



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA

**“EFECTO DEL PERFIL PROTEICO EN LAS PROPIEDADES
DE UNA PELÍCULA COMESTIBLE A BASE DE PROTEÍNA DE
QUINUA-QUITOSANO ENTRECruzADO CON
TRANSGLUTAMINASA”**

TESIS INDIVIDUAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

LUIS FELIPE DELGADO SÁNCHEZ

DIRIGIDA POR

DR. CARLOS REGALADO GONZÁLEZ

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2019



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA

“EFECTO DEL PERFIL PROTEICO EN LAS PROPIEDADES
DE UNA PELÍCULA COMESTIBLE A BASE DE PROTEÍNA DE
QUINUA-QUITOSANO ENTRECruzADO CON
TRANSGLUTAMINASA”

TESIS INDIVIDUAL
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

LUIS FELIPE DELGADO SÁNCHEZ

DIRIGIDA POR

Dr. CARLOS REGALADO GONZÁLEZ

SINODALES

Dr. CARLOS REGALADO GONZÁLEZ

DIRECTOR

Dra. MONSERRAT ESCAMILLA GARCÍA

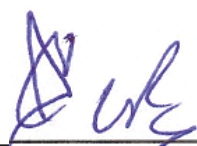
SINODAL

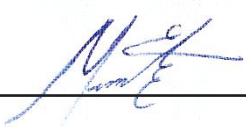
Dra. GEORGINA CALDERÓN DOMÍNGUEZ


SINODAL


Dr. JUAN VICENTE MÉNDEZ MÉNDEZ

SINODAL









AGRADECIMIENTOS

Esta tesis se realizó gracias al financiamiento otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con el proyecto CB-166751, al programa de Fondo de Proyectos Especiales de Rectoría (FOPER), por el financiamiento otorgado al proyecto con folio FOPER-2018-00092-847. Al Dr. Juan Vicente Méndez Méndez del Centro de Nanociencias y Micro y Nanotecnologías del Instituto Politécnico Nacional, a la Dra. Georgina Calderón Domínguez a la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (IPN), por su colaboración y apoyo para el desarrollo de la presente tesis.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, deseo expresar mi agradecimiento al director de esta tesis el Dr. Carlos Regalado, por permitirme ser parte de su equipo de trabajo, por sus consejos, correcciones y aportaciones que fortalecieron este trabajo.

A la Universidad Autónoma de Querétaro, al Programa de Ingeniería en Biotecnología de la Facultad de Química, a los doctores y profesores, por su apoyo y facilidades otorgadas.

A la Dra. Monserrat Escamilla por compartir sus conocimientos, por apoyarme y por su guía, paciencia y valiosas aportaciones para la realización de este proyecto.

A mis Padres y hermana por ser los principales promotores de mis sueños, por su apoyo incondicional y gracias a ellos por cada día confiar y creer en mí y en mis expectativas. A mis amigos y compañeros de carrera y del laboratorio de Biotecnología de la UAQ, que siempre me han prestado un gran apoyo moral y humano, necesarios en los momentos difíciles de este trabajo y esta profesión, por su ayuda y por su amistad.

ÍNDICE GENERAL

Contenido

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE CUADROS

ÍNDICE DE FIGURAS

RESUMEN

1. Antecedentes	1
1.1 Película comestible	1
1.2 Películas comestibles a base de proteínas	1
1.3 Quinoa	2
1.3.1 Composición Quinoa	3
1.3.2 Películas a base de proteína de Quinoa	4
1.4 Películas comestibles a base de polisacáridos	5
1.4.1 Propiedades quitosano	6
1.4.2 Películas comestibles a base de quitosano	7
1.4.3 Películas comestibles a base de quitosano	7
1.5 Agentes entrecruzantes	8
1.5.1 Transglutaminasa	8
1.6 Plastificantes	10
1.7 Digestibilidad in vitro	101
2. HIPÓTESIS	12
3. OBJETIVOS	13
3.1 Objetivo general	13
3.2 Objetivos específicos	13
4. METODOLOGÍA	14
4.1 Materiales	14
4.2 Métodos	14
4.2.1 Extracción de proteína de quinoa	14
4.2.2 Caracterización de los aislados proteicos	14

4.2.3 Electroforesis SDS-PAGE	15
4.2.4 Elaboración de películas a base de quitosano	15
4.2.5 Elaboración de películas a base de proteína de quinua	15
4.2.6 Elaboración de películas comestibles a base de proteína de quinua- quitosano	16
4.2.7 Determinación del grado de entrecruzamiento	16
4.2.8 Caracterización de películas comestibles	16
4.2.8.1 Espesor de películas comestibles	16
4.2.8.2 Solubilidad	17
4.2.8.3 Permeabilidad a vapor de agua	17
4.2.9 Estudios de adsorción	19
4.2.10 Simulación de hidrólisis proteolítica	19
4.2.11 Microscopía de fuerza atómica	20
4.2.12 Espectroscopia Raman	21
4.3 Análisis estadístico	22
5. RESULTADOS	23
5.1 Caracterización de los aislados proteicos	23
5.2 Electroforesis SDS-PAGE	23
5.3 Características generales de película comestible	
23; Error! Marcador no definido.	
5.4 Determinación del grado de entrecruzamiento	24
5.5 Propiedades físicas de las películas comestibles	26
5.6 Adsorción	27
5.7 Hidrólisis proteolítica	30
5.8 Microscopía de fuerza atómica	30
5.9 Espectroscopia Raman	32
6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	37
6.1 Caracterización del aislado proteico	37
6.2_Electroforesis SDS-PAGE	37
6.3 Grado de entrecruzamiento	38
6.4_Propiedades físicas	39

6.5 Isoterma de adsorción	40
6.6_Hidrólisis proteolítica	41
6.7 Microscopía de fuerza atómica (AFM)	42
6.8 Espectroscopia Raman	42
7. CONCLUSIONES	44
8. REFERENCIAS	45

Dirección General de Bibliotecas UAQ

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Contenido de aminoácidos en el grano de quinua	4
2	Cantidad en porcentaje de humedad y concentración de proteína de los aislados proteicos de cada una de las variedades de quinua.	23
3	Características generales de las películas comestibles obtenidas	25
4	Porcentaje del grado de entrecruzamiento en las películas comestibles	26
5	Propiedades <i>físicas</i> de películas comestibles a base quitosano - proteína de quinua	28
6	Valores de sorción de películas comestibles a base de proteína de quinua - quitosano	29

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Desacetilación de quitina	6
2	SDS-PAGE de la proteína de quinua de la variedad Pasankalla y Willd con y sin transglutaminasa (TG)	24
3	Simulación de hidrólisis proteolítica de las películas comestibles de quitosano–proteína de quinua	31
4	Micrografías AFM películas comestibles de quitosano-proteína de quinua	33
5	Espectrograma RAMAN de películas elaboradas con proteína de quinua Pasankalla.	35
6	Espectrograma RAMAN de películas elaboradas con proteína de quinua Willd	36

RESUMEN

La demanda de los consumidores por alimentos inocuos y con mayor vida útil, ha obligado a la industria a desarrollar nuevas formas de procesamiento de alimentos, manejo y estrategias de empaque, es aquí donde los conceptos de película y recubrimiento comestible surgen como una alternativa a esta problemática. Actualmente este tipo de empaques pretenden obtener con propiedades similares a los de los materiales sintéticos convencionales, tales como resistencia mecánica y al agua, superficie lisa y transparente. El objetivo del presente trabajo fue elaborar una película comestible a base de proteína de dos variedades de quinua con quitosano (Q) entrecruzada con transglutaminasa (TG). Las propiedades evaluadas de las películas obtenidas fueron permeabilidad al vapor de agua, solubilidad, espesor y adsorción, determinando las interacciones químicas entre sus componentes mediante microscopía de fuerza atómica y espectroscopia Raman. El perfil proteico de las variedades se determinó mediante electroforesis. Las películas con las mejores propiedades se sometieron a un proceso de digestión simulada. Las películas elaboradas con el aislado proteico de la variedad Pasankalla (QP) presentó mayor entrecruzamiento que las de la variedad Willd (QW) ($61.45 \pm 3.73\%$ vs $40.55 \pm 3.61\%$, respectivamente). La película con la mayor permeabilidad al vapor de agua fue la Q:QW (1:5, p/p) con $9.95 \pm 0.29 \text{ g cm Pa}^{-1} \text{ cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$, el cual disminuyó significativamente ($p < 0.05$) a $3.07 \pm 0.29 \text{ g cm Pa}^{-1} \text{ cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ al adicionar TG. La reticulación con TG mejoró las propiedades de las películas comestibles, pero la espectroscopia Raman reveló que la proteína de quinua y la TQ interactúan principalmente con los grupos amino de la lisina de las proteínas. Para aumentar la vida de anaquel de los alimentos, se podría adicionar algún agente antimicrobiano en la matriz de la película.

1. ANTECEDENTES

1.1 Película comestible

Las tecnologías de envasado de alimentos han mejorado constantemente en respuesta a las demandas de la sociedad moderna, así como a las tendencias de producción industrial hacia productos alimenticios frescos, ligeramente conservados, seguros, sanos y de calidad con una vida útil más larga (Ahmed y col., 2017).

La creciente preocupación por parte de los consumidores sobre la seguridad alimentaria y el aumento en la producción de materiales de envasado, de los cuales menos del 5% de todos los plásticos se reciclan, condujeron al desarrollo de películas y recubrimientos biodegradables, comestibles y renovables adecuados para su aplicación en el empaquetado de alimentos (Tavassoli-Kafr, 2016). La principal diferencia entre un recubrimiento y una película comestible es que el recubrimiento se aplica en forma líquida sobre los alimentos, generalmente por aspersión, barnizado o sumergiendo el producto en la solución de material comestible, y la película comestible primero se moldea en láminas sólidas para posteriormente aplicarla como envoltura para productos alimenticios (Falguera y col., 2011).

Las películas comestibles tienen al menos dos grupos de componentes: (a) matriz, un biopolímero estructurado cohesivo basado en biomacromoléculas tales como proteínas (caseína, gnetina, zeína y gluten), lípidos (ceras), carbohidratos (almidón y quitosano) o la combinación de estos; y (b) aditivos como plastificantes, reticulantes y nano-refuerzos (Mkandawire y Aryee, 2018;).

1.2 Películas comestibles a base de proteínas

Las proteínas ofrecen una gran variedad de propiedades físicas y mecánicas y, por lo tanto, pueden adaptarse a las necesidades específicas de diferentes productos alimenticios. Proteínas tales como gelatina, caseína, proteína de suero de leche, zeína de maíz, gluten de trigo y proteína de soja, son componentes frecuentemente usados para recubrimientos comestibles (Santacruz, 2015). Para la elaboración de películas a base de proteínas, es necesario la desnaturalización de estas con la

finalidad de dar forma a los sistemas extra prolongados que pueden ser necesarios para su formación, las cadenas de proteínas pueden unirse mediante puentes de hidrógeno, enlaces iónicos y covalentes. La colocación equitativa de los grupos polares a lo largo de la cadena del polímero aumenta la probabilidad de las interacciones requeridas, las cuales determinarán la fuerza y las propiedades de barrera de la película (Hassan y col.,2018). Las proteínas solubles en agua tienden a formar interacciones iónicas o enlaces de hidrógeno en solución. Las proteínas con poca solubilidad en agua son usualmente menos permeables a los vapores (Arnon-Rips y Poverenov, 2018).

Las películas proteínicas poseen propiedades físicas inferiores a las de la mayoría de las películas sintéticas tales como el polietileno de alta y baja densidad, por lo que se han sugerido varios métodos para mejorar dichas propiedades, entre los que se pueden mencionar están el uso de plastificantes, la alteración del pH, la adición de lípidos y el entrecruzamiento de proteínas (Wihodo y Moraru, 2013).

1.3 Quinoa

La quinoa (*Chenopodium quinoa Willd.*) es un pseudocereal que pertenece a la familia Chenopodiaceae, es endémica peculiar de América del Sur, sin embargo, fue domesticado por personas que vivían en los Andes, particularmente en Perú y Bolivia, hace miles de años (Navruz-Varli y Sanlier, 2016). La quinoa juega un papel importante en la seguridad alimentaria por su amplia diversidad genética y una extraordinaria adaptabilidad a una amplia gama de condiciones agroecológicas, posee una alta tolerancia a las condiciones ambientales adversas, como la sequía y los ambientes salinos con bajos costos de insumos (Li y Zhu, 2018).

La quinoa ejerce efectos beneficiosos en consumidores de grupos de alto riesgo, como niños, ancianos, intolerantes a la lactosa y personas con anemia, diabetes, obesidad, dislipidemia y enfermedad celíaca. Estos beneficios se han relacionado con el contenido de proteínas, fibra, vitaminas y minerales, ácidos grasos, y especialmente con la presencia de una gran cantidad de fitoquímicos que

proporcionan a la quinua una ventaja notable sobre otros cereales (Vilcacundo y Hernández-Ledesma, 2017).

La quinua ha sido seleccionada por la FAO en 2011 como uno de los cultivos destinados a ofrecer mayor seguridad alimentaria en el próximo siglo. Entre el 2005 y 2015 las exportaciones de quinua acumularon 946 millones de dólares en términos de valor, y 285 mil toneladas en volumen, registrándose el pico más alto en el 2014.

1.3.1 Composición Quinua

En los últimos años, ha habido un renovado interés en la quinua debido a sus atractivas características nutricionales. La semilla es una fuente de almidón, proteína, fibra dietética, grasa, minerales, polifenoles. No contiene gluten y puede ser una alternativa sin gluten para personas con enfermedad celiaca (Li y Zhu, 2018). El componente mayoritario de la semilla de quinua es el almidón (32-69%), posee entre 7-11.7g de fibra dietética /100 g de materia comestible, y 1.3-6.1g de fibra soluble por cada 100 g de materia comestible (Vilcacundo y Hernández-Ledesma, 2017).

El contenido de proteína en la materia seca de las semillas de quinua varía entre 13.8% y 16.5%, siendo más alto que el del arroz, la cebada, el maíz, el centeno y el sorgo, y se acerca al trigo. De las proteínas de reserva, la quinua se compone de albúminas (35%) y globulinas (37%), contiene bajas concentraciones de prolaminas, y estos porcentajes pueden variar en diferentes especies (Navruz-Varli y Sanlier, 2016).

La proteína de quinua presenta un alto contenido en lisina (con un rango de 2.4 a 7.8 g/100 g de proteína), metionina (0.3-9.1 g/100 g de proteína) y treonina (2.1-8.9 g/100 g de proteína) que son los aminoácidos limitantes en cereales convencionales, como el trigo y el maíz (Vilcacundo y Hernández-Ledesma, 2017). El valor nutricional de la quinua ha sido básicamente reconocido por su proteína de alta calidad, particularmente rica en aminoácidos esenciales (Cuadro 1).

