



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

II. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2017ko maiatzaren 10, 11 eta 12
Iruñea, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)

INGENIARITZA ETA ARKITEKTURA

**Kurkuma deribatudun gelatinazko
filmen aktibitate antioxidatzailea,**

*Alaitz Etxabide, Pedro Guerrero
eta Koro de La Caba*

16-21 or.

<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.ii.03.02>

ANTOLATZAILEA:



ELKARLANEAN:



LAGUNTZAILEAK:



Kurkuma deribatudun gelatinazko filmen aktibitate antioxidatzailea

Alaitz Etxabide, Pedro Guerrero, Koro de la Caba

BIOMAT Ikerketa Taldea. Ingeniaritza Kimikoa eta Ingurumenaren Ingeniaritza Saila.
Gipuzkoako Ingeniaritza Eskola. Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea
(UPV/EHU)
alaitz.etxabide@ehu.eus

Laburpena

THC antioxidatzaile natural bat da laktosarekin saretutako gelatinazko filmak eratzeko soluzioan gehitu dena, saretze erreakzioak eta gehitutako bioaktiboak filmen antioxidatzaile ahalmenean nola eragiten duten aztertzeko. Erreakzio kimikoa ematen den heinean konposatu fenolikoak sortzen direnez, laktosarekin erreakzionatutako filmek antioxidatzaile ahalmen (% 88.5) handiagoa erakusten dute laktosa gabeko filmek baino (% 84.5). Gainera, filmen bi aldeetan ordenamendu morfologiko ezberdinak ikusi dira THCren aglomerazio eta saretze erreakzioarengatik. Ondorioz, distira eta leuntasun gutxiagoko gainazalak eratu dira.

Hitz gakoak: Gelatina, laktosa, saretze erreakzioa, THC, XPS, inhibizioa

Abstract

THC is a natural antioxidant which was incorporated into the film forming solutions of lactose crosslinked gelatin films in order to analyze the effect of the reaction and the addition of the bioactive in the antioxidant capacity of gelatin films. Since phenolic compounds are formed during chemical crosslinking of gelatin film, they showed higher antioxidant capacity (88.5 %) than films prepared without lactose (84.5 %). Furthermore, morphological changes were observed in both surfaces of gelatin films due to THC agglomeration and crosslinking, leading to less glossy and rougher surfaces.

Keywords: Gelatin, lactose, cross-linking, THC, XPS, inhibition

1. Sarrera eta motibazioa

Gelatina ugaria, erabilgarria, merkea, biobateragarria eta biodegradagarria den proteina mota bat da aplikazio ugarietan erabiltzen dena. Aurkeztutako propietate hauek oso interesgarriak dira biomedikuntza bezalako aplikazioetarako. Gelatina ordea, uretan oso erraz disolbatzen den materiala da eta ondorioz, gelatinaren urarekiko portaera higroskopikoa arazotzat hartzen da. Urarekiko erresistenteagoa den materiala polimero kateen saretze erreakzio bidez lortu daiteke. Maillard izeneko erreakzioa proteina eta azukreen nahastea berotzerakoan lortzen den erreakzio natural bat da, gelatinaren disolbagarritasuna nabarmenki txikitzeko erabili dena (Etxabide et al., 2015a). Azukrearen karbonilo taldearen eta proteinaren amino taldeen artean gertaturiko kondentsazio erreakzio honetan propietate antioxidatzaileak dituzten konposatu aromatikoak sortzen direla ikusi da (Hong et al., 2014; Karnjanapratum et al., 2016; Samira et al., 2014). Bestalde, gelatina konposatu aktiboak askatzeko garraiatzaile gisa erabili daiteke (Kowalczyk eta Biendl, 2016; Tongnuanchan et al., 2013). Gaur egun naturalak diren konposatu aktiboak erabiltzea nahiago da eta landareak medikuntzan, industria farmazeutikoan eta elikagaietan erabiltzeko antioxidatzaileak diren balio handiko konposatu fenolikoak lortzeko iturri direla ikusi da (Bandyopadhyay et al., 2012; Freile-Pelegriñ eta Robledo, 2014). Tetrahidrokurkumina (THC) kolore eta zapora gabeko konposatu aktibo bat da antioxidatzailea izateaz gain antikantzerosoa, antidiabetikoa eta anti-hanturazkoa ere dena. Beraz, laktosa bidezko saretze erreakzioa eman den gelatinazko filmetan THC konposatua gehitzeak proteina mota hau medikuntzan erabiltzeko material aproposa bilaka dezake.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburua

