

Obtención, caracterización e inmovilización de las proteínas de reserva de la semilla de apio (*Apium graveolens*)

K. G. Rodríguez-Barboza¹, S. J. Almanza-González¹, F. L. M. Herrera-Castillo², J. A. Gómez-Salazar^{1,2}, J. E. Barboza-Corona^{1,2}, M. C. Del Rincón-Castro^{1,2}, M. F. León-Galván^{1,2} y E. Mares-Mares^{1,2}

¹Departamento de Alimentos, ²Posgrado en Biociencias. División de Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca, Universidad de Guanajuato, Carretera Irapuato-Silao km 9, Irapuato, Gto., C.P. 36500.

e.maresmares@ugto.mx

RESUMEN:

La semilla de apio tiene propiedades como diurética, antioxidante, antiespasmódica, sin embargo no existen reportes que pongan en evidencia su potencial atribuido a péptidos bioactivos, los cuales se pueden encontrar en sus proteínas de reserva. Sin embargo para mantener su potencial debido a su inestabilidad fisicoquímica se requieren sistemas de inmovilización o encapsulación mediante el uso de polímeros. En este trabajo se obtuvieron las proteínas de reserva de la semilla de acuerdo a su solubilidad (albuminas, globulinas, prolaminas y glutelinas); Se cuantificaron y se caracterizaron en geles SDS-PAGE y se deshidrataron (secado por aspersión) a 100, 110 y 120°C para su concentración. Para su inmovilización, cada fracción se solubilizo en PBS pH 7.5, se mezcló con alginato de sodio y por goteo se gelificaron en CaCl₂ a 0.1, 0.5 y 1M, finalmente se evaluó su perfil de liberación en jugos gastrointestinales. Como resultados, las albuminas es la fracción mayoritaria, las fracciones mostraron similitud en el perfil electroforético en las bandas de 33, 30, 15kDa, y este no se afectó durante el secado. Se obtuvo una mayor esfericidad de las capsulas a una concentración de 1M, la mayor liberación de proteínas (Albuminas 150ug/mL) en jugos intestinales y gástricos fueron a los 15 y 30 minutos respectivamente.

ABSTRACT:

Celery's seed have diuretics, antioxidants and antispasmodic properties, however there are no reports that show their potential attributed to bioactive peptides which can be found in their reserve proteins. Nevertheless, to maintain their potential due to their physicochemical instability, systems of immobilization or encapsulation are required through the use of polymers. In this work seed's storage proteins were obtained according to their solubility (albumins, globulins, prolamins and glutelins); they were quantified and characterized on SDS-PAGE gels and dehydrated (spray-dried) at 100, 110 and 120 ° C to concentrate them. For their immobilization, each fraction was solubilised in PBS at pH 7.5, mixed with sodium alginate and dripped in CaCl₂ at 0.1, 0.5 and 1M, finally their release profile in gastrointestinal juices was evaluated. As results, albumins are the majority fraction, the fractions showed similarity in the 33, 30, 15kDa bands in the electrophoretic profile, and this was not affected during drying. Greater sphericity of the capsules was obtained at a concentration of 1M, the highest release of proteins (albumin 150ug/mL) in intestinal and gastric juices were at 15 and 30 minutes respectively.

Palabras clave Apio, Proteínas de Reserva, Encapsulación.

INTRODUCCIÓN

En la última década del siglo XX comenzaron a desarrollarse nuevos conceptos en nutrición, como fruto de nuevos estilos de vida y la preocupación por elevar la calidad de vida de los individuos. La interrelación de disciplinas como la Biología Molecular, la Biotecnología, la Informática, entre otras, con la Nutrición, permite a las industrias alimentarias el desarrollo de nuevos productos con funciones adicionales a las del alimento original (De las Cagigas y Blanco 2002), uno de los métodos para aumentar el valor nutricional de un alimento es la encapsulación de compuestos bioactivos. Entre la gran variedad de técnicas de encapsulación se encuentran: el secado por atomización, la atomización por congelamiento o enfriamiento, la extrusión, la fluidización en lecho, la inclusión en liposomas, la polimerización interfacial y la inclusión molecular (Madene *et al.*, 2006; Lakkis, 2007). A pesar de existir una gran variedad de métodos el más usado por costos y por aplicación es el secado por atomización. Tomando en cuenta estos aspectos y buscando una nueva alternativa de alimento funcional que ayude a mejorar la nutrición en la población se ha seleccionado la semilla de Apio (*Apium graveolens*) para su análisis proteico e inmovilización o también llamado encapsulación de sus compuestos en una matriz de alginato de calcio.