Cuadro 1. Contenido de aminoácidos en el grano de quinua

Aminoácido	mg/g
Lisina	64
Triptófano	9
Isoleucina	53
Metionina + Cisteína	28
Fenilalanina+ Tirosina	72
Treonina	44
Valina	48
Histidina	48

(FAO, 2011)

1.3.2 Películas a base de proteína de Quinua

Existen escasos estudios acerca de películas comestibles a base de proteína de quinua, y la mayoría de estos las elaboraron en presencia de otros compuestos, principalmente con quitosano, sin embargo, ninguno de estos han realizado entrecruzamiento, ni evaluado el efecto del perfil de diferentes variedades de quinua.

La proteína de quinua puede interactuar iónicamente a través de grupos sulfuro aniónicos con grupos amino protonados del quitosano. La combinación de ambos polímeros produce un efecto sinérgico en las propiedades mecánicas y adhesivas de las películas debido a la excelente elongación y las propiedades adhesivas de las proteínas de quinua, evitando así el uso de plastificantes (Abugoch y col., 2011)

Las fracciones de proteína de quinua que podrían interactuar con el quitosano son la fracción 2S (albúminas) y 11S (globulinas) cuya estructura se estabiliza a través de puentes disulfuro (Brinegar y col., 1996). Se ha demostrado que la proteína de quinua es un buen biopolímero para formar películas comestibles, en condiciones de alta solubilidad y carga negativa para poder tener un mayor aprovechamiento de las

propiedades de sus grupos sulfuro aniónicos para interactuar iónicamente con otros compuestos (Abugoch y col., 2011; Valenzuela, 2015).

1.4 Películas comestibles a base de polisacáridos

Los polisacáridos son polímeros de origen natural, ampliamente utilizados para preparar películas o revestimientos comestibles como almidón, celulosa, pectina y derivados de todos estos, pululano, alginatos y quitosano (Hassan y col., 2018).

Los polisacáridos son altamente disponibles, no evocan reacciones alergénicas, generalmente se disuelven en agua y frecuentemente tienen buenas propiedades mecánicas. Una ventaja notable en los polisacáridos es su estructura química definida para cada unidad monomérica. Esto permite predecir y controlar las propiedades de recubrimiento. Por otro lado, los polisacáridos a menudo tienen una baja barrera a la humedad (Arnon-Rips y Poverenov, 2018).

Los polisacáridos tienen la capacidad de formar películas por sí solos debido a la linealidad que presentan sus cadenas poliméricas, lo que facilita la interacción de los grupos funcionales con el solvente (Valenzuela y col., 2015). Las películas a base de polisacáridos son incoloras, tienen una apariencia libre de grasa y un menor contenido calórico y se pueden aplicar para prolongar la vida útil de frutas, verduras, mariscos o productos cárnicos reduciendo significativamente la deshidratación, el oscurecimiento de la superficie y la rancidez oxidativa (Hassan y col., 2018), se caracterizan por ser firmes pero con elasticidad baja, motivo por el cual es necesario el uso de plastificantes para su formulación (Falguera y col., 2011). Este tipo de películas presentan valores altos en la permeabilidad al vapor de agua, debido a las propiedades hidrofílicas de la mayoría de los polisacáridos (Valenzuela y col., 2015). Las películas a base de polisacáridos, presentan generalmente baja permeabilidad al oxígeno (PO), debido a su alto grado de estructuración y continuidad de la matriz polimérica (Valenzuela, 2013).

1.4.1 Quitosano

El quitosano es un polisacárido lineal obtenido por la desacetilación parcial de la

quitina (Figura 1), es un polímero biodegradable y no tóxico. La quitina es el segundo polímero natural más abundante en la naturaleza que es encontrado en el exoesqueleto de los crustáceos, células fúngicas y otros materiales biológicos (Escamilla-García y col., 2013).

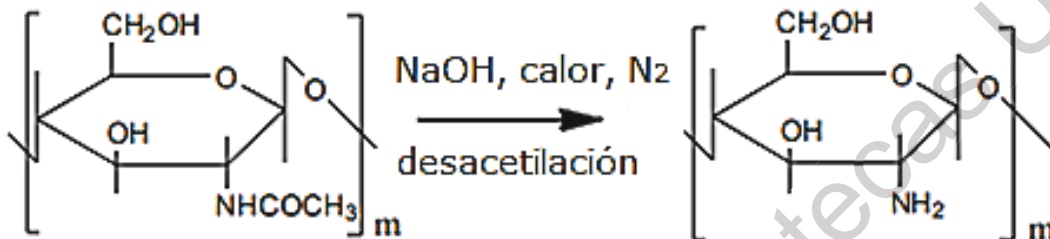


Figura 1. Desacetilación de quitina (Pokhre,2016)

El quitosano consiste en unidades β -(1-4)-2-acetamido-D-glucosa y β -(1-4)-2-amino-D-glucosa (Elsabee y Abdou, 2013), tiene actividad antimicrobiana contra hongos filamentosos, levaduras y bacterias (Kong y col., 2010), razón por la cual se ha estudiado como un potencial conservante de alimentos de origen natural, ha sido aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (USFDA) como un aditivo alimentario generalmente reconocido como seguro (GRAS) (Yuan y col., 2016).

El quitosano forma enlaces de hidrógeno inter e intramoleculares debido a los grupos amina e hidroxilo; por lo tanto, tiene una estructura cristalina rígida, tiene varias bioactividades debido a los abundantes grupos amino primarios en la cadena principal de quitosano. Por esta razón, el quitosano se usa ampliamente para los campos biomédicos, como la administración de fármacos y / o genes, y los campos industriales (Choi y col., 2016).

1.4.2 Propiedades quitosano

Las propiedades del quitosano dependen del grado de desacetilación, cuando el grado de desacetilación del quitosano alcanza aproximadamente el 50%, se vuelve

soluble en medios ácidos acuosos, condiciones bajo las cuales los grupos amino de la cadena se protonan y el polímero se convierte en catiónico, lo que le permite interactuar con diversos tipos de moléculas (Muxika y col., 2017).

La actividad antifúngica del quitosano depende del peso molecular, el grado de desacetilación, condiciones de reacción como la temperatura y pH, la dosis aplicada, la naturaleza policatiónica del quitosano, longitud de la cadena de este polímero, efecto inhibitorio en la síntesis de enzimas macerantes producida por los hongos (la poligalacturonasa, pectato liasa y celulasa) y la formación de barreras estructurales (papilas, lignificación, tilosas) que impiden la penetración de los hongos en el hospedero (Bautista-Baños y col., 2005; Chang y col., 2015).

1.4.3 Películas comestibles a base de quitosano

El quitosano tiene la propiedad de formar películas por sí solo, como resultado de la linealidad de su cadena, en donde los grupos catiónicos pueden establecer enlaces de puentes de hidrógeno intra e intermoleculares con el solvente (Valenzuela y col., 2013). Las películas se forman a partir de soluciones de quitosano en ácidos orgánicos diluidos (Mayachiew y Devahastin, 2008; No H.K. y col., 2007). Las diferencias entre los tipos de quitosano, sus propiedades, los solventes utilizados, los métodos de preparación de la película, y los tipos y cantidades de otros polímeros usados, como plastificantes, afectan el tipo y propiedades de las películas obtenidas (Abugoch, 2008). Las películas de quitosano muestran valores de permeabilidad de oxígeno extremadamente bajos, una permeabilidad alta al CO₂, humedad relativa baja, y permeabilidad al vapor de agua alta (Jost y col., 2014). Estas características se mejoran cuando se agregan plastificantes u otros componentes como proteínas y lípidos a las formulaciones (Di Pierro y col., 2006; Abugoch y col., 2011). Las películas a base de quitosano al tener una alta permeabilidad al vapor de agua presentan una limitante en su uso ya que el control de esta propiedad es deseable en la mayoría de los alimentos (Elsabee y Abdou, 2013), por lo que su aplicación en frutas u otros alimentos no logra producir una barrera efectiva al paso del vapor de agua (Valenzuela, 2013).

1.5 Agentes entrecruzantes

El método de entrecruzamiento implica la formación de enlaces químicos entre diferentes cadenas moleculares para generar una red tridimensional más fuerte. Los agentes entrecruzantes se pueden clasificar sobre la base del tipo de enlace producido, lo que conduce a una reticulación covalente bien estabilizada, formación de enlaces iónicos y reticulación física creada por enlaces de hidrógeno y fuerzas Van der Waals (Garavand y col., 2017).

El entrecruzamiento se utiliza en biopolímeros, tales como proteínas o polisacáridos, y su uso se ha recomendado en la elaboración de películas comestibles, ya que el reduce la movilidad de la estructura de los polímeros, mejorando las propiedades mecánicas y de barrera, reduce su solubilidad en agua, crea estructuras más resistentes al calor y a la luz, mejora la estabilidad dimensional y la resistencia química y a los disolventes (Azeredo y Waldron, 2016).

El proceso de entrecruzamiento se puede llevar a cabo de dos maneras diferentes, por entrecruzamiento o entrecruzamiento posterior. En el primer caso, el reticulante se añade directamente durante la preparación del polímero con el fin de obtener el material final en una etapa, mientras que en el segundo caso el entrecruzamiento se produce después de la formación del polímero (Garavand y col., 2017)

1.5.1 Transglutaminasa

La enzima transglutaminasa (TG) se emplea como agente reticulante o de entrecruzamiento para mejorar la fuerza de red de proteínas en una película. El nombre sistemático de la TG es R-glutaminil-péptido: amina (γ - glutamiltransferasa (E.C. 2.3.2.13), lo que indica que la catálisis consiste en la transferencia de acilo de residuos gamma glutaminil, presente en las proteínas o sustratos peptídicos (donador de acilo), a un sustrato aceptor de acilo, lo que resulta en una variedad de diferentes productos en función de las moléculas involucradas (Rossi, 2011).

La formación de los enlaces isopeptídicos ϵ -(γ -glutaminil) lisina, entre los residuos glutaminas y lisinas puede ser intramoleculares o intermoleculares. Debido a la formación de polímeros de alto peso molecular por acción de la TG en las películas comestibles, se pretende que las propiedades mecánicas y de barrera de las películas mejoren (Porta y col., 2015).

Inicialmente, la TG se extraía de tejidos u órganos, pero en escasa cantidad y de una calidad media y su aplicación en alimentos era difícil. El descubrimiento en 1970 de la cepa *Streptoverticillium St. mobaraense* ha permitido su producción industrial.

La TG es capaz de otorgar una mejor estructura, ya que el enlace covalente catalizado por la TG es difícil de romper bajo una acción no enzimática. Una vez que se ha formado, no se dispersa ni siquiera en un proceso de congelación y/o cocción. Tiene la capacidad además de generar mayor resistencia física, dotar de firmeza, proveer elasticidad y mayor estabilidad de emulsión (Barreiro y Seselovsky, 2003).

Algunos factores que influyen en la actividad enzimática de la transglutaminasa son la temperatura y pH. La actividad enzimática es óptima a una temperatura de 50-55 °C y cubre un amplio rango de pH de 4.5 a 9, con un óptimo entre 6 y 7. La TG puede ser inactivada por un aumento de la temperatura interna, con valores mayores a los 75°C. El tiempo de reacción de la enzima depende directamente de la temperatura. Por ejemplo, a 2°C, el tiempo de reacción es de 2.5 h y a 55°C de sólo 30 min, si se trabaja a pH=6 (Barreiro y Seselovsky, 2003).

1.6 Plastificantes

Los plastificantes son compuestos de bajo peso molecular y han sido incorporados en la formulación de las películas para reducir las interacciones entre los polisacáridos. La función general de los plastificantes es reducir las interacciones intramoleculares entre las cadenas de polímeros, lo cual incrementa el espacio de volumen libre y facilita el movimiento de las moléculas. Como consecuencia, la red polimérica se vuelve suave y flexible (Osés y col., 2009).

La capacidad del plastificante para reducir las interacciones entre polímeros depende del número de grupos hidroxilo libres, que formarán enlaces de hidrógeno con biopolímeros y, por lo tanto, aumentarán el volumen y la flexibilidad de la matriz de la película, y la compatibilidad del plastificante con el polímero. Para la formación de películas comestibles, los plastificantes más utilizados son el glicerol, polietilenglicol, sorbitol y algunos azúcares (Domínguez y col., 2012).

Los plastificantes comunes para películas comestibles son monosacáridos, oligosacáridos, polioles, lípidos y derivados. Diversos plastificantes consisten en diferentes números de grupos hidroxilo y tienen diferentes estados físicos (sólidos o líquidos); por lo tanto, muestran diferencias en el grado de rigidez de la película (Shotornvit y Krochta, 2005).

El agua también es considerada un plastificante importante para películas comestibles. El agua tiene el peso molecular más pequeño ($PM = 18 \text{ g/mol}$) y es bien conocido como un excelente plastificante. Sin embargo, la mayoría de las películas aún necesitan un plastificante adicional para obtener la flexibilidad de película deseada. La sorción de humedad de varios plastificantes juega un papel importante al afectar las diferentes propiedades de la película, como la permeabilidad a gases y al vapor de agua (Shotornvit y Krochta, 2005).

1.7 Digestibilidad *in vitro*

La digestibilidad es una forma de medir el aprovechamiento de un alimento, es decir, la facilidad con que es convertido en el aparato digestivo en sustancias útiles para la nutrición. Comprende dos procesos, la digestión que corresponde a la hidrólisis de las moléculas complejas de los alimentos, y la absorción de pequeñas moléculas (aminoácidos, ácidos grasos) en el intestino (FAO, 1994).

La digestibilidad, por lo tanto, constituye una excelente medida de calidad y ello ha suscitado la idea medirla de diferentes formas, *in vitro* al someter las proteínas a una digestión artificial por enzimas proteolíticas que se encuentran de manera in vivo en

los seres humanos (Giosafatto, 2014).

La estabilidad de la digestión se usa como criterio para evaluar diferentes características de los componentes alimenticios como el potencial alergénico de nuevas proteínas. Además, los estudios de digestión gástrica y duodenal realizados en las mismas condiciones que se encuentran en el sistema de digestión humana han demostrado que las películas que contienen transglutaminasa se digieren regularmente, fomentando la aplicación de los materiales propuestos como recubrimientos alimentarios (Shani y col, 2016).

El análisis de la digestibilidad provee además información acerca de los alimentos basados en proteínas, por ejemplo, el impacto de la estructura de los alimentos en la digestibilidad y el tiempo de vaciado gástrico (Romano, 2016). Asimismo, es posible entender la adaptación de nuevas matrices de alimentos que, debido a su menor digestibilidad, podrían proporcionar productos comerciales con una ingesta energética controlada (Monogioudi y col., 2011). Por otro lado, el impacto en la digestibilidad de los alimentos podría ayudar a dilucidar otro tipo de factores como el índice glucémico, nivel de gasto energético y suponer procesos de catabolismo y anabolismo (Romano, 2016).

2. HIPÓTESIS

El perfil de proteínas de dos variedades diferentes de quinua afectará las propiedades fisicoquímicas y de barrera de películas comestibles elaboradas a base de proteína de quinua-quitosano, así como la adición de transglutaminasa como agente entrecruzante mejorará las propiedades físicas y de barrera de las mismas.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Determinar el efecto del perfil proteico en las propiedades físicas, químicas y digestibilidad de películas comestibles a base de quitosano y proteína de quinua de dos variedades diferentes.

