



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS
CARRERA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS



TEMA:

“Obtención de aislados proteicos de chía (*Salvia hispánica* L.) y evaluación *in vitro* de su digestibilidad gastrointestinal, actividad antiinflamatoria y antioxidante”.

Proyecto de Trabajo de Titulación, Modalidad proyecto de Investigación, previa la obtención del título de Ingeniera en Alimentos, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

El mismo que se realizará dentro del proyecto “Aislamiento y caracterización de nuevos ingredientes funcionales a partir de proteínas de amaranto y quinua para la elaboración de un producto funcional”, este proyecto podría extenderse a otras proteínas alimentarias, cereales andinos, leche, huevo y extractos de plantas. Aprobado por el Honorable Consejo Universitario de la Universidad Técnica de Ambato. Con Resolución N° 1373-CU-P-2014. Coordinado por el Dr. Ismael Carrillo.

Autor: Marjorie Karina Cárdenas Hidalgo

Tutor: Ph.D. Wilman Ismael Carrillo Terán

Ambato – Ecuador

Octubre-2016

APROBACIÓN DEL TUTOR

PhD. Wilman Ismael Carrillo Terán

CERTIFICA:

Que el presente trabajo de titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto autorizo la presentación de este Trabajo de Titulación modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad.

Ambato, 23 de Junio del 2016



PhD. Wilman Ismael Carrillo Terán

C.I. 17570800-4

TUTOR

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Marjorie Karina Cárdenas Hidalgo, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Proyecto de Investigación, previo la obtención del Título de Ingeniería en Alimentos son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas.



Marjorie Karina Cárdenas Hidalgo

C.I. 172421959-5

AUTORA

APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos profesores Calificadores, aprueban el presente Trabajo de Titulación modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:



Presidente del Tribunal



MSc. Ing. Fabián Patricio Cuenca Mayorga

C.I. 110406755-6



Mg. Lcdo. Paulo Santiago Baquero Icaza


C.I.180323354-1

Ambato, 17 de Agosto del 2016

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato para que haga de este Proyecto de Investigación o parte de él un documento disponible para su lectura consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi Proyecto, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de éste Proyecto dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando ésta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



Marjorie Karina Cárdenas Hidalgo

C.I. 172421959-5

AUTORA

Dedicatoria

Todo lo que soy y todo lo que he logrado se lo debo a mi primer amor, sé que si no habría tenido la bendición de conocerte nada en mi vida tendría sentido. Por eso mi tesis te la dedico a ti mi Dios, mi papito amoroso, el forjador de mi camino, el ser que me dio la oportunidad de vivir, el que estuvo ahí en los peores momentos recordándome que soy la niña de sus ojos. El que me levanto de mis continuos tropiezos, tu fuerza empezó cuando la mía terminaba, jamás me soltaste la mano y me enseñaste cosas importantes durante todo este tiempo, sobretodo me permitiste comprender que tu tiempo y tu plan en mi vida es perfecto.

No temas, porque yo estoy contigo;
no desmayes, porque yo soy tu Dios
que te esfuerzo; siempre te ayudaré
siempre te sustentaré con la diestra de
mi justicia.

Isaías 41:10

Marjorie Karina

Agradecimiento

A la Universidad Técnica de Ambato, en especial a los docentes de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos quienes con sus conocimientos y su paciencia me ayudaron a superar cada etapa de este largo camino.

Mi total agradecimiento a mi tutor Ismael Carrillo quien me dio la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, por la confianza brindada, por ser una guía importante en el desarrollo de este trabajo, por su tiempo y paciencia mil gracias.

A la Ing. Cecilia Carpio, Ing. Rubén Vilcacundo y la Ing. Dayana Morales quienes colaboraron con sus conocimientos en la realización de este proyecto.

A mis papitos Pedro y Ceci mis más grandes amores, gracias por ser el ejemplo de perseverancia, de fortaleza y de amor incondicional, por alentarme a seguir aun cuando sentía que ya todo había terminado. Gracias por su inmenso sacrificio, este también es su logro, sin ustedes no lo habría conseguido. Los amo.

A mi hermana Dome, gracias por ser mi sonrisa, mi alegría, mi fuerza, porque aun cuando mis días eran grises tu sabias pintarlos de colores. Me contagias día a día tus ganas de vivir, eres el regalo más grande que pudo darme Dios, es por ti por quien soy, por quien vivo, a quien le debo los días más felices de mi vida gordita mía te amo.

A mis abuelitos Angel, Luis y Sara por sus sabios consejos y por ser mi ejemplo de lucha. A la mujer que más admiro, Charito gracias por ser la guía, la voz de aliento, mi compañía más grata en los momentos más difíciles mamita gracias por todo.

A mis tíos Luis, Pato, Marco, Javier, Angelita, Rocío, Diego, Roberto, y en general a toda mi familia por enseñarme lo importante de la unidad, gracias a ustedes comprendí que jamás estaré sola gracias por alegrar mis días, por sus locuras, por sus consejos y por todo su amor.

A mis amigos, Pato, Osito, Yos, Tally, Jessy, Gabby por su apoyo incondicional, y por tantos momentos hermosos. Sheth, Fer, Amochi, y Mafer, gracias por su confianza, sus consejos, por todos esos momentos que jamás podré olvidar y que llevo en mi corazón por siempre. Gracias por ser las cómplices de mis secretos, mis lágrimas y de mi locura, no tengo palabras para agradecerles tanto y todo.

A Willy por ser la persona que con solo una sonrisa le dio luz a mis días durante todo este tiempo, por ser mi cómplice y confidente, gracias por tu amor, tu compañía, tu paciencia. Por contagiarme de tu locura, por la ayuda que me brindaste siempre que necesite de ti. Sobre todo gracias por saltarme, por darme la oportunidad de conseguir lo que de verdad merezco, por demostrarme que hay sueños más grandes después de ti.

Marjorie Karina

INDICE

1. CAPÍTULO I.....	1
EL PROBLEMA	1
1.1. Tema	1
1.2. Justificación	1
1.3. Objetivos.....	3
1.3.1. General.....	3
1.3.2. Específicos	3
2. CAPÍTULO II	4
MARCO TEÓRICO	4
2.1. Antecedentes investigativos.....	4
2.1.1. Chía.....	4
2.1.2. Proteínas alimentarias	5
2.1.3. Aislados proteicos.....	6
2.1.4. Métodos de cuantificación de proteína.....	7
2.1.4.1. Método Biuret.....	7
2.1.4.2. Método BCA (ácido bicinconínico).....	8
2.1.4.3. Método Dumas (nitrógeno total)	8
2.1.5. Digestión gastrointestinal simulada <i>in vitro</i>	8
2.1.6. Electroforesis de proteínas alimentarias	10
2.1.7. Actividad antiinflamatoria	12
2.1.8. Actividad antioxidante	13
2.2. Hipótesis.....	15
2.3. Señalamiento de las variables de las hipótesis	15
3. CAPÍTULO III	17
MATERIALES Y MÉTODOS	17

3.1. Materiales	17
3.2. Métodos	19
3.2.1. Extracción del mucílago de las semillas de chía	19
3.2.2. Obtención de la harina de chía	20
3.2.3 Análisis proximal de la harina de chía	20
3.2.4. Desengrasado de la harina de chía	21
3.2.5. Obtención de aislados proteicos de chía.....	21
3.2.6. Análisis proximal del aislado proteico de chía	22
3.2.7. Determinación del rendimiento de los aislados proteicos de chía	22
3.2.8. Cuantificación de proteína	24
3.2.8.1. Método Biuret.....	24
3.2.8.2. Método BCA (ácido bicinconínico).....	24
3.2.8.3. Método Dumas.....	25
3.2.9. Aplicación de la técnica analítica de electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE)	26
3.2.10. Digestión gástrica <i>in vitro</i>	27
3.2.11. Digestión duodenal <i>in vitro</i>	27
3.2.12. Evaluación de las actividades biológicas de los aislados proteicos de chía.	28
3.2.12.1. Actividad antiinflamatoria (<i>in vitro</i>).....	28
3.2.12.2. Actividad antioxidante <i>in vitro</i> (método TBARS)	29
4. CAPÍTULO IV.....	30
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
4.1. Análisis y discusión de los resultados	30
4.1.1. Análisis proximal de la harina de chía	30
4.1.2. Análisis proximal del aislado proteico de chía	32
4.1.3. Rendimiento de aislados proteicos de chía	33

4.1.4. Cuantificación de proteína aislada de chía.....	34
4.1.4.1. Método de Biuret.....	34
4.1.4.2. Método BCA (ácido bicinconínico).....	35
4.1.4.3. Método Dumas.....	37
4.1.5. Caracterización de proteína de chía mediante electroforesis (SDS-PAGE)	38
4.1.6. Digestión gástrica <i>in vitro</i> analizada mediante electroforesis (SDS-PAGE)	41
4.1.7. Digestión duodenal <i>in vitro</i> analizada mediante electroforesis (SDS-PAGE)	43
4.1.8. Evaluación de las actividades biológicas de los aislados proteicos de chía.....	44
4.1.8.1. Determinación de la actividad antiinflamatoria <i>in vitro</i>	44
4.1.8.2. Evaluación de la actividad antioxidante <i>in vitro</i> (método TBARS)....	45
4.2. Verificación de hipótesis	47
5. CAPÍTULO V.....	48
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	48
5.1. Conclusiones	48
5.2. Recomendaciones	49
Referencias bibliográficas.....	50
ANEXOS	61

Índice de tablas

Tabla 1. Equipos de laboratorio empleados durante la investigación	17
Tabla 3. Reactivos empleados durante la investigación.....	18
Tabla 4. Materiales de laboratorio empleados durante la investigación	19
Tabla 5 . Métodos empleados en el análisis proximal de la harina de chíá. .	20
Tabla 6. Métodos empleados en el análisis proximal del aislado proteico de chíá.....	22
Tabla 7. Factores y niveles del diseño A*B	23
Tabla 8. Interacciones del diseño A*B	23
Tabla 9. Análisis proximal de la harina de chíá	30
Tabla 10. Análisis proximal del aislado proteico de chíá.	32
Tabla 11. Porcentaje de rendimiento de aislados proteicos de chíá extraídos a diferentes pH.	33
Tabla 12. Porcentaje de concentración de proteína de chíá medido por el método Biuret.	35
Tabla 13. Porcentaje de concentración de proteína de chíá medido por el método BCA.	36
Tabla 14. Porcentaje de concentración de proteína de chíá medido por el método Dumas	37
Tabla 15. Porcentaje de inhibición antiinflamatoria que presenta el concentrado proteico de chíá a diferentes pH.....	44
Tabla 16. Porcentaje de inhibición de oxidación lipídica que presenta el concentrado proteico de chíá a diferentes pH.....	46
Tabla 17. Pesos obtenidos de la extracción de proteína con agua a los diferentes pH (en base a 10 gr de muestra).....	63
Tabla 18. Pesos obtenidos de la extracción de proteína con NaCl a los diferentes pH (en base a 10 gr de muestra).....	63
Tabla 19. Porcentaje de rendimiento calculado a partir de los pesos obtenidos de la extracción de proteína con agua a los diferentes pH.....	64
Tabla 20. Porcentaje de rendimiento calculado a partir de los pesos obtenidos de la extracción de proteína con NaCl a los diferentes pH.....	64
Tabla 21. Descripción de tratamientos para el análisis estadístico.	66

Tabla 22. Análisis de varianza realizado en el programa InfoStat.....	66
Tabla 23. Prueba de diferencias significativas tuckey con un nivel de significancia de $\alpha=0,05$ para los diferentes solventes empleados para la extracción de proteína de chía.....	66
Tabla 24. Prueba de diferencias significativas tuckey con un nivel de significancia de $\alpha=0,05$ para los diferentes pH empleados para la extracción de proteína de chía.....	67
Tabla 25. Prueba de diferencias significativas tuckey con un nivel de significancia de $\alpha=0,05$ para los diferentes tratamientos empleados para la extracción de proteína de chía.....	67
Tabla 26. Datos empleados en la curva estándar de pepsina.....	69
Tabla 27. Análisis de varianza de la concentración de la proteína de chía por el método Biuret mediante el programa estadístico InfoStat.	70
Tabla 28. Prueba de diferencias significativas tuckey con un nivel de significancia de $\alpha=0,05$ para los diferentes pH empleados para la determinación de la concentración de proteína por el método Biuret mediante el programa estadístico InfoStat.	70
Tabla 29. Datos para la curva estándar de albúmina de suero bovino (BSA)	72
Tabla 30. Análisis de varianza de la concentración de la proteína de chía por el método BCA mediante el programa estadístico InfoStat	73
Tabla 31. Prueba de diferencias significativas tuckey con un nivel de significancia de $\alpha=0,05$ para los diferentes pH empleados para la determinación de la concentración de proteína por el método BCA mediante el programa estadístico InfoStat.	73
Tabla 32. Porcentaje de inhibición de desnaturalización de proteína (albúmina de huevo) mediante diclofenaco sódico.	79
Tabla 33. Porcentaje de inhibición de desnaturalización de proteína (albúmina de huevo) mediante concentrado proteico de chía a pH 2,0.	79
Tabla 34. Porcentaje de inhibición de desnaturalización de proteína (albúmina de huevo) mediante concentrado proteico de chía a pH 3,0.	79
Tabla 35. Porcentaje de inhibición de desnaturalización de proteína (albúmina de huevo) mediante concentrado proteico de chía a pH 4,0.	80

Tabla 36. Porcentaje de inhibición de desnaturalización de proteína (albúmina de huevo) mediante concentrado proteico de chía a pH 5,0.	80
Tabla 37. Porcentaje de inhibición de desnaturalización de proteína (albúmina de huevo) mediante concentrado proteico de chía a pH 6,0.	80
Tabla 38. Porcentaje de inhibición de oxidación lipídica obtenido mediante BHT.....	82
Tabla 39. Porcentaje de inhibición de oxidación lipídica obtenido mediante concentrado proteico de chía a pH 2,0.	82
Tabla 40. Porcentaje de inhibición de oxidación lipídica obtenido mediante concentrado proteico de chía a pH 3,0.	82
Tabla 41. Porcentaje de inhibición de oxidación lipídica obtenido mediante concentrado proteico de chía a pH 4,0.	83
Tabla 42. Porcentaje de inhibición de oxidación lipídica obtenido mediante concentrado proteico de chía a pH 5,0.	83
Tabla 43. Porcentaje de inhibición de oxidación lipídica obtenido mediante concentrado proteico de chía a pH 6,0.	83

Índice de figuras

Figura 1. Semillas de chía.....	4
Figura 2. Aislado proteico de chía.....	6
Figura 3. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS- PAGE).....	11
Figura 4. Análisis SDS-PAGE de concentrados proteicos de chía a diferentes pH, en condiciones no reductoras sin 2-β-ME. Gel de acrilamida al 14 % teñido con azul de Coomasie. Se cargó 10 µl de marcador de PM y 20 µl de proteína. Carril 1: estándar de proteínas; carril 2: aislado proteico de chía a pH 2,0 carril 3: aislado proteico de chía a pH 3,0; carril 4: aislado proteico de chía a pH 4,0; carril 5: aislado proteico de chía a pH 5,0; carril 6: aislado proteico de chía a pH 6,0.....	38
Figura 5. Análisis SDS-PAGE de concentrados proteicos de chía a diferentes pH, en condiciones reductoras con 2-β-ME. Gel de acrilamida al 14 % teñido con azul de Coomasie. Se cargó 10 µl de marcador de PM y 20 µl de proteína. Carril 1: estándar de proteínas; carril 2: aislado proteico de chía a pH 2,0 carril 3: aislado proteico de chía a pH 3,0; carril 4: aislado proteico de chía a pH 4,0; carril 5: aislado proteico de chía a pH 5,0; carril 6: aislado proteico de chía a pH 6,0.....	40
Figura 6. Electroforesis SDS-PAGE en presencia de βME. Simulación gástrica de aislados proteicos de chía carril1: estándar de proteínas; carril 2: aislado proteico de a chía pH 3,0; carril 3: digestión gástrica de chía a pH 1,2; carril 4: digestión gástrica de chía a pH 2,0; carril 5: digestión gástrica de chía a pH 3,2; carril 6: digestión gástrica de chía a pH 4,5; carril 6: digestión gástrica de chía a pH 5,5.	41
Figura 7. Electroforesis SDS-PAGE en presencia de βME. Carril 1 estándar de proteínas; carril 2: aislado proteico de chía a pH 3,0; carril 3: pepsina....	42
Figura 8. Electroforesis SDS-PAGE en presencia de βME. Simulación duodenal de aislados proteicos de chía carril1: estándar de proteínas; carril 2: aislado proteico de chía a pH 3,0; carril 3: digestión duodenal de chía a pH 3,2.	43
Figura 9. Desengrasado de la harina de chía	85
Figura 10. Proceso de filtrado.	85

Figura 11. Secado de la harina desengrasada.....	85
Figura 12. Ajustado de la harina desengrasada con agua a pH 9,0	85
Figura 13. Centrifugado.	85
Figura 14. Ajustado del sobrenadante a diferentes pH.....	85
Figura 15. Precipitado de la proteína.	86
Figura 16. Liofilizado de la proteína	86
Figura 17. Balanza analítica.....	86
Figura 18. Plancha de agitación.....	86
Figura 19. Centrifuga	86
Figura 20. Agitador de tubos eppendorf	86
Figura 21. Equipo de electroforesis.....	87
Figura 22. Liofilizador.....	87

Índice de gráficos

Gráfico 1. Curva estándar de pepsina para la determinación de concentración de proteína de chía.....	69
Gráfico 2. Curva estándar de albúmina de suero bovino para la determinación de concentración de proteína de chía.....	72

RESUMEN

La chía es una planta anual de verano considerada uno de los cultivos más importantes en las sociedades precolombinas, los principales productores de chía a nivel mundial son Paraguay, Canadá, Bolivia, Etiopía, Argentina, India, México, China, Perú, Ecuador, Australia y Nicaragua.

Hoy en día el interés de los consumidores en alimentos que, además de nutrir aporten con beneficios a la salud es mayor. La chía es una fuente vegetal potencial para cumplir con estos requerimientos. Por ello, este trabajo tuvo como fin analizar las propiedades nutricionales y funcionales de esta semilla. La harina desengrasada de chía es una fuente importante de carbohidratos (31,46 %), fibra (27,88 %) y de proteína (19,78 %).

Con el fin de caracterizar las proteínas presentes en la misma se llevó a cabo el proceso de aislamiento mediante precipitación isoeléctrica, el aislado proteico con mayor porcentaje de rendimiento fue el obtenido a pH 3,0 (25,53 %), asimismo se determinó el contenido de proteína mediante el método de Biuret (81,03 %), BCA (44,92 %) y Dumas (31,54 %).

Además se analizó la proteína de chía mediante la técnica de electroforesis SDS-PAGE, en donde se pudieron observar péptidos con un peso molecular entre 14 y 66 kDa que corresponden a 7S y 11S globulinas y albúminas. Las proteínas de chía fueron sometidas a un proceso de digestión gastrointestinal *in vitro*, en donde se pudo constatar que éstas fueron hidrolizadas por completo.