Ekonomia zirkularra sustatzeko asmoz, non prozesu amaierako hondakina lehengai bihurtzen den ziklo ekonomiko etengabe eta jasangarrian bueltaka jarraituz, eta beraz zero-zabor sortuz, ikerketa honek industria-hondakinetatik edota elikagaien osagaietatik eratorritako hondakinak aprobeztatzea du helburu. Izan ere, berriro ere lehengai bihurtzen diren produktuak elikadura, medikuntza eta kosmetikorako baliogarriak izan daitezke. Konposatu bakoitzaren propietateak hobetzeko, materialak elkarren artean nahasi egiten dira, hainbat sistema sortuz. Ikerketa honek, medikuntzarako gelatinazko filmak sortzea du helburu. Proteina honen urarekiko portaera ahula eta propietate antioxidatzaileak hobetzeko asmoz, saretze erreakzioa sustatuko duten laktosa erreaktiboa eta propietate

antioxidatzaileak hobetuko dituen THC konposatua gehitu dira. Beraz, saretze erreakzioak eta konposatu antioxidantzailearen gehikuntzak gelatinazko filmen gainazalean eta propietate antioxidantzaileetan duten eragina aztertu da.

3. Ikerketaren muina

3.1 Materialak eta metodoak

Materiala

Arrain gelatina izan da ikerlan honetan erabili den oinarritzko materiala. % 11,06ko hezetasuna eta % 0,15ko errautsak ditu eta Weishardt Internatioalek (Eslovakia) ekoiztutakoa da. Gehigarri moduan, glizerola eta laktosa (Panreac, Bartzelona) erabili dira, plastifikatzaile eta saretze erreaktibo gisa, hurrenez hurren, eta tetrahidrokurkumina (THC) (Sabinsa Corporation, New Jersey, USA) aldiz konposatu antioxidantzaile bezala gehitu da.

