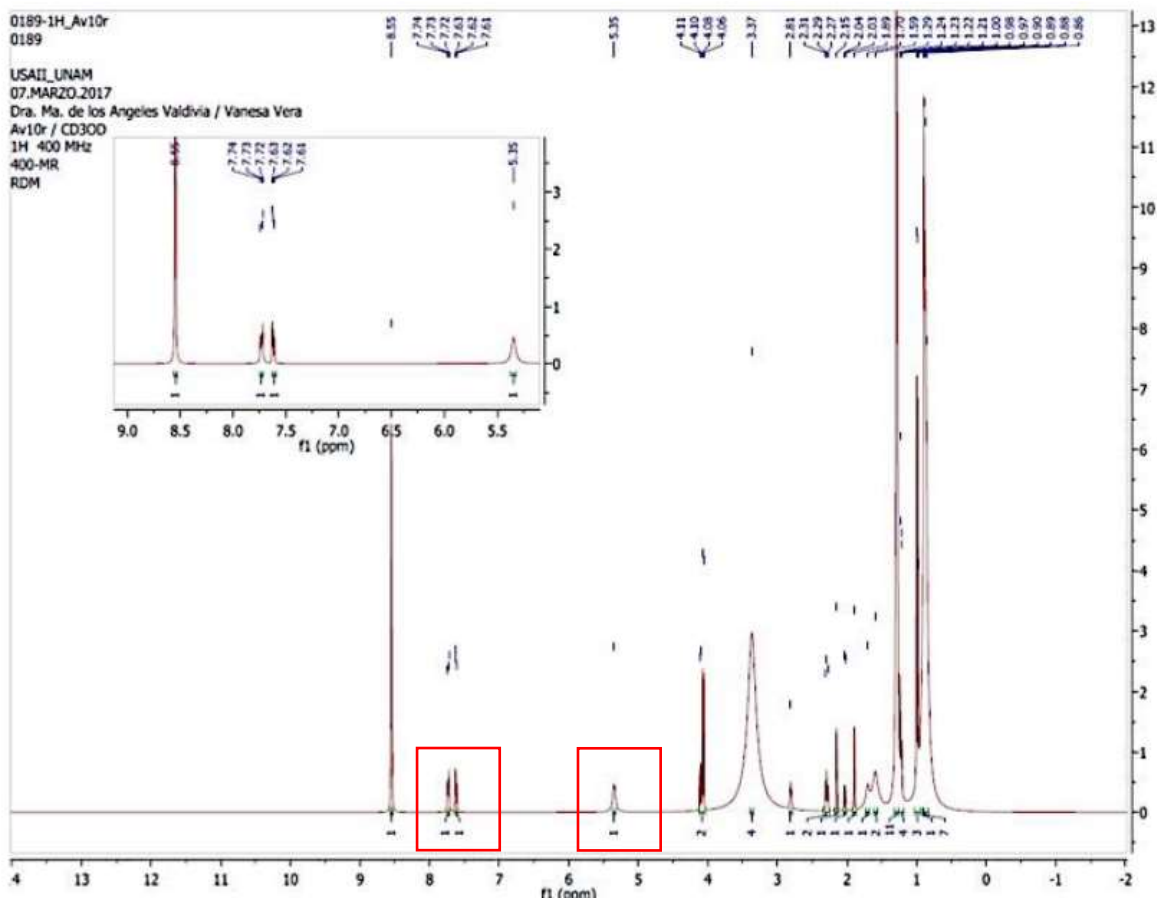


Figura 3.15. Espectro RMN-¹H de la fracción M₃-10 procedente de una CCP.

*Las señales en el espectro dentro del rango de desplazamiento químico 7.72-7.63 ppm y 5.35 ppm, podrían indicar la presencia de ácido clorogénico. Sin embargo, la señal singulete en 5.35 ppm descarta la posibilidad de que sea este compuesto puro, ya que en este desplazamiento químico se encuentra un sextuplete en este desplazamiento, ver figura 3.3.3.1.

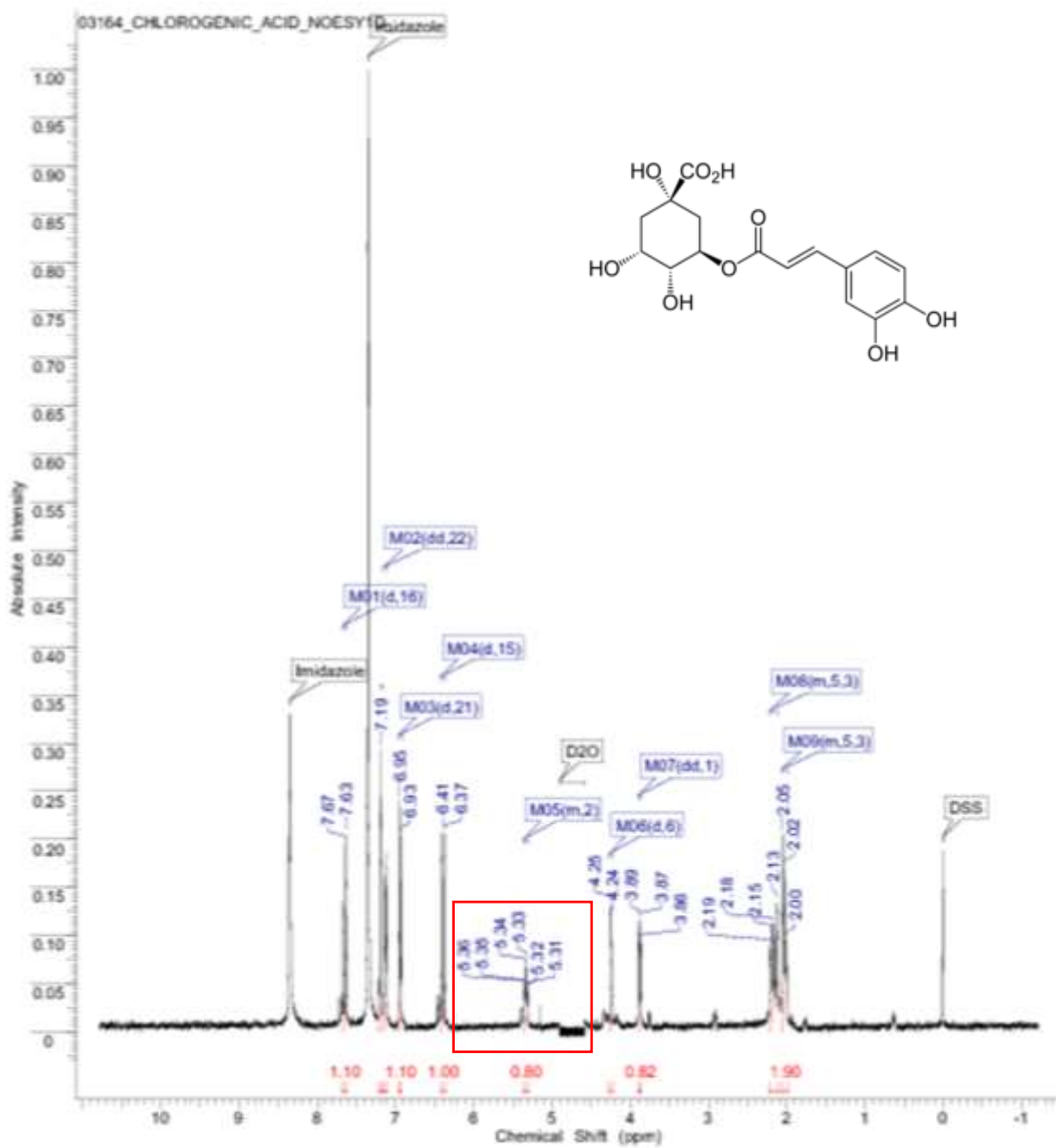


Figura 3.15.1. Espectro estándar ácido clorogénico por RMN- ^1H .

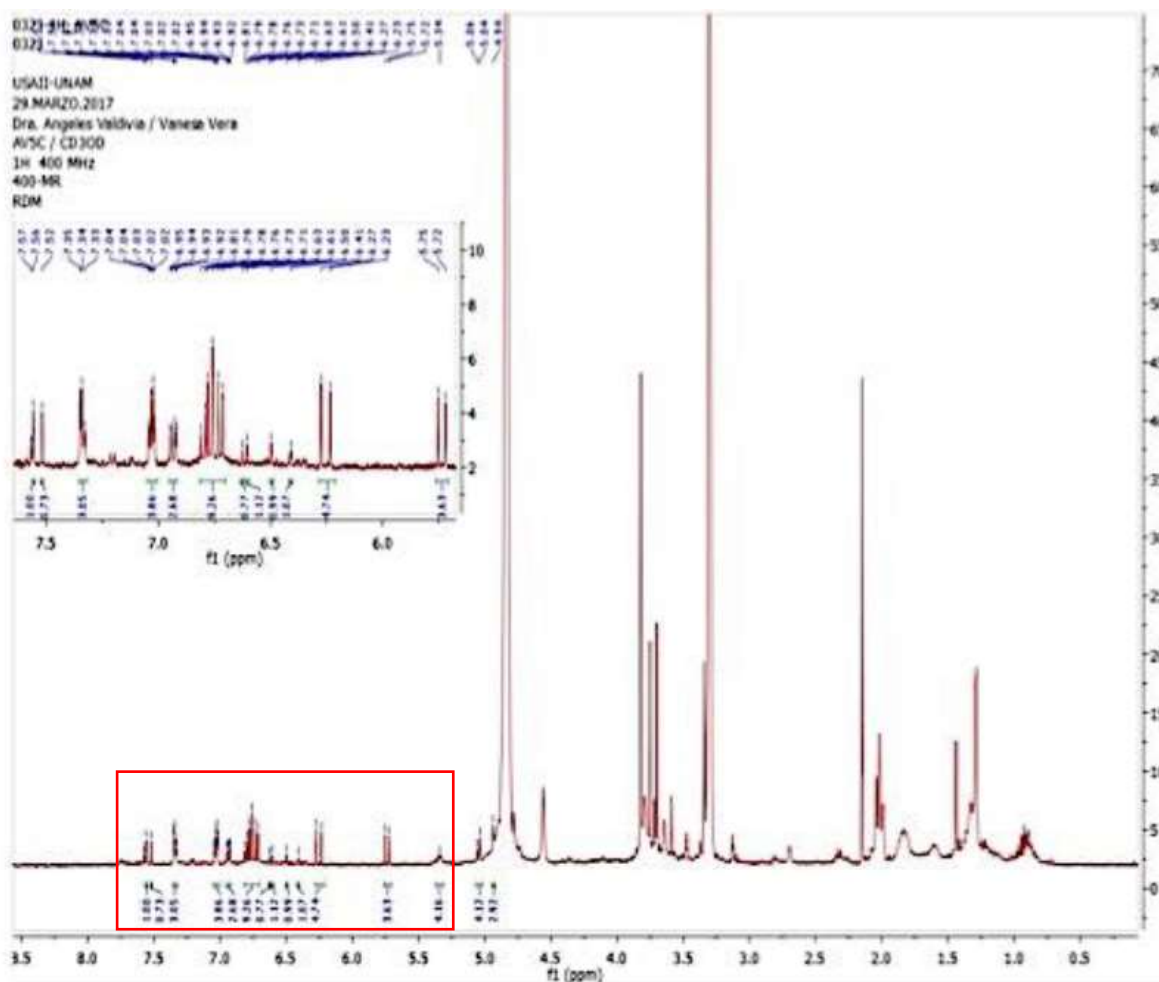


Figura 3.16 Espectro RMN-¹H de la fracción M₂-5, procedente de una CCP.