Respecto a las propiedades funcionales de la proteínas de chía se determinó que estas poseen actividad antiinflamatoria (335,41 %) usando como control positivo diclofenaco y actividad antioxidante (95,98 %) con BHT como control positivo, en los dos casos su mayor porcentaje de inhibición se encontró a pH 6,0 a una concentración de 100 µg/ml.

ABSTRACT

Chia is an annual summer plant which is considered one of the most important crops in pre-Columbian societies, World-wide leading producers of chia are Paraguay, Canada, Bolivia, Ethiopia, Argentina, India, Mexico, China, Peru, Ecuador, Australia and Nicaragua.

Currently, consumers interest is high food which can contribute to health benefits. Chia is a food species which can potentially meet these requirements. The aim of this study is to analyze the nutritional and functional properties of this seed. The defatted flour of chia is an important source of carbohydrates (31.46 %), fibers (27.88 %) and proteins (19.78 %).

To characterize the proteins present in chia, the isolation process by isoelectric precipitation of the protein isolate was carried out. The greater percentage yield was obtained at pH 3.0 (25.53 %), and was determined obtaining protein by Biuret method (81.03 %), BCA (44.92 %) and Dumas (31.54 %).

Furthermore chia protein was analyzed by electrophoresis SDS-PAGE technique. Polypeptides were observed with a molecular weight between 14 and 66 kDa corresponding to globulins 7S and 11S and albumins. Chia proteins were subject to a process of *in vitro* gastrointestinal digestion, where it was found that they were completely hydrolyzed, indicating that these proteins cannot be considered allergenic are completely hydrolyzed.

With regards to the functional properties of the proteins of chia, it was determined that they have anti-inflammatory activity (335.41 %) of positive control used was diclofenac and antioxidant activity (95.98 %) with BHT as positive control, in both cases most percent inhibition was found at pH 6.0 to a concentration of 100 ug/ml.

INTRODUCCIÓN

La chía (*Salvia hispánica L.*) es una planta anual de verano considerada uno de los cultivos más importantes en las sociedades precolombinas, que por sus virtudes nutricionales fue básico en su dieta (**Bueno et al., 2010**). La palabra chía viene del náhuatl, lenguaje de los aztecas, cuyo significado es “aceitoso” (**Coates, 2004**). Es originaria de Mesoamérica y la mayor diversidad genética se presenta en la vertiente del Océano Pacífico, desde el centro de México hasta el norte de Guatemala, en el primero se encuentra el 88 % de las especies de *Salvia*, lo que sugiere que es el centro de origen de esta planta (**Cahill, 2004**).

La semilla de chía tiene forma ovalada, es de color gris oscuro con pequeñas líneas negras y mide aproximadamente 2 mm de largo por 1 mm de ancho, es una semilla con un alto contenido de varios nutrientes como proteínas (23,60 % p/p), carbohidratos (18,70 % p/p), lípidos (29,80 % p/p), vitaminas, minerales y fibra (18.00 % p/p), aunque cabe mencionar que esta composición varía de acuerdo al lugar de procedencia (**Bushway et al, 1981**).

Su aceite contiene un 19,0 % de ácido graso linoleico y un 63,8 % de ácido alfa linolénico (omega-3), la cantidad que posee de este último es mayor al presente en los aceites de algas, hígado de bacalao, y salmón, según los datos de la USDA (Departamento de Agricultura de los Estados Unidos) (**Ayerza y Coates, 2006**). Se pueden encontrar también ácidos grasos palmítico, esteárico, oleico, aunque estos se ven afectados por el lugar en donde son cultivados (**Ayerza y Coates, 2011**).

El mucílago presente en esta semilla tiene la capacidad de formar hidrocoloides, por esta razón son utilizados como agentes gelificantes y espesantes en la industria alimentaria. (**Phillips y Williams, 2000**).

Olivos- Lugo et al. (2010) han descrito que las semillas de chía y aislados proteicos a partir de la semilla tienen buenas características físico química, y

excelente retención de agua. Permitiendo su uso en la industria de la panificación.

Además estos aislados proteicos se usan como ingredientes en la elaboración de barras energéticas, bebidas, panes, jaleas, emulsiones, galletas, suplementos dietéticos, y alimentos para animales (**Capitani et al., 2012**).

La harina desengrasada de oleaginosas es utilizada como un subproducto de bajo valor añadido empleado para la alimentación de ganado a pesar de ser una fuente de proteína vegetal importante. Hoy en día los requerimientos de aislados proteicos aumentan y con ello la necesidad del desarrollo de procesos de extracción de los mismos. De esta manera se podría reducir la ingesta de proteínas animales. Por esta razón, en los próximos años se incrementará la disponibilidad y transformación de fuentes proteicas vegetales para su aplicación con fines alimentarios conforme a las demandas del mercado (**Vioque et al., 2001**).

Las propiedades medicinales y nutritivas como lo indican numerosos estudios, hacen de las semillas de chía un producto de gran demanda (**Beltrán Orozco y Romero, 2003**).

La chía proporciona numerosos beneficios para la salud, su consumo previene problemas cardiovasculares, reduce los niveles de triglicéridos, aumenta el colesterol HDL (bueno) y disminuye el colesterol total y el colesterol LDL (**Weintraub, 2013**). Además una fuente de péptidos biológicamente activos. La hidrólisis enzimática produce eficazmente péptidos bioactivos a partir de una gran variedad de fuentes proteicas incluyendo las semillas de chía. Los hidrolizados de proteína de chía con mayor actividad biológica podrían ser empleados como un ingrediente funcional en una amplia gama de alimentos (**Segura et al., 2013**).

1. CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

1.1. Tema

“Obtención de aislados proteicos de chía (*Salvia hispánica* L.) Y evaluación *in vitro* de su digestibilidad gastrointestinal, actividad antiinflamatoria y anti-oxidante”.

1.2. Justificación

Los principales productores de chía a nivel mundial son Paraguay, Canadá, Bolivia, Etiopía, Argentina, India, México, China, Perú, Ecuador, Australia y Nicaragua (**OCE, 2014**). La semilla de esta planta fue uno de los productos de alto consumo en el mundo prehispánico debido a que es una fuente importante de ácido graso omega 3, así como de fibra, carbohidratos y por sus aminoácidos balanceados (**Cahill, 2003**).

La chía posee aproximadamente un 20 % de proteína, es decir tiene un nivel más alto de proteína que los cereales usados tradicionalmente como el arroz (8,5 %), el maíz (14,0 %), el trigo (14,0 %), la avena (15,3 %) y la cebada (9,2 %), además no contiene gluten y puede ser usada por personas con enfermedad celiaca (**Ayerza Y Coates, 2006**).

Este proyecto está enfocado en cumplir con los siguientes objetivos del Plan Nacional del Buen Vivir 2013-2017. “Mejorar la calidad de vida de la población” que además tiene como meta erradicar la desnutrición crónica en niños menores de 2 años y revertir la tendencia a la obesidad y sobrepeso en niños de 5 a 11 años. Por esta razón, la industria alimentaria se ha visto en la necesidad de buscar alimentos que permitan combatir estos problemas

usando fuentes proteicas vegetales ya que poseen grandes ventajas frente las proteicas animales. Las proteínas vegetales presentan un menor costo de producción, y un mayor tiempo de almacenamiento, siendo así más accesibles para los consumidores lo que permitiría también cumplir con el objetivo de “Impulsar el cambio de la matriz productiva” incentivando el cultivo de esta semilla. Incrementando también los estudios tecnológicos para el proceso y aprovechamiento de las proteínas presentes en las mismas.

Las proteínas presentes en la chía forman parte de las proteínas no convencionales, por ello, se plantea la importancia de la extracción, caracterización y estudio de su digestión, ya que mediante ello se podría explotar al máximo sus propiedades nutricionales, incluyéndola como un posible ingrediente de productos funcionales, mejorando la calidad nutritiva de los nuevos productos y de muchos ya existentes en el mercado.

1.3. Objetivos

1.3.1. General

- ❖ Estudiar la digestibilidad gastrointestinal, actividad antiinflamatoria y actividad antioxidante de las proteínas aisladas de chía (*Salvia hispánica* L.).

1.3.2. Específicos

- ❖ Cuantificar el contenido de proteína de chía mediante método Biuret y BCA.
- ❖ Caracterizar por peso molecular las proteínas de chía mediante técnica de electroforesis SDS-PAGE.
- ❖ Determinar la actividad antiinflamatoria de los aislados proteicos de chía *in vitro*.
- ❖ Evaluar la actividad antioxidante de las proteínas aisladas de chía *in vitro* (Método TBARS).

2. CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes investigativos

2.1.1. Chía

La chía es una planta anual de verano perteneciente a la familia *Labiatae* que comprende aproximadamente 512 especies (**Ayerza 1995; Hernández, 1994**). Empezó a usarse en la alimentación humana hace unos 3500 años A.C. en la época prehispánica. Las semillas y harina de chía fueron muy apreciadas ya que se empleaban en la preparación de alimentos, pinturas y medicinas. Las mismas que se usaban como ofrendas a los dioses en ceremonias religiosas, razón por la cual poco a poco se consideró un cultivo sacrilego y fue desapareciendo (**Cahill, 2003**).



Figura 1. Semillas de chía.

La chía es una fuente potencial de nutrientes y su cultivo está en un continuo aumento. Es importante señalar que las semillas de chía contienen mayor cantidad de proteínas que la quinua (14 %) y el amaranto (16 %), con un 29 % (**Loubes et al., 2012**).

Las semillas de chía al igual que la torta que queda como desecho después de la extracción del aceite, contiene altos niveles de proteína lo que la

convierte en un cereal completo para la alimentación tanto para animales como para humanos **(Ayerza, Coates, y Lauria, 2002)**.

Las semillas de chía son una fuente natural de ácido graso omega-3, esencial para la alimentación, **(Dubios et al., 2007)** cuyo consumo se considera un factor para la disminución de problemas cardiovasculares por la reducción de triglicéridos, la pérdida de peso y reducción de los niveles plasmáticos de glucosa **(Mohn, 2012)**.

2.1.2. Proteínas alimentarias

Las proteínas son biomoléculas que desempeñan un papel fundamental en la función y estructura de las células, además están formadas por largas cadenas de aminoácidos unidos uno a otro por enlaces covalentes. **(Hernández et al., 1999)**. La misión de las proteínas en el organismo son de dos tipos: una de tipo estructural, formando parte del propio organismo y otro de tipo funcional. Algunas proteínas se unen al DNA y regulan la expresión de los genes, otras participan en la replicación y la transcripción de la información genética **(Teijon, 2001)**.

La calidad de una proteína está definida en función de su valor nutricional y este a su vez por el contenido, balance y disponibilidad de aminoácidos esenciales **(Aufrère et al, 1992)**. En lo que se refiere a balance de aminoácidos la proteína animal posee mejor calidad nutricional, sin embargo su costo no está al alcance de países en vías de desarrollo, es por ello que se debe aprovechar la proteína vegetal a través del consumo de cereales y leguminosas que representan una fuente importante de este tipo de proteína **(Mandal y Mandal, 2000)**.

Según el estudio de **Vázquez-Ovando et al. (2010)** algunos de los aminoácidos presentes tanto en la harina de chía desengrasada como en la FRP (fracción rica en proteína de chía) son tirosina, histidina, arginina, prolina, ácido

aspártico y ácido glutámico, sin embargo, el contenido de los mismos es mayor en la FRP, además se halló presencia de aminoácidos azufrados cisteína y metionina.

La disminución del contenido de aminoácidos en la harina desengrasada se debe a la formación de compuestos oxidados a causa de su almacenamiento. El perfil de aminoácidos de la chía es balanceado por lo que puede incluirse en la dieta de un adulto (**Weber et al., 1991**), además diferentes estudios han comprobado que puede ser incorporada en la misma junto con el consumo de otros granos para producir una fuente de proteínas equilibrada (**Fernández et al., 2005**).

2.1.3. Aislados proteicos

Un aislado proteico vegetal se obtiene aplicando un tratamiento de solubilización alcalina seguido de una precipitación ácida, la misma que se logra ajustando el pH hasta alcanzar el punto isoeléctrico de la proteína. Este método es el más empleado por su facilidad, por el alto rendimiento obtenido y por la mejora de la digestibilidad que produce en la misma. Además, permite reducir o eliminar los factores anti nutritivos o la presencia de componentes no peptídicos como lípidos, azúcares, fibra y otros no deseables en el producto final (**Martínez et al., 2011**).

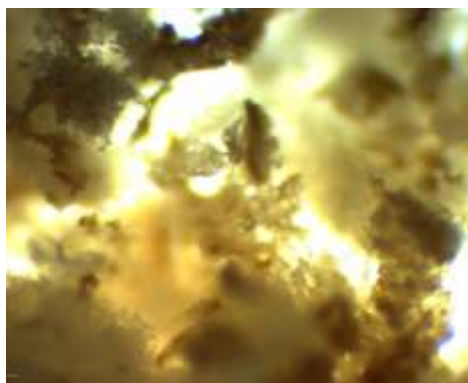


Figura 2. Aislado proteico de chía

2.1.4. Métodos de cuantificación de proteína

Los métodos de cuantificación de proteína en una muestra biológica son de suma importancia al momento de referirse a la purificación de una proteína concreta. **(Fernández y Galván, 2001)**.

García y Vázquez (1998) mencionan que existen diferentes métodos para la cuantificación de proteína, el uso adecuado de cada uno de ellos depende de los siguientes criterios.

- ✓ Cantidad total de proteína presente en la muestra.
- ✓ Concentración de la proteína.
- ✓ Especificidad del método.
- ✓ Presencia de otras sustancias que pudieran interferir.
- ✓ Facilidad y reproducibilidad del método.

2.1.4.1. Método Biuret

Se basa en la formación del complejo de color violeta debido a la formación de un complejo entre el Cu^{2+} y los pares de electrones no compartidos del nitrógeno que forma parte de los enlaces peptídicos en medio básico presentando un máximo de absorción a 540 nm **(Bradford, 1976)**.

La intensidad de la coloración es directamente proporcional a la cantidad de proteínas (enlaces peptídicos). Este es un método bastante específico y son pocas las sustancias que interfieren, su uso se recomienda para la cuantificación de proteínas en preparados concentrados **(Fernández y Galván, 2001)**.

Biuret es una técnica sencilla y rápida para la cuantificación de proteínas pero tiene como inconveniente la turbidez que se produce antes de las lecturas, lo que dificulta la reproducibilidad de este método. Sin embargo, se puede emplear EDTA para mejorar los resultados ya se ha demostrado que este compuesto secuestra los iones causantes de esta turbidez **(Hidalgo, 2006)**.

2.1.4.2. Método BCA (ácido bicinconínico)

Es un método sumamente sensible, combina la reacción de las proteínas con Cu^{+2} en un medio alcalino produciendo Cu^+ . Para la detección de este último se emplea un reactivo altamente selectivo denominado ácido bicinconínico. Este es el responsable del color que adquieren las muestras de proteína en presencia del Cu^+ (**García y Vázquez, 1998**).

El método BCA actúa sobre la estructura macromolecular de la proteína y cuatro aminoácidos específicos (cistina, cisteína, tirosina y triptófano) (**Wiechelman, et al. 1988**).

2.1.4.3. Método Dumas (nitrógeno total)

A lo largo de los años se han desarrollado métodos para la cuantificación de nitrógeno total, sin embargo no fue hasta 1831 que Jean Baptise André Dumas mejoró el método propuesto por Liebig (**López, 2005**).

El método Dumas es empleado para la determinación de nitrógeno en compuestos orgánicos, el cual se basa en la reducción de los óxidos de nitrógeno formados por la combustión a altas temperaturas de las muestras, realizando una medición volumétrica del gas nitrógeno de dicha reducción (**Southgate, 2003**).

2.1.5. Digestión gastrointestinal simulada *in vitro*

La digestión gastrointestinal de alimentos, en nutrientes disueltos es un paso fundamental en la nutrición y salud humana (**Luo, 2015**). Tras la ingestión, los alimentos se someten a una serie de cambios físico-químicos que llevan a su desintegración, transporte y a la absorción en el cuerpo (**Drechsler y Ferrua, 2016**).

Cuando se ingiere alimentos estos son primero triturados y cortados en la

boca donde se mezclan con la saliva para posteriormente ser sometidos a un proceso gástrico en el que el pH puede variar de 2,0 a 4,0 o más durante la digestión. Sin embargo, el pH real depende del volumen, el contenido de los alimentos, la presencia o ausencia de antiácidos y el consumidor individual, finalmente al entrar al intestino delgado se neutraliza y se somete a una digestión duodenal para pasar al intestino grueso (**Wickham et al., 2009**).

Durante todas las fases de digestión la comida es mezclada con enzimas (amilasas, proteasas y lipasas) y en el duodeno con (sales biliares y fosfolípidos). Las proteínas se liberan de los alimentos en todas las etapas de la digestión y dependiendo de la solubilidad y accesibilidad son sometidas a hidrólisis enzimática en el estómago (pepsina) y duodeno (proteasas pancreáticas) (**Nicoletti et al., 2004**).

Los estudios sobre digestibilidad en humanos requieren de un número elevado de voluntarios lo que dificulta en gran medida este tipo de ensayos. Por ello, se han desarrollado numerosos modelos *in vitro* que buscan simular las condiciones fisiológicas humanas que ocurren *in vivo*. Los modelos *in vitro* presentan ventajas, entre ellas se puede destacar que se pueden realizar numerosas replicas, establecer tiempos de hidrólisis y trabajar con diferentes muestras alimentarias, tanto de origen animal como de origen vegetal. Incluso se puede trabajar con proteínas purificadas (**Carrillo, 2014**).

El ensayo de digestión *in vitro* de las proteínas es un método ampliamente usado para establecer el parámetro de digestibilidad. Simula las condiciones de los procesos digestivos que tienen lugar en el tracto gastrointestinal humano. A través de las enzimas proteolíticas, midiendo el porcentaje de proteínas que son hidrolizadas por tales enzimas durante el proceso (**Almeida et al., 2015**).

Astwood et al. (1996) demostraron que un número de proteínas alergénicas mostraron resistencia notable a la digestión por pepsina, incluyendo las de maní, soja y leche de vaca, en comparación con proteínas no alergénicas. Por

esta razón, se desarrolló un modelo estático en la digestión *in vitro* con el fin de evaluar el potencial de una proteína para considerarlo un alérgeno alimentario **(FAO/ WHO, 2001)**.

2.1.6. Electroforesis de proteínas alimentarias

La técnica más utilizada para la caracterización de mezclas complejas de proteínas es la electroforesis. La electroforesis es un método analítico, en el que se separan las biomoléculas en dependencia de su carga, tamaño y bajo acción de un campo eléctrico **(González, 2010)**. Es de alta sensibilidad, poder de resolución y versatilidad, que además sirven para la separación de mezclas complejas de ácidos nucleicos, proteínas y otras biomoléculas **(García, 2000)**.