3.2 Objetivos específicos

- Extraer, identificar y cuantificar proteína de dos variedades de quinua “*C. quinua* Pasankalla” y “*C. quinua* Willd”
- Establecer las condiciones óptimas de pH y concentración para la elaboración de películas comestibles a base de quitosano y proteína de quinua
- Establecer las diferencias del perfil proteico de las dos variedades de quinua
- Elaborar películas comestibles a base de quitosano y proteína de quinua “*C. quinua* Pasankalla” y “*C. quinua* Willd” en presencia y ausencia de transglutaminasa
- Evaluar las propiedades de barrera de las películas comestibles
- Evaluar el efecto de la transglutaminasa en las propiedades fisicoquímicas de las películas comestibles
- Establecer la relación entre las propiedades fisicoquímicas de las películas comestibles y su perfil proteico.
- Determinar el efecto de las interacciones químicas de los componentes de la matriz de las películas comestibles con sus propiedades físicas.
- Realizar una digestión simulada de las películas comestibles con y sin agente entrecruzante.

4. METODOLOGÍA

4.1 Materiales

Quitosano (Sigma-Aldrich, EUA), quinua comercial peruana (Hanseatik) y Boliviana (Tiqua quinua), Sorbitol (Sigma Aldrich), transglutaminasa microbiana derivada de *Streptoverticillium sp*, con 92 UI/ g (Activa WM, Ajinomoto, Francia).

4.2 Métodos

4.2.1 Extracción de proteína de quinua

Para la obtención de los aislados de proteína de quinua, las semillas de quinua se molieron utilizando un molino de café (Krupps Modelo GX410011, Solingen, Alemania) y se pasaron a través de un tamiz de apertura de poro de 200 μ m (malla No. 9, Tyler standard), para producir harina. La harina se desgrasó tres veces utilizando una solución de cloroformo: metanol (2:1 (v/v)) en proporción 1:10 (p/v) harina: solución, con agitación durante 2 h (Elsouhaimy y col., 2015). La extracción se realizó de acuerdo a lo reportado por (Ruiz y col., 2016), la harina desgrasada se suspendió en agua destilada (10% harina en agua, p/v) y se ajustó a pH 11 utilizando NaOH (Sigma-Aldrich) 1 N. Estas suspensiones se agitaron durante 1 h a temperatura ambiente, se centrifugaron a 10 ° C durante 30 min a 3200 x g. Posteriormente el pH de los sobrenadantes se ajustó a 4.5 usando HCl 1 N y se centrifugó durante 30 min en las mismas condiciones. El precipitado se suspendió en agua destilada (5% precipitado: agua, p/v) y se neutralizó con NaOH 2 N, el extracto obtenido se secó a 50°C (Binder). Finalmente, los aislados proteicos se molieron en un molino de café (Krupps Modelo GX410011, Solingen, Alemania) durante 2 min y se pasaron a través de un tamiz de apertura de poro de 200 μ m (malla No. 9, Tyler standard).

4.2.2 Caracterización de los aislados proteicos

Se evaluó la humedad de los aislados mediante una termobalanza (Precisa, XM 50, Dietikon, Switzerland). La proteína se determinó por el método Kjeldahl (AACC 46-10.01.) usando un factor de conversión de N \times 6.25.

4.2.3 Electroforesis SDS-PAGE

El perfil proteico de los aislados se evaluó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), la separación electroforética se llevó a cabo a 100 V durante 5 min y luego a 150 V utilizando una cámara Bio-Rad (Mini-PROTEAN II, California, EUA), se utilizó un marcador de bajo peso molecular (GE Healthcare, Little Chalfont, UK), las imágenes se tomaron con un fotodocumentador (ProteinSimple, Alphamager, Kent, UK) (Brunelle y Green, 2014).

4.2.4 Elaboración de películas a base de quitosano

Las películas de quitosano se realizaron de acuerdo a lo propuesto con (Escamilla-García y col., 2017) con algunas modificaciones. Se elaboró una suspensión de quitosano (1% p/v) en ácido láctico (0.5% p/v) con agitación constante durante 1 h a 80 °C, transcurrido este tiempo se retiró del calentamiento y se adicionó sorbitol en proporción 1:1 (p/p) y se mantuvo en agitación durante 10 min. La película se formó mediante el método de vaciado en caja con un secado a 60 °C, humedad relativa del 50% durante 24 h, en una cámara climática (Binder, KBF 115, Tuttlingen, Alemania)

4.2.5 Elaboración de películas a base de proteína de quinua

Para la elaboración de películas comestibles se utilizó la metodología propuesta por (Sharma y Singh, 2016) con algunas modificaciones. La proteína aislada (2% p/v) se disolvió en agua destilada y se adicionó sorbitol como plastificante (40% p/p, en base a la proteína), el pH de la solución se ajustó a pH 11 con NaOH 1N. Se utilizó pH alcalino para preparar las películas a pH alcalino la proteína de quinua sufre cambios estructurales significativos (desnaturalización / agregación / disociación) los cuales le permiten la formación de películas (Valenzuela y col., 2013).

La solución se calentó en baño de agua a 70° durante 30 min, finalmente la película se formó mediante el método de vaciado en caja bajo las mismas condiciones que en el punto 4.2.4. Estas soluciones se prepararon en ausencia y presencia de TG (10% p/v), lo que representa el 1.4 % (p/v) de la solución.

4.2.6 Elaboración de películas comestibles a base de proteína de quinua-quitosano
Se preparó una solución mezclando las soluciones de quitosano y proteína de quinua que se describieron en los puntos 4.2.4 y 4.2.5 en diferentes proporciones (1:5, 1:10, 1:15 y 1: 20 quitosano/proteína p/p), se utilizó la concentración de plastificante y la TG descrita en el punto 4.2.5.

4.2.7 Determinación del grado de entrecruzamiento

La determinación del grado de reticulación se llevó a cabo mediante el método descrito por (AL-Hassan y Norziah, 2017), el cual consiste en la reacción de los grupos amino libres con ácido-2,4,6 trinitrobenceno sulfónico (TNBS). Se pesaron 5 mg de películas en tubo de ensaye y se adicionó 1 ml de TNBS (0.5% p/v) y 1 ml de solución bicarbonato de sodio (4% p/v, pH= 8.5). La mezcla se calentó a 40 °C durante 2 h. Los grupos amino no entrecruzados reaccionaron con el formando un complejo amarillo soluble. La solución fue tratada con 2 mL de HCl 6 N con calentamiento a 60°C durante 1.5 h y se midió la absorbancia a 415 nm en un lector de microplaca (GENESYS Vis/UV-Vi, Thermo Scientific, Massachusetts, EUA). El grado de entrecruzamiento se calculó utilizando la Ecuación 1 y los valores se expresaron como media \pm desviación estándar (n = 4).

$$\% E_{TGA} = \frac{1-A_{ETGA}}{A_{STGA}} \times 100 \quad \dots\dots\dots (1)$$

Donde %E_{TGA} es el porcentaje de entrecruzamiento, A_{ETGA} es la absorbancia de las películas con entrecruzamiento y A_{STGA} es la absorbancia de la película sin entrecruzamiento.

4.2.8 Caracterización de películas comestibles

4.2.8.1 Espesor de películas comestibles

El espesor de las películas se determinó utilizando un micrómetro (Mitutoyo, Serie

293 Imp, Illinois, EUA)

4.2.8.2 Solubilidad

Se cortaron porciones de película de 2 cm x 2 cm y se secaron a 70°C durante 24 h y se registró como peso inicial. Las películas secas se colocaron en tubos de ensaye con tapón de rosca los cuales contenían 20 mL de agua destilada, y 0.01% (p/v) de benzoato de sodio. Los tubos se pusieron en agitación en un baño de agua durante 24 h a 25°C. La solución se filtró través de un papel filtro previamente sometido a peso constante, y se secaron al igual que las porciones de película a 70°C durante 24 h. El filtrado seco con residuos de película se pesó para determinar su peso seco final. Las pruebas se realizaron por triplicado. La solubilidad se calculó utilizando la Ecuación 2 (Soo y Sarbon, 2018)

$$\%SP = \frac{P_{1s} - P_{2s}}{1} \times 100 \dots\dots\dots (2)$$

Donde %SP es el porcentaje de solubilidad, P_{1s} es peso inicial de la película seca y P_{2s} es el peso final de la película seca.

4.3.8.3 Permeabilidad a vapor de agua

La permeabilidad al vapor de agua (PVA) se evaluó mediante el método gravimétrico ASTM E 96-80 (Hoffe, 1989) con modificaciones. Para esta prueba se utilizaron copas de permeabilidad de boca abierta y área conocida. A las copas de permeabilidad se adicionaron una solución de NaCl (10% p/v), las copas se colocaron en el interior de un desecador el cual contenía una solución de KNO₃, el sistema se mantuvo a una temperatura constante de 25°C, con la finalidad de mantener una humedad relativa entre 75 y 95.6% para el interior y exterior de la copa de permeabilidad respectivamente. La diferencia de humedad relativa generó la transferencia de vapor de agua de la copa de permeabilidad al exterior de esta. Se registraron las variaciones en peso de la copa de permeabilidad cada 20 min, hasta alcanzar el equilibrio (Alvarado-González y col., 2012). La permeabilidad al vapor de

agua (PVA) se obtuvo a partir de la Ecuación (3).

$$PVA = \frac{\Delta W}{tA} * \frac{L}{\Delta P} \dots\dots\dots (3)$$

En donde ΔW es la variación del peso de la celda de permeabilidad (g), t es el tiempo que dura la prueba (s), A es el área de contacto de la película comestible (m^2), L es el espesor de la película (mm) y ΔP es la diferencia de presiones (Pa). Una vez calculado la PVA, este valor se corrigió por medio de la metodología propuesta por (Escamilla-García y col., 2017) . (Ecuaciones 4 a 9)

$$P_{w1} = P_0 * \frac{HR_1}{100} \dots\dots\dots (4)$$

$$P_{w2} = P_0 * \frac{HR_2}{100} \dots\dots\dots (5)$$

$$P_{w3} = P_T - (P_T - P_{w1}) \frac{PVA * R * T * h_i}{P_T * D} \dots\dots\dots (6)$$

$$P_{w4} = P_T - (P_T - P_{w2}) \frac{PVA * R * T * h_0}{P_T * D} \dots\dots\dots (7)$$

$$Permeancia_c = Permeancia_m * \frac{P_{w1} - P_{w2}}{P_{w3} - P_{w4}} \dots\dots\dots (8)$$

$$PVA_c = Per_c * \frac{L}{P_{w1} - P_{w2}} \dots\dots\dots (9)$$

donde P_{w1} es la presión parcial dentro de la celda de permeabilidad, P_{w2} es la presión parcial dentro del desecador, P_{w3} y P_{w4} son la presión debajo y sobre la película comestible respectivamente, D es la difusividad del vapor de agua a través del aire ($2.82 \text{ m}^2/\text{día}$, 25°C , R es la constante de los gases [$0.000462 \text{ m}^3 \text{ kPa}/(\text{g K})$], T es la temperatura a la cual se realiza el experimento (298 K), P_T es la presión atmosférica (85 kPa en Querétaro) y $Permeancia_m$ es la pendiente de

la curva de variación de peso contra tiempo que dure la prueba.

4.2.9 Estudios de adsorción

Para esta prueba se prepararon soluciones saturadas de cloruro de litio, acetato de potasio, cloruro de magnesio, carbonato de potasio, nitrato de magnesio, bromuro de sodio, cloruro de sodio y cloruro de potasio en desecadores para obtener diferentes humedades relativas con valores de actividad de agua (a_w) de 0.11, 0.23, 0.33, 0.43, 0.58, 0.76 y 0.85, respectivamente. Previo a la prueba se determinó el contenido de humedad inicial de las películas utilizando una termobalanza (Precisa XM 50, Dietikon, Suiza). Se cortaron porciones de película de 1.5 cm x 1.5 cm y se acondicionaron a 53% de humedad relativa a 23 ± 1 ° C, las porciones de película se colocaron en los diferentes desecadores y se registraron las variaciones en peso hasta alcanzar el equilibrio (Abugoch y col., 2011). Los datos de isoterma de sorción dependientes de la temperatura se ajustaron al modelo de sorción de Guggenheim-Anderson-de Boer (GAB) Ecuación 10.

$$X = \frac{x_m C K_{aw}}{(1 - K_{aw})(1 - K_{aw} + C K_{aw})} \dots\dots\dots (10)$$

Donde X es el contenido de humedad (kg de agua/kg de sólido seco); x_m es el valor de la monocapa (kg de agua/ kg de sólido seco), C es la constante de Guggenheim, característica del producto y relacionada con el calor de adsorción de la monocapa. k, es un factor de corrección relacionado con el calor de sorción de la multicapa.

4.2.10 Simulación de hidrólisis proteolítica

Para esta prueba se colocaron 5 mg de cada una de las películas elaboradas en 600 μ L de fluido de saliva simulado (FSS: NaCl 150 mM y urea 4 mM (pH 6.9)) y se incubaron durante 5 min en agitación constante (170 rpm) a temperatura ambiente (25°C). De la solución de película en FSS se tomaron 75 μ L y se incubaron a 37 °C, posteriormente se adicionaron 100 μ L del fluido gástrico simulado (FGS: NaCl 0.15 M a pH 2.5) y pepsina en una proporción 1:20 pepsina: proteína (p/p) y se adicionaron

40 μ L de una solución de $\text{NH}_4(\text{HCO}_3)$ a intervalos de tiempo de 1, 2, 5, 10, 20, 40 y 60 min para detener la reacción de la pepsina. El control se incubó durante 60 min sin la adición de pepsina. La hidrólisis duodenal se llevó a cabo utilizando la muestra gástrica sometida a la acción de pepsina por 60 min, la cual se ajustará pH 6.5 utilizando bis-Tris HCl 0.5 M. Se prepararon sales biliares (taurocolato de sodio y glico desocolato de sodio) y se disolvieron de manera simultánea en el fluido duodenal simulado (FDS; NaCl 0.15 M pH 6.5) a una concentración final de 4 mM, las soluciones se incubaron a 37°C durante 10 min.

Posteriormente una proporción de tripsina: proteína y quimotripsina: proteína 1:400 y 1:100 p/p, respectivamente se adicionarán a la mezcla duodenal. Durante el tiempo de digestión se tomarán alícuotas en los intervalos de tiempo de 1, 2, 5, 10, 20, 40 y 60 min y se detendrá la proteólisis mediante la adición de un exceso equivalente al doble de volumen por encima del calculado para inhibir tripsina y quimotripsina en la mezcla de digestión, del inhibidor de tripsina-quimotripsina Bowmann-Birk de soya (Giosafatto y col., 2014). Las muestras se analizaron mediante SDS-PAGE (sección 4.3.3).