Antecedentes: El apio es una planta herbácea bianual, de hasta 50 cm de altura, con tallo hueco, acanalado, succulento, con surcos externos o estrías profundas. Hojas lobuladas, lisas, brillantes, verde amarillosas. Flores blancas o blanco verdosas reunidas en umbelas. Frutos planoconvexos a esféricos estriados, oscuros, acanalados, aromáticos (Fonnegra, R., & Jiménez, L. 2007). Las semillas del apio son ricas en aceite esencial (hasta un 3%) constituidas principalmente por d-limoneno (60%), apiol, ácido linoleico, ácido oleico, ácido palmítico, ácido petroselinico, se ha detectado la presencia de alcaloides (no identificados) en las semillas (Fonnegra, R., & Jiménez, L. 2007). Existen estudios en animales que constatan el efecto diurético y antiespasmódico de los frutos de apio, pero aún no se encuentra suficientemente demostrada su efectividad y seguridad en personas. Es diurético y carminativo. Se ha demostrado que el extracto acuoso disminuye la artritis en ratas. Es hipotensor en animales y humanos (Fonnegra, R., & Jiménez, L. 2007). La actividad biológica de los alimentos de origen vegetal se puede atribuir a la presencia de compuestos bioactivos como los extractos fenólicos y péptidos bioactivos (secuencia de aminoácidos de 3 a 45 residuos), estos últimos se encuentran encriptados en proteínas de reserva y requieren de un tratamiento enzimático o químico para su liberación (Torruco-Uco, 2008).

Osborne (1924) clasificó a las proteínas de reserva de acuerdo a su solubilidad en cuatro tipos de fracciones: a) Albúminas, solubles en agua y en soluciones salinas diluidas b) Globulinas, generalmente insolubles en agua pero solubles en soluciones salinas diluidas; c) Prolaminas, estas proteínas son solubles en etanol 50-80% y d) Glutelinas, que se caracterizan por ser solubles en medio ácido o alcalino. Sin embargo, las proteínas y/o péptidos como agentes terapéuticos, presentan algunas limitaciones, por ejemplo su inestabilidad físico-química en algunos fluidos corporales (ej.: en la saliva y los jugos gástricos) lo cual limita el uso de algunas rutas de administración (vía oral). Debido a las limitaciones mencionadas se trabaja en la búsqueda de nuevos sistemas de administración que permitan aprovechar su potencial terapéutico. Uno de los sistemas que se han aplicado con mayor éxito a los péptidos y proteínas son: los basados en la inmovilización o encapsulación de las moléculas en sistemas lipídicos o poliméricos. Actualmente no existen reportes que exploren las propiedades bioquímicas de la semilla de apio a nivel proteico, por tal motivo el objetivo de la presente investigación es obtener, caracterizar e inmovilizar o encapsular las proteínas de reserva de la semilla de apio en una matriz de alginato de sodio, concentrándolas mediante secado por aspersion para evaluar su estabilidad y potencial biológico ante condiciones gastrointestinales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Biológico. Las semillas de apio (*Apium graveolens*), fueron adquiridas por el INIFAP, Bajío en la Ciudad de Celaya Gto., para el análisis, las semillas se molieron y desgrasaron utilizando el método de la AOAC (920.39). Posteriormente la harina obtenida libre de grasa a temperatura se hizo pasar por una malla de No.100. La harina de la semilla de apio se almacena a 4°C durante el análisis.