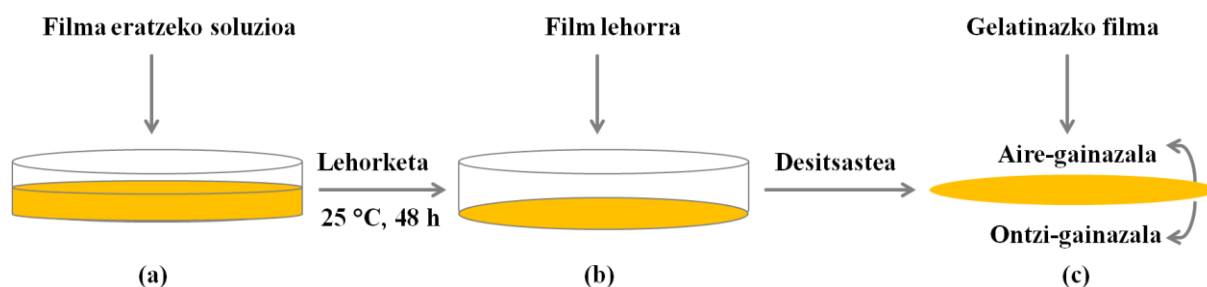
Filmen prestaketa

Gelatinan oinarrituriko filmak disoluzio metodoa erabiliz prestatu dira. Lehenengo, arrain gelatina 5 g eta % 20 laktosa (portzentajearen arabera pisua, gelatina idorrarekiko) 100 mL ur distilatuan nahastu dira eta jarraian, 80 °C-an eta 200 bira minutuko abiaduran, 30 minutuz berogailu magnetiko batean irabiatzen utzi da nahastea. Ondoren, % 10 glizerola eta % 5 THC duen nahastea gehitu da eta NaOH (1 N)-arekin pH-a 10an finkatu da. Nahastea ultrasoinu ekipoan giro tenperaturaren 5 minutuz utzi da eta ondoren beste 30 minutuz 80 °C-an eta 200 bira minutuko abiaduran irabiatzen utzi da berogailu magnetikoan. Azkenik, nahastea Petri ontzietan banatu da disoluzioko ura giro tenperaturaren lurruntzeko eta filmak sortzeko. Film lehorrak Petri ontzietatik desitsatsi ondoren, 105 °C-an 24 orduz bero tratamendua jaso dute gelatina eta laktosaren arteko erreakzioa sustatzeko. Ondoren, saretze erreakzioak eta THCren gehitzeak gelatinazko filmen gainazalean eta propietate antioxidantzaileetan izan duten eragina aztertu da. Filmen gainazalak X izpien espektroskopia fotoelektrikoaren (XPS), mikroskopio optikoaren (MO) eta distiraren neurketen bidez aztertu dira. Gero, filmak metanol (MeOH) soluzioan murgildu dira THCren askatzea ikusgai-ultramareko espektroskopia (UV-vis) bidez aztertzeko eta bioaktiboaren ahalmen antioxidantzailea fenolikoen guztizko edukia (TPC) eta DPPH erradikalak ezabatzeak aktibitatea neurtuz aztertzeko (Etxabide et al., 2017).

3.2 Emaitzak eta eztabaida

Disoluzio metodoaz lorturiko THC duten gelatinazko filmak (G) eta laktosadun gelatinazko filmak (GL) gainazal ezberdinak aurkezten dituzte lehortze prozesuan filmak Petri ontziaren gainazalarekin edo airearekin kontaktuan egon ostean (**1. irudia**). Horregatik, filmen gainazalen azterketa XPS, MO eta distiraren neurketa bidez egin da.

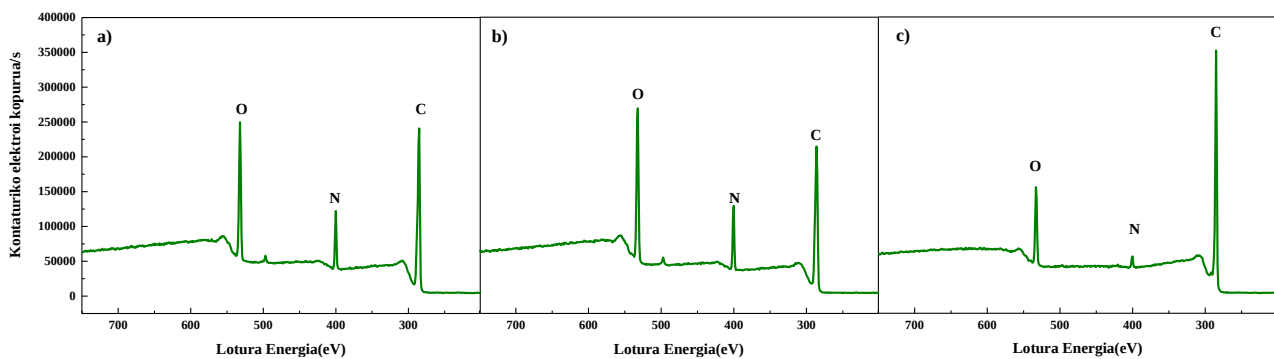
1. irudia. Gelatinazko filmak lortzeko disoluzio metodoaren eskema.