*En este espectro se pueden observar señales de desplazamiento químico entre 5.2 y 7.8 ppm, zona de identificación de compuestos aromáticos. Este espectro había sido identificado por CCP (Rf=0.48) como quercetina por su similitud en dicha cromatografía, sin embargo, aunque muestra similitudes (ver figura 3.15.1), las señales están desplazadas hacia campo alto, por lo que podríamos declarar que es un compuesto con estructura similar o una mezcla de ellos.

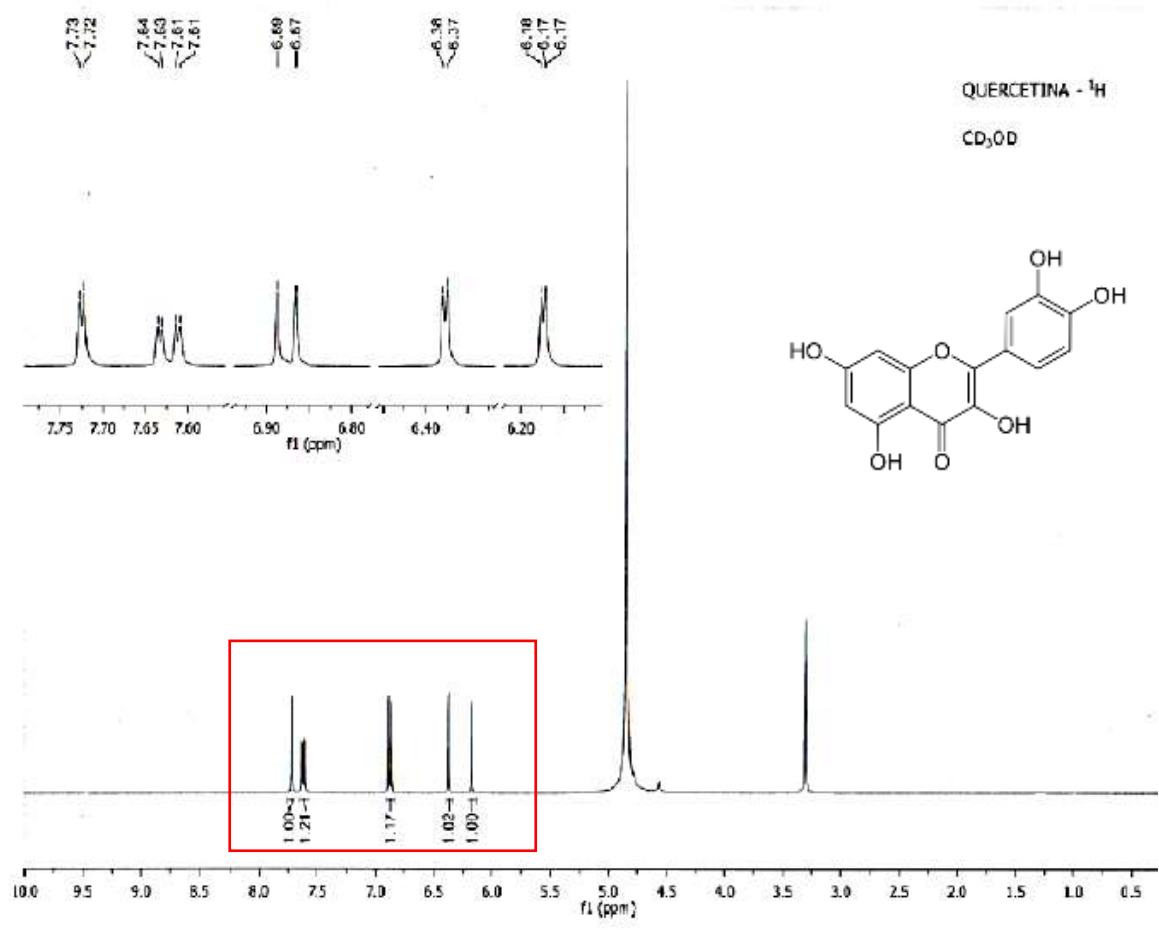


Figura 3.16.1 Espectro estándar quercetina por RMN-¹H.

➤ 3.4 Acoplamiento de Proteína

La reacción de acoplamiento se hizo con base en la evidencia experimental existente sobre la unión covalente entre una amina primaria (procedente de algún residuo de lisina de la proteína o de un grupo amino terminal) y el antioxidante (Arizmendi, N. 2016).

La implementación de peroxidasa como catalizador formará un radical en alguno de los átomos del polifenol. Este intermediario reaccionará mediante un proceso radicalario para unirse covalentemente a un residuo de lisina o a un grupo amino terminal de la proteína. Debido a la complejidad del espectro de RMN- H^1 de la proteína, sólo se pudo confirmar que se llevó a cabo la unión, aunque no se conoce con exactitud el sitio de unión entre las dos moléculas.

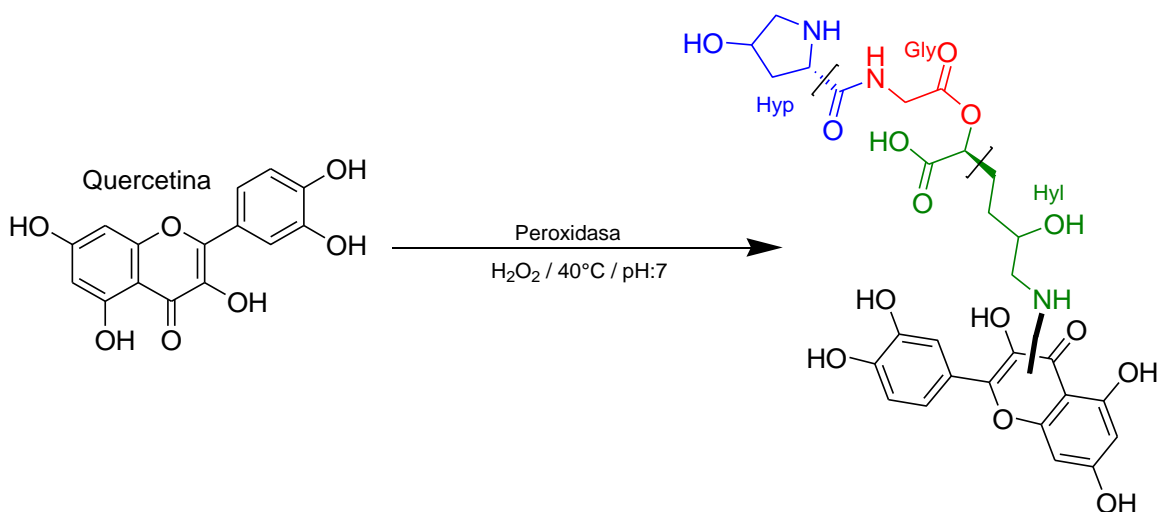


Figura 3.18. Bosquejo de reacción entre Quercetina y una cadena polipeptídica formada por Hyl-Gly-Hyp.

Para que se llevara a cabo la reacción de acoplamiento enzimático, se agregó a la solución de proteína hidrolizada (5%) un estándar de 200 ppm de antioxidante: ácido cafeico (AC), quercetina (Q) y kaempferol (K), así como una unidad de peroxidasa; posteriormente para generar el medio oxidante, se adicionó H_2O_2 a una concentración de $1.2 \mu M$ cada 10min en condiciones óptimas para la enzima ($40^\circ C$, $pH=7$) durante un periodo de 1.5 horas.

Para corroborar dicha unión, se cuantificó el antioxidante remanente producto de la purificación del hidrolizado, así como su capacidad antioxidante.

- 3.4.1 Comprobación de la unión enzimática antioxidante-proteína

Una vez finalizada la reacción de acoplamiento, se determinó la eficiencia de la reacción y la unión del polifenol a la proteína. Para ello, se purificó la proteína funcionalizada, mediante precipitación etanólica, con el fin de eliminar el antioxidante remanente. Al sobrenadante se le cuantificaron polifenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu, con la finalidad de medir la cantidad de antioxidante que no se enlazó a la proteína y así diferenciarlo del que sí se acopló. Los resultados se observan en la Tabla 3.9.

Tabla 3.9 Concentraciones de antioxidante estándar remanente en el sobrenadante de la purificación de la reacción de acoplamiento.

	Colágeno Hidrolizado			Grenetina Hidrolizada		
<i>Procedencia</i>	[Quercetina] (ppm)	[Kaempferol] (ppm)	[Ácido cafeico] (ppm)	[Quercetina] (ppm)	[Kaempferol] (ppm)	[Ácido cafeico] (ppm)
<i>Principio de la reacción</i>	200	200	200	200	200	200
<i>Sobrenadante</i>	0.01±0.06	0.18±0.09	0.01±0.03	0.32±0.12	0.17±0.05	0.49±0.63
<i>Rendimiento de la reacción</i>	99.85%	99.84%	99.90%	99.68%	99.64%	99.51%

*Resultados expresados considerando Blanco de hidrolizado + Blanco c/enzima sin antioxidante.

** Resultados promedio de cinco repeticiones ± la desviación estándar. C.V.< 5%.

Con base en los resultados (ver tabla 3.9), se observó de manera indirecta que aproximadamente el 99% del antioxidante estándar reacciona con la proteína, no obstante, esta prueba no es suficiente para asegurar que se llevó a cabo la formación del enlace amida.

La implementación de la enzima como catalizador de la reacción ha aumentado considerablemente el rendimiento de esta última si se comparan los resultados obtenidos en este experimento con los reportados por Arizmendi (2016), donde se indica que el rendimiento al utilizar ácido cafeico como antioxidante modelo fue tan solo de 56.63%. Es

importante considerar que el estudio antes mencionado se realizó con proteína de colágeno extraída de piel de pollo y el acoplamiento se llevó a cabo con reactivos de acoplamiento de química de péptidos (por ejemplo EDC), y que el colágeno hidrolizado comercial tiene más sitios activos disponibles, provocados por la hidrólisis de enlaces peptídicos durante su obtención. A pesar de la diferencia de tratamiento (Arizmendi, 2016), se muestra que la implementación de la enzima en la reacción de acoplamiento antioxidante-proteína aumenta el rendimiento de la misma.

➤ 3.4.2 Re-suspensión de la proteína funcionalizada

La proteína funcionalizada que se purificó, mediante precipitación etanólica, se re-suspendió en un volumen mínimo de agua destilada (5 mL) para cuantificar la capacidad antioxidante de la proteína acoplada mediante el método de efecto secuestrante del radical ABTS*. A continuación, en la Tabla 3.10 se muestran los resultados.

Tabla 3.10 Porcentaje de capacidad antioxidante estándar de la proteína funcionalizada y purificada.