4.2.11 Microscopía de fuerza atómica

La microscopía de Fuerza atómica (AFM) es una técnica que permite obtener información de la topografía de las superficies y en el presente trabajo se utilizó para evaluar la rugosidad de la superficie de las películas comestibles. Se utilizó un microscopio de AFM (di Multimode V, Veeco, Plainview, NY, EUA) en el modo de contacto. Este método permite producir un perfil 3D de la superficie de la muestra al medir los cambios de fuerza entre la viga voladiza "cantilever" y la muestra (Morris, 2012). Para este análisis se cortaron porciones de película de 0.5 x 0.5 cm de cada una de las películas, el barrido se realizó con una frecuencia de resonancia de 286-362 kHz y una constante de resorte de 20-80 N/m y velocidad de escaneo de 1 Hz con resolución de 256 x 256 píxeles, y utilizando puntas de silicio (Bruker RTESP Cantilever, Karlsruhe, Alemania), los resultados se analizaron utilizando el software

Gwyddion Versión 2.53 (Okružní, República Checa). La rugosidad se calculó a partir de las imágenes de la superficie comestible de la película, calculando la raíz cuadrada de la desviación desde un plano medio de los picos y valles superficiales (R_q) (Ecuación 11).

El promedio de los valores absolutos de las desviaciones de altura de la superficie medidos desde el plano medio (R_a) se calculó usando la Ecuación (12).

$$R_q = \sqrt{\frac{\sum Z_i^2}{N}} \dots\dots\dots (11)$$

$$R_a = \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N Z_j \dots\dots\dots (12)$$

Donde R_a y R_q son los valores de rugosidad (nm), Z_i es la diferencia de la altura i respecto al promedio de las alturas, y N es el número de puntos en la imagen. (Escamilla-García y col., 2017)

4.2.12 Espectroscopia Raman

La espectroscopia Raman es una técnica fotónica de alta resolución que proporciona en pocos segundos información química y estructural de compuestos orgánicos e inorgánicos permitiendo su identificación. Las interacciones de los componentes de la película se evaluaron utilizando un espectrómetro Raman (Olympus BX41 Horiba, Yvon, Japón) acoplado a un microscopio (Olympus BX 41). Las muestras se radiaron con un láser de 735 nm con un objetivo de 50x y N.A. 0.55 y un límite de difracción de 702 nm.

La resolución espectral utilizada fue de 0.16 cm^{-1} , con 1800 g/mm utilizando un detector CCD (Charge Coupled Device) con un rango espectral de 450 a 950 nm.

La apertura confocal y la rendija de entrada del monocromador se fijaron a $400 \mu\text{m}$. Realizando las lecturas en un intervalo espectral de 500 a 3500 cm^{-1} . Para el

tratamiento de los datos se utilizó el programa Spekwint 32 (Escamilla-García y col., 2017).

4.3 Análisis estadístico

Todos los análisis se realizaron por triplicado y se compararon los promedios para detectar diferencias significativas mediante la prueba de Tuckey ($p < 0.05$).

Dirección General de Bibliotecas UNQ

5. RESULTADOS

5.1 Caracterización de los aislados proteico

El porcentaje de humedad y de proteína de los dos aislados obtenidos se muestran en el Cuadro 2, de acuerdo con estos la *C. quinua* Willd tiene mayor contenido de humedad y proteína en comparación a la de la variedad *C. quinua* Pasankalla.

Cuadro 2. Contenido de humedad y concentración de proteína de los aislados proteicos de cada una de las variedades de quinua.

Parámetro	Willd	Pasankalla
Humedad (% p/p)	12.42 ± 0.72	10.07 ± 0.54
Proteína (% p/p)	71.49 ± 1.99	67.93±2.01

5.2 Electroforesis SDS-PAGE

En la Figura 2 se muestra el perfil proteico de las dos variedades de quinua utilizadas, en presencia y ausencia de TG. Para ambas variedades es posible ver el entrecruzamiento, en los carriles 1 y 3 donde se muestra *C. quinua* Willd con y sin TG respectivamente. Al agregar la TG, la primera banda (carril 3) desaparece y aparece una nueva franja indicada en la figura con una; el mismo fenómeno se puede observar con la variedad Pasankalla (carriles 2 y 4). A pesar de que en ambas variedades se observa entrecruzamiento, la banda observada para las muestras con TG son de diferente peso molecular.

5.3 Características generales de película comestible

Las películas elaboradas con proteína de quinua de las dos variedades de estudio (Pasankalla y Willd) se observaron transparentes, lisas, y con una ligera coloración café; además resultaron flexibles y fáciles de manipular, la adición de TG en las películas comestibles mejoró la resistencia mecánica de las películas.

El Cuadro 3 se describe las características visuales de cada una de las películas

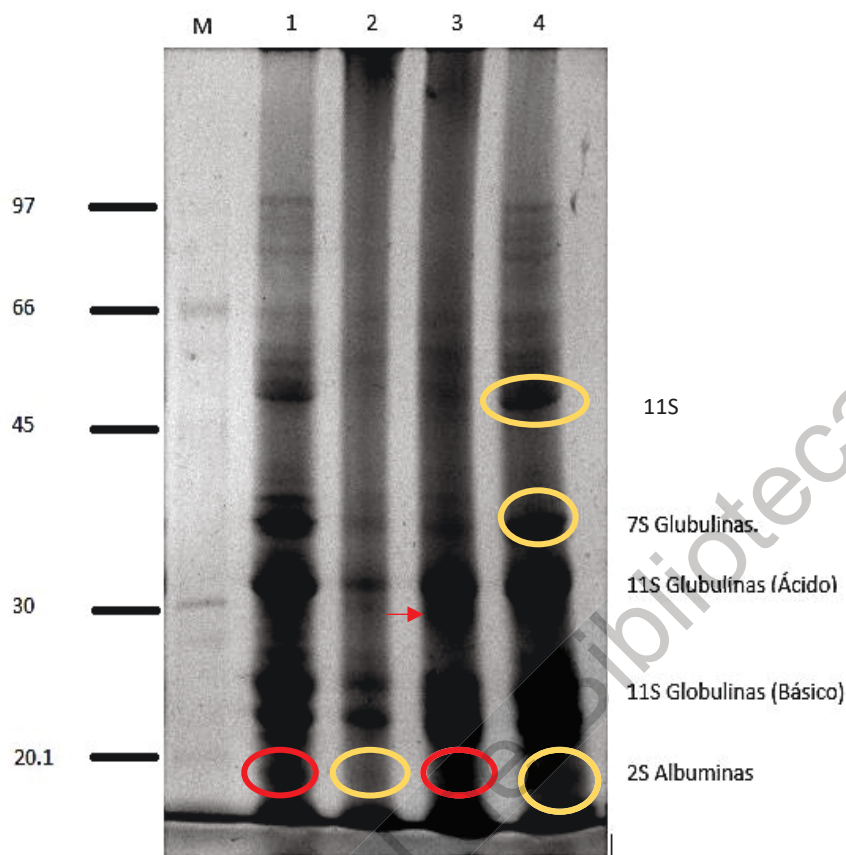


Figura 2. SDS-PAGE de aislados de quinua de la variedad Pasankalla y Willd con y sin TG. M: Marcador de peso molecular; 1: aislado Willd; 2: aislado Pasankalla 3: aislado Willd + TG; 4: aislado Pasankalla + TG.

comestibles, en el cual es posible observar que las películas elaboradas con las dos variedades de quinua son similares entre sí.

5.4 Determinación del grado de entrecruzamiento

El porcentaje de entrecruzamiento obtenido al adicionar TG se presenta en el Cuadro 4, en donde se observa que de las películas elaboradas sólo con el aislado proteico, la de la variedad Pasankalla presenta un mayor entrecruzamiento en comparación con la Willd con valores de $61.45 \pm 3.73\%$ y $40.55 \pm 3.61\%$ respectivamente. Sin embargo, la presencia de quitosano favorece el entrecruzamiento en la variedad Willd, siendo la película elaborada a partir de Q-WQ (1:15) con mayor porcentaje de entrecruzamiento (67.61 ± 3.28).

Cuadro 3. Características generales de las películas comestibles obtenidas con las dos variedades de quinua

Película comestible	Características	Película comestible	Características
Q-WQ	Transparente, ligeramente café, poco flexible y quebradiza	Q-PQ	Transparente, ligeramente amarilla, poco flexible y quebradiza
Q-WQ-TG	Transparente, ligeramente café, poco flexible y quebradiza	Q-PQ TG	Transparente, ligeramente amarilla, poco flexible y quebradiza
Q-PP 1:5	Opaca, firme, quebradiza, de forma convexa	Q-PQ 1:5	Opaca, firme, quebradiza, de forma convexa
Q-WQ-TG 1:5	Opaca, firme, quebradiza, de forma convexa	Q-PQ-TG 1:5	Opaca, firme, quebradiza, de forma convexa
Q-WQ 1:10	Transparente, firme y poco quebradiza	Q- PQ 1:10	Transparente, firme y poco quebradiza
Q- WQ-TG 1:10	Transparente, firme y poco quebradiza	Q-PQ-TG 1:10	Transparente, firme y poco quebradiza
Q- WQ1:15	Transparente, ligeramente café y flexible	Q-PQ1:15	Transparente, ligeramente y flexible
Q-WQ-TG 1:15	Transparente, ligeramente café y flexible	Q-PQ-TG 1:15	Transparente, ligeramente café y flexible
Q-WQ 1:20	Transparente y quebradiza	Q-PQ1:20	Transparente y quebradiza
Q-WQ-TG 1:20	Transparente y quebradiza	Q-PQ-TG 1:20	Transparente y quebradiza

*Q-WQ: mezcla quitosano-proteína de quinua variedad Willd. Q-PQ: mezcla quitosano proteína de quinua variedad Pasankalla, TG: enzima transglutaminasa.

Cuadro 4. Porcentaje de entrecruzamiento en las películas comestibles

Película	% Entrecruzamiento	Película	% Entrecruzamiento
WQ+ TG	40.55 ± 3.61 ^a	PQ+ TG	61.45±3.73 ^a
Q+WQ (1:5)	25.78 ± 3.66 ^b	Q+PQ (1:5)	11.44 ± 2.70 ^b
Q+WQ (1:10)	62.03 ± 1.96 ^c	Q+PQ (1:10)	44.27 ± 1.13 ^c
Q+WQ (1:15)	67.61 ± 3.28 ^c	Q+PQ (1:15)	39.31 ± 2.18 ^d
Q+WQ (1:20)	44.59 ± 3.21 ^a	Q+PQ (1:20)	32.63 ± 2.68 ^e

*Q: Quitosano, WQ: Willd, PQ: Pasankalla. Letras diferentes en superíndice en la misma columna indican valores significativamente diferentes ($p < 0.05$)

5.5 Propiedades físicas de las películas comestibles

Las propiedades físicas que se evaluaron fueron espesor, permeabilidad al vapor de agua y solubilidad. Los resultados se muestran en el Cuadro 5. El espesor de las películas de las dos variedades de quinua no presenta diferencia significativa; sin embargo, las películas elaboradas sólo con proteína de quinua presentan menor espesor en comparación con las películas elaboradas a partir de la mezcla Q-proteína de quinua, siendo las películas con mayor concentración de proteína (1:20) las que presentaron los menores espesores para ambas variedades.

Otro parámetro importante de las películas es la permeabilidad al vapor de agua (PVA), donde los resultados obtenidos muestran que la permeabilidad al vapor de agua disminuye en presencia de TG para ambas variedades (Cuadro 5). Sin embargo, la permeabilidad aumentó significativamente ($p < 0.05$) al adicionar el quitosano y disminuyó conforme aumentaba la cantidad de proteína en la película, observándose dicho comportamiento para las dos variedades. El valor más alto de PVA obtenido fue el de la película Q:WQ (1:5) con $9.95 \pm 0.29 \text{ g cm Pa}^{-1} \text{ cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$, el cual disminuyó significativamente ($p < 0.05$) a $3.07 \pm 0.29 \text{ g cm Pa}^{-1} \text{ cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ al adicionar TG. Las películas elaboradas usando la variedad Pasankalla mostraron mejores

propiedades de barrera, sin embargo, el efecto de la adición de TG en las películas elaboradas con esta variedad es menor que el observado con la quinua willd, teniendo una mayor diferencia en la película elaborada a partir de Q: PQ (1:5) cambiando de un valor de 4.97 ± 0.82 a $3.23 \pm 0.43 \times 10^{-13} \text{ g cm Pa}^{-1} \text{ cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ en presencia de TG.

El comportamiento observado para el parámetro de solubilidad es contrario al de PVA, ya que disminuyó al adicionar quitosano siendo las de mayor concentración de proteínas más solubles. La TG disminuyó significativamente la solubilidad de las películas para ambas variedades. La película más soluble fue la elaborada a partir de proteína variedad Pasankalla ($71.84 \pm 1.58 \%$) y la menos soluble la elaborada a partir de la mezcla Q-WQ (1:5) en presencia de TG ($14.02 \pm 2.17\%$).

La adición de TG tiene un efecto significativo en las propiedades de las películas de ambas variedades, disminuyendo su permeabilidad al vapor de agua y solubilidad; el efecto del entrecruzamiento de la proteína con TG fue mayor para los parámetros en la variedad de la proteína obtenida de quinua Willd, por lo que la variedad de la cual se obtiene la proteína afecta el grado de entrecruzamiento y las propiedades de permeabilidad y solubilidad de las películas comestibles. El espesor de las películas comestibles no muestra diferencia significativa a causa de la fuente de proteína de quinua utilizada, mientras que la adición de TG no afectó significativamente ($p < 0.05$) este parámetro.

5.6 Adsorción

En el Cuadro 6 se enlistan los valores obtenidos a partir de las curvas de adsorción, de los cuales se puede observar que las películas que mayor cantidad de agua retienen en la monocapa son las elaboradas a partir de la mezcla de quitosano-proteína de quinua a las concentraciones 1:15 y 1:20 para ambas variedades, sin embargo, para la variedad Willd la sorción es mayor en presencia de TG, mientras que para la variedad Pasankalla fue mayor en ausencia de TG. La película Q-WQ (1:20)+TG es la que presentó el valor más alto de X_m ($0.18 \pm 0.01 \text{ kg de agua/kg de}$

sólido seco).