XPS bidez lorturiko emaitzak **2. irudian** aurkezten dira eta kasu guztietan 3 banda ezberdin identifikatu daitezke; C 1s (284.6 eV), N 1s (398.8 eV) eta O 1s (532.0 eV) (Deligianni et al, 2001). Laktosa gabeko filmetan saretze erreaktziorik ez dagoenez, bi gainazalen artean ez da ezberdintasunik ikusten (**2. irudia** a). Laktosadun filmetan ordea, aire-gainazalaren (**2. irudia** b) eta ontzi-gainazalaren

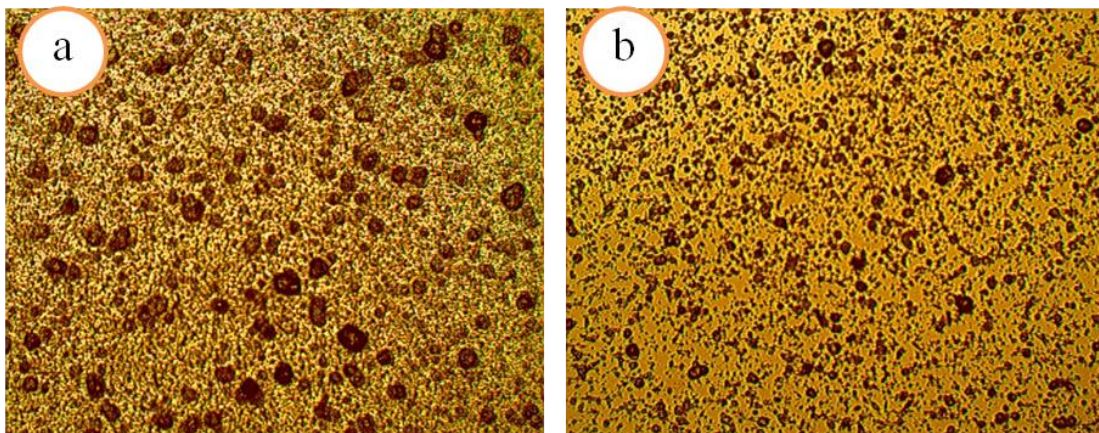
(2. irudia c) arteko ezberdintasuna nabaria da. Izan ere, N 1s banda, matrize organikoetako nitrogenoaren banda bereizgarria, ia guztiz desagertzen da laktosadun filmen ontzi-gainazalean. Bandaren desagertzea gelatinaren nitrogeno taldeen eta laktosaren karbonilo taldeen arteko saretze erreakzioarekin erlazionatu daiteke, zeinek proteinaren konformazioa aldatu dezakeen, gainazalean aldaketak emanez. Gainazalen arteko ezberdintasuna THCren disolbagarritasun baxuagatik izan daiteke. Filmaren lehortze prozesuan zehar THC aire-gainazalean pilatzen da eta honek filmen bero tratamenduan zehar ematen den gelatina eta laktosaren arteko erreakzioa oztopatzen du. Saretze erreakzioa ematen denean C 1s bandaren intentsitatearen handitzea eta O 1s bandaren intentsitatearen txikitzea gertatzen dela ikusi da (2. irudia c).

2. irudia. a) gelatinazko filmen (G) eta b) aire-gainazala eta c) ontzi-gainazala duten laktosadun gelatinazko filmen (GL) XPS espektroak.



Laktosaren gehikuntzak filmen aire-gainazalean duen eragina ikusteko MO bidez filmak aztertu dira (3. irudia). G filmetan (3. irudia a) THC aglomeratuen tamaina handiagoa dela ikusi da eta ondorioz gainazala leunagoa da (distira $35 \pm 1^\circ$). Izan ere, saretze erreakziorik ez dagoenez, gelatinaren amino talde libre gehiago daude. Talde libre hauek THCekin hidrogeno-zubi bidezko loturak sortu ditzakete, THCren aglomerazioa eraginez. Laktosa duten filmen aire-gainazalean ordea (3. irudia b), gelatina eta laktosaren arteko saretze erreakzioarengatik THCrenkin lotura fisikoak sortzeko amino talde libre gutxiago daude. Ondorioz, tamaina txikiagoko aglomeratu gehiago sortzen dira, latzagoa den gainazala erakutsiz (distira $25 \pm 2^\circ$).