	Hidrolizado s/polifenoles	Quercetina	Kaempferol	Ácido Cafeico
<i>Colágeno Hidrolizado</i>	23.88 ^b ±0.48%	75.85 ^a ±1.23%	75.72 ^a ±3.12%	75.76 ^a ±2.17%
<i>Grenetina Hidrolizada</i>	16.35 ^a ±1.24%	83.33 ^b ±2.83%	81.46 ^b ±3.02%	82.7 ^b ±2.89%

* Resultados promedio de cinco repeticiones ± la desviación estándar. C.V.< 5%.

**Resultados reportados en % de actividad antioxidante en la proteína funcionalizada.

***Resultado repostados considerando Blanco de hidrolizado + Blanco c/enzima sin antioxidante.

****Letras diferentes indican que existe una diferencia significativa, $\alpha=0.05\%$ (a>b)

Con base en estos resultados, se comprobó que el hidrolizado funcionalizado con estándar de antioxidantes, presenta una actividad antioxidante mayor a la que tiene por sí sólo (16.35% Grenetina Hidrolizada y 23.88% Colágeno Hidrolizado); por se puede fundamentar que el acoplamiento ocurrió.

Los hidrolizados comerciales de colágeno son generalmente del tipo II, cartílago de articulaciones, (Richar-Blum *et al.*, 2011), donde aproximadamente el 30% de los

aminoácidos totales son glicina (Gly), y el 25% hidroxiprolina (Hyp) e hidroxilisina (Hyl), el producto *per se* podría contar con moléculas con estructuras cíclicas y probablemente aromáticas derivadas del proceso de hidrólisis industrial que interferirían con la identificación de la unión covalente. La diferencia entre la capacidad antioxidante de cada tipo de hidrolizado corresponde a la purificación y calidad de cada producto, pues éstos sufren una o varias hidrólisis proteicas (con enzimas especializadas) dependiendo de su uso comercial.

En el siguiente esquema (Figura 3.19), se muestra un bosquejo de la reacción de acoplamiento entre un flavonoide (kaempferol) y una cadena polipeptídica típica del hidrolizado comercial, observando la unión covalente en un anillo aromático del flavonoide debido a su elevada deslocalización electrónica.

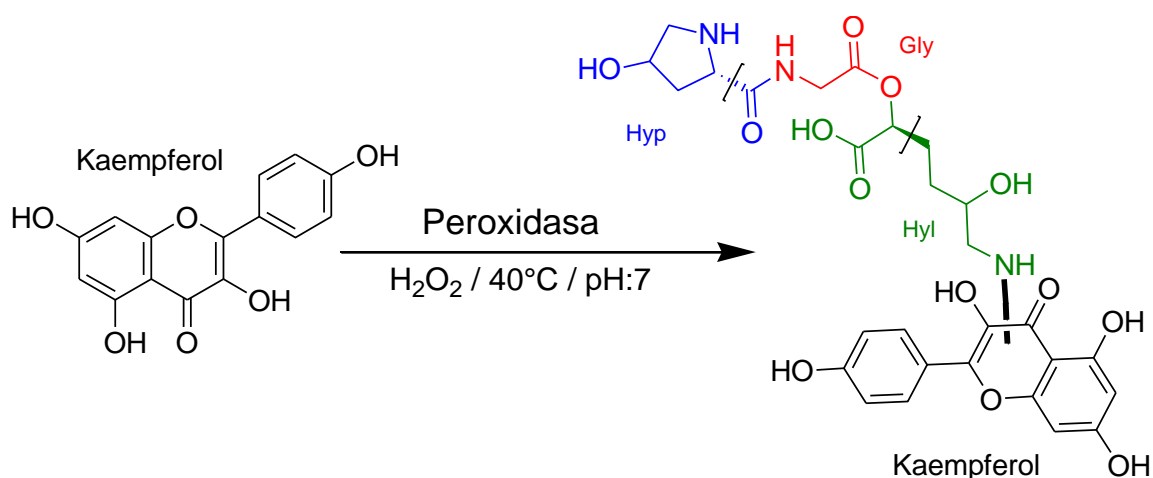


Figura 3.19. Bosquejo de reacción entre kaempferol y una cadena polipeptídica formada por Hyl-Gly-Hyp.

➤ 3.4.3 Identificación de la unión proteína-antioxidante por medio de Resonancia Magnética Protónica (RMN-¹H) del precipitado de la proteína funcionalizada

Para comprobar que la funcionalización enzimática del hidrolizado se llevó a cabo exitosamente, se obtuvieron los espectros de RMN-¹H de las muestras de colágeno

hidrolizado y grenetina hidrolizada funcionalizadas con estándar de quercetina y kaempferol. Las muestras se disolvieron en D₂O para su análisis en un equipo *Varian Unity Inova* (300 MHz).

En todos los espectros (ver Figuras 3.20-3.24) se observan señales entre 0 y 5 ppm que corresponden a las cadenas laterales de los aminoácidos alifáticos del hidrolizado. Las resonancias con un δ entre 6.5 y 8.5 ppm son típicas de un compuesto aromático y, por lo tanto, corresponden al antioxidante (Figura 3.22). Estos espectros siguieron la unión covalente, por vía enzimática, del antioxidante con las aminas primarias disponibles de la proteína hidrolizada, aunque no se conoce con exactitud el lugar de la unión covalente.

Los espectros blanco de ambos hidrolizados (Figura 3.20 y 3.21), presentan una señal a $\delta = 7.4$, lo que sugiere la presencia de aminoácidos con cadenas laterales aromáticas (como Tyr y/o Phe), presentes en la composición nativa del hidrolizado. Al observar esta señal, se compararon los desplazamientos químicos de las señales que corresponden a la muestra funcionalizada con las del antioxidante estándar purificado. En la Figura 3.4.3.4 se muestra una ampliación del espectro de funcionalización de grenetina hidrolizada con estándar de quercetina, donde se observan señales en un $\delta = 8.15, 7.75$ y 6.97 ppm, características de quercetina purificada (Figura 3.23).

Estos valores de desplazamiento químico, así como los análisis indirectos a dichos hidrolizados indican que la unión por vía enzimática se llevó a cabo y que presenta una mayor eficiencia de acoplamiento comparada con estudios anteriores (Arizmendi, 2016), donde la unión fue mediante métodos químicos. Las diferencias en desplazamiento químico se deben a que el ambiente químico del antioxidante unido a la proteína es diferente al antioxidante puro.

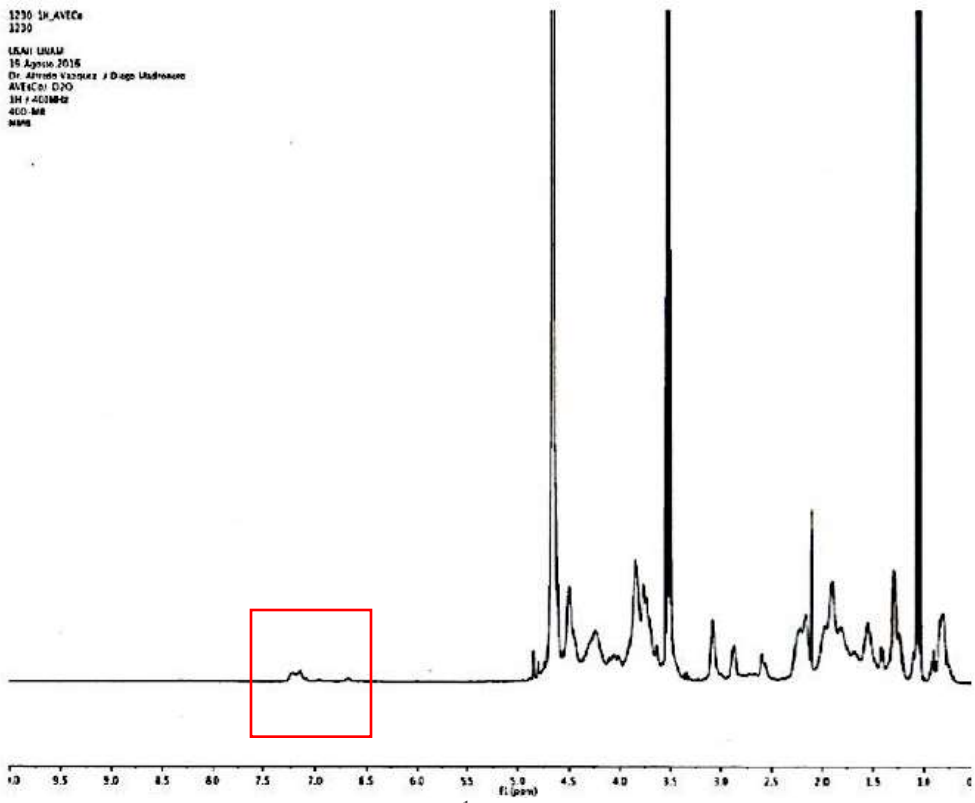


Figura 3.20 Espectro de RMN- H^1 blanco de colágeno hidrolizado.

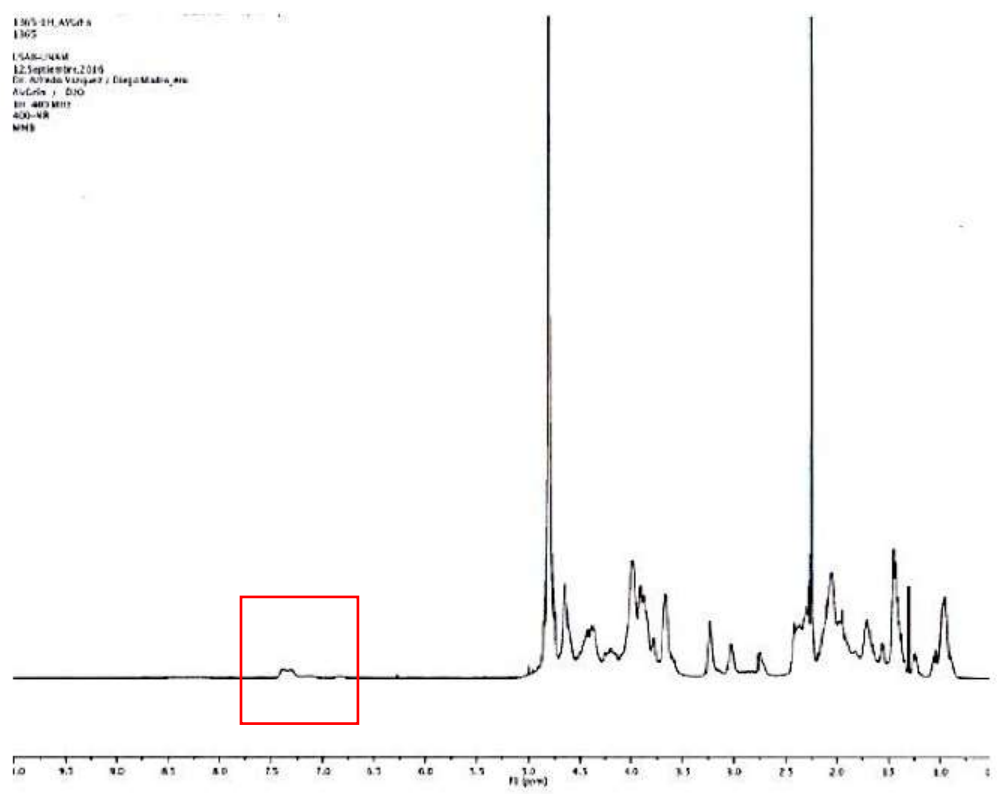


Figura 3.21. Espectro de RMN- H^1 blanco de grenetina hidrolizada.