Cuadro 5. Propiedades físicas de películas comestibles a base quitosano y proteína de quinua (*Pasankalla* y *Willd*)

Películas comestibles sin TG			
Película	Espesor (mm)	PVA x10 ⁻¹³ (g cm Pa ⁻¹ cm ⁻² s ⁻¹)	% Solubilidad
PQ	0.155 ± 0.051 ^a	2.85 ± 0.78 ^a	71.84±1.58 ^a
Q: PQ 1:5	0.231 ± 0.025 ^{ab}	4.97± 0.82 ^b	27.98±1.07 ^b
Q: PQ 1:10	0.258 ± 0.014 ^b	3.64 ± 0.64 ^{be}	32.28±1.09 ^c
Q: PQ 1:15	0.214 ± 0.057 ^b	3.74 ± 0.37 ^{be}	47.38±1.07 ^d
Q: PQ 1:20	0.173 ± 0.011 ^{ab}	3.26 ± 0.96 ^{be}	56.91 ±1.50 ^e
WQ	0.184 ± 0.016 ^{ab}	3.40 ± 0.68 ^{be}	67.92±1.58 ^f
Q: WQ 1:5	0.253 ± 0.050 ^b	9.95 ± 0.29 ^c	17.5 ±1.87 ^g
Q: WQ 1:10	0.266 ± 0.003 ^b	6.74 ± 0.83 ^d	26.73 ±2.54 ^b
Q: WQ 1:15	0.223 ± 0.004 ^b	5.56 ± 0.50 ^{bd}	43.52±1.22 ^h
Q: WQ 1:20	0.181 ± 0.001 ^{ab}	4.77 ± 0.79 ^b	55.24±2.36 ^e
Películas comestibles con TG			
PQ	0.179 ± 0.064 ^{ab}	2.87 ± 0.68 ^a	68.82±1.01 ^f
Q: PQ 1:5	0.266 ± 0.003 ^{ab}	3.23 ± 0.43 ^e	26.14±1.82 ^b
Q: PQ 1:10	0.205 ± 0.007 ^{ab}	2.83 ± 0.58 ^a	26.83 ±1.9 ^b
Q: PQ 1:15	0.205 ± 0.003 ^{ab}	2.99 ± 0.62 ^{ae}	42.95±1.75 ^h
Q: PQ 1:20	0.179 ± 0.011 ^{ab}	2.42 ± 0.5 ^{ae}	55.25±1.33 ^e
WQ	0.205 ± 0.003 ^{ab}	3.07 ± 0.29 ^{ae}	55.24±1.49 ^e
Q: WQ 1:5	0.276 ± 0.068 ^{ab}	3.88 ± 0.12 ^{ae}	14.02 ± 2.17 ^g
Q: WQ 1:10	0.275 ± 0.003 ^{ab}	4.69 ± 0.52 ^b	25.81±2.95 ^b
Q: WQ 1:15	0.225 ± 0.035 ^{ab}	3.4 ± 0.69 ^e	42.26±2.13 ^h
Q: WQ 1:20	0.227 ± 0.007 ^{ab}	3.64 ± 0.49 ^{be}	53.48±1.57 ^e

PQ, Quinua; *Pasankalla*; WQ, Quinua *WILLD*; Q, Quitosano; TG, transglutaminasa. Letras diferentes en superíndice en la misma columna indican valores significativamente diferentes

($p < 0.05$)

Cuadro 6. Parámetros de adsorción de películas comestibles a base de proteína de quinua-quitosano, según el modelo GAB.

Películas comestibles sin TG			
	K	C	Xm
PQ	0.95 ± 0.02 ^a	11.73 ± 1.94 ^a	0.03 ± 0.001 ^a
Q: PQ 1:5	0.98 ± 0.07 ^a	15.45 ± 2.16 ^a	0.03 ± 0.001 ^a
Q: PQ 1:10	0.74 ± 0.14 ^{bc}	7.89 ± 0.67 ^b	0.08 ± 0.003 ^b
Q: PQ 1:15	0.70 ± 0.08 ^b	7.07 ± 0.08 ^b	0.11 ± 0.05 ^c
Q: PQ 1:20	0.82 ± 0.03 ^c	1.36 ± 0.23 ^c	0.13 ± 0.02 ^c
WQ	0.78 ± 0.06 ^b	7.27 ± 0.35 ^b	0.06 ± 0.001 ^b
Q: WQ 1:5	0.81 ± 0.06 ^c	3.82 ± 1.14 ^d	0.03 ± 0.001 ^a
Q: WQ 1:10	0.75 ± 0.12 ^b	4.41 ± 0.46 ^d	0.03 ± 0.007 ^a
Q: WQ 1:15	0.53 ± 0.18 ^d	4.91 ± 1.37 ^d	0.04 ± 0.005 ^a
Q: WQ 1:20	0.61 ± 0.17 ^d	3.33 ± 0.68 ^d	0.07 ± 0.008 ^d
Películas comestibles con TG			
PQ	0.95 ± 0.03 ^a	78.72 ± 4.94 ^e	0.02 ± 0.001 ^e
Q: PQ 1:5	0.93 ± 0.08 ^a	7.28 ± 1.22 ^b	0.05 ± 0.001 ^f
Q: PQ 1:10	0.90 ± 0.11 ^a	7.07 ± 0.06 ^b	0.07 ± 0.002 ^d
Q: PQ 1:15	0.94 ± 0.07 ^a	7.39 ± 0.7 ^b	0.08 ± 0.003 ^g
Q: PQ 1:20	0.74 ± 0.02 ^b	9.79 ± 0.18 ^a	0.06 ± 0.001 ^b
WQ	0.79 ± 0.18 ^b	2.82 ± 0.82 ^f	0.03 ± 0.007 ^a
Q: WQ 1:5	0.88 ± 0.06 ^c	6.80 ± 2.48 ^{bf}	0.06 ± 0.008 ^b
Q: WQ 1:10	0.81 ± 0.16 ^c	5.19 ± 0.83 ^d	0.03 ± 0.002 ^a
Q: WQ 1:15	0.69 ± 0.18 ^b	2.95 ± 0.93 ^f	0.13 ± 0.02 ^c
Q: WQ 1:20	0.62 ± 0.04 ^b	2.31 ± 0.53 ^f	0.18 ± 0.01 ^h

PQ, Quinoa; Pasankalla; WQ, Quinoa Willd; Q, Quitosano; TG, transglutaminasa. Letras diferentes en superíndice en la misma columna indican valores significativamente diferentes (p<0.05)

Los valores de K para ambas variedades se encuentran por debajo de 1, siendo más altos para PQ en ausencia y presencia de TG, el valor más alto fue el obtenido por la película Q: PQ (1:5) con un valor de 0.98 ± 0.07 .

5.7 Hidrólisis proteolítica

En la Figura 3 se muestran los geles obtenidos de la digestión simulada de cada una de las muestras, en las Figura 3A y 3B se presentan los geles obtenidos después de la hidrólisis con el fluido salival simulado de las muestras de proteína de quinua Pasankalla y Willd respectivamente, en donde se puede apreciar que se presentan para ambas variedades fracciones proteicas de peso molecular menor a los 97 kDa. Sin embargo, en los geles obtenidos de la hidrólisis con el fluido gástrico simulado (Figura 3C y 3D), la cantidad de bandas presentes en dichos geles disminuye, para la variedad Pasankalla (Figura 3C) desaparecen para las mezclas 1:5 y 1:10 en presencia y ausencia de TG las bandas con peso molecular 30.48 kDa, las bandas que permanecieron corresponden a pesos moleculares de 47.98 y 58.26 kDa, pero la variedad Willd no presentó diferencias en ninguna de las concentraciones. Finalmente, en las Figuras 4E y 4F se presentan los geles obtenidos de la hidrólisis con el fluido duodenal simulado, para ambas variedades, no se presenta ninguna banda.

5.8 Microscopía de fuerza atómica

En la Figura 4 se muestran las micrografías de las películas comestibles de proteína de quinua de las dos variedades y de las mezclas con quitosano 1:10 (Q:proteína de quinua). Se eligió esta concentración ya que son las películas con menor solubilidad, y no presentaba diferencia significativa en PVA con películas con mayor concentración de proteína. La rugosidad de la película WQ (Figura 4a) no presenta diferencia significativa ($p < 0.05$) al adicionar TG (Figura 4b), sin embargo, al adicionar quitosano (Figura 4c) la rugosidad aumenta. La adición de TG en la película elaborada a partir de la mezcla provoca una disminución significativa en los valores de rugosidad (Figura 4d).

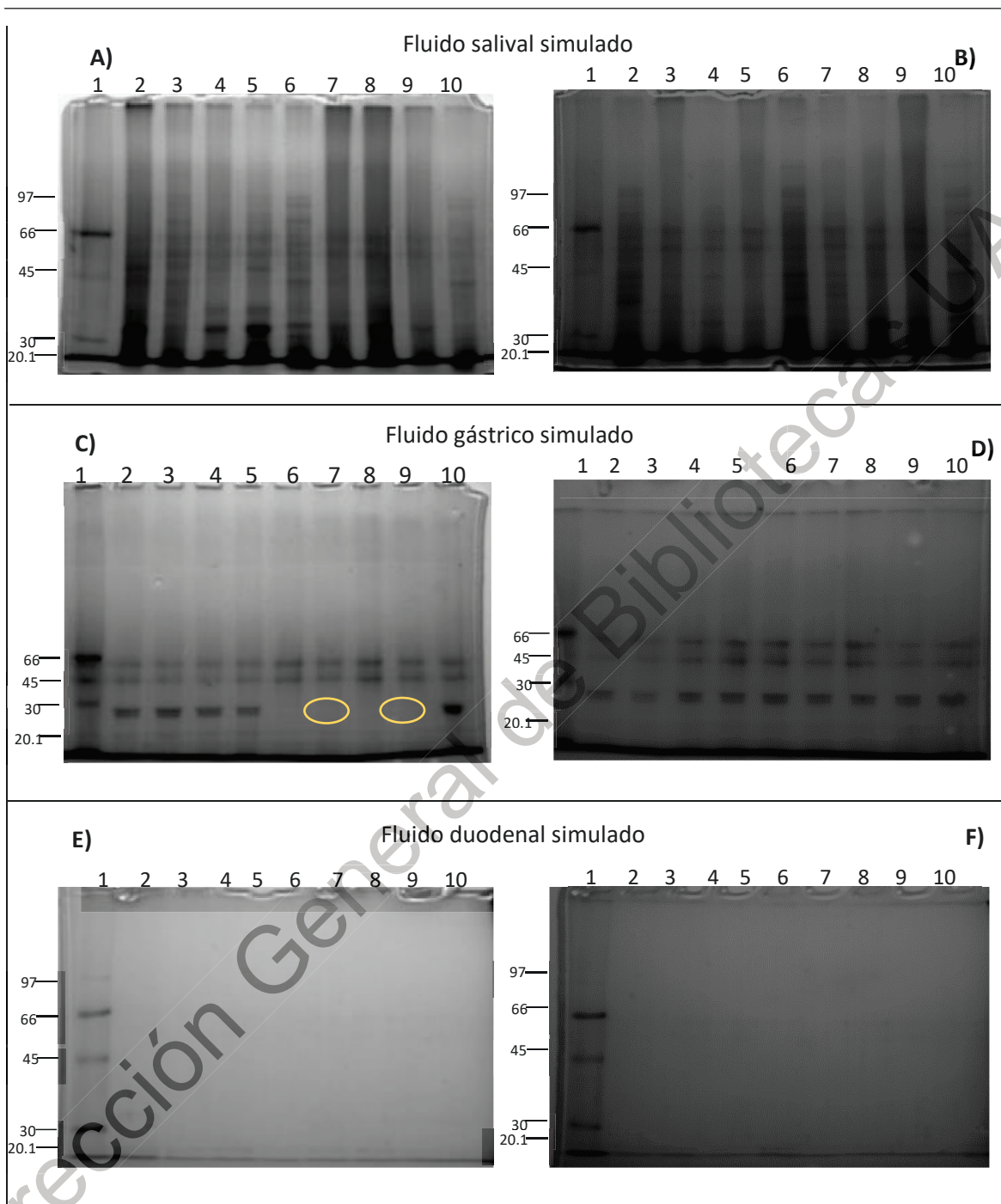


Figura 3. Hidrólisis proteolítica de las diferentes películas comestibles a base de proteína de quinua-quitosano.

A, C y E: Proteína de quinua Willd; carriles; 1: WQ, 2: WQ+TG, 3: WQ-Q (1:5), 4: WQ-Q (1:5) +TG, 5: WQ-Q (1:10), 6: WQ-Q (1:10) +TG, 7: WQ-Q (1:15), 8: WQ-Q (1:15) +TG, 9: WQ-Q (1:20), 4: WQ-Q (1:20) +TG. **B, D y F:** Proteína de quinua Pasankalla; carriles; 1: PQ, 2: PQ+TG, 3: PQ-Q (1:5), 4: PQ-Q (1:5) +TG, 5: PQ-Q (1:10), 6: PQ-Q (1:10) +TG, 7: PQ-Q (1:15), 8: PQ-Q (1:15) +TG, 9: PQ-Q (1:20), 4: PQ-Q (1:20) +TG. PQ, Quinoa; Pasankalla; WQ, Quinoa Willd; Q, Quitosano; TG, transglutaminasa.

Las películas elaboradas con proteína de la variedad Pansankalla presenta valores de rugosidad mayores que las elaboradas con la variedad Willd. En las Figuras 4d y 4e se muestran las películas de PQ en ausencia y presencia de TG respectivamente, donde se observa que el entrecruzamiento no tiene efecto significativo en la rugosidad. La Figura 4g presenta la película Q-PQ (1:10), donde se aprecia que la adición de quitosano aumenta significativamente el valor de rugosidad, la cual disminuyó al entrecruzado con TG (Figura 4h). Como se mencionó anteriormente el entrecruzamiento tiene un efecto significativo en la rugosidad de las películas que contienen quitosano, aunque, se observa un mayor efecto con la variedad Pasankalla, disminuyendo el valor en aproximadamente un 50%, mientras que para la variedad Willd disminuye aproximadamente 20%. El impacto del quitosano en las películas fue mayor en las elaboradas con PQ aumentando los valores de rugosidad 2.4 veces mientras que en las elaboradas con WQ aumento 1.5 veces.

Al igual que en los parámetros físicos evaluados anteriormente, el entrecruzamiento con TG tendrá un impacto diferente dependiendo de la variedad de proteína de quinua que se esté utilizando en la elaboración de las películas. Por lo que el utilizar una variedad u otra dependerá de la aplicación que se pretenda dar a la película.

5.9 Espectroscopia Raman

En la Figura 5 se muestran los espectrogramas Raman obtenidos de las películas elaboradas con la proteína de quinua de la variedad Pasankalla, donde las Figuras 5a y 5b muestran el entrecruzamiento de la proteína con TG. Al agregar TG se puede observar que se intensifican algunas señales a los 503.3, 699.1, 719.1 y 757.9 cm^{-1} y la aparición de una señal a los 874.9 cm^{-1} . Lo cual es indicativo de posibles interacciones entre la proteína y el entrecruzante. El entrecruzamiento es más evidente en presencia del quitosano (Figura 5c y 5d), este espectrograma con TG muestra un nuevo pico a 550.7 cm^{-1} , y también desaparecen, en comparación a la misma mezcla en ausencia de TG, a los 875.6, 974.7 y 724.5 cm^{-1} .