Análisis químico proximal. Se determinó por triplicado el contenido de nitrógeno total (método 954.01), grasa (método 920.39), cenizas (método 923.03), fibra (método 962.09) y humedad (método 925.09) de la semilla de apio de acuerdo a los procedimientos estándar de la AOAC (1990).

Extracción de proteínas total (método TCA-C). De acuerdo al protocolo establecido por Saravan y Rose (2004), se mezcló 5g de harina de semilla de apio con 15mL de acetona fría con 10% de ácido tricloro-acético y 0.07% de β -Mercaptoetanol. Se homogeneizó la mezcla por sonicación durante 15 min en hielo, una vez homogeneizada se centrifugó a 2000g durante 2 minutos a 4°C, se dejó secar el sobrenadante durante 4 horas. Posteriormente se centrifugó a 13000g durante 30 min a 4°C para obtener una pastilla de proteínas la cual se lavó 3 veces en acetona fría y se secó a temperatura ambiente hasta eliminar el exceso de acetona y se almacena a -20°C.

Extracción y cuantificación de las fracciones proteicas. Se realizó la extracción secuencial de proteínas solubles de acuerdo a Osborne (1924). A partir de harina desengrasada de la semilla de apio se diluyó con un solvente específico para cada fracción en una relación harina/solvente (1:10 p/v) en agitación magnética por 1h a 4°C y se centrifugó a 13000 rpm por 15 min a 4°C y se recolectó el sobrenadante. Para Albuminas en agua, Globulinas 7S en NaCl al 0.1M, 11S en NaCl al 0.8M, Prolaminas en alcohol al 70% y Glutelinas en NaOH al 0.1M. Cada una de las fracciones se cuantificó por el método de Bradford con el kit Protein assay de Biorad de acuerdo con las especificaciones del fabricante y al protocolo modificado por León Galván (datos no publicados). Todas las muestras se trabajaron por triplicado

Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE). Se realizó la electroforesis en una dimensión de proteínas en geles de 12.5 de acrilamida de acuerdo con el método reportado por Huerta-Ocampo (2011). Se corrieron todos los geles en un sistema Tetra Mini-Protean de Biorad. Se realizó la reducción de puentes disulfuro con β -mercaptoetanol (1% p/v) a 100°C por 5 min.

Concentración de las fracciones proteicas mediante secado por aspersión. Para la concentración de proteínas de reserva se tomaron como referencia las condiciones establecidas por el fabricante del Mini Secador por aspersión B-290 a tres diferentes temperaturas

5.2.8. Inmovilización de las proteínas de reserva en microcápsulas de alginato de calcio. Para la inmovilización de las proteínas de reserva se empleó la técnica de encapsulación por gelificación iónica externa. Para la obtención de las cápsulas, se empleó una mezcla de alginato de sodio (1%) y proteínas de reserva deshidratadas (resuspendidos en medio PBS a pH 7.5) en una relación 1:1. Posteriormente por goteo manual (utilizando una micropipeta de 200 μ L con 500 μ m de diámetro en la boquilla de la punta) se gelificó en presencia de cloruro de calcio a tres concentraciones (0.1, 0.5 y 1 M) para evaluar el efecto coagulante del agente entrecruzador. Finalmente las cápsulas obtenidas se dejaron en solución de cloruro de calcio durante 24 horas y después se lavaron con agua destilada, posteriormente se liofilizaron a -55°C utilizando glicerol como agente crioprotector durante 18 horas y se almacenaron a 4°C.