*Una muestra blanco de colágeno hidrolizado y otra de grenetina hidrolizada se sometieron por separado al mismo tratamiento de funcionalización enzimática. En los espectros (figuras 3.20 y 3.21), se pueden observar señales en el intervalo 6.5-7.5 ppm, características de compuestos aromáticos, que podrían ser reflejo de algunos aminoácidos aromáticos presentes en el hidrolizado o de la estructura de la enzima que se utilizó.

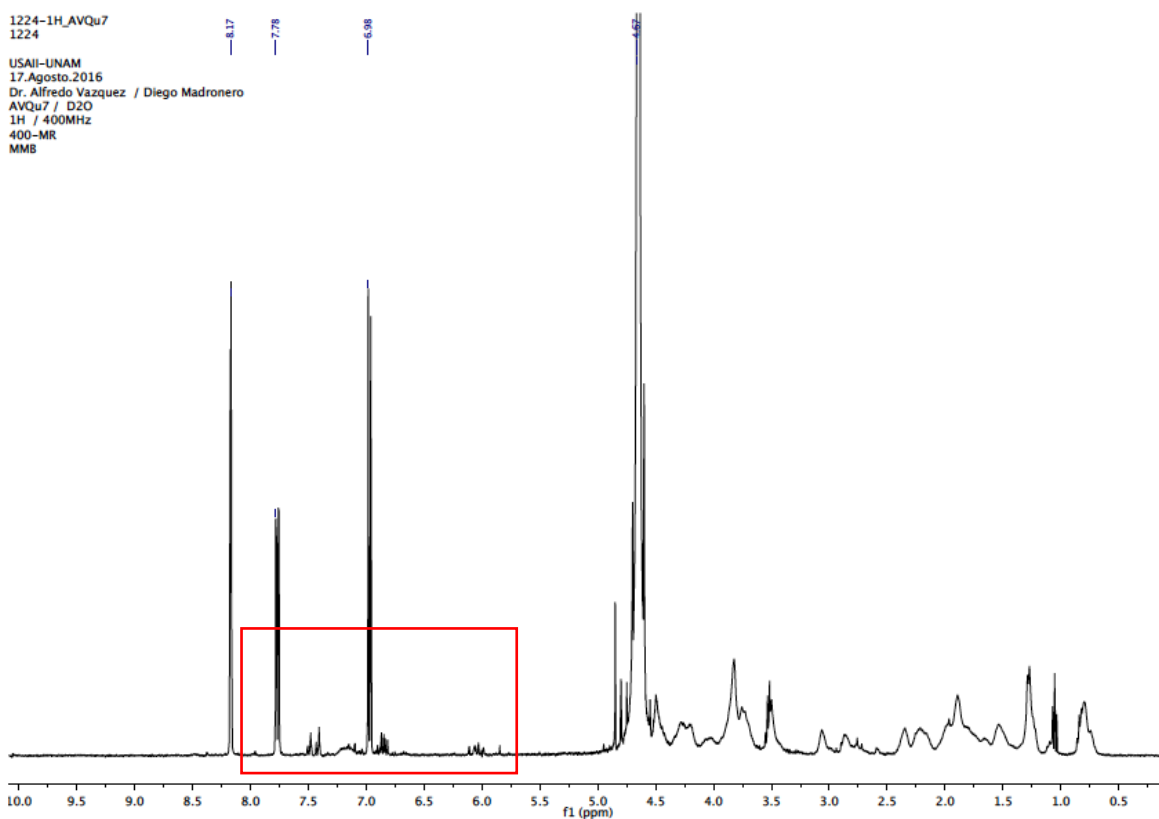


Figura 3.22. Espectro de RMN- H^1 de la unión proteína-quercetina (grenetina hidrolizada).

*En este espectro se observan señales con desplazamiento químico entre 5.5 y 8 ppm, correspondientes a compuestos aromáticos. Al comparar este espectro con el espectro estandar de quercetina (ver Figura 3.24), se pueden observar señales iguales en 6.87 ppm y 7.65 ppm, y otras señales de desplazamiento químico similar (ver Figura 3.23). Los resultados de la RMN- H^1 y las pruebas de capacidad antioxidante – polifenoles totales realizadas demuestran el acoplamiento proteico con quercetina.

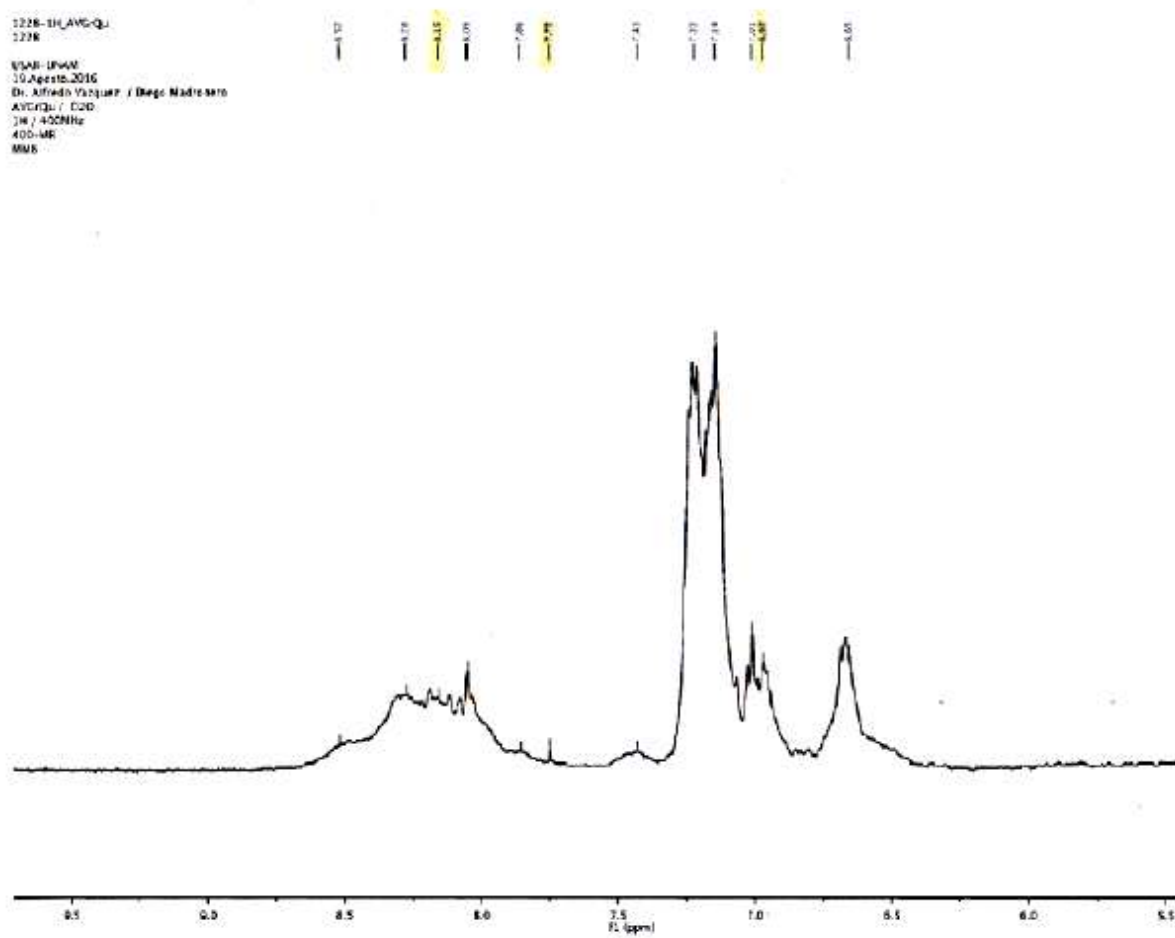


Figura 3.23. Ampliación de espectro de RMN- H^1 unión proteína-quercetina (gretina hidrolizada).

*Se observan señales en 6.87, 7.65 y 8.15 ppm correspondientes a las señales emitidas por un estándar de quercetina (Figura 3.4.3.5).

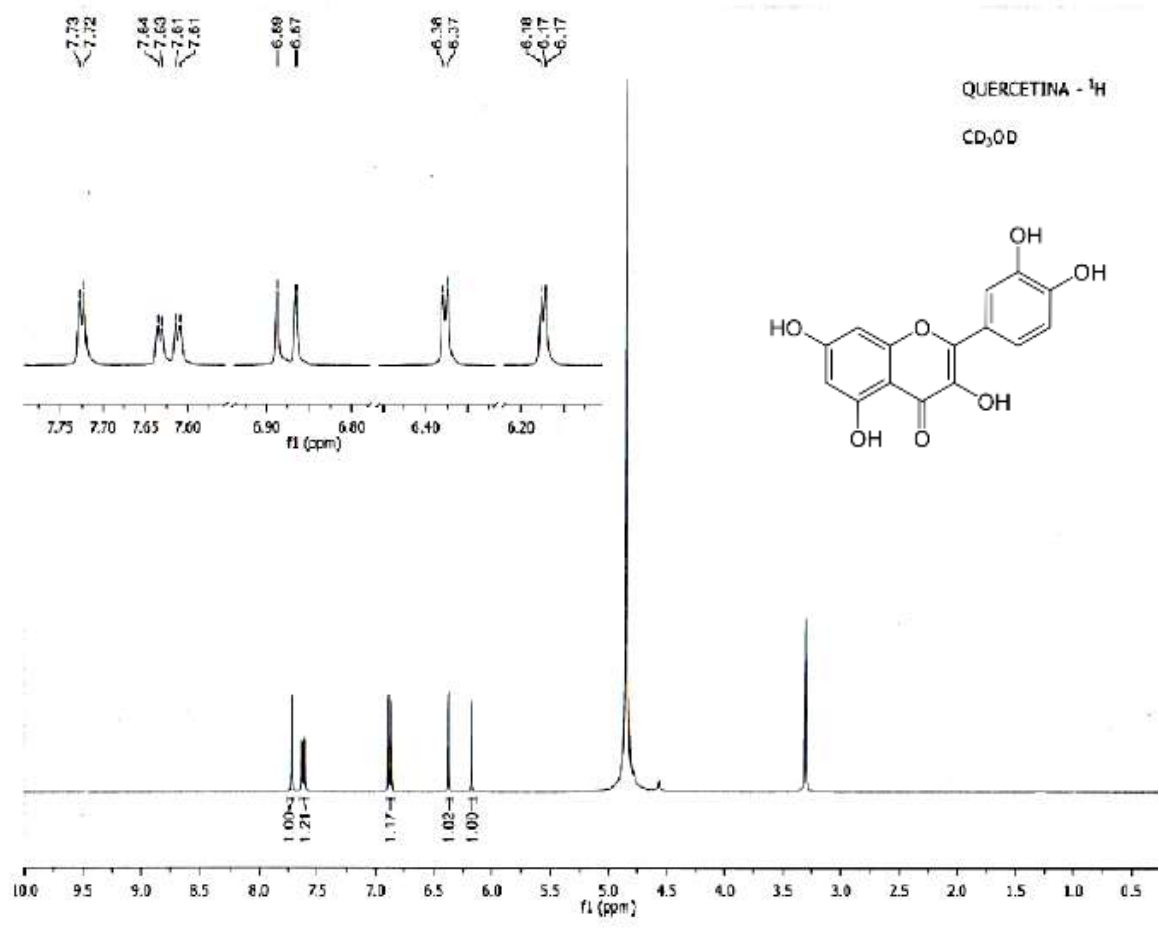


Figura 3.24. Espectro de RMN-H¹ muestra estándar de quercetina.