Los péptidos, proteínas, nucleótidos y ácidos nucleicos poseen grupos ionizables y un pH determinado para estar cargadas eléctricamente sean cationes (+) o aniones (-). Según la naturaleza de la carga neta las partículas migran hacia el cátodo o hacia el ánodo, mediante la fuerza de atracción eléctrica de la electroforesis que no es más que la tensión eléctrica aplicada a los electrodos en ambos extremos del gel. Las propiedades de una molécula determinan la velocidad con la que el campo eléctrico puede desplazarla a través de un medio gelatinoso **(De la Fuente, 2007)**.

Este método fue empleado por primera vez por Tiselius en el año 1937, sin embargo fue **Laemmli (1970)** quien descubrió la electroforesis discontinua en geles que contenían SDS (sodium dodecyl sulfate: dodecilsulfato sódico). En 1992 se emplean agentes reductores y SDS para la determinación del peso molecular de proteínas, lo que se denominó SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis o electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico).

Para la determinación del peso molecular de proteínas puede emplearse la electroforesis al comparar las movilidades electroforéticas de varios marcadores de peso molecular conocido. Existen patrones que son mezclas

de proteínas de peso molecular conocido que se tiñen uniformemente, estos tienen varios rangos de peso molecular. El patrón debe ser tratado como una muestra más al momento de realizar el procedimiento **(García, 2000)**.

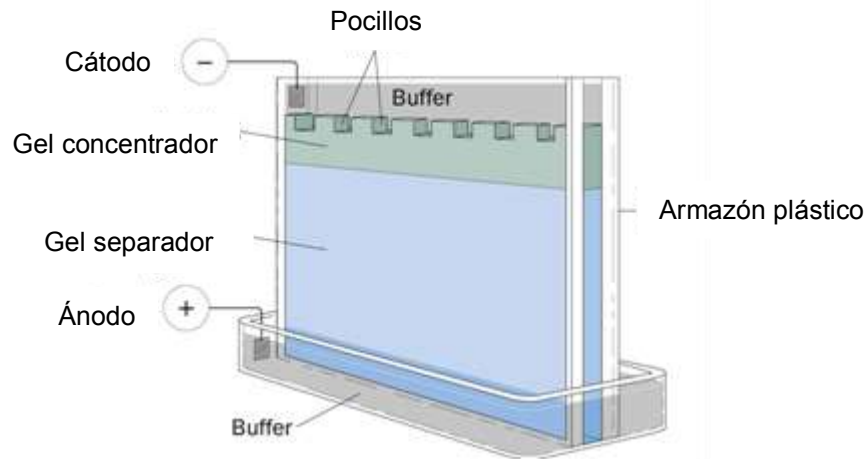


Figura 3. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS- PAGE)

Hoy en día la electroforesis se realiza con dos tipos de geles, uno concentrador (de poros grandes) y un gel separador (de poros pequeños), los constituyentes iónicos de las soluciones tampones en ambos geles son iguales, pero el pH y el tampón de corrida en los electrodos es diferente. El proceso general constituye tres etapas: concentración, desconcentración y resolución. En el gel concentrador la muestra se concentra en una zona muy estrecha, lo que determina la separación en bandas finas en el gel separador y alto poder de resolución **(Inzana, 1999)**.

Las proteínas con pigmentos naturales como la mioglobina, hemoglobina, ferritina y citocromo C se pueden observar directamente en los geles, sin embargo, la mayor parte de las proteínas necesitan ser teñidas para ser observada. Los colorantes orgánicos más empleados para teñir proteínas son: bromofenol azul, azul de coomassie, plata etc. **(Schägger y Von Jagow, 1987)**.

2.1.7. Actividad antiinflamatoria

La inflamación es una respuesta del tejido vivo a una lesión que puede ser causada por agentes biológicos, químicos o físicos (**Coleman, 2001**). En este proceso existe una liberación de sustancias como la bradiquina, prostaglandina, histidina y serotonina, las mismas que liberan un proceso inflamatorio (sopa algogénica), actúan en las terminaciones nerviosas generando dolor (**Enciso y Arroyo, 2011**).

Castro et al. (2013) mencionan que la inflamación expone el cuerpo a niveles prolongados de ROS (Reactive oxygen species o especies reactivas de oxígeno), causando una acumulación de daño oxidativo en los tejidos. Compuestos pro-oxidantes que son parte de la respuesta inmune contra patógenos.

La inflamación es un intento de protección del organismo para retirar los estímulos nocivos, así como iniciar el proceso de recuperación del tejido (**Ashley et al., 20012**). Existen medicamentos que son usados comúnmente para el tratamiento de condiciones inflamatorias, pero estos están asociados con muchos efectos secundarios no deseados, tales como irritación gástrica, úlcera gástrica y duodenal entre otras (**Amir et al. 2012**).

La inflamación tiene un objetivo protector, en donde libera al organismo del elemento causante del daño celular (microbios, toxinas). Sin la inflamación las infecciones se extenderían y las heridas no cicatrizarían. Estas inflamaciones mal curadas provocan reacciones de hipersensibilidad y enfermedades como la artritis reumatoide, la aterosclerosis y la fibrosis pulmonar (**Licastro et al., 2005**).

En los últimos años se ha despertado gran interés científico sobre la actividad antiinflamatoria debido a la evolución de enfermedades que inician con un proceso de inflamación (**Gómez et al., 2011**).

Los AINE (antiinflamatorios no esteroideos) son un grupo de agentes que son capaces de suprimir los signos y síntomas de la inflamación. Últimamente las investigaciones han revelado que los AINE generan efectos indeseables como la toxicidad gastrointestinal y renal (**Ortiz-Pereda et al., 2007**).

Por esta razón, se han realizado a través de diferentes modelos farmacológicos estudios tanto *in vivo* como *in vitro* de la evaluación de la actividad antiinflamatoria de extractos y metabolitos aislados de fuentes naturales, con el fin de minimizar el uso de AINE por los efectos negativos que producen (**Newman et al. 2003**).

Una posible alternativa natural es la chía, según **Norlaily et al. (2012)** se ha descubierto que esta semilla es una fuente importante de compuestos fenólicos, que actúan no solo como antioxidantes naturales sino que además posee propiedades anti-inflamatorias, antitrombóticas y anti-tumorales.

2.1.8. Actividad antioxidante

Los antioxidantes son sustancias generalmente orgánicas cuya función principal es retardar o impedir la formación de radicales libres e interceptar los que ya se han generado (**Shi, 2001**). Los antioxidantes pueden estar en forma libre o unidos a azúcares mediante enlaces glicosídicos, lo que aumenta su solubilidad en agua (**Valdivia- López y Tacante, 2015**).

Compuesto oxidantes se producen continuamente en los seres vivos, los cuales desencadenan un estrés oxidativo que consiste en un desequilibrio entre la producción de especies reactivas del oxígeno y la capacidad de un sistema biológico de destoxificar rápidamente los reactivos intermedios o reparar el daño resultante (**Fernández-Sánchez et al., 2011**).

El estrés oxidativo genera daños en proteínas celulares, lípidos y ADN que podrían resultar incluso en una muerte celular, además ha sido relacionado con enfermedades y el envejecimiento (**Marineli, et al., 2015**). Según

Gallegos et al. (2013) el estrés oxidativo en los alimentos afecta a su calidad nutricional y funcional.

Las cetonas, aldehídos, alquenos y alcanos son compuestos oxidados que se generan tras la descomposición de los hidroperóxidos en los alimentos con un alto contenido de lípidos (**Rodríguez et al., 2007**). A la formación de estos compuestos se le denomina rancidez, la misma que afecta al valor sensorial de los alimentos. Los antioxidantes logran retardar la rancidez pero no detenerla (**Rojano et al., 2008**).

Los antioxidantes sintéticos tales como Butilhidroxianisol (BHA) y Butilhidroxitolueno (BHT) se utilizan como aditivos alimentarios y conservantes. La actividad antioxidante de estos compuestos sintéticos es más fuerte que en los encontrados en compuestos naturales, tales como α -tocoferol y ácido ascórbico, pero están estrictamente regulados por el peligro que representan para la salud ya que se ha demostrado que son cancerígenos (**Segura et al., 2013**).

Por esta razón el interés en el desarrollo y la utilización de antioxidantes naturales como una alternativa a los productos sintéticos. Recientemente se ha descubierto que los hidrolizados de proteínas a partir de fuentes animales y vegetales presentan actividad antioxidante (**Lee et al., 2010**).

Las plantas medicinales desde tiempos antiguos son elogiadas por sus diversas acciones farmacológicas que podrían atribuirse a la presencia de metabolitos secundarios, tales como alcaloides, flavonoides, glucósidos, taninos, esteroides, etc. Algunas de estas plantas son fuente importante de antioxidantes naturales que se ha demostrado que pueden reducir el riesgo y la progresión de ciertas enfermedades agudas y crónicas como el cáncer y enfermedades del corazón (**Ali et al., 2008**).

Los primeros estudios realizados demostraron que la chía posee una fuerte actividad antioxidante. Entre los compuestos más importantes que se han

descrito en diferentes fuentes alimentarias se encuentran el δ y γ - tocoferol, ácido clorogénico, ácido caféico, miricetina, quercetina, kaempferol, ácido cafeico, flavonoides y compuestos fenólicos (**Peiretti y Gai, 2009**).

Debido a la presencia de estos compuestos las semillas de chía podrían ser empleadas como una fuente importante de antioxidantes naturales con aplicaciones comerciales (**Reyes-Caudillo et al., 2008**). Según el estudio de **Marineli et al., (2014)** las semillas de chía tienen mayor actividad antioxidante que la que se encuentra en el salvado de trigo, sorgo y grano entero de cebada.

2.2. Hipótesis

Tema: “Obtención de aislados proteicos de chía (*Salvia hispánica L.*) y evaluación *in vitro* de su digestibilidad gastrointestinal, actividad antiinflamatoria y antioxidante”.

H1: Los aislados proteicos de chía (*Salvia hispánica L.*) son digeridos por las enzimas.

H2: Los aislados proteicos de chía (*Salvia hispánica L.*) poseen actividad antiinflamatoria.

H3: Los aislados proteicos de chía (*Salvia hispánica L.*) presentan actividad antioxidante.

2.3. Señalamiento de las variables de las hipótesis

1. Variable independiente: aislados proteicos de chía (*Salvia hispánica L.*)

1. Variable dependiente: Digestión por enzimas

2. Variable independiente: aislados proteicos de chía (*Salvia hispánica L.*)

2. Variable dependiente: actividad antiinflamatoria

3. Variable independiente: aislados proteicos de chía (*Salvia hispánica L.*)

3. Variable dependiente: actividad antioxidante

3. CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

Tabla 1. Equipos de laboratorio empleados durante la investigación

Equipos
Agitador eléctrico vortex Mixer
Agitador VWR
Balanza analítica OHAUS Model V71P30T
Balanza analítica Precisa gravimétrica AG Pietikon
Balanza granataria Model VWR-224AC
Cámara Fotográfica
Centrifuga, eppendorf model 5702
Congelador Mabe
Congelador Panasonic Healthcare ultra-low Temperature freezer
Equipo de agua mili-Q Thermo Scientific
Equipo de electroforesis, mini-protean, Tetra System, BIO-RAD
Espectrofotómetro convencional de haz simple model DR-500
Estufa lan incubator Model In-010
Kit para electroforesis Bio-Rad
Liofilizador Bench Top Pro with Omnitronics model BTP-3ES0VW
Micro incubador, Esco, Provolcell Shaking
Microcentrifuga Labnet Model C2400-B
pHmetro Mettler Toledo
pHmetro Thermo SScientific Orion Star A211
Refrigerador Indurama model RI-470

Tabla 2. Reactivos empleados durante la investigación.

Reactivos
Ácido 2-tiobarbitúrico
Ácido acético
Ácido clorhídrico
Acrilamida
Agua ultra pura (mili-Q)
Azul de bromo fenol
Azul de Coomassie
Bicarbonato de sodio
Cloroformo
Cloruro de sodio
DMSO (dimetilsulfóxido)
Enzimas (amilasas, lipasas y proteasas)
Fosfato de sodio di básico
Fosfato mono sódico
Glicerol
Glicina
Hidróxido de sodio
Kit (Thermo)
PSA (
Reactivo de Biuret
Sales biliares
SDS (dodecilsulfato de sodio)
SFG (Simuladores de Fluido Gástrico)
Temed
Tris-HCl
Aceite de chía oxidado
β -mercaptoetanol

Tabla 3. Materiales de laboratorio empleados durante la investigación

Materiales de laboratorio
Balones de aforo
Cajas Petri
Envases herméticos
Espátula
Goteros
Guantes de látex
Kit Micro pipetas
Magneto
Probetas
Puntas para micro pipetas
Rotuladores
Tiras de pH
Tubos eppendorf
Tubos para centrifugar
Varillas de agitación
Vasos de precipitación

3.2. Métodos

3.2.1. Extracción del mucílago de las semillas de chía

Las semillas de chía (*Salvia hispánica* L.) se hidrataron en agua destilada en relación 1:10 (p/v) por 4 horas. Una vez que la semilla dobló su tamaño, se extrajo el mucílago mediante prensado con la ayuda de un lienzo.

3.2.2. Obtención de la harina de chía

Una vez extraído el mucílago, las semillas limpias se secaron con el fin de eliminar la humedad en una incubadora durante 24 horas a 50°C.

Las semillas secas se trituraron en un molino de cuchillas hasta obtener un polvo muy fino.

3.2.3 Análisis proximal de la harina de chía

El análisis proximal de la harina de chía se realizó en el INIAP (Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias) ubicado en la ciudad de Quito los métodos empleados para los análisis respectivos de humedad, cenizas, grasa proteína, fibra y carbohidratos se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4 . Métodos empleados en el análisis proximal de la harina de chía.

Análisis	Método
Humedad	MO-LSAIA-0.01
Cenizas	MO-LSAIA-0.02
Grasa	MO-LSAIA-0.03
Proteína	MO-LSAIA-0.04
Fibra	MO-LSAIA-0.05
Carbohidratos	MO-LSAIA-0.06

Fuente: INIAP (Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias)

3.2.4. Desengrasado de la harina de chía

A la harina obtenida del triturado se le retiró la grasa mediante extracción con cloroformo en una relación 1:10 (p/v) 10 g de harina por cada 100 ml de cloroformo. El proceso se realizó a temperatura ambiente con agitación continua durante 24 horas de contacto de la harina con el solvente. Luego se separó la harina del cloroformo por filtración dejándolo a temperatura ambiente bajo campana de extracción durante 12 horas esparcida sobre una superficie plana para eliminar los restos de cloroformo. La harina se almacenó a 4°C hasta su utilización (**Martínez y Añón, 1996**).

3.2.5. Obtención de aislados proteicos de chía

Los aislados proteicos de chía se obtuvieron por el método descrito por **Martínez y Añón (1996)** con modificaciones.

La harina de chía fue suspendida en agua en una relación 1:8, se llevó a un valor de pH de 9,0 con NaOH, 2 N, la suspensión se mantuvo en agitación durante 30 minutos. Posteriormente se centrifugó a 4500 rpm durante 20 minutos a temperatura ambiente. Los sobrenadantes resultantes se llevaron a diferentes pH (pH 2,0; pH 3,0; pH4,0; pH 5,0; pH 6,0) con HCl 2 N, con esto se determinó el pH óptimo de precipitación y el porcentaje de rendimiento, luego se dejó en reposo en refrigeración para la precipitación de la proteína, la misma que fue separada del sobrenadante por eliminación del mismo.

Los precipitados obtenidos se resuspendieron en 10 ml de agua y se neutralizaron con Na(OH) 0,1 N. Posteriormente, fueron liofilizados y guardados a -20°C. Además siguiendo el método antes mencionado se realizó modificaciones para obtener aislados proteicos mediante precipitación isoeléctrica en presencia de cloruro de sodio 1M a pH (pH 2,0; pH 3,0; pH4,0; pH 5,0; pH 6,0) y de igual manera se determinó el pH óptimo de precipitación y el porcentaje de rendimiento.

3.2.6. Análisis proximal del aislado proteico de chía

El análisis proximal del aislado proteico de chía se llevó a cabo en el INIAP (Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias). Los métodos empleados para los análisis respectivos de humedad, cenizas, grasa proteína, fibra y carbohidratos se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Métodos empleados en el análisis proximal del aislado proteico de chía.

Análisis	Método
Humedad	MO-LSAIA-0.01
Cenizas	MO-LSAIA-0.02
Grasa	MO-LSAIA-0.03
Proteína	MO-LSAIA-0.04
Fibra	MO-LSAIA-0.05
Carbohidratos	MO-LSAIA-0.06

Fuente: INIAP (Instituto nacional de investigaciones agropecuarias)

3.2.7. Determinación del rendimiento de los aislados proteicos de chía

El rendimiento de los aislados proteicos se obtuvo tras conseguir las muestras siguiendo el método ya mencionado de **Martínez y Añón (1996)** en donde se empleó agua y cloruro para la suspensión y llevándolas a diferentes pH (pH 2,0; pH 3,0; pH4,0; pH 5,0; pH 6,0)

Para el estudio del rendimiento de los aislados proteicos de chía se empleó un diseño A*B

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + (AB)_{ij} + R_k + \varepsilon_{ij}$$

$$H_0: A_i = 0$$

$$H_0: B_j = 0$$

$$H_0: (AB)_{ij} = 0$$

Tabla 6. Factores y niveles del diseño A*B

Factor A (pH de precipitación de proteínas)	Factor B (Solvente)
a ₀) pH 2	b ₀ .- Agua
a ₁) pH 3	b ₁ .- Cloruro de sodio 1M
a ₂) pH 4	
a ₃) pH 5	
a ₄) pH 6	

Tabla 7. Interacciones del diseño A*B

N°	Interacción	Interacción
1.-	a ₀ b ₀	pH 2- Agua
2.-	a ₁ b ₀	pH 3- Agua
3.-	a ₂ b ₀	pH 4- Agua
4.-	a ₃ b ₀	pH 5- Agua
5.-	a ₄ b ₀	pH 6- Agua
6.-	a ₀ b ₁	pH 2- Cloruro de sodio 1M
7.-	a ₁ b ₁	pH 3- Cloruro de sodio 1M
8.-	a ₂ b ₁	pH 4- Cloruro de sodio 1M
9.-	a ₃ b ₁	pH 5- Cloruro de sodio 1M
10.-	a ₄ b ₁	pH 6- Cloruro de sodio 1M

Los resultados se expresaron como el valor promedio de tres replicas \pm desviación estándar y fueron analizados mediante un análisis de varianza. Las medias fueron evaluadas mediante la prueba de tuckey de las mínimas diferencias significativas, con un nivel de significancia de $\alpha=0,05$ para ello se empleó el programa InfoStat.