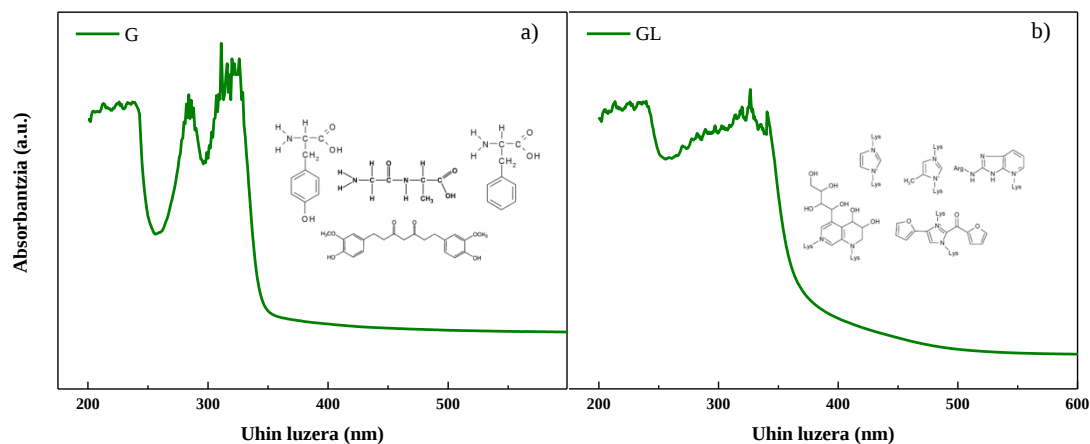
3. irudia: a) gelatinazko filmen (G) eta b) laktosadun gelatinazko filmen (GL) aire-gainazala.



Gelatina eta laktosaren arteko saretze erreakzioaren zeharkako analisia egiteko filmek argi ultramorea absorbatzeko duten gaitasuna aztertu da. 4. irudian ikusi daitekeen moduan, G filmek argi ultramorea absorbatzeko propietate oso onak aurkeztu dituzte, gelatinaren berezko lotura peptidikoengatik (200-250 nm), aminoazido aromatikoengatik, hala nola, tirosina eta fenilalanina

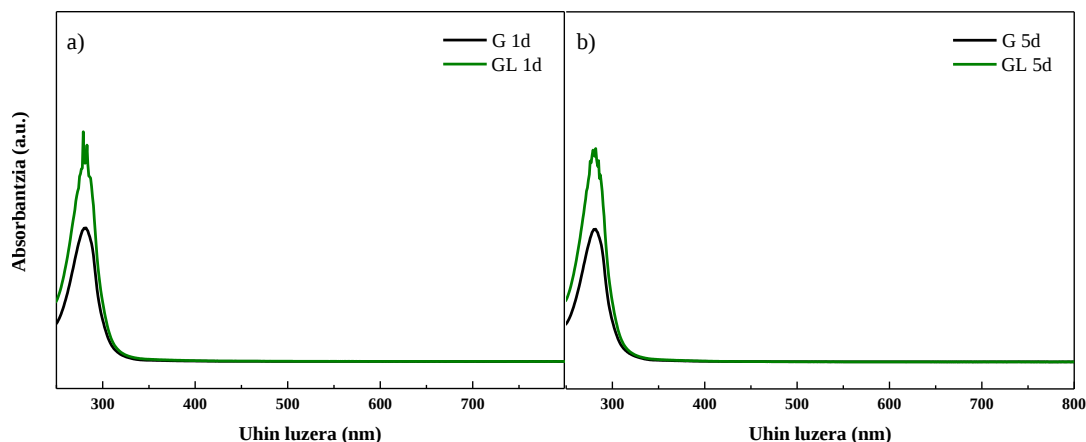
kromoforoak (250-300 nm) (Samira et al., 2014) eta gehituriko THCrengatik (280 nm) (Portes et al., 2009). Laktosa duten filmak aldiz gai dira uhin-luzera handiagoetan UV argia xurgatzeko. Izan ere, saretze erreakzioaren ondorioz aminoazido konposatu aromatikoaren kantitatea igotzen da (250-300 nm) eta egitura konjugatu berriak sortzen dira (300-420 nm).