➤ 3.4.4 Síntesis de Tripéptido Boc-Hyp-Gly-Lys(Cbz)-OCH₃: comprobación de la unión covalente entre grupo amino residual de Lisina y quercetina.

La presencia de diversos residuos de aminoácidos con estructuras químicas diferentes en una proteína tiene como consecuencia que los espectros de RMN-H¹ de este tipo de compuestos sean difíciles de interpretar y que se complique la asignación precisa de todas las señales. Para el caso particular de los espectros de RMN-H¹ del acoplamiento entre el antioxidante y la proteína hidrolizada, sólo se obtiene información que demuestra la presencia de ambas moléculas, pero por las razones expuestas anteriormente, no es posible conocer el sitio exacto de la unión. Para reunir información útil para resolver este problema, se planteó la síntesis de un tripéptido que contuviera en su estructura los aminoácidos más frecuentes en la proteína de colágeno: hidroxiprolina (Hyp), glicina (Gly) y lisina (Lys). Una vez sintetizado el tripéptido, se planeó llevar a cabo su acoplamiento, vía enzimática, con el antioxidante polifenólico, y debido a que los espectros de RMN-H¹ de moléculas pequeñas son relativamente sencillos, se podrá conocer con facilidad el sitio de unión entre el antioxidante y el péptido, esta información se podrá usar (extrapolar) para comprender mejor la unión del antioxidante con la proteína.

Las reacciones de acoplamiento peptídico han avanzado con el desarrollo de nuevos agentes de acoplamiento en síntesis (Han, J. *et.al.*, 2004). Estos agentes han facilitado la síntesis de grupos carboxamida, para las que se empleaba comúnmente la condensación de ácidos carboxílicos y carboxidiamidas para la activación del grupo carboxilo (Pu, Y., *et al.*, 2009). En este experimento se utilizó el hidrocloroformo de N-(3-dimetilaminopropil)-N-etilcarboxidiimida (EDC-HCl) como agente activador para el acoplamiento entre los grupos carboxilo y amino de aminoácidos comerciales, para la síntesis del tripéptido Boc-Hyp-Gly-Lys(Cbz)-OCH₃.

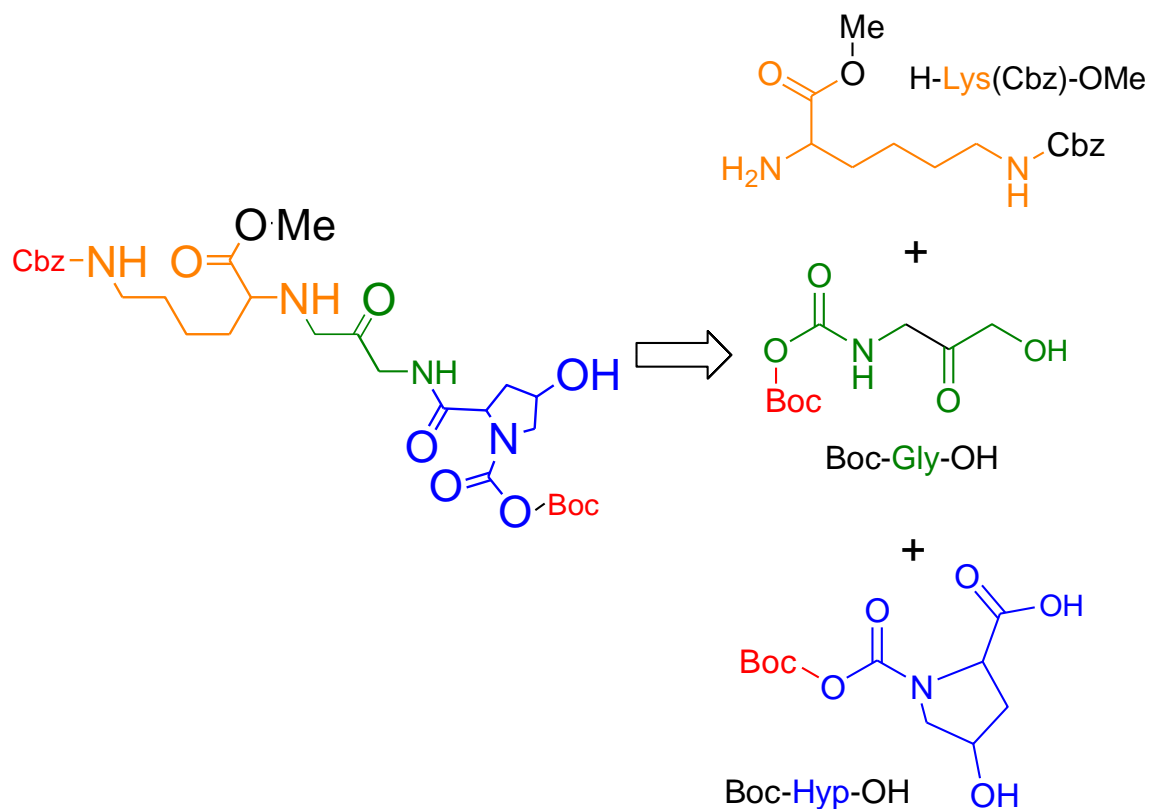


Figura 3.25. Retro-síntesis de Tripeptido Boc-Hyp-Gly-Lys(Cbz)-OMe.

La síntesis del tripéptido se llevó a cabo en dos etapas: la primera, fue la reacción de acoplamiento entre Boc-Gly-OH y H-Lys(Cbz)-OMe, ambos aminoácidos comerciales con 99% de pureza (*Sigma-Aldrich*). Después de la reacción (procedimiento descrito en la sección de metodología), el dipéptido se purificó y concentró, obteniendo 91% de rendimiento; y se sometió a un proceso de desprotección del grupo BOC mediante el uso de TFA y CH₂Cl₂. El producto de la reacción se identificó por medio de RMN-H¹ (ver Figura 3.25), confirmando que se llevó a cabo la reacción de acoplamiento.

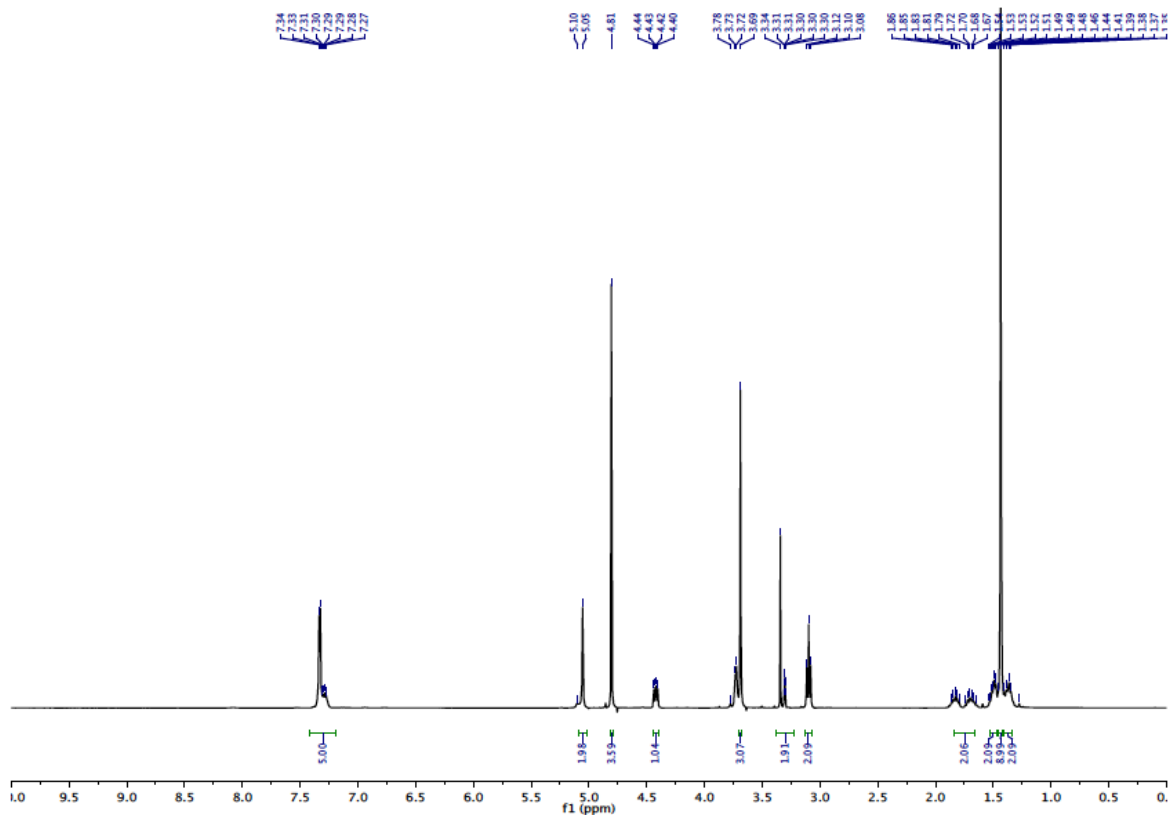


Figura 3.26 Comprobación de síntesis de dipéptido Boc-Gly-Lys(Cbz)-OMe; espectroscopia por RMN- H^1 .

El espectro de RMN- H^1 para el dipéptido (Figura 3.26) se obtuvo en CD_3OD como disolvente, por lo que la señal de los protones de las amidas no aparece en el espectro. Entre 7.34-7.27 ppm se observa un multiplete que integra para 5H. En 5.05 ppm aparece un singulete ancho (2H) que corresponde a los protones bencílicos del grupo protector Cbz; en 4.43 ppm se observa un doble de dobles ($d,d J = 8$ Hz, 1H) que corresponde al proton C- α del residuo de lisina; en 3.74 ppm aparece un multiplete que integra para 2H asignado a los dos protones C- α del residuo de glicina; en 3.10 ppm se observa un triplete aparente (ta, 2 H, $J = 8$ Hz) asignados a C- β del residuo de lisina; entre 1.88-1.68 ppm aparece un multiplete que integra para 2H y que corresponde a los protones C- γ de la lisina; en 1.49 ppm se observa un multiplete que integra para 2H y corresponde a los protones C- δ de la lisina; en 1.37 ppm aparece otro multiplete que integra para 2H, asignados a los protones C- ϵ de la lisina. Finalmente, en 1.44 ppm aparece un singulete que integra para 9H y que corresponde a los protones del grupo protector Boc.

La segunda etapa de síntesis, consiste en la reacción de acoplamiento dipéptido-aminoácido comercial Boc-Hyp-OH (99% de pureza, Sigma-Aldrich), que se purificó y concentró, obteniendo un 86% de rendimiento; posteriormente, se identificó por medio de RMN- H^1 (ver Figura 3.27).