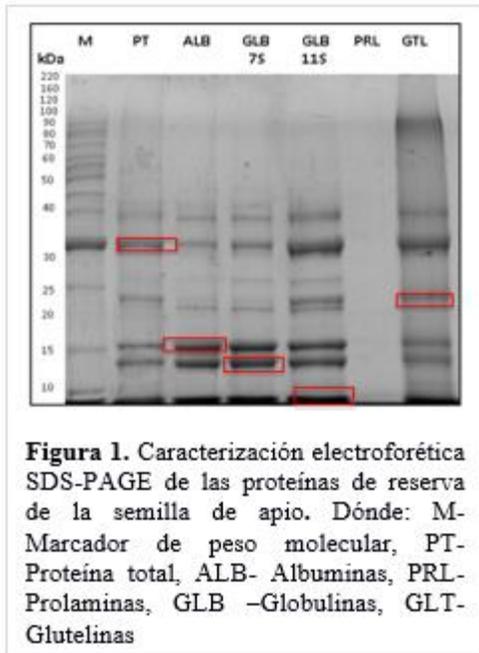
Ensayo de Simulación de Digestión en Jugos Gástricos (SGJ). Se probó la resistencia de las proteínas encapsuladas, a la acción de las enzimas gástricas pepsina y tripsina. Este procedimiento se realizó simulando las condiciones *in vivo* del tracto gastrointestinal de acuerdo al protocolo

establecido por Ohsawa *et al.*, (2008) y Chavirri *et al.*, (2012), con ciertas modificaciones. Se resuspendió 0.2g de las capsulas en 10 mL de solución acuosa de NaCl al 0.9% a pH 2 ajustada con HCl 1 N. Se hidrolizó primero con 50 µL de pepsina (pH de la reacción 2) a 37° C por 5, 10, 20, 30, 60 y 120, con agitación constante a 150 rpm. La reacción fue detenida por calentamiento (95° C por 10 min). La relación enzima: sustrato fue de 1:25 (w/w). Durante los intervalos de tiempo se cuantifica el contenido de proteína por el método Bradford.

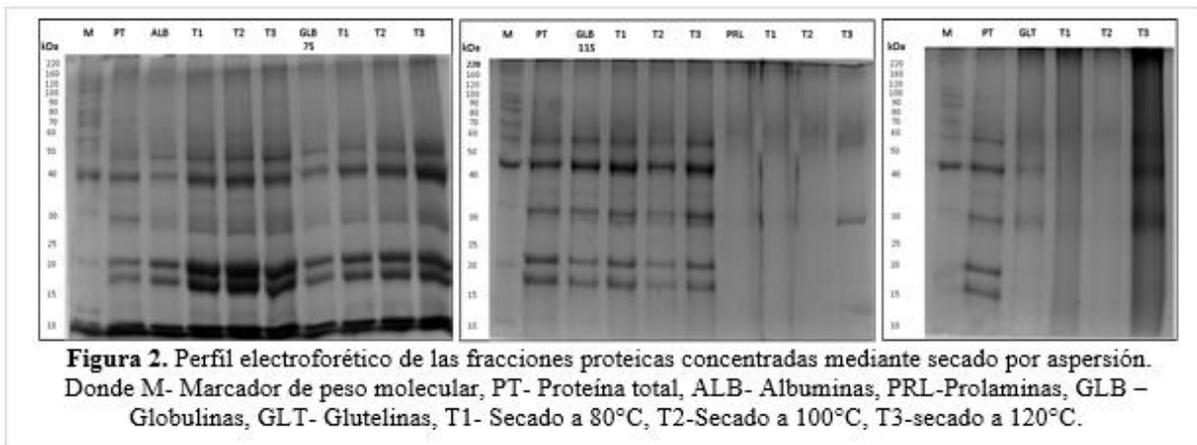
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis químico proximal, caracterización y cuantificación de las proteínas de reserva de la semilla de apio En la Tabla I se presentan los valores para una porción de 100g de semilla de apio y su IDA% basada en una dieta de de 2000kcal de esta manera se puede conocer la calidad de la semilla para el consumo humano. El contenido total proteico estimado fue del 16.17% un poco más alto al contenido de los cereales de 12%, pero más bajo al valor de las leguminosas que oscila entre 18 y 25%. (Badui, 2006). En la Tabla II se puede observar que las fracciones proteicas más abundantes en la semilla de apio son las albúminas y las glutelinas. No existen reportes de la cuantificación de las proteínas de la semilla de apio. En la caracterización de las proteínas de reserva por electroforesis SDS-PAGE se puede observar una ausencia de prolaminas debido a su baja cantidad en la semilla de apio, el patrón de bandeo en las demás fracciones proteicas es similar.