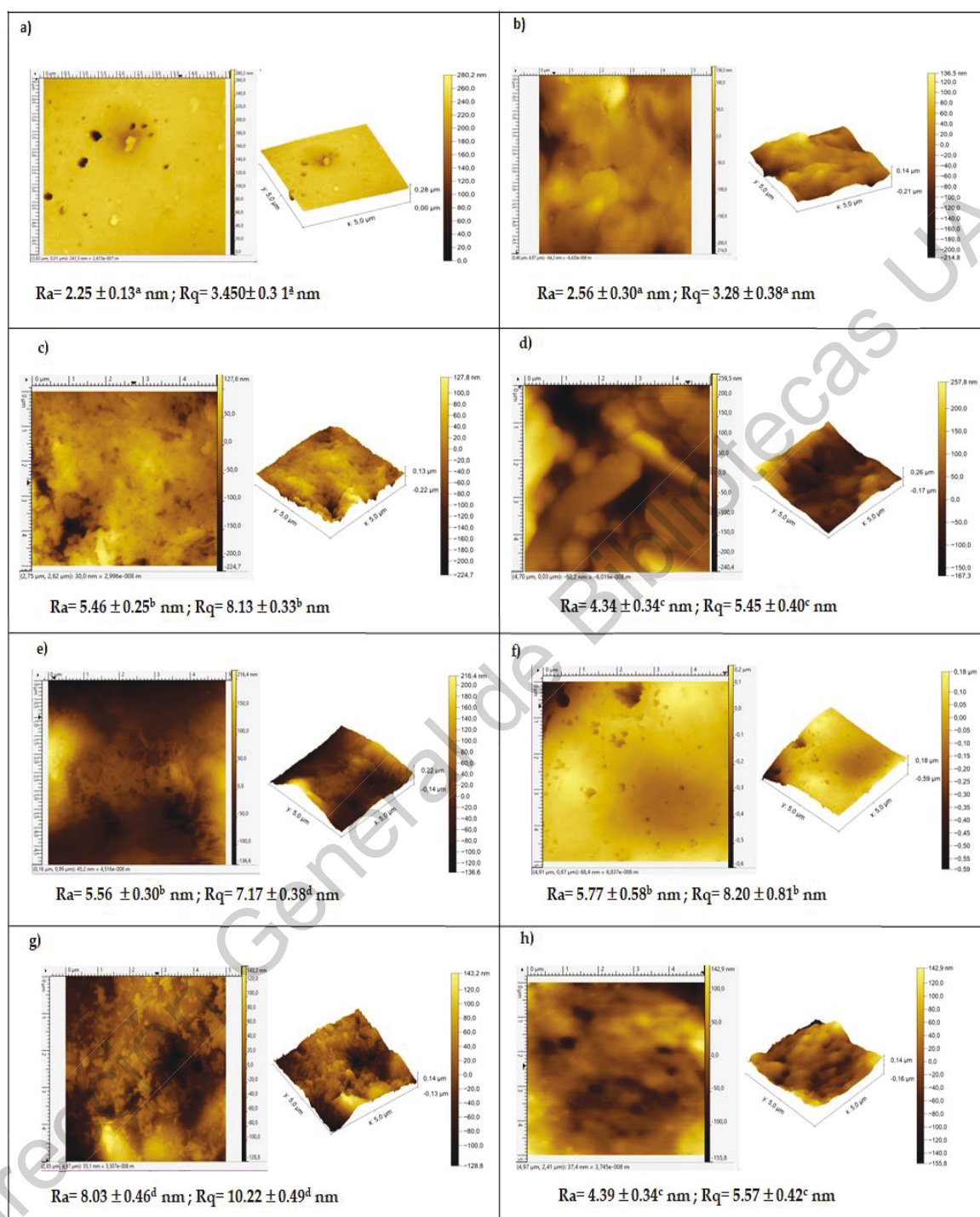


Figura 4. Micrografías AFM películas comestibles de quitosano-proteína de quinua. a) WQ, b) WQ+ TG, c) Q-WQ (1:10), d) Q-WQ (1:10) +TG, e) PQ, f) PQ +TG, g) Q-PQ (1:10), h) Q-PQ (1:10) +TG.

PQ, Quinua; *Pasankalla*; WQ, Quinoa *Willd* ; Q, Quitosano; TG, transglutaminasa. Letras diferentes en superíndice en el mismo parámetro indican valores significativamente diferentes ($p \leq 0.05$)

Comparando las Figuras 5a y 5d, la presencia de quitosano genera la supresión de tres picos a los 857.8, 940.1 y 478.2 cm^{-1} , por lo que se puede decir existe una interacción entre la proteína y el quitosano. De igual manera comparando los espectros de las Figura 5b y 5c, el quitosano inhibe las señales a los 742, 858.4 y 1176 cm^{-1} .

En la Figura 6, se muestran los espectros de las películas elaboradas con proteína de quinua de la variedad *WILLD*. las Figuras 6a y 6b muestran el efecto de la adición de TG en la proteína; la presencia de TG aumentó la intensidad de la señal a los 782 y 1319 cm^{-1} , la aparición de una señal a los 1617 cm^{-1} , así como la supresión del pico a los 546 cm^{-1} . Los espectros de la mezcla Q:WQ (1:10) en ausencia y presencia de TG se muestran en las Figuras 6c y 6d respectivamente, la adición de TG a la mezcla Q:WQ, generó 2 picos a los 646.4 y 701.6 cm^{-1} y un aumento de la señal a los 1319 cm^{-1} . Comparando los espectros sin TG (Figura 6a y 6c), se observa la supresión de 2 picos a los 474.2 y 546 cm^{-1} en presencia de quitosano, mientras que en las películas con TG, la adición de quitosano muestra dos señales nuevas a los 546.2 y 876.2 cm^{-1} . En base a los resultados se puede observar que la proteína de las dos variedades de quinua actúa de manera diferente tanto con el quitosano como con la TG, lo cual genera diferencias significativas en las propiedades físicas evaluadas en el presente trabajo (% solubilidad, permeabilidad al vapor de agua, rugosidad y sorción de agua).

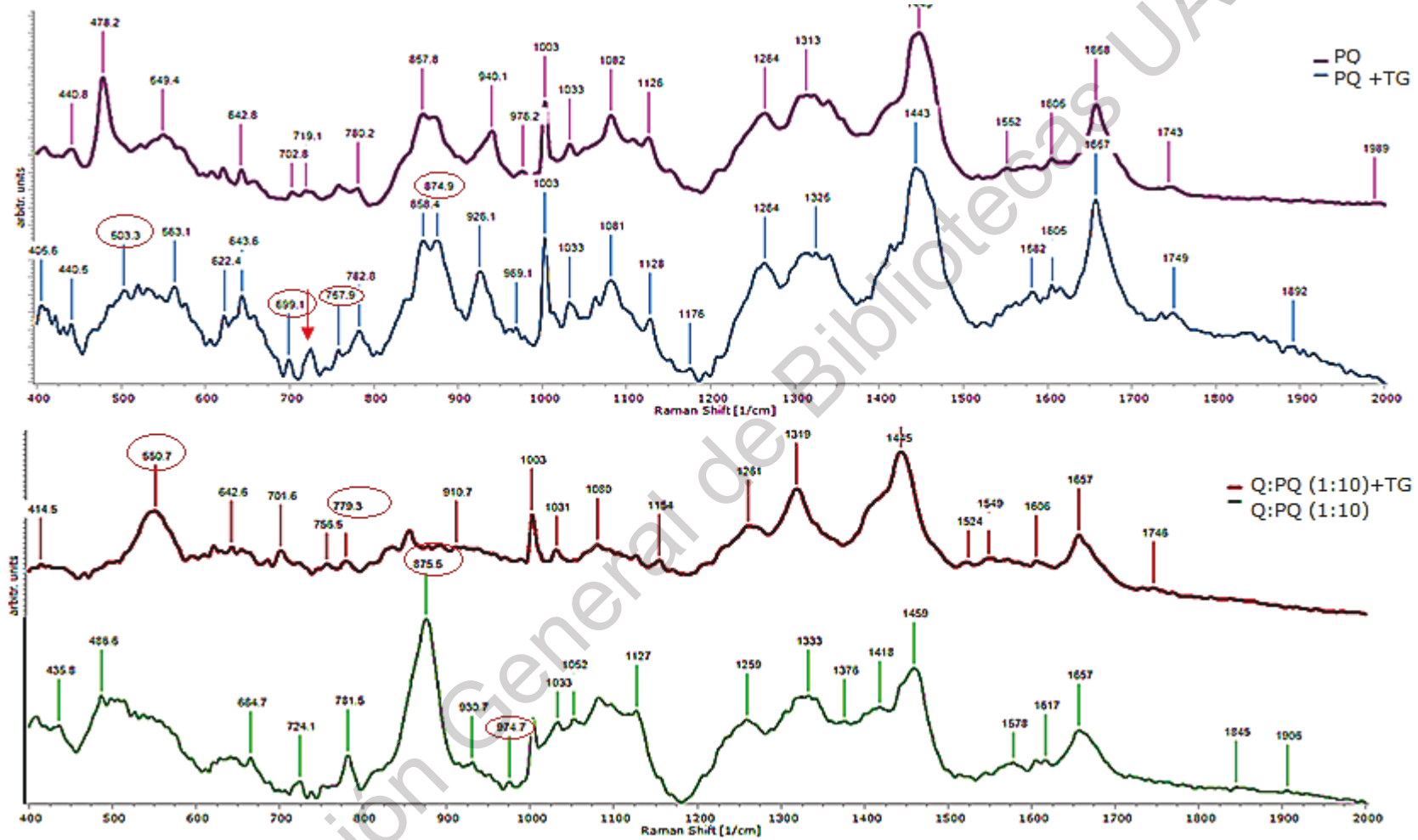


Figura 5. Espectrograma RAMAN de películas elaboradas con proteína de quinua *Pasankalla*. a) PQ y PQ+ TG; b) Q-PQ (1:10) y Q-PQ (1:10) + TG. PQ, Quinoa; *Pasankalla*; Q, Quitosano; TG, transglutaminasa

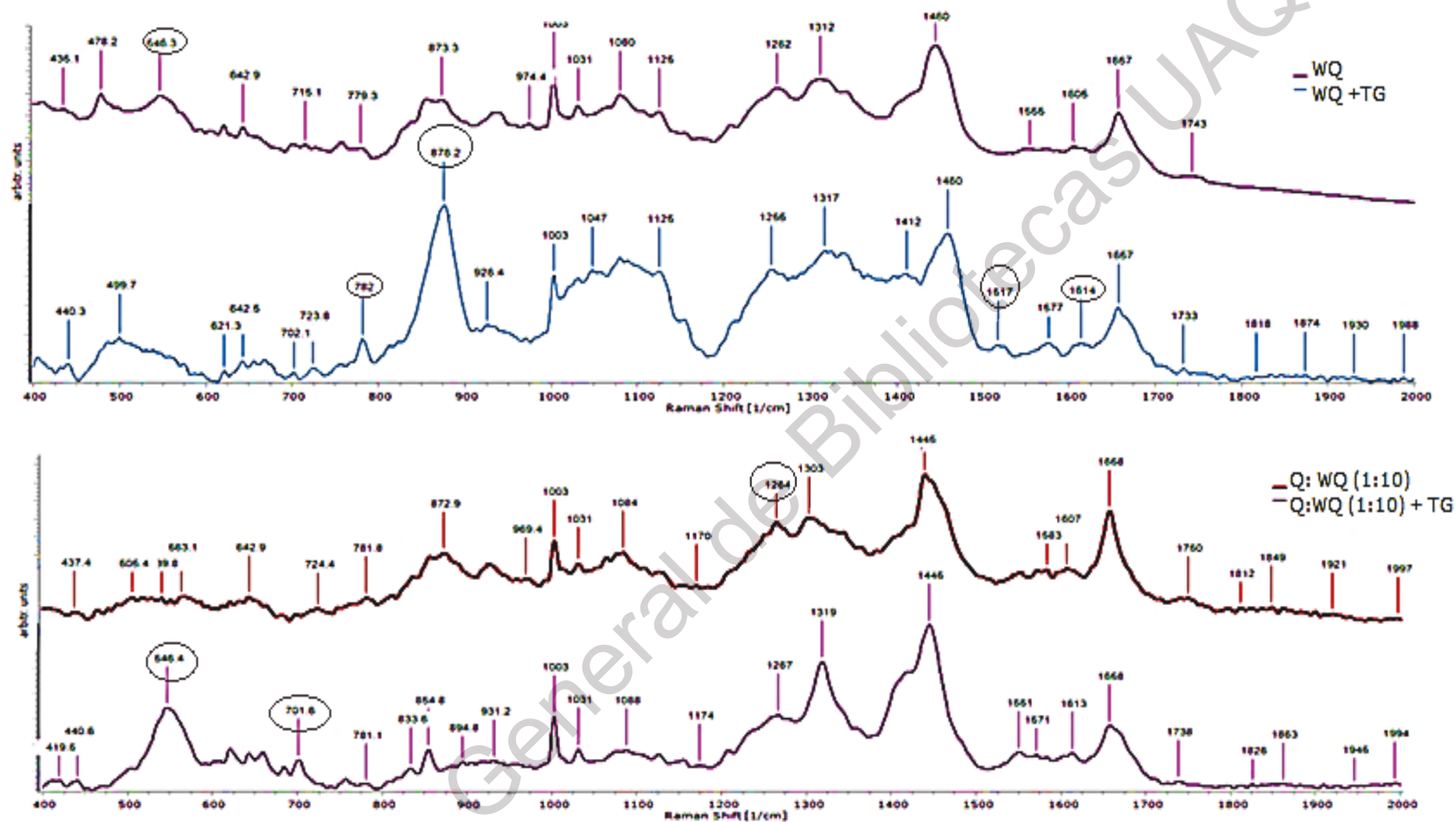


Figura 6. Espectrograma RAMAN de películas elaboradas con proteína de quinua *Willd* . a) WQ y WQ + TG; b) Q-WP (1:10) y Q-WQ (1:10) a) WQ y WQ+ TG; b) Q-WQ (1:10) y Q-W Q (1:10) + TG. WQ: *Willd* ; Q, Quitosano; TG, transglutaminasa

6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

6.1 Caracterización del aislado proteico

De acuerdo con lo reportado por (Pereira y col., 2019) las características nutrimentales y biológicas que expresa la semilla de quinua depende del ambiente en las que fueron cultivadas (presión atmosférica, clima, salinidad, entre otros). En el presente trabajo se utilizaron dos variedades diferentes de quinua, *Willd* y *Pasankalla* provenientes de Perú y Bolivia respectivamente. De los resultados obtenidos se puede observar que el contenido proteico obtenido de la variedad *Willd* es mayor que el de la variedad *Pasankalla* con un valor de 71.79 % de proteína, dichos valores son similares con lo reportado por otros autores para la misma variedad (74.3%- 76.3%) (Steffolani y col., 2016).

6.2 Electroforesis SDS-PAGE

Con la finalidad de identificar posibles cambios entre las dos variedades de proteína de quinua y el efecto de entrecruzamiento, se realizó electroforesis SDS-PAGE. Los resultados obtenidos muestran diferencias entre los perfiles proteicos de las dos variedades utilizadas. En la Figura 2, se observan para ambas variedades en presencia y ausencia de TG bandas características de las fracciones 7S y 11S de globulinas. Las fracciones proteicas que se encontraron para ambas variedades son la subunidad 11S básica de globulinas (28 kDa), 11S ácida (40.5 kDa), 7s de globulinas (43 kDa) y fracción 2S de albúminas (< 20 kDa), estos resultados coinciden con lo reportado por (Kaspchak y col., 2017), quienes encontraron en la proteína de quinua aislada péptidos de peso molecular de 59 kDa, 43 kDa, 35 kDa, 26 kDa, 24 kDa y 22 kDa, las cuales son características de subunidades ácidas y básicas de la globulina 11S de la quinua (Castellió y col., 2010). La variedad *Willd* mostró bandas de alto peso molecular >66 kDa que no se observaron en la variedad *Pasankalla*, además de encontrar claramente bandas de 58.4 y 40.5 KDa, las cuales son más intensas, y 3 bandas cercanas a los 29 KDa, siendo estas las que caracterizan a esta variedad (Steffolani y col., 2016).