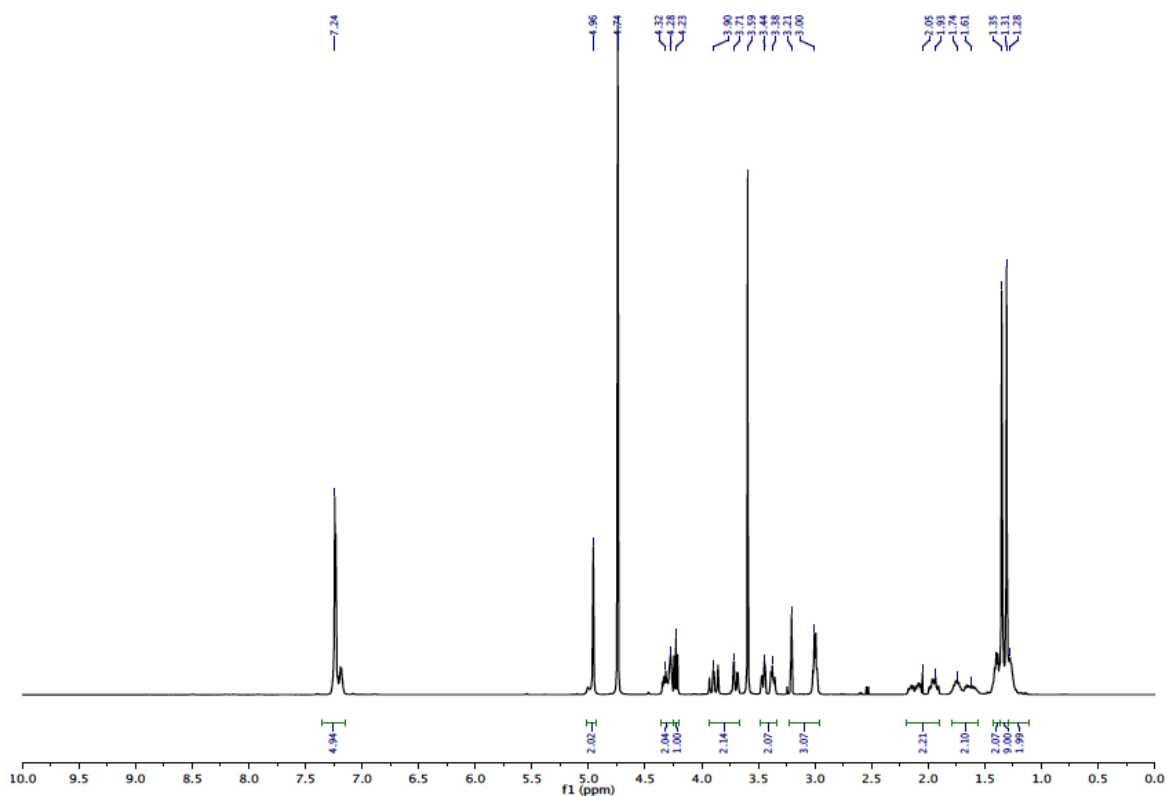


Figura 3.27 Espectro de RMN- H^1 de la síntesis del tripéptido Boc-Hyp-Gly-Lys.

El disolvente utilizado fue CD_3OD , por lo que no se aprecia el grupo hidroxilo de la Hyp. En la Figura 3.27 comenzando por campo bajo, se observa un singulete en 7.24 ppm que integra para los 5H del anillo aromático del grupo Cbz; en 4.96 ppm hay un singulete aparente que integra 2H de la cadena alifática del Cbz, en 4.28-4.32 ppm se observa un multiplete que integra para 2H, uno de ellos del C- α del residuo de Hyp y el otro del C- α del residuo de Lys; en 4.23 ppm aparece un triplete que integra 1H del C-4 del residuo de Hyp; en la región entre

3.71-3.90 ppm aparece un multiplete que integra para 2H, que corresponde a C-4 de la cadena alifática del residuo de Lys; 3.38-3.44 ppm hay un multiplete que integra para 2H del C-5 del residuo de Hyp; en 3.00-3.21 ppm hay un multiplete que integra para 3H del metilo libre del residuo de Lys; en 1.93-2.06 ppm se da un multiplete que integra para 2H del C-3 del residuo Hyp; en 1.61-1.74 ppm existe un multiplete que integra para 2H, correspondientes al C-1 de la cadena alifática de Lys; 1.38 ppm hay un multiplete que integra para 2H de C-3 de la cadena de Lys y en 1.27 ppm aparece la señal de los 2H del C-2 de la misma cadena; finalmente, entre 1.31-1.35 ppm aparece un doblete que integra 9H, que corresponden al grupo protector Boc. Las señales entre 4.74 ppm y 3.59 corresponden de manera respectiva, al H₂O y al MeOH residual.

El tripéptido caracterizado y purificado se sometió a una desprotección del grupo Cbz de la cadena residual de lisina, para poder cuantificar y comprobar la unión covalente de la reacción de funcionalización proteína-antioxidante (Figura 3.28); por lo que 30 mg de tripéptido desprotegido se ajustaron a las condiciones de acoplamiento enzimático (descritas anteriormente); dicha muestra se identificó estructuralmente por medio de RMN-H¹ (Figura 3.30).

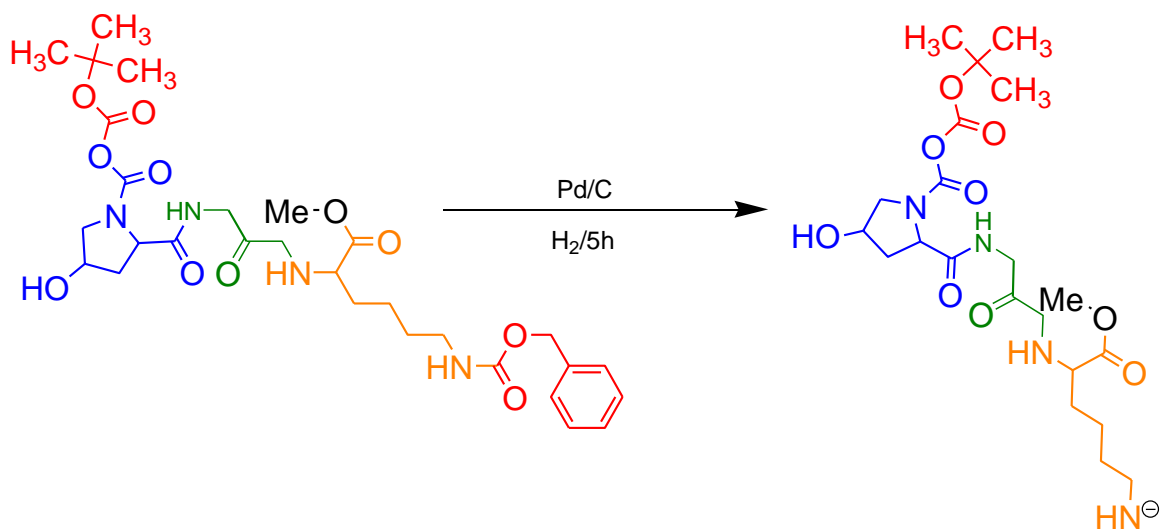


Figura 3.28. Desprotección del grupo Cbz en amina libre presente en el tripéptido.

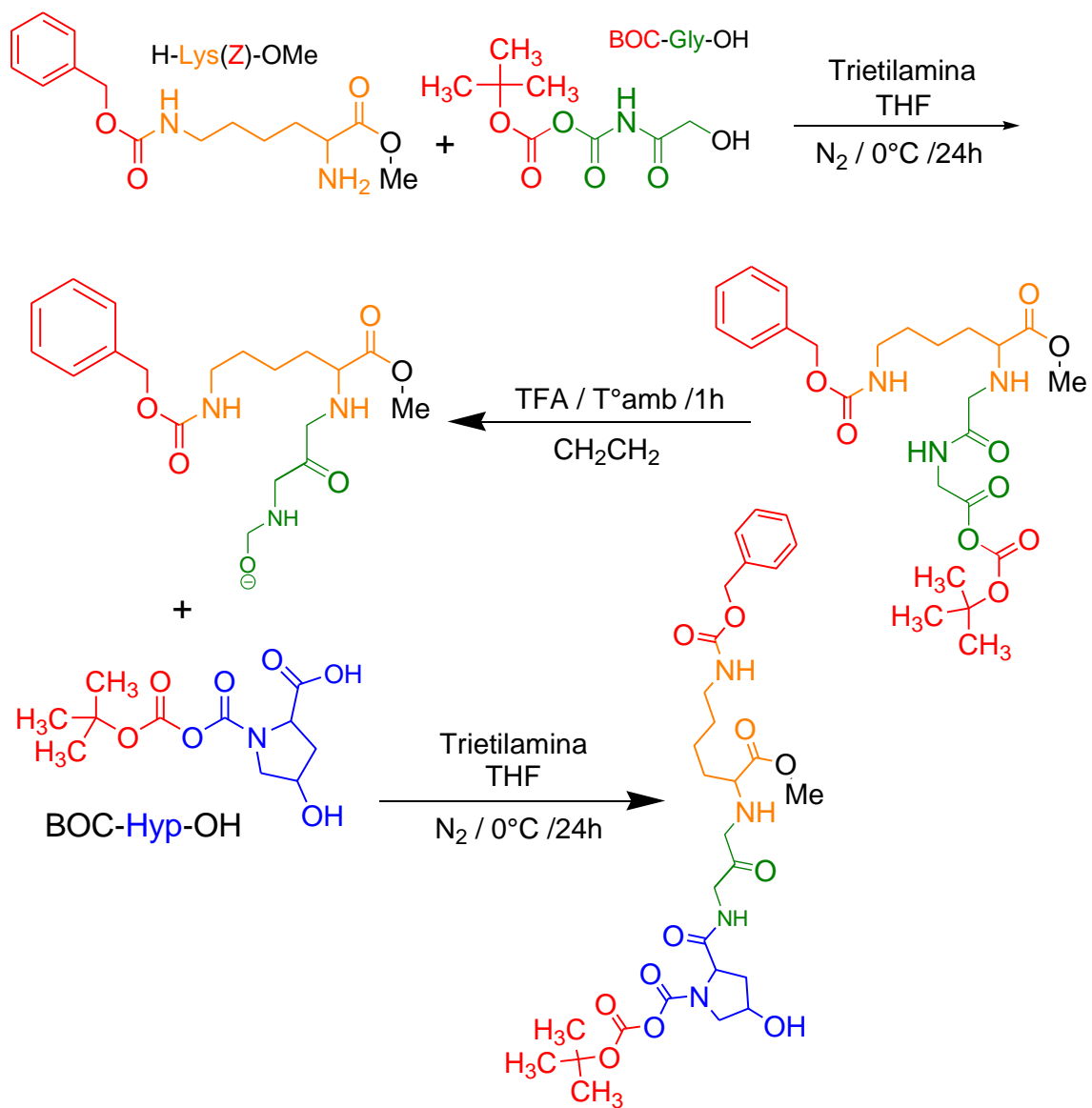


Figura 3.29 Síntesis de tripéptido (Boc-Hyp-Gly-Lys-OMe).