4. irudia. UV-vis argia absorbatzeko gaitasuna a) gelatinazko filmetan (G) eta b) laktosadun gelatinazko filmetan (GL).



Saretze erreakzioan sorturiko konposatu aromatikoaren eta gehituriko THCren propietate antioxidatzaileak aztertze asmoz, G eta GL filmak bost egunez metanol (MeOH) soluzioan murgildu dira eta ondoren ingurune likidoa UV-vis bidez aztertu da. **5. irudian** ikusten den moduan, GL filmak murgilduta egon diren inguruneak absorbantzia balio handiagoak aurkezten ditu 280 nm-ko uhin-luzeran G filmak murgilduta egon diren ingurune likidoak baino. Absorbantziaren handitzea gelatina eta laktosaren arteko saretze erreakzioan sorturiko disolbagarriak diren konposatu fenolikoaren askapenarekin erlazionatu daiteke (Monti et al., 1999; Monti et al., 2000). Aipatzeko da, denboran zehar ez dela absorbantzia aldaketarik ikusi (**5. irudia** b), lehenengo egunean konposatuaren gehieneko askapen eman dela adieraziz.

5. irudia. Metanolaren (MeOH) UV-vis argia absorbatzeko gaitasuna gelatinazko filmak (G) eta laktosadun gelatinazko filmak (GL) a) egun batez eta b) bost egunez murgilduta egon ostean.



Aipaturiko emaitzak bat datoz filmen murgilketa ostean neurturiko masa galerekin (**1. taula**). Ikusi daitekeen moduan, GL filmek G filmek galdutako masaren bikoitza galdu dute. Ezberdintasun hau saretze erreakzioan sorturiko konposatu disolbagarriekin edota erreakzionatu ez duen laktosaren askatzearekin erlazionatu daiteke, aurreko lanean ikusi dugun bezala (Etxabide et al., 2015b).

1.taula. Gelatinazko filmen (G) eta laktosadun gelatinazko filmen (GL) masa galera, azido galikoaren baliokidea (GAE), inhibizioa (I) eta butilhidroxitoluenoaren baliokidea (BHTE).

Filma	Masa galera (%)	GAE (mg/L)	I (%)	BHTE (mg/L)
G	8,20 ± 0,01 ^a	29,7 ± 1,4 ^a	84,5 ± 1,5 ^a	198,0 ± 1,1 ^a
GL	15,14 ± 0,02 ^b	43,2 ± 2,3 ^b	88,5 ± 0,3 ^b	425,7 ± 17,1 ^b

Filmek askaturiko fenoliken guztizko edukia aztertzerakoan GL filmek G filmek baino konposatu fenoliko gehiago liberatu dituztela ikusi daiteke. Hau G eta GL filmen morfologian ikusitako ezberdintasunekin erlazionatuta egon daiteke. Esan dezakegu saretze erreakzioan zehar konposatu fenolikoak sortzeaz gain, saretzeak THC konposatuaren askatzean lagundu duela. DPPH erradikalak ezabatzeko aktibitateari dagokionez, GL filmek inhibizio (I) balio handiagoak (% 88.5) erakutsi dituzte G filmek baino (% 84.5), masa galarekin eta askaturiko konposatu fenoliken balioekin bat etorritik.