Como se mencionó anteriormente, las dos variedades de quinua utilizadas presentan perfiles proteicos diferentes, dichas diferencias se reflejan en las propiedades físicas evaluadas en las películas comestibles. La adición TG en la película elaborada con WQ provoca la supresión de la fracción 11S conocida comúnmente como chenoponida, la cual es rica en glutamina/ácido glutámico, asparagina/ácido aspártico, arginina, serina, leucina y glicina y un contenido bajo de aminoácidos azufrados (metionina y cisteína) (Dakhili y col., 2019; Miravalles y O'Mahony, 2018), algunos estudios indican que dichas subunidades (11S ácidas y básicas) contienen aproximadamente entre 2.7% y 2.9% de lisina (Burrieza y col., 2019), por lo que la TG podría estar interaccionando con la glutamina y la lisina presente en dichas subunidades.

Los cambios que se observan en las bandas de peso molecular de ~50 kDa puede deberse a la interacción de la lisina con TG, las cuales varían de acuerdo a la variedad de la quinua utilizada, ya que la TG es una enzima capaz de formar enlaces peptídicos intramoleculares e intermoleculares en presencia del grupo ϵ -amino de los residuos de lisina (Cao y col., 2019), por lo que se observa el entrecruzamiento de las proteínas de quinua de las dos variedades con la TG. Un comportamiento similar fue observado por (Basman y col., 2002) quienes realizaron un entrecruzamiento de proteína de soya con TG observando que dicho entrecruzamiento afecta principalmente a las subunidades ácidas, ya que las subunidades básicas no son fácilmente accesibles para la TG.

6.3 Grado de entrecruzamiento

De acuerdo con los resultados obtenidos para las películas elaboradas con WQ, la presencia de TG induce un mayor entrecruzamiento en comparación a la película elaborada en ausencia de quitosano, un efecto contrario se observó con la variedad PQ. Se observó una disminución en el grado de entrecruzamiento en presencia de quitosano, estas variaciones dependen de la cantidad de aminos libres, los cuales a su vez dependen de las restricciones estéricas y conformacionales (AL-Hassan y Norziah, 2017). En la Figura 2 se observa la formación de polímeros de mayor peso

molecular al adicionar TG en la variedad PQ, los cuales no se forman con la variedad WQ, lo que indica una mayor reticulación con la variedad PQ, lo cual coincide con los valores de entrecruzamiento obtenidos.

6.4 Propiedades físicas

Los resultados obtenidos de PVA muestran que para las películas de proteína de quinua con quitosano disminuye cuando se realiza el entrecruzamiento con TG. La disminución de este parámetro es mayor para las películas Q:WQ, debido a que presentan un mayor entrecruzamiento. El entrecruzamiento con TG permite la formación de una red espacial reticulada, la cual disminuye el espacio intermolecular lo que inhibe el paso de las moléculas de agua (Cheng y col., 2019), por lo que entre mayor sea el porcentaje de entrecruzamiento mejor barrera a vapor de agua tendrá la película comestible.

A pesar de que el entrecruzamiento mejoró la propiedad de barrera a vapor de agua, la adición de quitosano tuvo el efecto contrario, probablemente ocasionado por el fenómeno de permeación que se da en las películas de quitosano, el cual consiste de dos etapas, adsorción y difusión, en la primera el agua es fácilmente absorbida en la matriz polimérica mediante grupos hidrofílicos libres de la estructura del quitosano, para luego difundirse; los grupos hidrofílicos del quitosano disminuyen al formarse enlaces covalente y/o de hidrógeno afectando la afinidad de la superficie de la película por las moléculas de agua mejorando así la difusión, es por ello que al aumentar la cantidad de proteína, se pueden estar formando enlaces de hidrógeno que permitan que la PVA disminuya (Tan y col., 2019)

Las películas elaboradas con WP y PQ presentaron los valores más altos de solubilidad, esto se debe principalmente al pH al que se elaboran las películas, ya que la solubilidad de la proteína depende de este, siendo a pH 11 donde el 90% de albúminas y el 50% de las globulinas alcanzan el máximo de solubilidad, a este pH la proteína se encuentra cargada negativamente debido a la ionización de los grupos carboxilo y la desprotonación de los grupos amina, lo cual también favorece la solubilidad (Dakhili y col., 2019). Sin embargo al adicionar el quitosano, la solubilidad

de la película disminuye, ya que el quitosano posee una naturaleza semicristalina, derivada principalmente de enlaces de hidrógeno inter e intramoleculares por lo que el quitosano es soluble en agua solo a $\text{pH} < 6$ (Qing-xi y col., 2014). Como se mencionó anteriormente, la solubilidad de las películas disminuye con la TG, sin embargo, dicha diferencia no es significativa en la mayoría de los casos; la disminución en la solubilidad de las películas se debe a la reducción del espacio intermolecular causado por el entrecruzamiento, lo cual inhibe la difusión de las moléculas de agua (Cheng y col., 2019).

Los resultados obtenidos muestran que las películas elaboradas con PQ son más solubles que las elaboradas con WQ, esto se debe a que las películas de PQ poseen una mayor cantidad de fracciones de bajo peso molecular, ya que de acuerdo a lo reportado por (AL-Hassan y Norziah, 2017), entre mayor sea la presencia de fracciones de bajo peso mayor solubilidad presentará la película.

6.5 Isoterma de adsorción

El contenido de humedad de la monocapa (X_m) nos indica la cantidad de moléculas de agua unidas a los sitios activos de la superficie del sustrato, X_m es considerado como el valor óptimo para asegurar la estabilidad del material del sustrato, a menor valor de X_m mayor estabilidad (Sk, Awasthi y col., 2017). Los valores más pequeños de X_m lo presentaron las películas elaboradas con WQ por lo que se considerarían estas películas más estables en comparación a las elaboradas con PQ. Es importante destacar que la estabilidad de las películas elaboradas con PQ, disminuye al adicionar quitosano, mientras que para películas elaboradas con WQ aumenta, el fenómeno contrario se observa con el entrecruzamiento, ya que al adicionar TG la estabilidad de las películas de PQ aumentó mientras que las de WQ disminuyó, esto se debe a las diferentes interacciones que se llevan a cabo entre los diferentes componentes, ya que podrían disminuir la cantidad de grupos polares y a su vez, la cantidad de sitios activos en la superficie de la película (Aguirre-Loredo y col., 2017).

El valor de la constante C se puede observar que es mayor para las películas sin

quitosano y aumenta con el entrecruzamiento, excepto para la película de WQ, esta constante representa la energía relacionada con la diferencia de potencial químico de las moléculas adsorbidas en la monocapa y las capas de adsorción superiores (Phan y col., 2005) El alto valor de esta constante de energía demuestra que las moléculas de agua se adsorben más fuertemente en los sitios activos de la matriz (Saberri y col., 2015), por lo que se puede observar que dependiendo de la variedad de la proteína utilizada el quitosano y la TG ocupan diferentes sitios activos, lo cual se ve reflejado con los parámetros obtenidos de las curvas de adsorción.

El valor de K proporciona una medida de la interacción de las moléculas en la multicapa con el adsorbente, y tiende a caer entre el valor de energía de las moléculas en la monocapa y el del agua líquida (Shih y col., 2011), para ambas variedades, el entrecruzamiento no presentó cambios significativos por la interacción entre las multicapas de las moléculas de agua; sin embargo, esta interacción disminuyó en presencia del quitosano, debido a las interacciones entre la proteína y el quitosano, lo cual podría estar disminuyendo la cantidad de grupo hidrófilos y por lo tanto la adsorción.

6.6 Hidrólisis proteolítica

En esta prueba se llevó a cabo una simulación de la digestión de las películas, de acuerdo con los resultados obtenidos se observa que las películas después de someterlas al fluido gástrico, no son digeridas completamente, sin embargo, después de la hidrólisis con el fluido duodenal simulado éstas han sido digeridas por completo.

Algunos autores han reportado que a pH alto ($\text{pH} > 8$), el grado de desnaturalización de la proteína es alto, rompiendo enlaces disulfuro provocando que la estructura terciaria de la proteína se desestabilice, por lo que las condiciones de temperatura ($90\text{ }^{\circ}\text{C}$) y pH (11) a las que se elabora las películas provoquen un cambio en dicha estructura dejando expuestos aminoácidos sensibles a la hidrólisis enzimática duodenal (Giosafatto y col., 2014) (Mäkinen y col., 2015) (Deleu y col., 2019).

Al finalizar la hidrólisis gástrica se puede observar que las bandas que representan

los pesos moleculares >66 kDa desaparecen, al mismo tiempo las bandas entre los 20.1 y 30 kDa se intensifican, al someter las películas a la pepsina, la cual hidroliza enlaces peptídicos ocasionando que las moléculas más grandes se convierten gradualmente en péptidos más pequeños (Opazo-Navarrete y col., 2018)

6.7 Microscopía de fuerza atómica (AFM)

De las micrografías obtenidas se puede observar que las películas elaboradas con PQ y WQ poseen una superficie lisa que coincide con lo reportado por otros autores (Opazo-Navarrete y col., 2018) (Ruiz y col., 2016). Bajo las condiciones de temperatura y pH en las que se realizaron las películas la cantidad de agregados proteicos es baja, además de que se generan matrices homogéneas. Como se mencionó anteriormente, la adición de TG en las películas de quitosano con proteína permitió que el valor de rugosidad disminuyera significativamente para ambas variedades; esto concuerda con lo reportado por (Giosafatto y col., 2014), quienes observaron que la rugosidad de películas elaboradas con faseolina disminuyó en presencia de TG. El entrecruzamiento realizado permite disminuir los espacios intramoleculares de la proteína generando superficies más lisas.

La adición de Q a las películas de PQ y WQ, generó mayor rugosidad. Nie y col. 2016, reportan que el quitosano en condiciones alcalinas tiende a formar agregados debido a que se llegan a formar enlaces por puente de hidrogeno inter e intramoleculares del propio quitosano en lugar de formar una interacción efectiva con PQ, lo cual podría estar generando superficies más rugosas.

6.8 Espectroscopia Raman

En los espectros Raman de la variedad PQ, se observa la supresión de picos a los 974.4, 875.6 y 940 cm^{-1} en presencia TG, estas señales son características de la lisina (Zhu y col., 2011), la supresión de estos picos podría ser un indicativo de la interacción con TG. El entrecruzamiento con TG se lleva a cabo con los grupos carboxilo de residuos de glutamina y grupos amino de lisina en sustratos proteicos (Soares y col., 2004). Para la variedad WQ se pueden observar interacciones con

lisina, ya que en presencia de TG desaparecen la señales características de este aminoácido (975 y 1080 cm^{-1})(Zhu y col., 2011). Para ambas variedades se observa que las señales entre 1600 y 1700 cm^{-1} se intensifican; según Kang y col. (2017), estos cambios pueden estar relacionados con el aumento de puentes de hidrógeno, en donde se da un cambio que afecta la estructura α -hélice de la proteína.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

7. CONCLUSIONES

La variedad de quinua utilizada en la producción de películas comestibles tiene un efecto significativo en sus propiedades físicas (% de solubilidad, permeabilidad al vapor de agua, aspereza y sorpresa). La reticulación con TG permite mejorar las propiedades de las películas comestibles, sin embargo, las interacciones entre la variedad de quinua utilizada en la producción de películas comestibles tienen un efecto significativo en sus propiedades físicas (% de solubilidad, permeabilidad al vapor de agua, rugosidad y adsorción). La reticulación con TG permite mejorar las propiedades de las películas comestibles, sin embargo, las interacciones entre proteínas y TG dependen de la fuente de proteínas y de su perfil de proteínas. Las películas con reticulación más grande mostraron la mejoría más alta en las propiedades físicas evaluadas. TG y la proteína de ambas variedades de quinua interactuaron principalmente con el residuo de lisina de la proteína.

8. REFERENCIAS

AACC International Approved Methods - AACC Method 46-10.01. Crude protein - improved Kjeldahl method. Recuperado 19 de abril de 2018, a partir de <http://methods.aaccnet.org/summaries/46-10-01.aspx>

Abugoch E, Tapia C, Villamán C, Yazdani-Pedram M, Díaz-Dosque, M. Characterization of quinoa protein–chitosan blend edible films. *Food Hydrocolloid*, **2011**;25:879-886.

Aguirre-Loredo R, Rodríguez-Hernández A y Velázquez G. Modelling the effect of temperature on the water sorption isotherms of chitosan films. *Ciencia Tecnol Alimentos*, **2017**;37:112-118.

Ahmed I, Lin H, Zou L, Brody A L, Li Z, Qazi I M, Lv L. A comprehensive review on the application of active packaging technologies to muscle foods. *Food Control*, **2017**;82:163-178.

AL-Hassan A, Norziah M. H. Effect of transglutaminase induced crosslinking on the properties of starch/gelatin films. *Food Pack Shelf Life*, **2017**;13:15-19.

Alonso-Miravalles L y O'Mahony J. Composition, Protein Profile and Rheological Properties of Pseudocereal-Based Protein-Rich Ingredients. Basel, Suiza: *Foods*, **2018**;7:73.

Alvarado-Gonzalez S, Chanona-Pérez J, Welti-Chanes S, Calderon-Dominguez G, Arzate-Vázquez I, Pacheco-Alcalá U. Optical microstructural functional and nanomechanical properties of Aloe vera gel/gellan gum edible films. *Rev Mex Ing Quim*, **2012**;11:193-210.

Arnon-Rips H, Poverenov E. Improving food products quality and storability by using Layer by Layer edible coatings. *Trends Food Sci Technol*, **2018**;75:81-92.

Azeredo C, Waldron W. Crosslinking in polysaccharide and protein films and coatings for food contact – A review. *Trends Food Sci Technol*, **2016**;52:52-55.

Barreiro J, Seselovsky F. Usos de la transglutaminasa en la industria alimentaria. Elaboración de carne reconstituida. Invenio [Serie en internet] **2003** [consultado: 2018 mayo 11]; 6(10): [aprox. 3pp]. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=87761011>> ISSN 0329-3475

Basman A, Köksel H, y Ng P. Effects of increasing levels of transglutaminase on the rheological properties and bread quality characteristics of two wheat flours. *Eur Food*

Res Technol, **2002**;215:419-424

Bautista-Baños S, Hernández-Lauzardo N, Velázquez del Valle G, Bosquez-Molina E, Sánchez-Domínguez D. Quitosano: Una alternativa natural para reducir microorganismos postcosecha y mantener la vida de anaquel de productos hortofrutícolas. *Rev Iberoam Tecnol Postcosecha*, **2005**;7:1-6.