3.2.8. Cuantificación de proteína

3.2.8.1. Método Biuret

La cuantificación de proteína de chía por el método de Biuret se llevó a cabo siguiendo el método descrito por **Valencia et al. (2012)** el mismo que se basó en la formación de un complejo violeta debido a la combinación de los iones Cu^{2+} del reactivo Biuret y los pares de electrones no compartidos del nitrógeno que forma parte de los enlaces peptídicos.

Se pesó 5 mg de proteína de chía, se disolvieron en 1 ml de agua ultra pura y se añadió 75 μl de NaOH 0,2 M, la mezcla se agitó con la ayuda de un agitador magnético, finalmente se agregó 1,25 ml del reactivo de Biuret. Para la preparación del reactivo de Biuret se empleó tartrato de potasio, tartrato de sodio, sulfato de cobre y yoduro de potasio, disueltos en 400 ml de solución de NaOH 0,2M.

La mezcla se centrifugó durante 30 minutos, posteriormente se guardó las muestras a 5°C antes de realizar las tres lecturas en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm.

3.2.8.2. Método BCA (ácido bicinconínico)

El método de cuantificación de proteína BCA (ácido bicinconinico) se llevó a cabo mediante un Kit (Thermo) siguiendo el método descrito por **García y Vázquez (1998)**. El principio de este método es la reducción de Cu^{+2} a Cu^+ en presencia de las proteínas en un medio alcalino. El ácido bicinconínico

que se unen a los iones de Cu^+ formando complejos de color púrpura intenso que se pueden cuantificar mediante espectrofotometría.

Se pesaron 5 mg de muestra, se agregó 1 ml de agua y 75 μL de NaOH dentro de un tubo eppendorf, la mezcla se agitó en un agitador magnético durante 15 minutos. Posteriormente la muestra fue centrifugada por 15 minutos, tras la centrifugación se realizó una dilución 1:30 (v/v), para ello se tomó 0,1 ml de la mezcla y 2,9 ml de agua ultra purificada. De esta última se tomó 70 μl y se mezcló con 1,4 ml del reactivo que se preparó mezclando 50 partes del reactivo A (carbonato de sodio, bicarbonato de sodio, reactivo BCA para detección, tartrato de sodio en una solución de NaOH 0,2 N) y una parte del reactivo B (solución de sulfato de cobre 4 %).

Se trabajó con la curva estándar de albúmina de suero bovino para lo cual se empleó una solución madre. Esta se preparó con 0,2 ml de la ampollita de albúmina de suero bovino y 1,4 ml de agua ultra pura, de esta se tomaron 100, 200, 300, 400 y 500 μl que se diluyeron en 400, 300, 200 y 100 μl de agua ultra purificada.

Las lecturas de los estándares y las muestras se llevaron a cabo en el espectrofotómetro a 562 nm.

3.2.8.3. Método Dumas

El método de Dumas se realizó siguiendo el manual de operación del equipo Velp Scientifica-NDA Series. Se trituro la muestra hasta obtener un polvo fino (0,05 mm de granulometría aproximada) y se mezcló bien antes de pesar, se empleó 50 mg de muestra homogénea.

Se seleccionó la curva de calibración con EDTA ya que fue la adecuada dependiendo del rango de contenido de proteína de la muestra / nitrógeno. Se ajustó los siguientes factores

Factor de oxígeno (mlO_2 / mg de muestra):1,8

Caudal de oxígeno (mlO_2 / min): 400

Factor de Proteína (% N = xpf PROT):5,7

La muestra de la sustancia orgánica se hace pasar por una combustión que consta de un tubo que contiene óxido de cobre que es calentado a una temperatura de 600 a 800°C. El agua formada se absorbe en otro tubo que contiene agente desecante, en donde se diluye el dióxido de carbono, esto provoca la reducción del nitrógeno, liberando nitrógeno molecular. Este último atraviesa una malla de cobre, en donde se reduce el óxido de cobre a nitrógeno elemental que pudo haberse formado, es aquí en donde se mide el volumen obtenido del mismo (**Smog y West, 1994**).

3.2.9. Aplicación de la técnica analítica de electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE)

La caracterización de las proteínas de chíá se logró con la ayuda de la técnica de electroforesis en gel de dodecil sulfato de sodio-poliacrilamida (SDS-PAGE) en condiciones desnaturalizantes y no desnaturalizantes utilizando el método descrito por **Laemmli (1970)** con modificaciones, con un equipo Bio-Rad, modelo Mini Protean II (Bio-Rad Life Science, USA).

El primer paso consistió en la polimerización del gel de poliacrilamida con la ayuda de dos placas de vidrio de 1 mm de espesor. El gel estuvo compuesto de dos fases. Una primer capa llamada gel de separación con una concentración de acrilamida del 14 % y una segunda capa con una concentración de acrilamida del 4 % llamado gel concentrador.

Una vez polimerizados los geles, estos fueron colocados en la cámara de electroforesis sumergidos en buffer running, que no es más que la solución que se emplea para la corrida de los geles. Posteriormente se cargaron 20 µl de cada muestra dentro de cada pocillo a una concentración de 5 mg/ml de proteína aislada de chíá. La muestra fue mezclada en una proporción 1:1 v/v con el buffer de muestra y se calentó a 80°C durante 10 minutos.

Una vez cargada la muestra se realizó la corrida de los geles a 200 V por 30 minutos. Los geles se tiñeron durante dos horas en azul de Coomassie y luego

fueron desteñidos en una mezcla de metanol, etanol y ácido acético.

3.2.10. Digestión gástrica *in vitro*

Se realizó una simulación de la digestión humana *in vitro* usando un método dinámico, simulando las condiciones fisiológicas de la digestión humana mediante el uso de una serie de enzimas proteolíticas y sales necesarias para el proceso de hidrólisis gástrica de las proteínas, según el método descrito por **Jiménez et al (2012)**. Se empleó fluido gástrico simulado a pH 1.2, 2.0, 3.2, 4.5 y 5.5, con el fin de simular las condiciones gástricas de personas con enfermedades, adultos niños y bebés.

Las muestras se prepararon pesando 10 mg de proteína de chíá que fue extraída a pH 3,0, que fue disuelta en 1 ml de agua. Para la simulación se empleó 2000 U/mg de pepsina porcina. Para ello se pesó 0,5 mg de la misma y se disolvió en 1ml de fluido gástrico simulado (SGF) NaCl 0,35 M a pH 1,2; pH 2,0; pH 3,2; pH 4,5; y pH 5,5.

Se mezcló la enzima y el sustrato en relación 1:1 (v/v) y se llevó a 37°C por 2 horas a 500 rpm, transcurrido este tiempo se detuvo la reacción con 200 µl de bicarbonato de sodio. Se empleó la técnica de electroforesis SDS-PAGE para comprobar la digestión de las proteínas.

3.2.11. Digestión duodenal *in vitro*

Para la digestión duodenal se emplearon las muestras que pasaron por la digestión gástrica, donde las proteínas se hayan digerido por la enzima pepsina, posterior a ello se empleó enzimas intestinales según el método descrito por **Jiménez- Saiz y col. (2012.)**.

Tras la digestión gástrica se tomó 1ml de los hidrolizados y se ajustó a pH 7,0, se colocó 1 ml de una mezcla de sales biliares 10 mM, CaCl₂ 1,5 mM, y pancreatina (10000 U/mg), la mezcla fue llevada al digestor en donde

permaneció a 37°C por 2 horas a 500 rpm, tras este proceso se paró la reacción de las enzimas llevando a 80°C por 10 minutos.

Los digeridos fueron analizados por la técnica de electroforesis SDS-PAGE para comprobar la digestión de las proteínas.

3.2.12. Evaluación de las actividades biológicas de los aislados proteicos de chíá.

3.2.12.1. Actividad antiinflamatoria (*in vitro*)

La actividad antiinflamatoria se determinó siguiendo el método descrito por **Alhakmani et al (2013)**. Se trabajó con las muestras de proteína de chíá y de diclofenaco de sódico (estándar) a concentraciones de 100 ug/ml, 200 ug/ml, 500 ug/ml y 1000 ug/ml. Para la preparación se empleó 2 ml de agua, 2ml de albúmina de huevo y 2,8 de solución tampón fosfato ajustado a pH 6,4, esta mezcla se llevó a 27°C por 15 minutos y luego a 70°C por 10 minutos, con el fin de llevar a cabo la reacción de desnaturalización de la proteína.

Además se preparó un control siguiendo el procedimiento anterior. Finalmente, se realizó dos diluciones con agua y la absorbancia de las muestras fue medida mediante un espectrofotómetro con una longitud de onda de 660 nm.

El porcentaje de inhibición de la proteína desnaturalizada fue calculada con la siguiente ecuación.

$$\%inhibición = \frac{A_t - A_c}{A_c} \times 100$$

Ec. 1

Dónde: A_t = Absorbancia de la muestra

A_c = Absorbancia del control

3.2.12.2. Actividad antioxidante *in vitro* (método TBARS)

Las muestras se analizaron mediante el método descrito por **Guzmán-Chozas et al. (1999)**; **Rojano et al. (2008)** con modificaciones.

Se preparó las muestras a concentraciones de 100 µg/ml, 200 µg/ml, 500 µg/ml, 1000 µg/ml, de las cuales se tomaron 500 µl y se mezclaron con de aceite de chía oxidado. Además se preparó estándares a las mismas concentraciones que las muestras usando BHT y de igual manera se mezcló con 500 µl de aceite de chía oxidado.

Las muestras y los estándares fueron llevados a 28°C por 8 horas, transcurrido este tiempo se colocó 1 ml de TBA al 1 % (ácido 2-tiobarbitúrico 0.02 M en ácido acético glacial al 90%). La mezcla se llevó a 90°C durante 60 minutos y posteriormente se enfriaron los tubos sumergiéndolos en hielo durante 5 minutos.

También se preparó un control con el mismo procedimiento anterior. Una porción de la muestra se llevó a una cubeta y la absorbancia de la muestra fue leída a 532 nm en un espectrofotómetro.

El porcentaje de inhibición de la oxidación fue calculado con la siguiente ecuación.

$$\%inhibición\ de\ oxidación = \frac{At - Ac}{Ac} \times 100$$

Ec. 2

Dónde: At = Absorbancia de la muestra

A_c = Absorbancia del control

4. CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Análisis y discusión de los resultados

4.1.1. Análisis proximal de la harina de chía

Tabla 8. Análisis proximal de la harina de chía

Análisis	%
Humedad	5,71
Cenizas	4,82
Grasa	16,06
Proteína	19,78
Fibra	27,88
Carbohidratos	31,46

Fuente: INIAP (Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias)

Los resultados del análisis proximal en base seca presentados por el INIAP, indican que la harina de chía es una fuente importante de carbohidratos, fibra, proteína y un gran contenido de lípidos, lo que convierte a esta semilla en un alimento con gran valor nutricional apto para el consumo diario tanto en la dieta humana como en la dieta animal. Es importante, tomar en cuenta que la composición de las semillas de chía varía dependiendo de las condiciones de cultivo, climáticas y de riego así como el lugar de siembra.

El resultado del análisis de fibra de la harina de chía fue de 27,88 % que es similar al presentado por **Salgado et al. (2005)** que además mencionan que la fibra presente en estas semillas tiene el mejor valor de retención de agua,

comparado con otras fuentes importantes de fibra, como lo son el salvado (15,0 %) y la semilla de linaza (22,3 %).

Además el consumo de fibra de la chía puede presentar ciertas ventajas ya que se sabe que la fibra soluble tiene la propiedad de retardar la absorción intestinal de glucosa en la sangre y disminuir el colesterol (**Guiotto, 2014**).

Las semillas de chía poseen un contenido de lípidos del 16,06 % según el análisis proximal presentado en la tabla 9. Valor que es comparable al estudio de **Di Sapia et al. (2008)**, donde además mencionan que la chía es una fuente vegetal con mayor porcentaje de ácidos grasos esenciales con una alta concentración de Omega 3. Posee un 33 % de aceite, del cual el 62 % representa al ácido linolénico y el 20 % al linoleico.

El resultado del análisis proximal reveló que el contenido de proteína de las semilla de chía (19,8 %) es comparable al de la lenteja (23,0 %) y el garbanzo (21,0 %) y mayor que el de otros cultivos empleados tradicionalmente en la alimentación como el maíz (10,0 %), arroz (8,0 %), trigo (14,0 %) y la avena (15,3 %) (**Lazcano y Cuellar, 2004**).

Sin embargo, según **Ayerza y Coates (2011)**, el contenido de proteína de la chía puede aumentar hasta un 26,0 % dependiendo el lugar donde se cultiva la misma.

4.1.2. Análisis proximal del aislado proteico de chía

Tabla 9. Análisis proximal del aislado proteico de chía.

Análisis	%
Humedad	2,86
Cenizas	3,93
Grasa	9,63
Proteína	61,32
Fibra	0,52
Carbohidratos	24,60

Fuente: INIAP (Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias)

El resultado del análisis proximal en base seca del aislado proteico de chía muestra que el contenido de proteína es alto en comparación al valor obtenido del análisis proximal de la harina. Lo que indica que el proceso de obtención con los parámetros empleados son los adecuados para la correcta solubilización de las proteínas, y su recuperación mediante la precipitación isoeléctrica. El incremento del contenido de proteína del aislado proteico, obtenido a partir de la harina de chía fue de un 19,78 % a un 61,32 %.

El porcentaje de fibra en comparación con la harina disminuyó del 27,88 % a un 0,52 % ya que esta fue desechada al momento de realizar la extracción de proteína y de igual manera el contenido de grasa disminuyó de un 16,06 % a un 9,63 % a pesar de haberse desengrasado con cloroformo.

Según el **Codex 175-1989** para productos proteicos de soya, se llama concentrados proteicos a aquellos cuyo contenido de proteína sea de 65% o más y menos del 90 %. En el caso de aislado proteicos el contenido de

proteína debe ser de 90 % o más. Este valor debe ser calculado en base seca, excluyendo las vitaminas, minerales y aminoácidos añadidos así como los aditivos alimentarios.

Es por esta razón que al producto extraído por precipitación isoelectrica de la chía al no cumplir el requisito mencionado para aislado (90 % de proteína o más), la forma correcta de denominarlo sería concentrado proteico, debido a que su contenido de proteína esta alrededor del 60 %.

4.1.3. Rendimiento de aislados proteicos de chía

Los concentrados proteicos de chía se obtuvieron por precipitación isoelectrica y posteriormente se liofilizaron, con el fin de determinar su rendimiento. Se trabajó inicialmente con 10 g de harina desengrasada de chía en 100 ml de agua destilada y en 100 ml de una solución de NaCl 1M.

Tabla 10. Porcentaje de rendimiento de aislados proteicos de chía extraídos a diferentes pH.

pH	Solvente	
	Agua ^b (%)	NaCl 1M ^a (%)
2	24,82 ± 0,757 ^d	28,21 ± 0,726 ^c
3	25,53 ± 0,911 ^d	38,13 ± 0,148 ^a
4	12,30 ± 0,238 ^g	38,03 ± 0,698 ^a
5	19,12 ± 0,743 ^e	34,73 ± 0,103 ^b
6	14,62 ± 0,186 ^f	37,40 ± 0,326 ^a

Cada valor representa la media de 3 réplicas ± desviación estándar (SD). Las diferencias estadísticas fueron expresadas como p<0,05 usando un ANOVA y test tuckey, las letras diferentes muestran diferencias significativas.

Elaborado por: Cárdenas (2016)

Fuente: Laboratorio de alimentos funcionales (Bio-propepti) FCIAL-UTA

En la tabla 11, se muestran los rendimientos obtenidos con los dos solventes empleados agua y NaCl 1M, para la extracción de la proteína por precipitación isoeléctrica a diferentes pH. Este parámetro permitió conocer el punto isoeléctrico de la proteína de chíá. Tanto para el agua como para el NaCl el mayor rendimiento se obtuvo a pH 3,0 con un 25,53 % y 38,13 % respectivamente, lo que indica que este puede ser el punto isoeléctrico de la proteína, cabe recalcar que se obtiene un mayor rendimiento con NaCl ya que las muestras no fueron dializadas, así que su peso se ve influido por el contenido de sal.

Según el diseño experimental aplicado, los precipitados a diferentes pH presentan diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos y entre pH. Por ello se aplicó la prueba comparativa tuckey que indica que el mejor pH para el aislamiento de proteína de chíá es el pH 3,0, mientras que los mejores tratamiento son con cloruro de sodio a pH 3,0; pH 4,0; y pH 6,0. Sin embargo, es importante recordar que el porcentaje de rendimiento obtenido mediante la extracción con este solvente no es un valor real, ya que se ve influido por el peso de la sal lo que aumenta significativamente en porcentaje final respecto al aislamiento con agua, por ello se debe tener en cuenta como mejores tratamientos los realizados con este último a pH 2,0 y pH 3,0.

4.1.4. Cuantificación de proteína aislada de chíá.

4.1.4.1. Método de Biuret

A través del método de cuantificación de proteínas Biuret, se logró determinar el contenido de proteína presente en los concentrados proteicos de chíá obtenidos a diferentes pH (pH 2,0; pH 3,0; pH 4,0; pH 5,0; pH 6,0), para ello se usó una curva estándar de pepsina. Los resultados obtenidos de este análisis se presentan en la tabla 12.

Tabla 11. Porcentaje de concentración de proteína de chía medido por el método Biuret.

c	Concentración de proteína %
2	61,21 ± 1,705 ^d
3	81,03 ^c ± 2,385 ^c
4	91,81 ^a ± 2,092 ^a
5	89,05 ± 3,057 ^{ab}
6	84,89 ± 1,063 ^{bc}

Cada valor representa la media de 3 réplicas ± desviación estándar (SD). Las diferencias estadísticas fueron expresadas como $p < 0,05$ usando un ANOVA y test tuckey, las letras diferentes muestran diferencias significativas.

Elaborado por: Cárdenas (2016)

Fuente: Laboratorio de alimentos funcionales (Bio-propepti) FCIAL-UTA

A pH 4,0 se encontró el mayor contenido de proteína con un valor de 91,81%. Por lo cual según la clasificación Codex podría ser considerado como un aislado proteico de chía según este método de cuantificación proteica. El valor más bajo se obtuvo a pH 2,0 con un 61,21%. Los demás pH presentaron valores superiores al 80%.

El análisis estadístico aplicado a esta prueba muestra que existen diferencias significativas entre pH. Por estar se aplicó la prueba comparativa tuckey, la misma que indica que los mejores tratamientos son pH 4,0 (91,81%) y pH 5,0 (89,05%) ya que estos no son significativamente diferentes entre sí.

4.1.4.2. Método BCA (ácido bicinconínico)

Mediante el método BCA o del ácido bicinconínico que emplea la curva estándar de BSA (bovine serum albumin o albúmina de suero bovino), se pudo

cuantificar el contenido de proteína de los concentrados proteicos de chía extraídos a diferentes pH (pH 2,0; pH 3,0; pH 4,0; pH 5,0; pH 6,0) los resultados de concentración de proteína se presentan en la tabla 13.