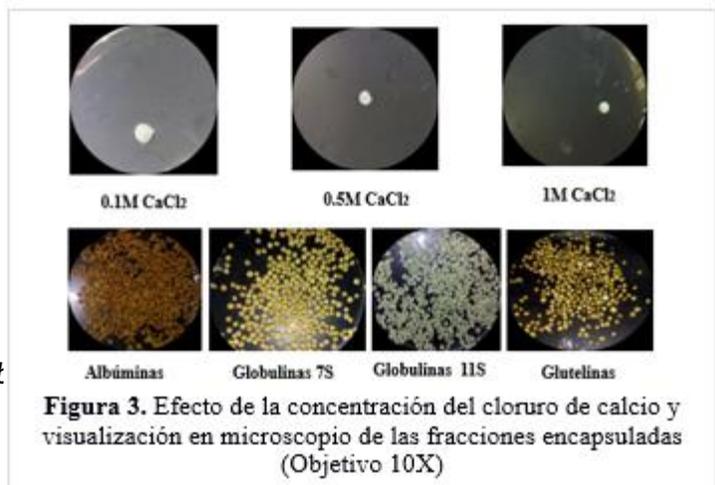
Tabla I. Análisis químico proximal de la semilla de apio		Tabla II. Cuantificación de las proteínas de reserva de la semilla de apio	
Determinación	En 100g	Cuantificación de las fracciones proteicas	Contenido de Proteína (mg de proteína / g de harina desgrasada)
Humedad	8.0g	Albúminas	28.21 ^a
Grasa	23.0g (52%)	Globulinas 7S	11.38 ^b
Proteína	16.17g (32.3%)	Globulinas 11S	8.09 ^c
Ceniza	9.0	Prolaminas	0.388 ^d
Fibra	12.0	Glutaminas	19.84 ^e
Carbohidratos	31.83g (9.0%)	Las medias con diferente literal indican diferencia significativa (Prueba de Tukey p>0.005)	
Contenido Calórico (kcal)	399 kcal (20%)		
(IDA%) Basados en una dieta de 2000 kCal			



Concentración de las fracciones proteicas mediante secado por aspersión. Después de concentrar las fracciones proteicas en el secador por aspersión a diferentes temperaturas se realizó una electroforesis SDS-PAGE. En la Figura 2 se observa que el patrón de bandeado no se afecta y además las fracciones se concentran, a excepción de las glutelinas.



Inmovilización de las proteínas de reserva en microcápsulas de alginato de calcio. En la Figura 3 se observa como la concentración del cloruro de calcio no es la óptima para la esfericidad de la capsula, la concentración óptima del cloruro de calcio es 1M. Las capsuladas liofilizadas tuvieron un color diferente dependiendo de la fracción proteica esto se debe a los pigmentos presentes en la extracción de proteínas (Figura



Rodríguez-Bart

3). En la tabla III se puede observar que las capsulas de globulinas 7S son las que contienen más proteína.

Ensayo de Simulación de Digestión en Jugos Gástricos (SGJ) y Jugos Intestinales (SJI). En la gráfica 1 se muestra que para albúminas y globulinas 11S la mayor liberación de proteína es al pasar 1 hora en cambio para globulinas 7S y glutelinas se sigue liberando proteína después de 2 horas, para el caso de jugos gástricos. En la gráfica 2 se muestra que para todas las fracciones a los 20 minutos es cuando más se libera proteína, para el caso de jugos intestinales.