Brinegar C, Sine B, Nwokocha L. High-cysteine 2S seedstorage proteins from quinoa (*Chenopodium quinoa*). *J Agric Food Chem*, **1996**;44:1621–1623

Brunelle L, Green R. Chapter Twelve - One-dimensional SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (1D SDS-PAGE). En J. Lorsch (Ed.), *Methods in Enzymology* (Vol. 541, pp. 151-159). Academic Press. **2014**;527-535.

Burrieza H, Rizzo A, Moura Vale E, Silveira V, y Maldonado S. Shotgun proteomic analysis of quinoa seeds reveals novel lysine-rich seed storage globulins. *Food Chem*, **2019**;293:299-306.

Cao H, Jiao X, Fan D, Huang J, Zhao J, Yan B, Zhang H. Catalytic effect of transglutaminase mediated by myofibrillar protein crosslinking under microwave irradiation. *Food Chem*, **2019**;284:45-52.

Castelli3n M, Matiacevich S, Buera P, y Maldonado S. Protein deterioration and longevity of quinoa seeds during long-term storage. *Food Chem*, **2010**;121:952-958.

Chang H, Lin V, Wu J, Tsai J. pH Effects on solubility, zeta potential, and correlation between antibacterial activity and molecular weight of chitosan. *Carbohydr Polym*, **2015**;134:74-81.

Cheng S, Wang W, Li Y, Gao G, Zhang K, Zhou J, y Wu Z. Cross-linking and film-forming properties of transglutaminase-modified collagen fibers tailored by denaturation temperature. *Food Chem*, **2019**;271:527-535.

Choi, C., Nam, J.-P., y Nah, J.-W. Application of chitosan and chitosan derivatives as biomaterials. *J Ind Eng Chem*, **2016**;33:1-10.

Dakhili S, Abdolalizadeh L, Hosseini S, Shojaee-Aliabadi S, y Mirmoghtadaie L. Quinoa protein: Composition, structure and functional properties. *Food Chem*, **2019**; 299:1-10.

Deleu L, Lambrecht M, Vondel J, y Delcour J. The impact of alkaline conditions on storage proteins of cereals and pseudo-cereals. *Curr Opin Food Sci*, **2019**;25:98-103.

Di Pierro P, Chico B, Damiao A, Villalonga R, Masi P, Mariniello L, Porta R. Chitosan-Whey Protein edible films produced in the absence or presence of transglutaminase: Analysis of their mechanical and barrier properties. *Biomacromolecules*, **2006**;7:744-749

Dominguez-Courtney M, Jimenez- Munguia. Peliculas comestibles formuladas con polisacaridos: propiedades y aplicaciones. *Temas selec Ing alimentos*, **2012**;6:110-112.

Elsabee Z, Abdou S. Chitosan based edible films and coatings: A review. *Mater Sci Eng*, **2013**;33:1819-1841.

Elsahaimy A, Refaay M, Zaytoun M. Physicochemical and functional properties of quinoa protein isolate. *Ann Agr Sci*. **2015**;60:297-305.

Escamilla-García M, Calderón-Domínguez G, Chanona-Pérez J, Farrera-Rebollo R, Andraca-Adame A, Arzate-Vázquez I, Moreno-Ruiz A. Physical and structural characterisation of zein and chitosan edible films using nanotechnology tools. *Int J Biol Macromol*. **2013**;61:196-203.

Escamilla-García M, Calderón-Domínguez G, Chanona-Pérez J, Mendoza-Madrigal G, Di Pierro P, García-Almendárez B, Regalado-González C. Physical, Structural, barrier, and antifungal characterization of chitosan–zein edible films with added essential oils. *Int J Mol Sci*, **2017**;18:2370.

Escamilla-García M, Reyes-Basurto A, García-Almendárez B, Hernández-Hernández E, Calderón-Domínguez G, Rossi-Márquez G, Regalado-González C. modified starch-chitosan edible films: physicochemical and mechanical characterization. *Coatings*, **2017**;7:224.

Falguera V, Quintero P, Jiménez A, Muñoz A, Ibarz A. Edible films and coatings: Structures, active functions and trends in their use. *Trends Food Sci Technol*, **2011**; 22:292-303.

FAO. I Curso Regional de Capacitación (Santiago de Chile, 20/9-8/10/1993). Documento preparado por el proyecto gcp/rla/102/ita “apoyo a las actividades regionales de acuicultura en América latina y el Caribe”—AQUILA II. **1994**;16:80-82

Garavand F, Rouhi M, Razavi H, Cacciotti I, Mohammadi R. Improving the integrity of natural biopolymer films used in food packaging by crosslinking approach: A review. *Int J Biol Macromol*. **2017**;104:687-707.

Giosafatto L, Di Pierro P, Gunning P, Mackie A, Porta R, Mariniello L.

Characterization of Citrus pectin edible films containing transglutaminase-modified phaseolin. *Carbohydr Polym*, **2014**;106:200-208.

Gwyddion – Free SPM (AFM, SNOM/NSOM, STM, MFM, ...) data analysis software. (s. f.). Recuperado 12 de abril de **2019**, de <http://gwyddion.net/>

Hassan B, Chatha S, Hussain I, Zia M, Akhtar N. Recent advances on polysaccharides, lipids and protein based edible films and coatings: A review. *Int J Biol Macromol*, **2018**;1095-1107.

Hoffee A. Variability of water vapor transmission rates of extruded polystyrene using ASTM E 96-80 (desiccant method). En: Water vapor transmission through building materials and systems: mechanisms and measurement. Ed. H. Trechsel y M. Bomberg. West Conshohocken, PA. ASTM International. **1989**

Jost V, Kobsik K, Schmid M, Noller K. Influence of plasticizer on the barrier, mechanical and grease resistance properties of alginate cast films. *Carbohydr Polym*, **2014**;110:309-319.

Kang Z, Li X, y Ma H. Effect of the levels of transglutaminase in frankfurters: A physical–chemical and Raman spectroscopy study. *CyTA J Food*, **2017**;15:75-80.

Kaspchak E, Oliveira M, Simas F, Franco C, Silveira, J, Mafra M, & Igarashi-Mafra L. Determination of heat-set gelation capacity of a quinoa protein isolate (*Chenopodium quinoa*) by dynamic oscillatory rheological analysis. *Food Chem*, **2007**;232:263-271.

Kong M, Chen G, Xing K, Park J. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. The 16th CBL (Club des Bactéries Lactiques) Symposium, May 2009, Toulouse, France. **2010**;144:51-63.

Li G, Zhu F. Quinoa starch: Structure, properties, and applications. *Carbohydr Polym*, **2018**;181:851-861.

Mäkinen O, Zannini E, y Arendt E. Modifying the Cold Gelation Properties of Quinoa Protein Isolate: Influence of Heat-Denaturation pH in the Alkaline Range. *Plant Foods Hum Nutr*, **2015**;70:250–256.

Mayachiew P, Devahastin S. Comparative evaluation of physical properties of edible chitosan films prepared by different drying methods. *Drying Technol*, **2008**; 26:176-185.

Menges F. (s. f.). Spectragryph - optical spectroscopy software. Recuperado 4 de mayo de 2018, a partir de <http://spectragryph.com/>

Mkandawire M, Aryee N. Resurfacing and modernization of edible packaging material technology. *Food Chem and Biochemistry, Food Bioprocessing*, **2018**;19:104-112.

Monogioudi E, Faccio G, Lille M, Poutanen K, Buchert J, y Mattinen M. Effect of enzymatic cross-linking of β -casein on proteolysis by pepsin. *Food Hydrocolloid*, **2011**;25:71–81.

Montaño E, Ávila D, Guevara J. Componente nutricional de diferentes variedades de quinua de la región Andina. *Avances de Investigación en Ingeniería*, **2006**;5:86–97.

Morris J. Atomic force microscopy (AFM) and related tools for the imaging of foods and beverages on the nanoscale A2 - Huang, Qingrong. En *Nanotechnology in the Food, Beverage and Nutraceutical Industries*. Woodhead Publishing. **2012**:99-148

Muxika A, Etxabide A, Uranga J, Guerrero P, De la Caba K. Chitosan as a bioactive polymer: Processing, properties and applications. *Functional and bioactive biopolymers from sea products and by-products*. **2017**;105:1358-1368.

Navruz-Varli S, Sanlier N. Nutritional and health benefits of quinoa (*Chenopodium quinoa Willd.*). *J Cereal Sci*. **2016**;69:371-376.

Nie J, Wang Z y Hu Q. Difference between Chitosan Hydrogels via Alkaline and Acidic Solvent Systems. *Scientific Reports*, **2016**;6: 36-53.

No H, Meyers P, Prinyawiwatkul W, Xu Z. Applications of chitosan for improvement of quality and shelf life of foods: A Review. *J Food Sci*, **2007**;72:87-100.

Osés J, Fernández-Pan I, Mendoza M, Maté I. Stability of the mechanical properties of edible films based on whey protein isolate during storage at different relative humidity. *Food Hydrocolloid*, **2009**;23:125-131.

Opazo-Navarrete M, Schutyser M, Boom R y Janssen A. Effect of pre-treatment on in vitro gastric digestion of quinoa protein (*Chenopodium quinoa Willd.*) obtained by wet and dry fractionation. *Int J Food Sci Nutr*, **2018**;69:1-11.

Pereira E, Encina-Zelada C, Barros L, Gonzales-Barron U, Cadavez V, & C.F.R. Ferreira I. Chemical and nutritional characterization of *Chenopodium quinoa Willd* (quinoa) grains: A good alternative to nutritious food. *Food Chem*, **2019**;280:110–114.

Phan T, Debeaufort F, Luu D, & Voilley A. Functional properties of edible agar based and starch-based films for food quality preservation. *J Agric Food Chem*, **2005**;53:973-981

Porta R, Di Pierro P, Rossi-Marquez G, Mariniello L, Kadivar M, & Arabestani A. Microstructure and properties of bitter vetch (*Vicia ervilia*) protein films reinforced by microbial transglutaminase. *Food Hydrocolloid*, **2015**;50:102–107.

Quin-Xi W, Dong-Qiang L, Shan-Jing Y. Design of Chitosan and Its WaterSoluble Derivatives-Based Drug Carriers with Polyelectrolyte Complexes. *Mar. Drugs* **2014**; 12:6236-6253

Romano A, Giosafatto L, Di Pierro P, Romano R, Masi P, Mariniello L. In vitro gastrointestinal digestion study of a novel bio-tofu with special emphasis on the impact of microbial transglutaminase. *Food Res Int*, **2016**;4:14

Rossi Marquez G, Di Pierro P, Esposito M, Mariniello L, Porta R. Application of Transglutaminase-Crosslinked Whey Protein/Pectin Films as Water Barrier Coatings in Fried and Baked Foods. *Food Bioprocess Technol*, **2013**;7:447–455.

Ruiz G, Xiao W, van Boekel M, Minor M, Stieger M. Effect of extraction pH on heat-induced aggregation, gelation and microstructure of protein isolate from quinoa (*Chenopodium quinoa Willd*). *Food Chem*, **2016**;209:203-210.

Saberi B, Vuong Q, Chockchaisawasdee S, Golding J, Scarlett C, & Stathopoulos C. Water Sorption Isotherm of Pea Starch Edible Films and Prediction Models. *Foods (Basel, Switzerland)*, **2015**;5:1-7.

Santacruz S. Edible films based on starch and chitosan. Effect of starch source and concentration, plasticizer, surfactant's hydrophobic tail and mechanical treatment. *Food Hydrocolloid*, **2015**;49:89-94.

Shani C, Alvito P, Andrés A, Assunção R, Reyes S, Bourlieu C, Brodkorb A, Cilla A, Deglarie A, Denis S, Dupont D, Heredia A, Karakaya S, Giosaffato V, Mariniello L, Martins C, Ménard O, Nehir S, Vegarud G, Ulleberg E, Lesmes U. Extending in vitro digestion models to specific human populations: Perspectives, practical tools and bio-relevant information. *Trends Food Sci Technol*, **2016**;61:139-147

Sharma L, & Singh C. Sesame protein based edible films: Development and characterization. *Food Hydrocolloid*, **2016**;61:139-147.

Shih F, Daigle K, & Champagne E. Effect of rice wax on water vapour permeability and sorption properties of edible pullulan films. *Food Chem*, **2011**;127:118-121.

Shotornvit R y Krochta J. Water vapor permeability and solubility of films from hydrolyzed whey protein. *J Food Sci*, **2000**;65:700-703

Sk B, Awasthi S, Utiye Ka, & Mishra B. Investigation of Moisture Sorption Properties of Gelatin/Poly (Aniline)/Films. *SOJ Mat Sci Eng*, **2017**;5:1-6.

Soares L, Albuquerque P, Assmann F y Ayub M. Physicochemical properties of three food proteins treated with transglutaminase. *Ciencia Rural*, **2004**;34:1219-1223.

Soo Y, Sarbon M. Preparation and characterization of edible chicken skin gelatin film incorporated with rice flour. *Food Pack Shelf Life*, **2018**;15:1-8.

Steffolani M, Villacorta P, Morales-Soriano E, Repo-Carrasco R, Leon A, Perez G. Physicochemical and Functional Characterization of Protein Isolated from Different Quinoa Varieties (*Chenopodium quinoa Willd*). *Cereal Chem*, **2016**;93:275–281.

Tan W, Dong F, Zhang J, Zhao X, Li Q, & Guo Z. Physical and Antioxidant Properties of Edible Chitosan Ascorbate Films. *J Agric Food Chem*, **2019**;67:2530-2539.

Tavassoli-Kafrani E, Shekarchizadeh H, Masoudpour-Behabadi M. Development of edible films and coatings from alginates and carrageenans. *Carbohydr Polym*, **2016**; 137:360-374.

Valenzuela C, Abugoch L, Tapia C. Quinoa protein–chitosan–sunflower oil edible film: Mechanical, barrier and structural properties. *LWT Food Sci Technol*, **2013**;50:531-537.

Valenzuela C, Tapia C, López L, Bunger A, Escalona V, y Abugoch L. Effect of edible quinoa protein-chitosan based films on refrigerated strawberry (*Fragaria × ananassa*) quality. *Electron J Biotechnol*, **2015**;18:406-411.

Vilcacundo R, Hernández-Ledesma B. Nutritional and biological value of quinoa (*Chenopodium quinoa Willd.*). *Current Opinion Food Sci*, **2017**;14:1-6.

Wihodo M, Moraru I. Physical and chemical methods used to enhance the structure and mechanical properties of protein films: A review. *J Food Eng*, **2013**;114:292-302.

Yuan G, Chen X, Li D. Chitosan films and coatings containing essential oils: The antioxidant and antimicrobial activity, and application in food systems. *Food Res Int*, **2016**;89:117-128.

Zhu G, Zhu X, Fan Q y Wan X. Raman spectra of amino acids and their aqueous solutions. *Spectrochim Acta, Part A*, **2011**;78:1187-1195.