Tabla 12. Porcentaje de concentración de proteína de chía medido por el método BCA.

pH	Concentración de proteína %
2	45,10 ± 1,429 ^c
3	44,91 ± 2,041 ^c
4	57,87 ± 1,830 ^a
5	51,23 ± 2,424 ^b
6	48,21 ± 0,429 ^{bc}

Cada valor representa la media de 3 réplicas ± desviación estándar (SD). Las diferencias estadísticas fueron expresadas como $p < 0,05$ usando un ANOVA y test tuckey, las letras diferentes muestran diferencias significativas.

Elaborado por: Cárdenas (2016)

Fuente: Laboratorio de alimentos funcionales (Bio-propepti) FCIAL-UTA

A pH 4,0 se encontró el mayor contenido de proteínas de chía con un valor de 57,88 %. El análisis estadístico aplicado para este método indicó que existen diferencias significativas entre pH de precipitación de las proteínas, por ello se aplicó la prueba comparativa tuckey que confirmó que el pH 4,0 es el pH en el que existe mayor porcentaje de proteína seguido por pH 5,0 y pH 6,0 con valores de 51,23 % y 48,15 % respectivamente. Tanto en el método Biuret como el BCA, el mayor contenido de proteína se obtuvo en el pH 4,0 de precipitación.

4.1.4.3. Método Dumas

Otro método aplicado para la cuantificación de proteína es el método Dumas, los valores obtenidos se presentan en la Tabla 14

Tabla 13. Porcentaje de concentración de proteína de chía medido por el método Dumas

pH	Concentración de proteína %
2	22,46 ^d
3	31,54 ^c
4	68,67 ^b
5	75,15 ^a
6	71,85 ^b

Las diferencias estadísticas fueron expresadas como $p < 0,05$ usando test tuckey, las letras diferentes muestran diferencias significativas.

Elaborado por: Cárdenas (2016)

Fuente: Laboratorio de alimentos funcionales (Bio-propepti) FCIAL-UTA

En este análisis los valores obtenidos de proteína difieren en gran manera a los valores obtenidos en Biuret y BCA, siendo el pH 5,0 el que posee mayor contenido de proteína con un 75,15%.

Biuret y Dumas son métodos menos sensibles que BCA, por ello los resultados de concentración de proteína en estos, son mayores que los obtenidos por BCA. Esto se debe a que este último un método es más específico y trabaja sobre la estructura macromolecular de la proteína y su coloración se produce en presencia de cuatro aminoácidos específicos (cistina, cisteína, tirosina y triptófano).

Dumas hace referencia al contenido de nitrógeno total incluyendo la fracción inorgánica, por lo tanto, Dumas es un método específico para los productos que contienen nitratos / nitritos (**Nielsen, 2010**).

4.1.5. Caracterización de proteína de chía mediante electroforesis (SDS-PAGE)

La técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) fue empleada con el fin de analizar los concentrados proteicos de chía a pH (pH 2,0; pH 3,0; pH 4,0; pH 5,0; pH 6,0) usando una concentración de 5 mg/ml.

Se usó un estándar de pesos moleculares comprendidos entre 14-180 kDa. Por medio de esta técnica de análisis se pudo confirmar visualmente la presencia de proteínas en los concentrados de chía, ya que cada banda teñida con azul de coomassie corresponde a las mismas.

Orona -Tamayo et al. (2015) mencionan que las fracciones de proteínas presentes en las semillas de chía son globulinas, albúminas, prolaminas y glutelinas.

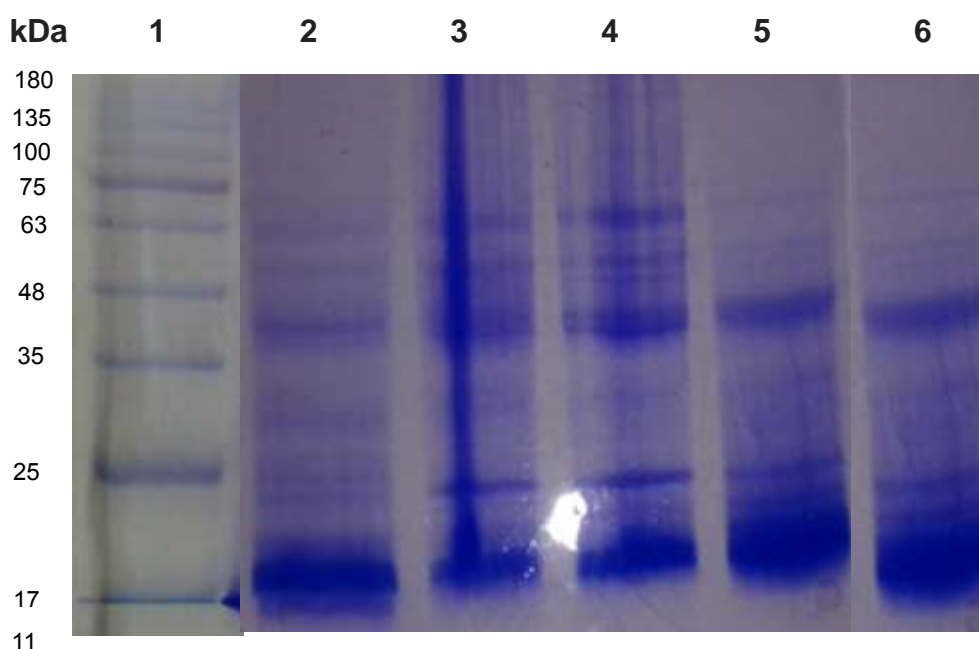


Figura 4. Análisis SDS-PAGE de concentrados proteicos de chía a diferentes pH, en condiciones no reductoras sin 2- β -ME. Gel de acrilamida al 14 % teñido con azul de Coomassie. Se cargó 10 μ l de marcador de PM y 20 μ l de proteína. Carril 1: estándar de proteínas; carril 2: aislado proteico de chía a pH 2,0 carril 3: aislado proteico de chía a pH 3,0; carril 4: aislado proteico de chía a pH 4,0; carril 5: aislado proteico de chía a pH 5,0; carril 6: aislado proteico de chía a pH 6,0.

En el gel (figura 4) se puede observar que el perfil de las proteínas es igual a todos los pH ensayados, Las bandas se encuentran comprendidas entre pesos moleculares de 14 y 66 kDa en donde se pudo identificar la presencia de albúminas y globulinas.

Las albuminas se presentan como una banda de bajo peso molecular < 14,4 kDa, mientras que las proteínas con peso molecular entre 33-36 kDa corresponden a la subunidad ácida de las 11S globulinas. Por otro lado, las proteínas con peso molecular entre 20-22 de kDa corresponden a la unidad básica de las 11S globulinas, mientras que las proteínas con 60 kDa correspondiente a la globulina 7S (**Abugoch et al., 2008**).

También se puede observar que las bandas tienen mayor expresión a pH 3,0; pH 4,0; pH 5,0; y pH 6,0. La fracción correspondiente a las albúminas tiene muy alta expresión en todos los pH de precipitación.

Las albúminas son solubles en soluciones salinas muy diluidas y en agua, esta fracción está compuesta por polipéptidos de peso molecular de 10 a 40 kDa (**Segura et al., 1992**), lo que permite confirmar la presencia de esta fracción en las semillas ya que se observan bandas con los pesos mencionados.

El perfil de las proteínas en el gel con 2-β-mercaptoetanol (+2-β-ME) (figura 5) ha cambiado considerablemente respecto al perfil proteico de la figura 4. Esto se debe a la ruptura de los puentes disulfuros, por ello las proteínas son vistas con diferente peso molecular.

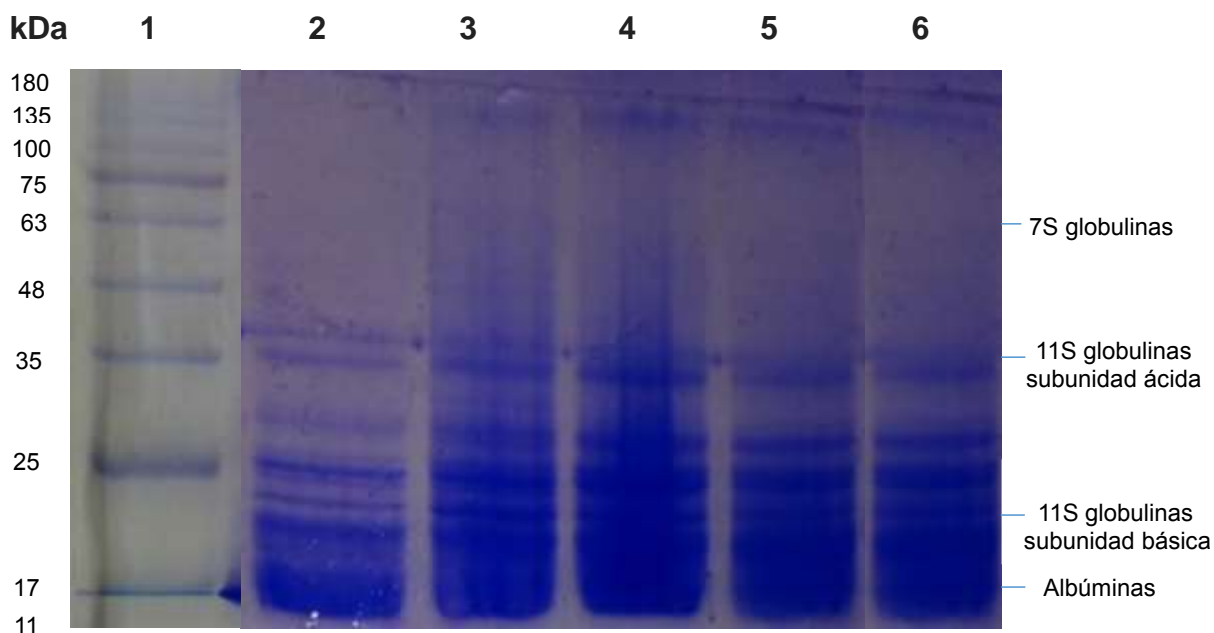


Figura 5. Análisis SDS-PAGE de concentrados proteicos de chíá a diferentes pH, en condiciones reductoras con 2-β-ME. Gel de acrilamida al 14 % teñido con azul de Coomassie. Se cargó 10 µl de marcador de PM y 20 µl de proteína. Carril 1: estándar de proteínas; carril 2: aislado proteico de chíá a pH 2,0 carril 3: aislado proteico de chíá a pH 3,0; carril 4: aislado proteico de chíá a pH 4,0; carril 5: aislado proteico de chíá a pH 5,0; carril 6: aislado proteico de chíá a pH 6,0.

El perfil electroforético en presencia del agente reductor (+2-β-ME), presentó subunidades de un tamaño aproximado de 50 kDa que hacen referencia a los monómeros del hexámero de una 11S globulina.

Las globulinas son las proteínas de reserva que conforman la mayor parte de las proteínas de ciertos granos como el fréjol y la soya, se clasifican en 7S y 11S (Sherwry, 2002).

Las 7S globulinas son proteínas cuyo peso molecular varía entre 150 a 190 kDa y están constituidas por subunidades de 40- 70 kDa que pueden ser iguales o diferentes (Casey *et al.*, 1993). Mientras que las 11S globulinas son oligómeros hexaméricos cuyas subunidades interaccionan por enlaces no covalentes con un peso molecular de 50-60 kDa (Plietz *et al.*, 1986).

Cada subunidad es sintetizada como una sola cadena de 55 kDa que es cortada proteolíticamente para producir una cadena acida de 30-40 kDa y una básica de 20-25 kDa enlazada por un puente disulfuro (Niesel *et al.*, 1995).

4.1.6. Digestión gástrica *in vitro* analizada mediante electroforesis (SDS-PAGE)

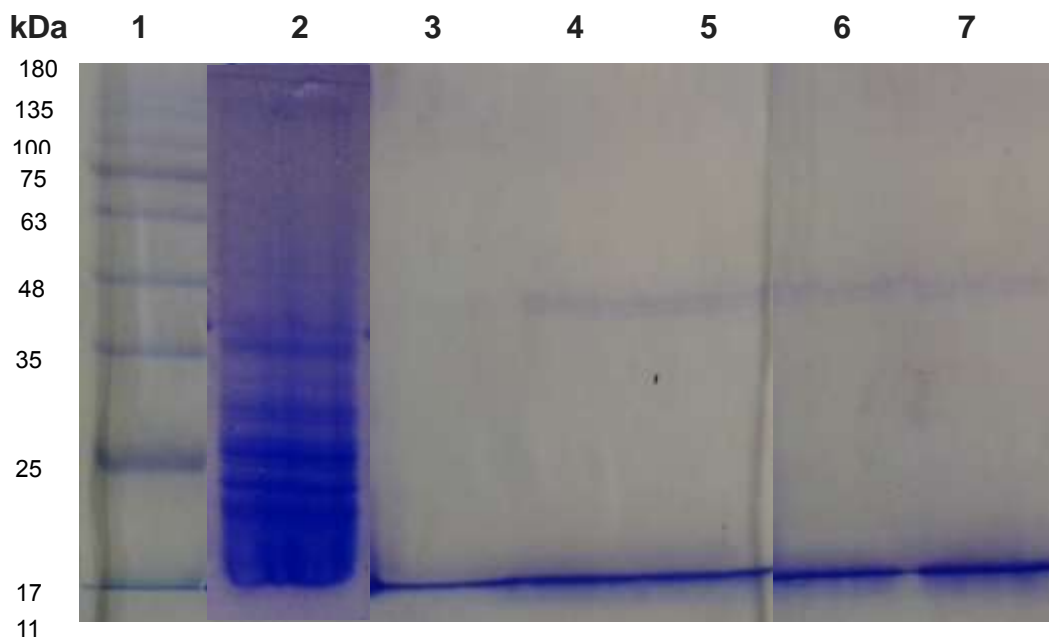


Figura 6. Electroforesis SDS-PAGE en presencia de β ME. Simulación gástrica de aislados proteicos de chía carril1: estándar de proteínas; carril 2: aislado proteico de a chía pH 3,0; carril 3: digestión gástrica de chía a pH 1,2; carril 4: digestión gástrica de chía a pH 2,0; carril 5: digestión gástrica de chía a pH 3,2; carril 6: digestión gástrica de chía a pH 4,5; carril 6: digestión gástrica de chía a pH 5,5.

El proceso de digestión gastrointestinal *in vitro*, se llevó a cabo simulando las condiciones del estómago usando un (SGF) que contiene cloruro de sodio 0.35M. Este fluido es recomendado por la farmacopea americana y europea para este tipo de ensayos de digestibilidad.

La simulación gastrointestinal se llevó a cabo en dos fases. Una gástrica a pH (pH 1,2; pH 2,0; pH 3,2; pH 4,5; pH 5,5). El pH 1,2 simula el pH del estómago de un adulto enfermo. El pH 2,0 simula el pH del estómago de un adulto sano

y el pH 3,2 simula el pH del estómago de un niño lactante.

Los pH altos de 4,5 y 5,5 simulan el pH del estómago de un recién nacido (**Jiménez-Sainz, 2012**). Se empleó una concentración de pepsina de 2000 U/ml en una relación (1:1) enzima sustrato.

En la figura 6 se muestran el geles realizado después de este proceso. Asimismo, se observa que la proteína aislada de chía es hidrolizada completamente por las enzimas a todos los pH ensayados, esto se evidencia al ser comparados con el aislado puro a pH 3,0 lo que indica que esta no es una proteína alérgena que podría ser consumida por todas las personas sin riesgos para su salud. Sin embargo, es importante mencionar que en los geles la banda que se observa con un peso aproximado de 45 kDa, corresponde a la pepsina restante de la hidrólisis, para estar seguros de ello se realizó un gel con pepsina (figura 7).

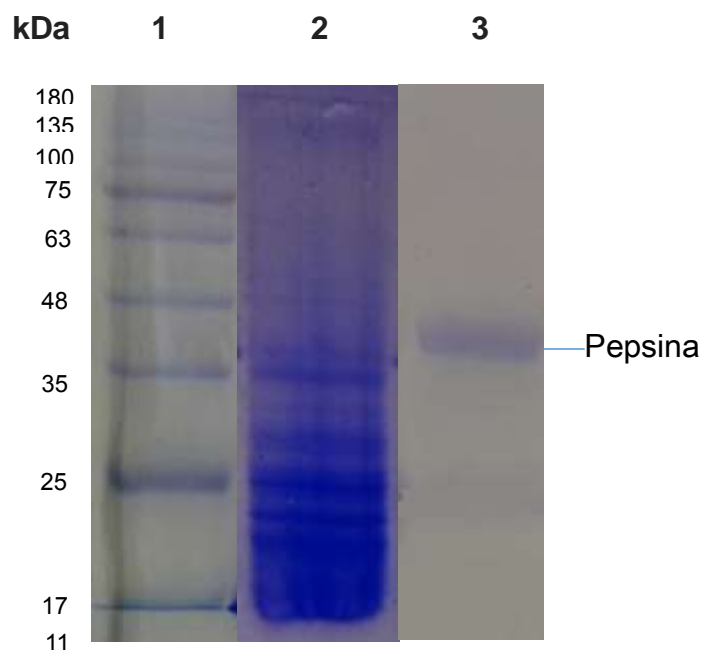


Figura 7. Electroforesis SDS-PAGE en presencia de β ME. Carril 1 estándar de proteínas; carril 2: aislado proteico de chía a pH 3,0; carril 3: pepsina.

4.1.7. Digestión duodenal *in vitro* analizada mediante electroforesis (SDS-PAGE)

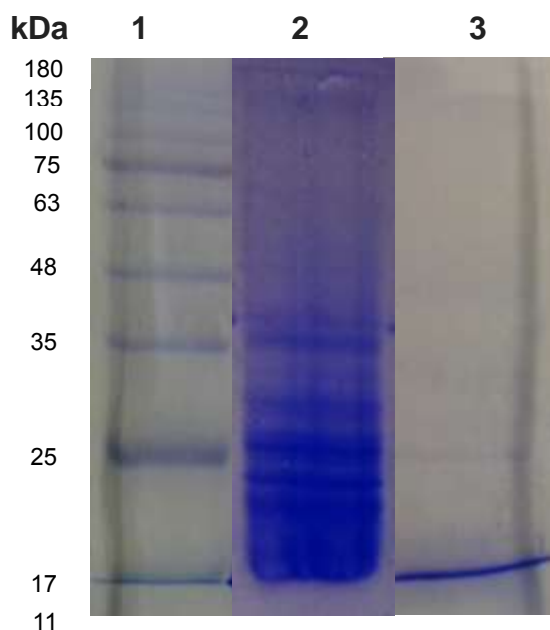


Figura 8. Electroforesis SDS-PAGE en presencia de β ME. Simulación duodenal de aislados proteicos de chía carril1: estándar de proteínas; carril 2: aislado proteico de chía a pH 3,0; carril 3: digestión duodenal de chía a pH 3,2.