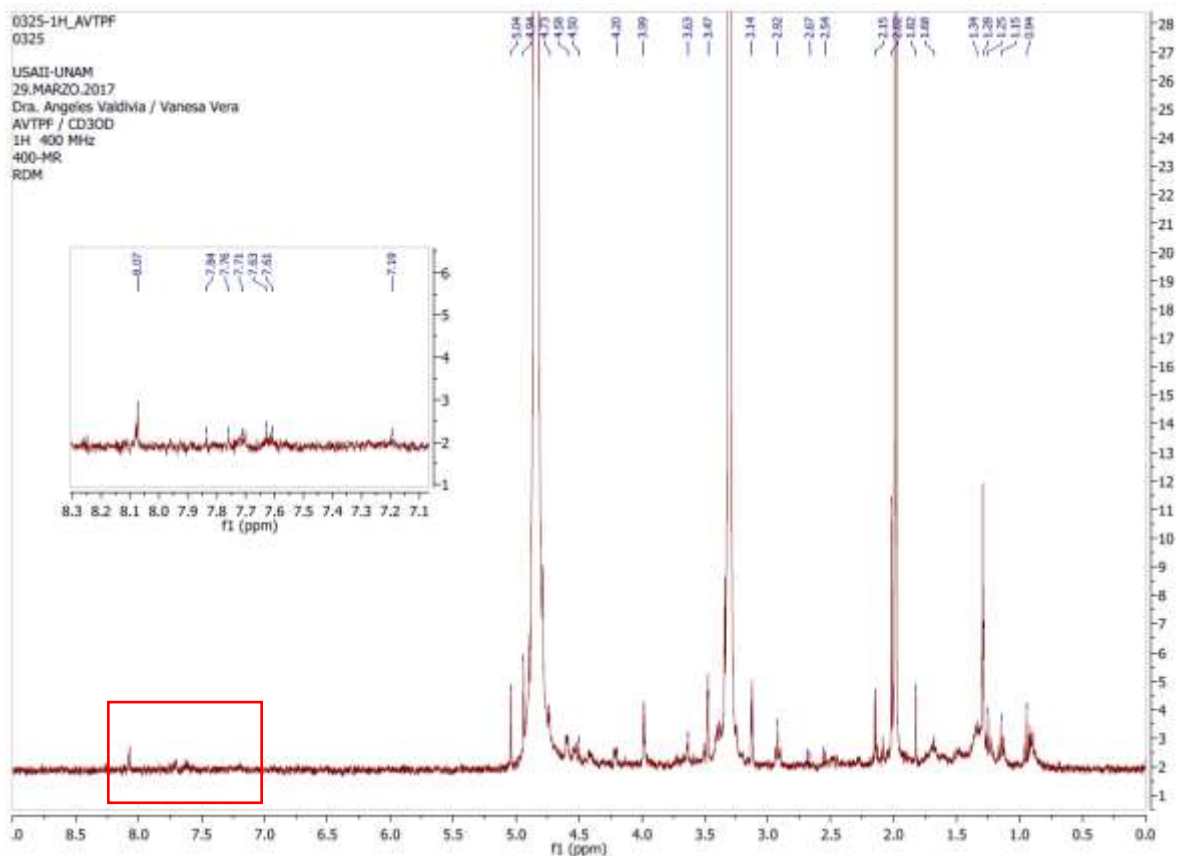


Figura 3.4.4.6. Espectro de RMN- H^1 de la unión tripéptido con quercetina.

*Al comparar el espectro de síntesis de tripéptido (Figura 3.27) con este espectro, que representa la funcionalización tripéptido–quercetina, se puede observar que en este ultimo hay señales entre 7 y 8 ppm, lo que comprueba la unión covalente del antioxidante con la cadena de lisina.

CONCLUSIONES

- ✓ Se extrajeron los polifenoles de la semilla de Chía, mediante una extracción ácido-etanólica a 60°C por 4h, con una concentración de 1.1684 mg EAC/g semilla.
- ✓ Se separaron compuestos polifenólicos con Rf igual a un estándar de quercetina y kaempferol en CH₂Cl₂:MetOH (95:5)
- ✓ Se obtuvieron espectros de RMN-H¹ donde se observa la presencia de compuestos polifenólicos del extracto ácido-etanólico de la semilla de Chía, con señales de desplazamiento químico en 5.2 y 7.8 ppm.
- ✓ Se tiene evidencia ”mediante análisis indirectos y RMN-H¹” de que la unión enzimática proteína-antioxidante se llevó a cabo.
- ✓ La reacción de acoplamiento enzimática tuvo un rendimiento para todas las muestras de aproximadamente el 99% de acuerdo con la cuantificación del antioxidante remanente.
- ✓ Mediante una técnica de RMN-¹H se comprobó la presencia de un polifenol en la proteína funcionalizada, lo que confirma la incorporación del polifenol a la proteína.
- ✓ Se determinó la capacidad antioxidante de la proteína funcionalizada “purificada” de aproximadamente 75% para el colágeno hidrolizado comercial y de aproximadamente el 80% para la grenetina hidrolizada de venta a granel.
- ✓ Se comprobó, mediante RMN-H¹ la síntesis del dipéptido Boc-Gly-Lys.OMe.
- ✓ Se comprobó, mediante una técnica de RMN-H¹, la síntesis del trípeptido Boc-Hyp-Lys-Gly-OMe.
- ✓ Se comprobó la unión covalente de un polifenol al tripéptido Boc-Hyp-Lys-Gly-OMe.

REFERENCIAS

- Al-Sheraji, S. H., Ismail, A., Manap, M. Y., Mustafa, S., Yusof, R. M., y Hassan F. A. (2013). *Prebiotics as functional foods: A review*. Journal of Functional Foods, 5(4), 1542-1553. DOI: 10.1016/j.jff.2013.08.009.
- Alu'datt, M. H., Rababah, T., Ereifej, K., y Alli, I. (2013). *Distribution, antioxidant and characterisation of phenolic compounds in soybeans, flaxseed and olives*. Food Chemistry, 139(1-4), 93-99. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.12.061.
- Arizmendi, N. (2016). *Desarrollo de películas activas por unión química de colágeno de piel de pollo a polifenoles de la chía (Tesis de licenciatura)*. UNAM, CDMX, México.
- Ayala, J.F., Vega, V., Rosas, C., Palafox, H., Villa, J.A, Siddiqui, M.W., Gonzales-Aguilar, G. A., (2011). *Agro-industrial potencial of exotic fruit byproducts as a source of food additives*. Food Research International, 44, 1866-1874.
- Ayerza, R. (2009). *The seed's protein and oil content, fatty acid composition, and growing cycle length of a single genotype of chia (Salvia hispanica L.) as affected by environmental factors*. J Oleo Sci, 58(7), 347-54.
- Bargagli, R. (2000). *Trace metals in Antarctica related to climate change and increasing human impact*. Rev Environ Contam Toxicol, 166, 129-173.
- Benitez, R., Ibarz, A., y Pagán, J. (2009). *Protein hydrolysates: processes and applications*. Acta bioquímica clinica latinoamericana, 42(2), 227-236.
- Beserra-Almeida, M. M., Machado de Sousa, P. H., Campos-Arriaga Â. M., Matias do Prado, G., de Carvalho Magalhães, C. E., Arraes-Maia, G., y Gomes de Lemos, T. L. (2011). *Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil*. Food Research International, 44, 2155–2159. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.03.051>.
- BRENDA (2018). Data base of enzyme peroxidase. The Comprehensive Enzyme Information System. Technische Universität Braunschweig. Recuperado de <https://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=1.11.1.16>.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., y Berset, C. (1995). *Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity*. LWT-Food Science and Technology, 28(1), 25-30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5).

- Bodoira R. M., Penci M. C., Ribotta P. D., y Martínez M. L. (2017). *Chía (Salvia hispánica L.) oil stability: Study of the effect of natural antioxidants*. LWT-Food Science and Technology, 75, 107-113.
- Cahill, J. P. (2004). *Genetic diversity among varieties of Chía (Salvia hisspanica L.)*. Genetic Resources and Crop Evolution, 57(7), 773-781.
- Cittadini M. C., García-Estévez, I., Escribano-Bailón, M. T., Rivas-Gonzalo, J. C., Valentich, M. A., Repposi, G., y Soria, E. A. (2018). *Modulation of Fatty Acids and Interleukin-6 in Glioma Cells by South American Tea Extracts and their Phenolic Compounds*. Nutr Cancer, 70(2), 267-277. DOI: 10.1080/01635581.2018.1412484.
- Chang, C.-C., Yang, M.-H., Wen, H.-M., y Chern, J.-C. (2002). *Estimation of total flavonoid content in propolis two complementary colorimetric methods*. Journal of Food and Drug Analysis, 10(3), 178-182.
- Coates, W., y Ayerza (h), R. (1996). *Production potential of chia in northwestern Argentina*. Industrial Crops and Products, 5(3), 229-233. [https://doi.org/10.1016/0926-6690\(96\)89454-4](https://doi.org/10.1016/0926-6690(96)89454-4).
- Choe, E., y Min, D. B. (2006). *Mechanisms and Factors for Edible Oil Oxidation*. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 5(4), 169-186. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2006.00009.x>.
- Cheison, S.C., Leeb, E., Toro-Sierra, J., y Kulozik, U. (2011). *Influence of hydrolysis temperatura and pH on the seletive hydrolysis of whey proteins by trypsin and potential recovery of native alpha-lactalbumin*. International Dairy Journal, 21, 166-177.
- Chen, X., Zhang, Y., Zu, Y., Yang, L., Lu, Q., y Wang, W. (2014). *Antioxidant effects of rosemary extracts on sunflower oil compared with synthetic antioxidants*. Food Science & Technology, 49(2), 385-391. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12311>.
- Cotabarren, J., Rosso, A. M., Tellechea, M., García Pardo, J., Rivera, J. L., Obregón, W. D., y Parisi, M. G. (2018). *Adding value to the Chía (Salvia hispanica L.) expeller: Production of bioactive peptides with antioxidant properties by enzymatic hydrolysis with Papain*. Food Chemistry, 274, 848-856.
- Da Silva, B. P., Anunciação, P. C., Matyelka, J. C. D. S., Della-Lucia, C. M., Martino, H. S. D., y Pinheiro-Sant'Ana, H. M. (2017). *Chemical composition of Brazilian chia*

- seeds grown in different places*. Food Chemistry, 221, 1709-1716. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.10.115.
- Denis, A., Brambati, N., Dessauvages, B., Guedj, C., Ridoux, C., Meffre, N., y Autier, C. (2008). *Molecular weight determination of hydrolyzed collagens*. Food Hydrocolloids, 22(6), 989-994. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2007.05.016>.
 - Dunn, J. (8th February 2010). *The Chia Company seeks entry into European market*. Melbourne, Australia: Australian Food News thought for food. Recuperado de <http://www.ausfoodnews.com.au/2010/02/08/the-chia-company-seeks-entry-into-european-market.html>.
 - Ege, S. (2000). *Química Orgánica: Estructura y Reactividad (Tomo 2)*. Barcelona: Reverté.
 - Gaffney, P. J., Edgell, T. A., Dawson, P. A., Ford, A. W., y Stocker, E. (1996). *A pig collagen peptide fraction. A unique material for maintaining biological activity during lyophilization and during storage in the liquid state*. J Pharm Pharmacol, 48(9), 896-898.
 - Galanakis, C.M. (2012). *Recovery of high added-value components from food wastes: Conventional, emerging technologies and commercialized applications*. Trends in Food Science and Technology, 26(2), 68-67.
 - Galanakis, C.M. (2013). *Emerging technologies for the production of nutraceuticals from agricultural by products: A viewpoint of opportunities and challenges*. Food and Bioproducts Processing, 91(4), 574-579.
 - Grimble, G. K. (2000). Mechanisms of peptide and amino acid transport and their regulation. In P. Fürst y V. Young (Eds.), *Proteins, Peptides and Amino Acids in Enteral Nutrition* (pp. 63-88). Nestec, Vevey, Switzerland: Nestlé Nutrition Workshops Series Clinical & Performance Program. <https://doi.org/10.1159/000061797>.
 - Halliwell, B. (1990). *How to characterize a biological antioxidant*. Free Radic Res Commun, 9(1), 1-32.
 - Harborne, J. B., y Williams, C. A. (2000). *Advances in flavonoid research since 1992*. Phytochemistry, 55(6), 481-504.