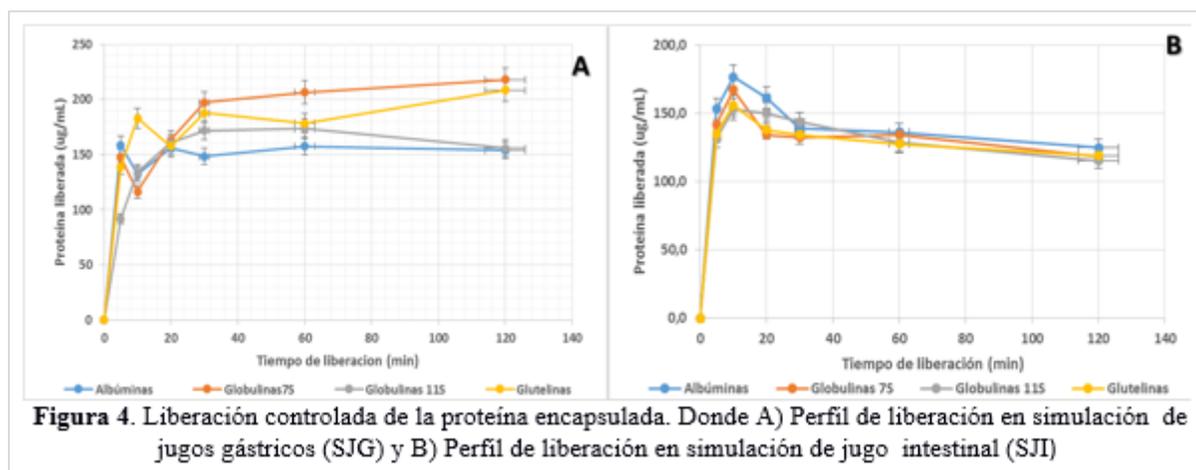


Tabla III. Cuantificación de las proteínas de reserva encapsuladas	
Cuantificación de las fracciones proteicas	Contenido de Proteína (ug de proteína / mg de capsula)
Albúminas	275.45±2.23
Globulinas 7S	415.77±5.25
Globulinas 11S	242.34±7.34
Glutaminas	348.25±8.17

CONCLUSIONES

- La semilla de apio tiene un alto contenido en ácidos grasos y en proteína. Las albúminas son las fracciones proteicas más abundantes en la semilla de apio.
- En el perfil electroforético de las fracciones proteicas de la semilla de apio se observó que tienen grandes similitudes de peso molecular entre sí.
- El calor efectuado durante el secado por aspersión no afecto a las proteínas de reserva de la semilla de apio teniendo una temperatura máxima de 120°C.
- La concentración de 1M de cloruro de calcio permitió obtener capsulas con mayor esfericidad.
- La liberación de proteína en la simulación gastrointestinal es más rápida en jugos intestinales que en jugos gástricos.

BIBLIOGRAFÍA

- De las Cagigas, A., & Blanco, A. (2002). Prebióticos y probióticos, una relación beneficiosa. *Revista Cubana Alimentos y Nutrición*.
- Madene, A., Jacquot, M., Sher, J. & Desobry, S. (2006) Flavour encapsulation and controlled release-a review. *International Journal of food Science and Technology*.
- Lakkis, J. M. (2007). *Encapsulation and controlled release technologies in food systems*. Blackwell Publishing. Iowa, EE. UU.
- Fonnegra, R., & Jiménez, L. (2007). *Plantas medicinales aprobadas en Colombia*. Colombia: Editorial Universidad de Antioquia.
- Ibañez CAM. 1991. Aislamiento y caracterización parcial de las fracciones proteínicas de avena cubierta var. Páramo y avena desnuda var. Dorada. Tesis. ENCB-IPN.
- Guéguen J & Cerletti P. 1994. Proteins of some legumes seeds: Soybean, pea, fababean and lupin. In: *New and Developing Sources of Food Proteins*. Hudson, F. (Ed). Chapman and Hall USA.
- Segura-nieto M. & Jiménez-Flores R. 1999. Genetic modifications of plant seed storage proteins for food production. In: *Molecular Biotechnology for Plant Food Production*. Technomic Publishing Co.Inc. USA.
- Huang YD & Khan K. 1997. Characterization and quantification of native glutenine aggregates by multistacking sodium dodecyl sulfate polyacrylamide Gel electrophoresis (SDS-PAGE) Procedures.
- Baduí, S. (2006). *Química de los alimentos*. México: Pearson Educación.