La digestión duodenal en humanos empieza en el intestino delgado, donde las proteínas son degradadas por enzimas proteolíticas y pancreatina. Sin embargo, para llevar a cabo la digestión duodenal *in vitro* se empleó cloruro de calcio, sales biliares, y enzimas (amilasas, lipasas y proteasas) contenidas en una capsula de pancreatina.

En la figura 8 se observa que no existen bandas que evidencien la presencia de proteínas y con ello se comprueba que la chía se digiere totalmente en el proceso duodenal.

Con ello se comprueba que las proteínas de chía obtenidas en este estudio, tienen alta digestibilidad *in vitro* en las condiciones en las que se realizó este ensayo.

4.1.8. Evaluación de las actividades biológicas de los aislados proteicos de chía

4.1.8.1. Determinación de la actividad antiinflamatoria *in vitro*

Mediante la Ec 1 ($\% \text{inhibición} = (\text{At-Ac})/\text{Ac} * 100$) se obtiene los valores expresados en la tabla 15, se muestra el porcentaje de inhibición de los concentrados proteicos sobre la desnaturalización de las proteínas de la albúmina de huevo frente al diclofenaco, el estándar empleado para la determinación de la actividad antiinflamatoria *in vitro*.

Tanto las muestras como el control positivo (diclofenaco sódico) se trabajaron a concentraciones de 100, 200, 500 y 1000 $\mu\text{g/ml}$.

Tabla 14. Porcentaje de inhibición antiinflamatoria que presenta el concentrado proteico de chía a diferentes pH.

Inhibición (%)	Concentraciones			
	100 $\mu\text{g/ml}$	200 $\mu\text{g/ml}$	500 $\mu\text{g/ml}$	1000 $\mu\text{g/ml}$
Estándar	148,80 \pm 0,523	243,42 \pm 0,485	308,52 \pm 0,159	313,72 \pm 0,558
pH 2	182,37 \pm 0,653	224,13 \pm 0,940	260,87 \pm 0,211	323,78 \pm 0,967
pH 3	305,66 \pm 0,138	234,58 \pm 0,575	213,81 \pm 0,239	190,84 \pm 0,388
pH 4	169,34 \pm 0,138	170,63 \pm 0,211	175,74 \pm 0,833	184,25 \pm 0,239
pH 5	157,92 \pm 0,319	167,22 \pm 0,211	168,65 \pm 0,239	218,69 \pm 0,211
pH 6	335,41 \pm 0,211	210,68 \pm 0,999	142,63 \pm 0,159	137,20 \pm 0,211

Cada valor representa la media de 3 réplicas \pm desviación estándar (SD).

Elaborado por: Cárdenas (2016)

Fuente: Laboratorio de alimentos funcionales (Bio-propepti) FCIAL-UTA

Los valores obtenidos del diclofenaco usado como estándar muestran que existe una relación directamente proporcional, entre la concentración de proteína y el porcentaje de inhibición, ya que con una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ el porcentaje de inhibición es de 148,80 %, y con 1000 $\mu\text{g/ml}$ el porcentaje de

inhibición es de 313,72 %. Sin embargo los valores de porcentaje de inhibición de los concentrados proteicos de chía a diferentes pH no siguen una tendencia específica.

La actividad antiinflamatoria *in-vitro* de los concentrados de chía son comparables a la del diclofenaco de sodio, un fármaco de referencia (100, 200, 500 y 1000 µg / ml), cabe mencionar que en pH 6,0 a una concentración de 100 µg/ml el concentrado proteico de chía tuvo un valor de inhibición de 335,41 %, mayor al obtenido del patrón 313,72 % a una concentración del 1000 µg/ml. Lo que indicó que a este pH existe una mayor actividad de esta proteína.

Los AINE como el ibuprofeno y el diclofenaco (usado en este estudio como control positivo) se unen en un 99,5 % a proteínas serinas humanas específicamente a albúminas que luego son liberadas poco a poco para ejercer su acción antiinflamatoria. Con el fin de simular estas condiciones, se empleó la albumina de huevo en este estudio. **(Martínez y Garrido, 2013)**

Durante años se han remplazado los antiinflamatorios comerciales por productos naturales, los mismos que hoy en día ofrecen ser una alternativa viable y lógica de agentes antiinflamatorios seguros y eficaces para el tratamiento de determinadas dolencias **(Alhakmani et al., 2013)**. Debido al perfil de compuestos fenólicos de la chia, esta presenta actividad antiinflamatoria, convirtiéndose así en una opción natural para el tratamiento de este tipo de estos fenómenos.

4.1.8.2. Evaluación de la actividad antioxidante *in vitro* (método TBARS)

Los datos obtenidos del porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica [Ec1], presentados en la tabla 16 se obtuvieron mediante la Ec 2 (% inhibición de oxidación= $(At-Ac)/Ac * 100$). Estos datos se expresaron en forma de porcentaje comparado con BHT, un potente antioxidante sintético.

Tanto las muestras como el control positivo (BHT) fueron empleados a diferentes concentraciones 100, 200, 500 y 1000 μ /ml.

Tabla 15. Porcentaje de inhibición de oxidación lipídica que presenta el concentrado proteico de chía a diferentes pH.

Inhibición (%)	Concentraciones			
	100 μ g/ml	200 μ g/ml	500 μ g/ml	1000 μ g/ml
Estándar (BHT)	93,94 \pm 0,034	94,05 \pm 0,056	96,18 \pm 0,032	97,43 \pm 0,078
pH 2	95,42 \pm 0,219	86,97 \pm 0,278	91,45 \pm 0,382	95,01 \pm 0,201
pH 3	95,57 \pm 0,053	92,63 \pm 0,089	91,09 \pm 0,077	90,86 \pm 0,041
pH 4	91,55 \pm 0,188	92,65 \pm 0,045	91,84 \pm 0,107	92,36 \pm 0,118
pH 5	92,91 \pm 0,015	94,30 \pm 0,096	91,75 \pm 0,244	92,30 \pm 0,036
pH 6	95,98 \pm 0,027	95,86 \pm 0,160	92,80 \pm 0,265	94,51 \pm 0,056

Cada valor representa la media de 3 réplicas \pm desviación estándar (SD).

Elaborado por: Cárdenas (2016)

Fuente: Laboratorio de alimentos funcionales (Bio-propepti) FCIAL-UTA

Según los datos presentados se pudo determinar que el concentrado de chía es un potente antioxidante ya que los valores obtenidos son comparables a la del patrón (BHT) empleado en la experimentación.

Aunque el estudio denota que el BHT tiene una mayor capacidad para inhibir los procesos oxidativos es evidente que el concentrado de chía es una buena opción para remplazarlo ya que no existe gran diferencia entre el porcentaje de inhibición entre estos dos. El BHT tiene su mayor porcentaje de inhibición (97,43%) a una concentración de 1000 μ g/ml, mientras que el concentrado de chía tiene su mayor porcentaje de inhibición (95,98%) en el pH 6,0 a la concentración más baja 100 μ /ml.

Este resultado sugiere que el aislado proteico de chía tiene una actividad antioxidante comparable con la actividad antioxidante de una marca comercial.

La chía se considera una semilla con alta capacidad antioxidante, ya que posee gran cantidad de compuestos fenólicos (**Martínez-Cruz y Paredes-López, 2014**). Por esta razón, la chía podría ser utilizada como una fuente natural de antioxidantes para prevenir la progresión o como prevención del estrés oxidativo o en enfermedades degenerativas relacionadas.

4.2. Verificación de hipótesis

1) Las proteínas presentes en los aislados proteicos de chía (*Salvia hispánica L.*), 7S y 11S globulinas, albúminas, prolaminas y glutelinas. Son digeridas completamente por las enzimas en los procesos *in vitro* de digestión gástrica y digestión duodenal simulados.

2) Los aislados proteicos de chía (*Salvia hispánica L.*) extraídos a diferentes pH poseen actividad antiinflamatoria.

3) Los aislados proteicos de chía (*Salvia hispánica L.*) extraídos a diferentes pH poseen actividad antioxidante.

5. CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- ❖ Se estudió la digestibilidad gastrointestinal, actividad antiinflamatoria y actividad antioxidante de las proteínas aisladas de chíá a diferentes pH, en donde se pudo determinar la presencia de fracciones proteicas como las 7S y 11S globulinas y albúminas que fueron digeridas completamente bajo las condiciones simuladas de digestión gástrica y duodenal *in vitro*, además, se comprobó que las proteínas obtenidas de estas semillas poseen tanto actividad antiinflamatoria como antioxidante.
- ❖ Se cuantificó el contenido de proteína por los métodos Biuret y BCA mediante los cuales se pudo determinar que el pH en el que se obtiene mayor cantidad de proteína es al pH 4,0 con un 91,81 %, y un 57,88 % respectivamente.
- ❖ Se caracterizó por peso molecular las proteínas de chíá mediante la técnica de electroforesis SDS-PAGE, en donde se comprobó la presencia de 7S y 11S globulinas, albúminas, prolaminas y glutelinas que se encuentran en pesos moleculares entre 14 y 66 kDa aproximadamente.
- ❖ Se determinó la actividad antiinflamatoria *in vitro* de los concentrados proteicos de chíá obtenidos a diferentes pH, teniendo como resultado que a pH 6,0 a una concentración de 100 µg/ml el porcentaje de inhibición fue mayor que los demás pH ensayados con un 335,41 %.
- ❖ Se evaluó la actividad antioxidante *in vitro* de las proteínas aisladas de chíá a diferentes pH, mediante el método TBARS en donde se obtuvo

- ❖ que la chía tiene un valor de actividad antioxidante comparable a la del BHT y su mayor porcentaje de inhibición de oxidación lipídica (95,98%) se observa en el pH 6,0 a una concentración de 100 µg/ml.

5.2. Recomendaciones

- ❖ Se recomienda realizar un estudio en el cual se pueda agregar la proteína aislada de chía a un alimento procesado, para convertirlo en un alimento funcional y de esta manera aprovechar los beneficios que la chía ofrece.
- ❖ Llevar a cabo un estudio sobre el perfil de aminoácidos de la proteína de chía.
- ❖ Realizar un estudio sobre los hidrolizados de la proteína de chía.
- ❖ Extraer el mucílago de las semillas de la chía ya que por ser muy denso afecta a la extracción de la proteína, así como en la caracterización de las mismas por la técnica de electroforesis.
- ❖ La muestra de la harina de chía debe estar desengrasada antes de llevar a cabo los análisis, ya que este componente puede afectar a los mismos y no se obtendrían valores confiables.
- ❖ La poliacrilamida resultante como residuo de la técnica de electroforesis por ser cancerígena debe ser tratada de manera adecuada, almacenándola en un recipiente adecuado.
- ❖ Purificar el solvente empleado para el desengrasado de la harina de chía, y jamás arrojarlo por las tuberías ya que produciría contaminaciones.

Referencias bibliográficas

Abugoch, L., Romero, N., Tapia, C., Silva, J., y Rivera, M. (2008). Study of some physico-chemical and functional properties of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) protein iso-lates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 4745 - 4750.

Alhakmani, F., Kumar, S., & Khan, S. (2013). Estimation of total phenolic content, *in-vitro* antioxidant and antiinflammatory activity of flowers of *Moringa oleifera*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 3, 623-627.

Ali, S. S., Kasoju, N., Luthra, A., Singh, A., Sharanabasava, H., Sahu, A., & (2008). Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. *Food Research International*, 41, 1-15

Almeida, C., Monteiro, M. L., Costa-Lima, B. R., Alvares, T., & Conte-Junior, C. (2015). *In vitro* digestibility of commercial whey protein supplements. *LWT - Food Science and Technology*, 61, 7-11.

Amir, M., Javed, S. A., & Kumar, H. (2010). Design and synthesis of 3-[3-(substituted phenyl)-4-piperidin-1-ylmethyl/-4-morpholin-4-ylmethyl-4, 5-dihydro-isoxazol-5-yl]-1H-indoles as potent anti-inflammatory agents. *Medicinal Chemistry Research*, 19, 299-310.

Ashley, N. T., Weil, Z. M., & Nelson, R. J. (2012). Inflammation: mechanisms, costs, and natural variation. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 43, 385-406.

Astwood, J. D., Leach, J. N., & Fuchs, R. L. (1996). Stability of food allergens to digestion *in vitro*. *Nature Biotechnology*, 14, 1269-1273.

Aufrère, J. L., Graviou, D., Demarquilly, C., Andrieu, J., Emile, J. L., Giovanni, R., & Maupetit, P. (1992). Estimation of organic matter digestibility of whole maize plant by laboratory method. *Animal Feed Science and Technology*, 36, 187-204.

Ayerza, R. (1995). Oil content and fatty acid composition of chía (*Salvia hispánica* L.), from five northeastern locations in northwestern Argentina. . *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 72, 1079-1081.

Ayerza, R., & Coates, W. (2006). *Chía, redescubrimiento un olvidado alimento de los aztecas* (Primera edición ed.). Buenos Aires, Argentina

Ayerza, R., & Coates, W. (2011). Protein content, oil content and fatty acid profiles as potential criteria to determine the origin of commercially grown chia (*Salvia hispánica* L.). *Industrial Crops and Products*, 34, 1366-1371.

Ayerza, R., Coates, W., & Lauria, M. (2002). Chia seed (*Salvia hispánica* L.) as an w-3 fatty acid source for broilers: influence on fatty acid composition, cholesterol and fat content of white and dark meats, growth performance, and sensory characteristics. *Poultry Science*, 81, 826 -837.

Beltrán- Orozco, M. C., & Romero, M. R. (2003). Chía, alimento milenario. *Revista Industria Alimentaria*, 22-25.

Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding *Analytical Biochemistry*, 72 248- 249.

Bueno, M., Di Sapio, O., Barolo, M., Busilacchi, H., & Quiroga, M. C. (2010). Análisis de la calidad de los frutos de *Salvia hispánica* L. (*Lamiaceae*) comercializadas en la ciudad de Rosario (Santa Fe, Argentina). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas (BLACPMA)*9, 221-227.

Bushway, A., Belyea, P. R., & Bushway, R. J. (1981). Chia seed as a source of oil, polysaccharide, and protein. *Journal of Food Science*, 46, 1349-1356.

Cahill, J. P. (2003). Ethnobotany of chia, *Salvia hispánica* L. *Economic Botany*, 57, 604-618.

Cahill, J. P. (2004). Genetic diversity among varieties of chia (*Salvia hispánica* L.). *Genetic resources and Crop Evolution*, 51, 773-781.

Capitani, M. I., Spotorno, V., Nolasco, S. M., & Tomás, M. C. (2012). Physicochemical and functional characterization of by-products from chia (*Salvia hispánica* L.) seeds of Argentina. *LWT - Food Science and Technology*, 45, 94-102.

Carrillo, W. (2014). Digestibilidad de las proteínas alergénicas. *Química Viva*, 13, 109-122.

Casey, R., Domoney, C., & Smith, A. (1993). Biochemistry and Molecular Biology of Seed Products, 121-169.

Castro, A., Castro, L., Santos, M., Faustino, M., Pinheiro, T., Dore, C., Leite, E. (2013). Anti-inflammatory, anti-angiogenic and antioxidant activities of polysaccharide-rich extract from fungi *Caripia montagnei*. *Biomedicine & Preventive Nutrition*, 4, 121-129.

Coates, W. (2004). Semillas de chía, ω -3, antioxidante y fibra. Universidad de Arizona

Codex. Norma del Codex para productos proteícos de soja *Codex Standard 175-1989* (pp. 1-3).

Coleman, J. (2001). Nitric oxide in immunity and inflammation. *International Immunopharmacology*, 1, 1397-1406.

De la Fuente, A., Rodríguez, J., & Fonseca, E. (2007). Análisis de proteínas mediante electroforesis e inmunotrasferencia. *Técnicas de Diagnóstico*, 22, 252-258.

Di Sapia, O., Bueno, M., Busilacchi, H., & Severin, C. (2008). Chía: Importante antioxidante vegetal. *Agromensajes* 56, 11-13.

Drechsler, K. C., & Ferrua, M. J. (2016). Modelling the breakdown mechanics of solid foods during gastric digestion. *Food Research International*, 2016, 1-15.

Dubois, V., Breton, S., Linder, M., Fanni, J., & Parmentier, M. (2007). Fatty acid profiles of 80 vegetable oils with regard to their nutritional potential. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109, 710-732.

Enciso, E., & Arroyo, J. (2011). Efecto antiinflamatorio y antioxidante de los flavonoides de las hojas de *Jungia rugosa* Less (matico de puna) en un modelo experimental en ratas. *Anales de la Facultad de Medicina*, 72, 231-237.

FAO/WHO. (2001). Evaluation of allergenicity of genetically modified foods. *Agriculture Organization of the United Nations*, 1-6.

Fernández, E., & Galván, A. (2001). Métodos para la cuantificación de proteínas. *Departamento de bioquímica y biología molecular*, 1-7.

Fernández, I., Viduerios, S. M., Feliu, M. S., Angellini, E., Ayerza, R., Coates, W., Pallaro, A. N. (2005). *Calidad proteica de nuevos viejos cultivos característicos de Mesoamérica y Sudamérica: quinoa, chía*. Paper presented at the VIII Congreso Nacional Bioquímico de la Republica Argentina. San Juan, Argentina

Fernández-Sánchez, A., Madrigal-Santillán, E., Bautista, M., Esquivel-Soto, J., Morales-González, A., & Esquivel-Chirino, C. (2011). Inflammation, oxidative stress, and obesity. *International Journal of Molecular Science*, 12, 3117-3132.

Gallegos, S., Guerrero, L. C., Corzo, L. J., & Martínez, A. L. (2013). Péptidos con actividad antioxidante de proteínas vegetales. *OmniaScience*, 111-122.

García, H. (2000). Electroforesis en geles de poliacrilamida: Fundamentos, actualidad e importancia. *University Diagnostic*, 1, 31-41.

García, H., & Vázquez, R. (1998). Cuantificación de proteína. *Bio Tecnología*, 3, 77-78.

Gómez, H., González, K., & Medina, J. (2011). Actividad antiinflamatoria de productos naturales. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas*, 10, 182-217.

González de Buitrago, J. M. (2010). 15 - Electroforesis *técnicas y métodos de laboratorio clínico (Terza edizione)* (pp. 211-217): Elsevier España.

Guiotto, E. (2014). Aplicación de subproductos de chia (*Salvia hispánica* L.) y girasol (*Helianthus annuus* L.) en alimentos. Universidad de la Plata.

Guzmán- Chozas, M., Vicario, I., & Guillén-Sans, R. (1997). Spectrophotometric profiles of off-flavor aldehydes by using their reactions with 2-thiobarbituric acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 2452-2457.

Hernández, L. (1994). *La flora endémica de la sierra de Manantlán. Observaciones preliminares*. Jalisco- Colima.

Hernández, M., & Sastre, A. (1999). *Tratado de nutrición* (D. d. S. S.A. Ed.). Madrid.