- Han, J., y Kim, Y. A. (2004). *Recent development of peptide coupling reagents in organic synthesis*. *Tetrahedron*, 60(11), 2447-2467. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2004.01.020>.
- Hans J. Reich. (2018). Chem 605 Structure Determination Using Spectroscopic Methods. 6(13) <https://www.chem.wisc.edu/areas/reich/chem605/index.htm>.
- Heim, K., Tagliaferro, A., y Bobilya, D. (2002). *Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure- activity relationships*. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13(10), 572-584.
- Hernández, J. A., y Miranda, S. (2008). Caracterización morfológica de Chía (*Salvia hispánica* L.). *Fitotec. México*. 31(2), 105-113.
- Institute of Medicine (1998). *Dietary Reference Intakes: Proposed Definition and Plan for Review of Dietary Antioxidants and Related Compounds*. Washington, DC: The National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/6252>.
- Iqbal, S., y Bhangar, M. I. (2007). *Stabilization of sunflower oil by garlic extract during accelerated storage*. *Food Chemistry*, 100(1), 246-254. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.09.049>.
- Ixtaina, V. Y., Martínez, M. L., Spotorino, V., Mateo, C. M., Maestri, D. M., Diehl, B. W. K., Nolasco, S. M., y 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. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2010.08.006>.
- Johnston-Banks, F. A. (1990). *Gelatin*. In P. Harris (Ed.), *Food gels* (pp. 233-289). London: Elsevier Appl. Sci.
- Kim, K.-H., Tsao, R., Yang, R., y Cui, S. W. (2006). *Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect of hydrolysis conditions*. *Food Chemistry*, 95(3), 466-473. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.01.032>.
- Krasaechol, N., Sanguandeeikul, R., Duangmal, K., y Owusu-Apenten, R. K. (2008). *Structure and functional properties of modified threadfin bream sarcoplasmic protein*. *Food Chemistry*, 107(1), 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.03.075>.

- Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., García-Parrilla, M. C., Troncoso, A. M., y Fett, R. (2004). *Actividad antioxidante de pigmentos antocianicos*. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 24(4), 691-693.
- Kunradi, F., Campelo, G., Copetti, C., Di Pietro, P., Nunes, E. y Feet R. (2011). *Phenolic compounds and antioxidant activity of the Apple flesh and peel of eleven cultivars grown in Brazil*. *Scientia Horticulturae*, 128, 261-266.
- Lozano-Ojalvo, D. (2017). *Estrategias basadas en péptidos para la prevención y tratamiento de la alergia contra el huevo (Tesis de Doctorado)*. Universidad Autónoma de Madrid. Departamento de Química Agrícola. Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL).
- Marineli, R. S., Moraes, É. A., Lenquiste, S. A., Godoy, A. T., Eberlin, M. N., y Maróstica Jr., M. R. (2014). *Chemical characterization and antioxidant potential of Chilean chia seeds and oil (Salvia hispanica L.)*. *LWT—Food Science and Technology*, 59(2), 1304–1310, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.04.014>.
- Manninen, A. H. (2009). *Protein hydrolysates in sports nutrition*. *Nutrition & Metabolism*, 6(38). <https://doi.org/10.1186/1743-7075-6-38>.
- McClements, D. J., y Decker, E. A. (2006). *Lipid Oxidation in Oil-in-Water Emulsions: Impact of Molecular Environment on Chemical Reactions in Heterogeneous Food Systems*. *Journal of Food Science*, 65(8), 1270-1282. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2000.tb10596.x>.
- Milner, J. A. (1994). *Reducing the Risk of Cancer*. In Goldberg (Ed.) (pp. 39-70), *Functional Foods*. New York: Chapman & Hall, Inc.
- Moreira, R., Chenlo, F., Prieto, D. M., y Torres, M. D. (2012). *Water Adsorption Isotherms of Chia (Salvia hispanica L.) Seeds*. *Food and Bioprocess Technology*, 5(3), 1077–1082. <https://doi.org/10.1007/s11947-010-0400-y>.
- Muñoz, L. A., Cobos, A., Diaz, O., y Aguilera, J. M. (2012). *Chia seeds: Microstructure, mucilage extraction and hydration*. *Journal of Food Engineering*, 108(1), 216-224. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.06.037>.
- Moure, A., Cruz, J., Franco, D., Dominguez, J., Sineiro, J., Dominguez, H., Nuñez, M., y Parajo, J. (2008). *Natural antioxidants from residual sources*. *Food Chemistry*. 72(2), 145-171.

- Nahar, Z., Sarwar, MS., Safiqi, Islam, M., Rahman, A., Nazrul, Islam S., Islam, MS, y Hasnat, A. (2013). Determination of serum antioxidant vitamins, glutathione and MDA kevels un panic disorder patients. *Drug Research (Stuttg). Thieme.* 63(08): 424-428.
- Oehlke, K., Heins, A., y Schwarz, K. (s. f.). *Influence of Emulsifier on Spectroscopic Properties of Ferulic and Isoferulic Acid in Relation to Their Antioxidant Activity* [archivo PDF]. Recuperado de http://www.eurofedlipid.org/meetings/archive/madrid/5860/5860_0666.pdf.
- Oviedo-Solís, C. I., Cornejo-Manzo, S., Murillo-Ortiz, B. O., Guzmán-Barrón, M. M., y Ramírez-Emiliano, J. (2018). *Los polifenoles de la fresa disminuyen el estrés oxidativo en enfermedades crónicas.* *Gac Med Mex,* 154, 80-86. DOI://dx.doi.org/10.24875/GMM.17002759.
- Pacheco, M. T. B., y Sgarbieri, V. C. (2001). *Alimentos funcionais: conceituação e importância na saúde humana.* In M. C. Carrão-Panizzi (Ed.), Trabajo presentado en Anais do I Simpósio Brasileiro sobre os Benefícios da Soja para a Saúde Humana (pp. 37-40). Londrina: Embrapa soja.
- Pereira da Silva, B., Días, D. M., Moreira, M. E., Lopez Toledo, R. C., Pinto de Matta, S. L., Della, C. M., y Duarte Martino, H. S. (2016). *Chía seed shows good protein quality, hypoglycemic effect and improves the lipid profile and liver and intestinal morphology of Wistar Rats.* *Plans Foods for Human Nutrition,* 71(3), 225-230.
- Pu, Y. J., Vaid, R. K., Boini, S. K., Towsley, R.W., Doecke, C. W., y Mitchell D. (2008). *A practical method for functionalized peptide or amide bond formation in aqueous-ethanol media with EDC as activator.* *Org Process Res Dev,* 13, 310–314. DOI: 10.1021/op800240d.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., y Rice-Evans, C. (1999). *Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay.* *Free Radic Biol Med,* 26(9-10), 1231-1237.
- Reyes-Caudillo, Tecante, A., y Valdivia-López, M. A. (2008). *Dietary fibre content and antioxidant activity of phenolic compounds present in Mexican chia (Salvia hispanica L.) seeds.* *Food Chemistry,* 107(2), 656-663. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.062>.

- Ricard-Blum, S. (2011). *The Collagen Family*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 3(1). DOI: 10.1101/cshperspect.a004978.
- Rumsey, G. L. (2016). *Antioxidants in Compounded Feeds*. In K. W. Chow (Ed.), ADCP/REP/80/11 - Fish Feed Technology (Chapter 10). Recuperado de <http://www.fao.org/docrep/x5738e/x5738e00.htm#Contents>.
- SIAVI, Secretaria de Economía de México, 2018. Estadística anual de fracción arancelaria 12. 1207.120799.12079999. Recuperado de <http://www.economia-snci.gob.mx/>
- Sibilla, S., Godfrey, M., Brewer, S., Budh-Raja, A., y Genovese, L. (2015). *An Overview of the Beneficial Effects of Hydrolysed Collagen as a Nutraceutical on Skin Properties: Scientific Background and Clinical Studies*. The Open Nutraceuticals Journal, 8(1), 29-42. DOI: 10.2174/1876396001508010029.
- Sila, A., y Bougatef, A. (2016). Antioxidant peptides from marine by products: Isolation, identification and application in food systems. A review. Journal of Funtional Foods, 21, 10-26.
- Siripatrawan, U., y Noipha, S. (2012). *Active film from chitosan incorporating Green tea extract for shelf life extensión of pork sausages*. Food Hydrocolloids, 27, 102-108.
- Tabart, J., Kevers, C., Sipel, A., Pincemail, J., Defraigne, J.-O., y Dommes, J. (2017). *Optimisation of extraction of phenolics and antioxidants from black currant leaves and buds and of stability during storage*. Food Chemistry, 105(3), 1268-1275. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.03.005>.
- Taga, M. S., Miller, E. E., y Pratt, D. E. (1984). *Chia seeds as a source of natural lipid antioxidants*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 61(5), 928-931.
- Tsao, R. (2010). *Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols*. Nutrients, 2(12), 1231–1246. DOI: 10.3390/nu2121231.
- USDA/ARS. (2018). Basic Report: 12006, *Seeds, chia seeds, dried. USA: USDA Food Composition Databases*. Recuperado de <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/12006>.

- Valdivia-López, M. Á., y Tecante, A. (2015). *Chia (Salvia hispanica): A Review of Native Mexican Seed and its Nutritional and Functional Properties*. *Adv Food Nutr Res*, 75, 53-75. DOI: 10.1016/bs.afnr.2015.06.002.
- Waterman, P. G., y Mole, S. (1994). *Analysis of phenolic plants metabolites*. Oxford, Boston: Blackwell Scientific.
- Williams, R. J., Spencer, J. P., y Rice-Evans, C. (2004). *Flavonoids: antioxidants or signalling molecules?* *Free Radic Biol Med*, 36(7), 838-49. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.01.001.
- Yi, S.-W., Tang, C.-H., Cao, J.-S., Hu, E.-K., Wen, Q.-B., y Yang, X.-Q. (2008). *Effects of limited enzymatic hydrolysis with trypsin on the functional properties of hemp (Cannabis sativa L.) protein isolate*. *Food Chemistry*, 106, 1004-1013.
- Yermakov, A. I., Arasimov, V. V., y Yarosh, N. P. (1987). *Methods of Biochemical Analysis of Plants*. Leningrad: Agropromizdat.
- Young, V. R., Erdman, J.W. J., y King, J. C. (1998). *Dietary reference intakes. Proposed definition and plan review of dietary antioxidant and related compounds*. Washington D. C. National Academy Press.