Hidalgo, Q. C. (2006). Evaluación del método de Biuret para la cuantificación de las proteínas totales en el líquido cefalorraquídeo. *Departamento de Análisis Clínicos*, 29-36.

Inzana, T. J., & Apicella, M. A. (1999). Use of a bilayer stacking gel to improve resolution of lipopolysaccharides and lipooligosaccharides in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 20, 462-465.

Jiménez- Saiz R, M. G., Carrillo W, Lopez- Fandiño R, Molina E, (2012). Susceptibility of lysozyme to in-vitro digestion and immunoreactivity of its digest. *Food Chemistry*, 127, 1719-1726.

Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the heat bacteriophage T4. *Nature*.

Lazcano, M., & Cuellar, D. (2004). *Caracterización de una golosina amaranto-avena-miel*. Paper presented at the Memorias VI Congreso de Ciencias de los Alimentos. *Revista Salud Pública y Nutricion*. Edición Especial N°6.

Lee, J. K., Yun, J. H., Jeon, J. K., Kim, S. K., & Byun, H. G. (2010). Effect of antioxidant peptide isolated from *Brachionis calCIFlorus*. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 53, 192-197.

Licastro, F., Candore, G., Lio, D., Porcellini, E., Colonna-Romano, G., Franceschi, C., & Caruso, C. (2005). Innate immunity and inflammation in ageing: a key for understanding age-related diseases. *Immunity & Ageing*, 2-8.

López, C. G. (2005). Lección inaugural curso 2004/2005: Química Analítica y Premio Nóbel.

Loubes, M. A., Calzetta, R., Tolaba, M. P., & Suarez, C. (2012). Mechanical and thermal characteristics of amaranth starch isolated by acid wet-milling procedure. *LWT - Food Science and Technology*, 46, 519-524.

Luo, Q., Boom, R. M., & Janssen, A. E. M. (2015). Digestion of protein and protein gels in simulated gastric environment. *LWT - Food Science and Technology*, 63, 161-168.

Mandal, R. K., & Mandal, S. (2000). Seed storage proteins and approaches improvement of their nutritional quality by genetic engineering *Current Science*, 79, 576-589.

Marineli, R. d. S., Lenquiste, S. A., Moraes, É. A., & Maróstica Jr, M. R. (2015). Antioxidant potential of dietary chía seed and oil (*Salvia hispánica* L.) in diet-induced obese rats. *Food Research International*, 76, Part 3, 666-674.

Marineli, R. d. S., Moraes, É. A., Lenquiste, S. A., Godoy, A. T., Eberlin, M. N., & Maróstica Jr, M. R. (2014). Chemical characterization and antioxidant potential of Chilean chia seeds and oil (*Salvia hispánica* L.). *LWT - Food Science and Technology*, 59, 1304-1310.

Martínez- Hernández, E., & Garrido- Acosta, O. (2013). Farmacocinética: antiulcerosos y antiinflamatorios. *Revista del Hospital Juárez de México*, 80, 41-53.

Martínez, E. N., & Añon, M. C. (1996). Composition an structural characterization of amaranth proteins isolates. An electrophoresis and calorimetric study. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 44, 2523- 2530.

Martínez, J. J., Medina, O. J., & Zambrano, R. (2011). Estudio fisicoquímico funcional de los aislados proteicos en semillas de maracuya (*Pasiflora edulis* f.). *Revista de la Facultad de Ciencia Básicas*, 9, 70-76.

Martínez-Cruz, O., & Paredes-López, O. P. (2014). hytochemical profile and nutraceutical potential of chia seeds (*Salvia hispánica* L.) by ultra high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 1346, 43-48.

Mohn, A. N., Yeap, S. K., Ho, W. Y., Beh, B. K., Tan, S. W., & Tan, S. G. (2012). The promising future of chia, *Salvia hispánica* L. *Journal Biomedical Biotechnology*, 1719-1756.

Newman, D., Cragg, G., & Snader, K. (2003). Natural products as sources of new drugs over the period 1981 - 2002. *Journal of Natural Products*, 66, 1022-1037.

Nicoletti, C., Chambers, S. J., Wickham, M. S., & Bertelli, E. (2004). Rapid in vivo transport of proteins from digested allergen across presensitized gut. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 325, 1258-1263.

Nielsen, N. C., Jung, R., Nam, Y., Beaman, T. W., Oliveira, L. O., & Bassuner, R. B. (1995). Synthesis and assembly of 11S globulins. *Journal of Plant Physiology*, 145, 641-647.

Nielsen, S. (2010). *Food Analysis* (Springer Ed. Cuarta edición ed.). Purdue University west Lafayette, IN, USA.

Norlaily, M. A., Swee, K. Y., Wan, Y. H., Boon, K. B., Sheau, W. T., & Soon, G. T. (2012). The promising future of chía, *Salvia hispánica* L. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012, 1-9

OCE. (2014). Proecuador <http://www.proecuador.gob.ec/wp-content/uploads/2014/04/BOLETIN-MARZO-ABRIL-2014.pdf>. Retrieved 19/05/2016

Olivos- Lugo, B. L., Valdivia-López, M.A, y Tecante, A. (2010). Thermal and physicochemical properties and nutritional value of the protein fraction of Mexican chia seed (*Salvia hispánica* L.). *Food Science and Technology International*, 1, 1-8.

Orona-Tamayo, D., Valverde, M. E., Nieto-Rendón, B., & Paredes-López, O. (2015). Inhibitory activity of chia (*Salvia hispánica* L.) protein fractions against angiotensin I-converting enzyme and antioxidant capacity. *LWT - Food Science and Technology*, 64, 236-242.

Ortiz-Pereda, V., López, M., Arroita, A., Aguilera, L., Azkue, J., Torre-Mollinedo, F., & Isla-Baranda, A. (2007). Antiinflamatorios no esteroideos y paracetamol en el tratamiento del dolor. *Gaceta Médica de Bilbao*, 104, 148-155.

Peiretti, P. G., & Gai, F. (2009). Fatty acid and nutritive quality of chia (*Salvia hispánica* L.) seeds and plant during growth. *Animal Feed Science and Technology*, 148 267-275.

Phillips, G. O., & Williams, P. A. (2000). Introduction to food hydrocolloids. *Handbook of Hydrocolloids*. England

Plietz, P., Damaschun, G., Muler, J. J., & Schlesier, B. (1986). Shape and quaternary structure of α -globulin from sesame (*Sesamum indicum* L.) seeds as revealed by small angle X-ray scattering and quasielastic light scattering. *Journal of Biological Chemistry*, 261, 12686-12691.

Reyes-Caudillo, E., Tecante, A., & Valdivia-López, M. A. (2008). Dietary fibre content and antioxidant activity of phenolic compounds present in Mexican chía (*Salvia hispánica* L.) seeds. *Food Chemistry*, 107, 656-663.

Rodríguez, A., Lozada, V., Larraín, M. A., Quitral, V., Vinagre, J., & Aubourg, S. P. (2007). Development of lipid changes related to quality loss during the frozen storage of farmed coho salmon. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 84, 727-734.

Rojano, B., Gaviria, C., & Sáez, J. (2008). Determinación de la actividad antioxidante en un modelo de peroxidación lipídica de mantequilla inhibida por el isopintanol. *Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*, 15, 212-218.

Salgado, C. M., Cedillo, L. D., & Beltrán, O. M. C. (2005). *Estudio de las propiedades funcionales de la semilla de chía (Salvia hispánica L.) y fibra dietaria obtenida de la misma*. Paper presented at the VII Congreso Nacional de Ciencia de los Alimentos y III Foro de Ciencia y Tecnología de Alimentos Guanajuato

Schägger, H., & Von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate Polyacrylamide gel electrophoresis for separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*, 166, 368-379.

Segura, M., Salazar, L., Chel, L., & Betancur, D. (2013). Biological potential of chia (*Salvia hispánica* L.) protein hidrilylates and their incorporation into functional foods. *LWT Food Science and Technology*, 50, 723-731.

Segura, M., Vazquez, N., Rubio, H., Olguin, L., Rodriguez, E., & Herrera, L. (1992). Characterization of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) seed proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 1553-1558.

Shewry, P. R. (2002). Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *Journal of Experimental Botany*, 53, 947-958.

Shi, H. (2001). Antioxidants in food. Practical applications *Introducing natural antioxidants* (CRC Press Inc ed., pp. 147-158). EAU.

Skoog, D. A., & West, D. M. (1994). *Química analítica* (E. M. Graw Ed. Cuarta ed.): Mexico DF.

Southgate, D. A. T. (2003). Datos de composición de alimentos: obtención gestión y utilización. Sidney, Australia. 112-113.

Taga, M. S., Miller, E. E., & Pratt, D. E. (1884). Chia seeds as a source of natural lipid antioxidants. *Journal of American Oil Chemistry Society*, 61, 928-931.

Teijon, J. (2001). *Bioquímica Estructural* (Tebar Ed. Primera Edición ed.).

Valdivia-López, M. Á., & Tecante, A. (2015). Chapter Two - Chia (*Salvia hispánica* L.): A Review of Native Mexican Seed and its Nutritional and Functional Properties. In H. Jeyakumar (Ed.), *Advances in Food and Nutrition Research* (Vol. Volume 75, pp. 53-75): Academic Press.

Valencia L., E., Cuellar R., I., Aguilar R., I., Salmerón A., A., & Rodríguez C., F. (2012). Implementación del método de Biured para la determinación de proteína residual en lactosuero. *Revista Sistemas Ambientales*, 21-24.

Vázquez-Ovando, J. A., Rosado-Rubio, J. G., Chel-Guerrero, L. A., & Betancur-Ancona, D. A. (2010). Procesamiento en seco de harina (*Salvia hispánica* L.): caracterización química de fibra y proteína C y TA. *Journal of Food*, 8, 117-127.

Vioque, J., Sánchez -Vioque, R., Pedroche, J., Yust, M. d. M., & Millán, F. (2001). Obtención y aplicaciones de concentrados y aislados proteicos. *Grasas y Aceites*, 52, 127-131.

Weber, C. V., Gentry, H. S., Kohlhepp, E. A., & McCrohan, P. R. (1991). The nutritional and chemical evaluation of chia seeds. *Ecology Food Nutricion*, 26, 119-125.

Weintraub, H. (2013). Update on marine omega -3-fatty acids: management of dyslipidemia and current omega-3 treatment options. 381-389.

Wickham, M., Faulks, R., & Mills, C. (2009). *In vitro* digestion methods for assessing the effect of food structure on allergen breakdown. *Molecular Nutrition & Food Research* -, 53, 952-958.

Wiechelman, K., Braun, R., & Fitzpatrick, J. (1988). Investigation of the bicinchoninic acid protein assay identification of the groups responsible for color formation. *Analytical Biochemistry*, 1775, 231-237.

ANEXOS

ANEXO A
RENDIMIENTOS DE LOS AISLADOS PROTEICOS DE CHÍA
A LOS DIFERENTES pH

Tabla 16. Pesos obtenidos de la extracción de proteína con agua a los diferentes pH (en base a 10 gr de muestra).

pH	Peso (g)			Promedio	Varianza	SD
	Replica 1	Replica 2	Replica 3			
2	1,134	1,282	1,36	1,259	0,013	0,115
3	1,231	1,523	1,322	1,359	0,022	0,15
4	0,759	0,627	0,603	0,663	0,007	0,084
5	0,996	0,77	0,849	0,872	0,013	0,114
6	0,741	0,99	0,727	0,819	0,022	0,148

Tabla 17. Pesos obtenidos de la extracción de proteína con NaCl a los diferentes pH (en base a 10 gr de muestra).

pH	Peso (g)			Promedio	Varianza	SD
	Replica 1	Replica 2	Replica 3			
2	1,374	1,447	1,617	1,479	0,015	0,124
3	1,907	1,899	1,914	1,907	1,00E-04	0,007
4	1,942	1,878	1,885	1,902	0,001	0,035
5	1,731	1,742	1,914	1,796	0,011	0,103
6	1,886	1,698	1,854	1,812	0,010	0,101

A partir de los diferentes pesos se calculó el rendimiento mediante la siguiente ecuación

$$\% \text{ de Proteína} = \frac{\text{proteína aislada (gr)}}{\text{cantidad de harina desengrasada (gr)}} * 100$$

Tabla 18. Porcentaje de rendimiento calculado a partir de los pesos obtenidos de la extracción de proteína con agua a los diferentes pH

pH	Rendimientos %			Promedio	Varianza	SD
	Replica 1	Replica 2	Replica 3			
2	24,680	25,630	24,156	24,822	0,558	0,747
3	24,618	25,530	26,440	25,529	0,830	0,911
4	12,300	12,538	12,062	12,300	0,057	0,238
5	19,916	18,448	18,980	19,115	0,552	0,743
6	14,828	14,482	14,536	14,615	0,035	0,186

Tabla 19. Porcentaje de rendimiento calculado a partir de los pesos obtenidos de la extracción de proteína con NaCl a los diferentes pH

pH	Rendimientos %			Promedio	Varianza	SD
	Replica 1	Replica 2	Replica 3			
2	27,488	28,940	28,214	28,214	0,527	0,726
3	38,132	37,984	38,280	38,132	0,022	0,148
4	38,836	37,564	37,700	38,033	0,488	0,698
5	34,624	34,830	34,728	34,727	0,011	0,103
6	37,724	37,398	37,072	37,398	0,106	0,326

ANEXO B
ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LA DETERMINACIÓN DEL MEJOR TRA-
TAMIENTO A PARTIR DEL PORCENTAJE DEL RENDIMIENTO DE PRO-
TEÍNA AISLADA DE CHÍA

Tabla 20. Descripción de tratamientos para el análisis estadístico.

Tratamiento		Rendimiento (%)		
		Replica 1	Replica 2	Replica 3
Agua pH 2	aobo	24,680	25,630	24,156
Agua pH 3	a0b1	24,618	25,530	26,440
Agua pH 4	aob2	12,300	12,538	12,062
Agua pH 5	a0b3	19,916	18,448	18,980
Agua pH 6	a0b4	14,828	14,482	14,536
NaCl pH 2	a1b0	27,488	28,940	28,214
NaCl pH 3	a1b1	38,132	37,984	38,280
NaCl pH 4	a1b2	38,836	37,564	37,700
NaCl pH 5	a1b3	34,624	34,830	34,728
NaCl pH 6	a1b4	37,724	37,398	37,072

Tabla 21. Análisis de varianza realizado en el programa InfoStat

Análisis de la varianza					
Variable	N	R ²	R ² Aj	CV	
Rendimiento	30	1,00	1,00	2,07	
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	2558,05	9	284,23	892,24	<0,0001
Solvente	1925,92	1	1925,92	6045,80	<0,0001
pH	165,03	4	41,26	129,52	<0,0001
Solvente*pH	467,09	4	116,77	366,57	<0,0001
Error	6,37	20	0,32		
Total	2564,42	29			

Tabla 22. Prueba de diferencias significativas tuckey con un nivel de significancia de $\alpha=0,05$ para los diferentes solventes empleados para la extracción de proteína de chía

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,42990			
Error: 0,3186 gl: 20			
Solvente	Medias	n	E.E.
Cloruro de sodio	35,30	15	0,15 A
Agua	19,28	15	0,15 B
Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)			

Tabla 23. Prueba de diferencias significativas tuckey con un nivel de significancia de $\alpha=0,05$ para los diferentes pH empleados para la extracción de proteína de chía.

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,97510				
Error: 0,3186 gl: 20				
pH	Medias	n	E.E.	
3,00	31,83	6	0,23	A
5,00	26,92	6	0,23	B
2,00	26,52	6	0,23	B
6,00	26,01	6	0,23	B C
4,00	25,17	6	0,23	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Tabla 24. Prueba de diferencias significativas tuckey con un nivel de significancia de $\alpha=0,05$ para los diferentes tratamientos empleados para la extracción de proteína de chía

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=1,63187				
Error: 0,3186 gl: 20				
Solvente	pH	Medias	n	E.E.
Cloruro de sodio	3,00	38,13	3	0,33 A
Cloruro de sodio	4,00	38,03	3	0,33 A
Cloruro de sodio	6,00	37,40	3	0,33 A
Cloruro de sodio	5,00	34,73	3	0,33 B
Cloruro de sodio	2,00	28,21	3	0,33 C
Agua	3,00	25,53	3	0,33 D
Agua	2,00	24,82	3	0,33 D
Agua	5,00	19,11	3	0,33 E
Agua	6,00	14,62	3	0,33 F
Agua	4,00	12,30	3	0,33 G

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

ANEXO C
CUANTIFICACIÓN PROTEICA MEDIANTE EL MÉTODO DE BIURET

Tabla 25. Datos empleados en la curva estándar de pepsina

Concentración de pepsina (mg/ml)	Absorbancia (nm)
0.00	0.000
3.79	0.139
7.66	0.265
11.40	0.373
15.32	0.479

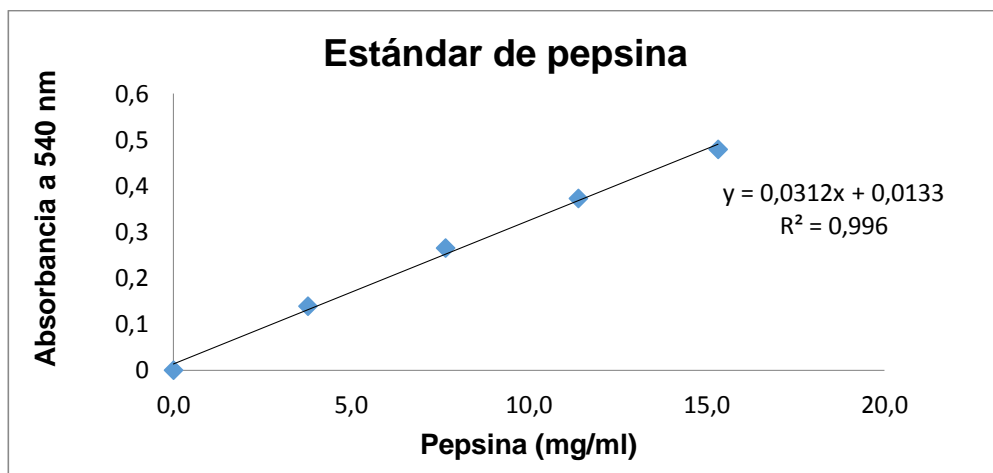


Gráfico 1. Curva estándar de pepsina para la determinación de concentración de proteína de chíá.

De la curva de calibración de pepsina se obtuvo la siguiente ecuación

$$A = m * C + B$$

A: Absorbancia

m: Pendiente de la ecuación de calibración

C: Concentración (mg/ml)

B: Interacción del valor de la absorbancia

Tabla 26. Análisis de varianza de la concentración de la proteína de chía por el método Biuret mediante el programa estadístico InfoStat.

Análisis de la varianza				
Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
% proteína	15	0,97	0,96	2,65

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1760,13	4	440,03	93,82	<0,0001
pH	1760,13	4	440,03	93,82	<0,0001
Error	46,90	10	4,69		
Total	1807,03	14			

Tabla 27. Prueba de diferencias significativas tuckey con un nivel de significancia de $\alpha=0,05$ para los diferentes pH empleados para la determinación de la concentración de proteína por el método Biuret mediante el programa estadístico InfoStat.

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=5,81951					
Error: 4,6901 gl: 10					
pH	Medias	n	E.E.		
4,00	91,81	3	1,25	A	
5,00	89,05	3	1,25	A B	
6,00	84,89	3	1,25	B C	
3,00	81,03	3	1,25	C	
2,00	61,21	3	1,25	D	

Medias con una letra común no son significativamente diferentes

ANEXO D
CUANTIFICACIÓN PROTEICA MEDIANTE EL MÉTODO DE BCA

Tabla 28. Datos para la curva estándar de albúmina de suero bovino (BSA)

[BSA] µg/ml	Absorbancia (nm)
0.00	0.000
53,267	0,227
104,095	0,429
158,212	0,602
206,356	0,781
259,713	0,999

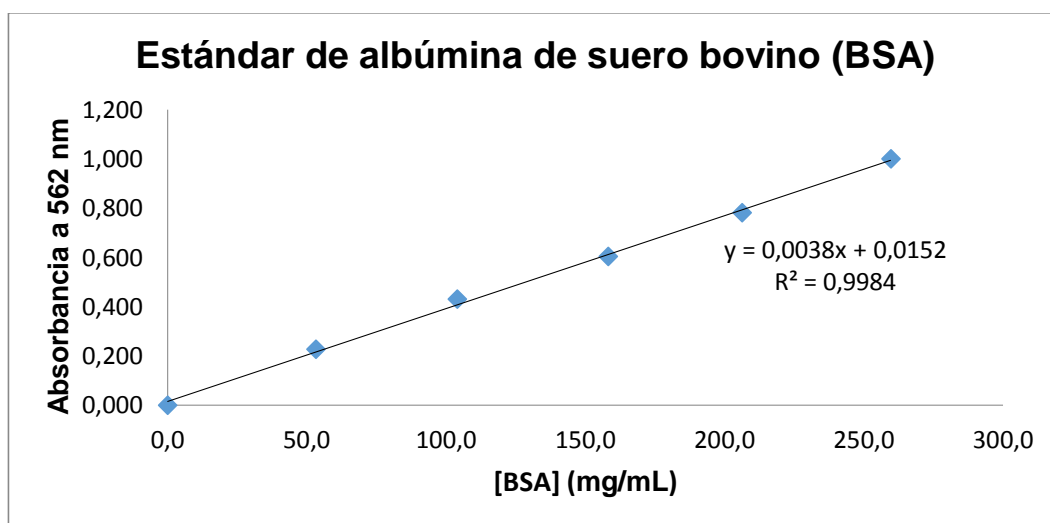


Gráfico 2. Curva estándar de albúmina de suero bovino para la determinación de concentración de proteína de chíá.

De la curva de calibración de albúmina de suero bovino se obtuvo la siguiente ecuación

$$A = m * C + B$$

A: Absorbancia

m: Pendiente de la ecuación de calibración

C: Concentración ($\mu\text{g/ml}$)

B: Interacción del valor de la absorbancia

Tabla 29. Análisis de varianza de la concentración de la proteína de chía por el método BCA mediante el programa estadístico InfoStat

Análisis de la varianza					
Variable	N	R ²	R ² Aj	CV	
% proteína	15	0,92	0,88	3,57	



Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	345,81	4	86,45	27,65	<0,0001
pH	345,81	4	86,45	27,65	<0,0001
Error	31,26	10	3,13		
Total	377,07	14			

Tabla 30. Prueba de diferencias significativas tuckey con un nivel de significancia de $\alpha=0,05$ para los diferentes pH empleados para la determinación de la concentración de proteína por el método BCA mediante el programa estadístico InfoStat.

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=3,84583					
Error: 1,8588 gl: 8					
pH	Medias	n	E.E.		
4,00	57,87	3	0,79	A	
5,00	51,23	3	0,79	B	
6,00	48,21	3	0,79	B	C
2,00	45,10	3	0,79		C
3,00	44,91	3	0,79		C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

ANEXO E
RESULTADOS DEL ANÁLISIS PROXIMAL DE LA HARINA Y DEL AIS-
LADO PROTEICO DE CHÍA (PH 3,0)

	INSTITUTO NACIONAL AUTÓNOMO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS ESTACION EXPERIMENTAL SANTA CATALINA DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y CALIDAD LABORATORIO DE SERVICIO DE ANÁLISIS E INVESTIGACIÓN EN ALIMENTOS Panamericana Sur Km. 1, Cutuglagua Tls. 2620091-3007134, Fax 3007134 Casilla postal 17-01-340	

INFORME DE ENSAYO No: 16-074

NOMBRE PETICIONARIO:	C E N I	INSTITUCION:	C E N I
DIRECCION:	Ambato	ATENCIÓN:	Sra. Marjorie Cárdenas
FECHA DE EMISION:	4 de Abril del 2016	FECHA DE RECEPCION:	14/03/2016
FECHA DE ANALISIS:	Del 14 de Marzo al 4 de Abril del 2016	HORA DE RECEPCION:	16H02
		ANÁLISIS SOLICITADO:	Proximal

ANÁLISIS	HUMEDAD	CÉNZAS ¹	E.E. ²	PROTEÍNA ³	FIBRA ⁴	E.L.N. ⁵	IDENTIFICACIÓN
MÉTODO	MO-LSAIA-01.01	MO-LSAIA-01.02	MO-LSAIA-01.03	MO-LSAIA-01.04	MO-LSAIA-01.05	MO-LSAIA-01.06	
MÉTODO REF.	U. FLORIDA 1970	U. FLORIDA 1970	U. FLORIDA 1970	U. FLORIDA 1970	U. FLORIDA 1970	U. FLORIDA 1970	
UNIDAD	%	%	%	%	%	%	
16-0419	5,71	4,82	18,06	19,78	27,88	31,46	Harina de Chia
16-0420	2,86	3,93	9,63	61,32	0,52	24,60	Aislado de Chia

Los ensayos marcados con Ω se reportan en base seca.

OBSERVACIONES: Muestra entregada por el cliente

RESPONSABLES DEL INFORME


 Dr. Armando Rubio
 RESPONSABLE DE CALIDAD




 Dr. Iván Sarmiento MSc.
 RESPONSABLE TÉCNICO

Este documento no puede ser reproducido ni total ni parcialmente sin la aprobación escrita del laboratorio.

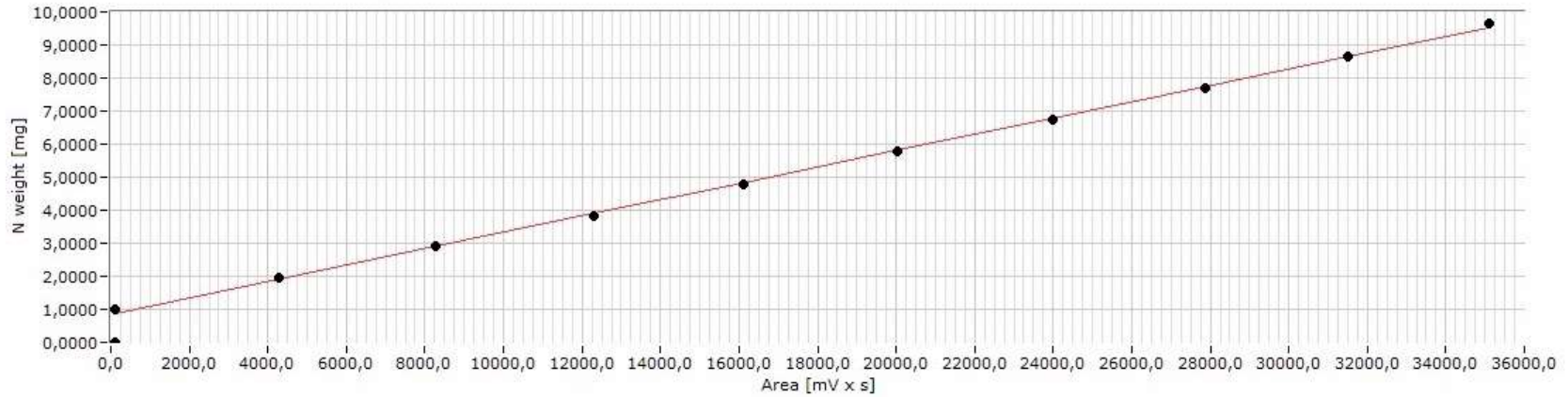
Los resultados arriba indicados solo están relacionados con el objeto de ensayo.

NOTA DE DESCARGO: La información contenida en este informe de ensayo es de carácter confidencial. Si usted es el destinatario de la misma y solo podrá ser usada por usted. Si el lector de este correo electrónico o fax no es el destinatario del mismo, sea le notifica que cualquier copia o distribución de este se encuentra totalmente prohibido. Si usted ha recibido este informe de ensayo por error, por favor notifique inmediatamente al remitente por este mismo medio y elimine la información.

ANEXO E
CURVA DE CALIBRACIÓN MÉTODO DUMA

NDA Dumas Nitrogen Analyser - Calibration

Calibration blank: Yes CF: 1,000 R2: 0,999496 Polynomial: $Y = 8,588983E-1 + X * 2,473134E-4$



Number	Standard	Standard Weighth [mg]	Area [mV x s]	N theoretical [mg]	N [mg]	N [%]	Blank [mV x s]	Residual error [mg]	Relative error [%]	Show	Date [dd/mm/yy]
1	Calibration blank	0,000	108,5	0,0000	0,8857	ND	0,0	0,8857	ND	Yes	30/05/16
2	EDTA	10,270	110,6	0,9859	0,8862	8,629	0,0	-0,0997	-10,110	Yes	30/05/16
3	EDTA	20,210	4292,8	1,9402	1,9206	9,503	0,0	-0,0196	-1,010	Yes	30/05/16
4	EDTA	30,210	8286,8	2,9002	2,9083	9,627	0,0	0,0082	0,282	Yes	30/05/16
5	EDTA	39,840	12313,8	3,8246	3,9043	9,800	0,0	0,0796	2,082	Yes	30/05/16
6	EDTA	50,010	16115,2	4,8010	4,8444	9,687	0,0	0,0434	0,905	Yes	30/05/16
7	EDTA	60,300	20045,1	5,7888	5,8163	9,646	0,0	0,0275	0,475	Yes	30/05/16
8	EDTA	70,220	23993,6	6,7411	6,7928	9,674	0,0	0,0517	0,767	Yes	30/05/16
9	EDTA	80,370	27868,3	7,7155	7,7511	9,644	0,0	0,0356	0,461	Yes	30/05/16
10	EDTA	90,100	31488,3	8,6496	8,6464	9,596	0,0	-0,0032	-0,037	Yes	30/05/16
11	EDTA	100,640	35093,1	9,6614	9,5379	9,477	0,0	-0,1235	-1,279	Yes	30/05/16

ANEXO F
RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA DE LOS CON-
CENTRADOS PORTEICOS DE CHÍA

Tabla 31. Porcentaje de inhibición de desnaturalización de proteína (albúmina de huevo) mediante diclofenaco sódico.

Concentraciones	Inhibición (%)			Promedio	Varianza	SD
	Replica 1	Replica 2	Replica 3			
Estándar 1	149,033	148,204	149,171	148,803	0,273	0,523
Estándar 2	243,923	243,37	242,956	243,416	0,235	0,485
Estándar 3	308,702	308,425	308,425	308,517	0,025	0,159
Estándar 4	313,122	313,812	314,227	313,720	0,312	0,558

Tabla 32. Porcentaje de inhibición de desnaturalización de proteína (albúmina de huevo) mediante concentrado proteico de chía a pH 2,0.

pH 2,0						
Concentraciones	Inhibición (%)			Promedio	Varianza	SD
	Replica 1	Replica 2	Replica 3			
100ug/ml	181,630	182,873	182,597	182,366	0,426	0,653
200ug/ml	224,448	224,862	223,066	224,125	0,884	0,940
500ug/ml	261,050	260,912	260,635	260,866	0,045	0,211
1000ug/ml	323,757	324,724	322,790	323,757	0,935	0,967

Tabla 33. Porcentaje de inhibición de desnaturalización de proteína (albúmina de huevo) mediante concentrado proteico de chía a pH 3,0.

pH 3,0						
Concentraciones	Inhibición (%)			Promedio	Varianza	SD
	Replica 1	Replica 2	Replica 3			
100ug/ml	305,663	305,525	305,801	305,663	0,019	0,138
200ug/ml	234,116	234,392	235,221	234,576	0,331	0,575
500ug/ml	213,536	213,950	213,950	213,812	0,057	0,239
1000ug/ml	190,193	190,884	191,436	190,838	0,388	0,623

Tabla 34. Porcentaje de inhibición de desnaturalización de proteína (albúmina de huevo) mediante concentrado proteico de chía a pH 4,0.

pH 4,0						
Concentraciones	Inhibición (%)			Promedio	Varianza	SD
	Replica 1	Replica 2	Replica 3			
100ug/ml	169,475	169,337	169,199	169,337	0,019	0,138
200ug/ml	170,856	170,580	170,442	170,626	0,045	0,211
500ug/ml	174,862	176,519	175,829	175,737	0,693	0,833
1000ug/ml	183,978	184,392	184,392	184,254	0,057	0,239

Tabla 35. Porcentaje de inhibición de desnaturalización de proteína (albúmina de huevo) mediante concentrado proteico de chía a pH 5,0.

pH 5,0						
Concentraciones	Inhibición (%)			Promedio	Varianza	SD
	Replica 1	Replica 2	Replica 3			
100ug/ml	158,287	157,735	157,735	157,919	0,102	0,319
200ug/ml	166,989	167,403	167,265	167,219	0,045	0,211
500ug/ml	168,508	168,923	168,508	168,646	0,057	0,239
1000ug/ml	218,923	218,646	218,508	218,692	0,045	0,211

Tabla 36. Porcentaje de inhibición de desnaturalización de proteína (albúmina de huevo) mediante concentrado proteico de chía a pH 6,0.

pH 6,0						
Concentraciones	Inhibición (%)			Promedio	Varianza	SD
	Replica 1	Replica 2	Replica 3			
100ug/ml	335,221	335,635	335,359	335,405	0,045	0,211
200ug/ml	209,530	211,326	211,188	210,681	0,998	0,999
500ug/ml	142,818	142,541	142,541	142,634	0,025	0,159
1000ug/ml	137,431	137,017	137,155	137,201	0,045	0,211

ANEXO H
RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS CONCEN-
TRADOS PORTEICOS DE CHÍA

Tabla 37. Porcentaje de inhibición de oxidación lipídica obtenido mediante BHT.

Concentraciones	Inhibición (%)
100ug/ml	93,941
200ug/ml	94,049
500ug/ml	96,176
1000ug/ml	97,425

Tabla 38. Porcentaje de inhibición de oxidación lipídica obtenido mediante concentrado proteico de chía a pH 2,0.

pH 2,0						
Concentraciones	Inhibición (%)			Promedio	Varianza	SD
	Replica 1	Replica 2	Replica 3			
100ug/ml	95,174	95,498	95,591	95,421	0,048	0,219
200ug/ml	86,972	86,694	87,249	86,972	0,077	0,278
500ug/ml	91,011	91,613	91,721	91,448	0,146	0,382
1000ug/ml	94,820	94,989	95,220	95,010	0,040	0,201

Tabla 39. Porcentaje de inhibición de oxidación lipídica obtenido mediante concentrado proteico de chía a pH 3,0.

pH 3,0						
Concentraciones	Inhibición (%)			Promedio	Varianza	SD
	Replica 1	Replica 2	Replica 3			
100ug/ml	93,540	93,540	93,632	93,571	0,003	0,053
200ug/ml	92,522	92,677	92,677	92,625	0,008	0,089
500ug/ml	91,011	91,088	91,166	91,088	0,006	0,077
1000ug/ml	90,873	90,888	90,811	90,857	0,002	0,041

Tabla 40. Porcentaje de inhibición de oxidación lipídica obtenido mediante concentrado proteico de chía a pH 4,0.

pH 4,0						
Concentraciones	Inhibición (%)			Promedio	Varianza	SD
	Replica 1	Replica 2	Replica 3			
100ug/ml	91,335	91,674	91,644	91,551	0,035	0,188
200ug/ml	92,599	92,677	92,677	92,651	0,002	0,045
500ug/ml	91,782	91,782	91,967	91,844	0,011	0,107
1000ug/ml	92,229	92,384	92,461	92,358	0,014	0,118

Tabla 41. Porcentaje de inhibición de oxidación lipídica obtenido mediante concentrado proteico de chía a pH 5,0.

pH 5,0						
Concentraciones	Inhibición (%)			Promedio	Varianza	SD
	Replica 1	Replica 2	Replica 3			
100ug/ml	92,892	92,923	92,908	92,908	0,0002	0,015
200ug/ml	94,187	94,372	94,326	94,295	0,0093	0,096
500ug/ml	91,536	91,690	92,014	91,746	0,0595	0,244
1000ug/ml	92,322	92,260	92,322	92,301	0,0013	0,036

Tabla 42. Porcentaje de inhibición de oxidación lipídica obtenido mediante concentrado proteico de chía a pH 6,0.

pH 6,0						
Concentraciones	Inhibición (%)			Promedio	Varianza	SD
	Replica 1	Replica 2	Replica 3			
100ug/ml	95,945	95,991	95,991	95,976	0,001	0,027
200ug/ml	95,683	95,991	95,914	95,863	0,026	0,160
500ug/ml	92,492	92,908	92,985	92,795	0,070	0,265
1000ug/ml	94,450	94,527	94,558	94,511	0,003	0,056

ANEXO I
FOTOGRAFIAS

Aislamiento de proteína de chía



Figura 9. Desengrasado de la harina de chía .



Figura 10. Proceso de filtrado.



Figura 11. Secado de la harina desengrasada.

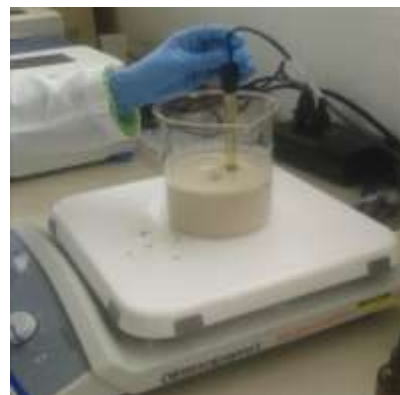


Figura 12. Ajustado de la harina desengrasada con agua a pH 9,0



Figura 13. Centrifugado.



Figura 14. Ajustado del sobrenadante a diferentes pH.



Figura 15. Precipitado de la proteína.



Figura 16. Liofilizado de la proteína

Equipos



Figura 17. Balanza analítica.



Figura 18. Plancha de agitación



Figura 19. Centrifuga



Figura 20. Agitador de tubos eppendorf



Figura 21. Equipo de electroforesis



Figura 22. Liofilizador