4. Ondorioak

Gelatina eta laktosaren arteko erreakzio kimikoak THC konposatua duten gelatinazko filmen egitura eragiten du, distira gutxiagoko eta ondorioz latzagoa diren gainazalak sortuz. Soluzio metodoaz prestatutako gelatinazko materialen XPS analisiak filmen bi gainazalen artean ezberdintasunak erakusten ditu, aire-gainazalean eman den THCren aglomerazioarengatik. Gelatinazko filmen ahalmen antioxidatzaileari dagokionez, laktosadun gelatinazko filmek (GL) fenoliken guztizko edukia eta erradikalak ezabatzeko aktibitate handiagok erakusten dituzte gelatinazko filmek (G) baino. Ezberdintasun hau gelatina eta laktosaren arteko saretze erreakzioan sorturiko disolbagarriak diren konposatu aromatikoekin eta THCren askapenaren erraztearekin erlazionatu da.

5. Etorkizunerako planteatzeko den norabidea

Gelatinaren urarekiko erresistentzia eta propietate antioxidatzaileak nabarmenki hobetu ostean, filmen biobateragarritasuna eta THCren sendagai efektuak giza gorputzean zein diren aztertzea da hurrengo pausua. Horretarako, *in vitro* eta *in vivo* saiakuntzak burutu nahi dira gelatinazko film hauek ehun-ingeniartzan erabilgarriak izan daitezen.

6. Erreferentziak

- Bandyopadhyay, P., Ghosh, A.K., eta Ghosh, C. (2012). Recent developments on polyphenol-protein interactions: effects on tea and coffee taste, antioxidant properties and the digestive system. *Food & Function*, 3, 592-605
- Deligianni, D.D., Katsala, N., Ladas, S., Sortirpoulou, D., Amedee, J., eta Missirlis, Y.F. (2001). Effect of surface roughness of the titanium alloy Ti-6Al-4V on human bone narrow cell response and on protein adsorption. *Biomaterials*, 22, 1241-1251.
- Etxabide, A., Coma, V., Guerrero, P., Gardrat, C., eta de la Caba, K. (2017). Effect of cross-linking in surface properties and antioxidant activity of gelatin films incorporated with a curcumin derivative. *Food Hydrocolloids*, 66, 168-175.
- Etxabide, A., Uranga, J., Guerrero, P., eta de la Caba, K. (2015a). Improvement of barrier properties of fish gelatin films promoted by gelatin glycation with lactose at high temperatures. *LWT-Food Science & Technology*, 63, 315-321.
- Etxabide, A., Urdanpilleta, M., Guerrero, P., eta de la Caba, K. (2015b). Effects of cross-linking in nanostructure and physicochemical properties of fish gelatins for bio-applications. *Reactive & Functional Polymers*, 94, 55-62.
- Freile-Pelegrín, Y., eta Robledo, D. (2014): Bioactive phenolic compounds from algae, In B. Hernández-Ledesma, eta M., Herrero (arg.), *Bioactive compounds from marine foods: plant and animal sources*, John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, 131-152.

- Hong, P.K., Gottardi, D., Ndagijimana, M., eta Betti, M. (2014). Glycation and transglutaminase mediated glycosylation of fish gelatin peptides with glucosamine enhance bioactivity. *Food Chemistry*, 142, 285-293.
- Karnjanapratum, S., O'Callaghan, Y.C., Benjakul, S., eta O'Brien, N.M. (2016). In vitro cellular bioactivities of Maillard reaction products from sugar-gelatin hydrolysate of unicorn leatherjacket skin system. *Functional Foods*, 23, 87-94.
- Kowalczyk, D., eta Biendl, M. (2016). Physicochemical and antioxidant properties of biopolymer/candelilla wax emulsion films containing hop extract-A comparative study. *Food Hydrocolloids*, 60, 384-392.
- Monti, S.M., Borrelli, R.C., Ritieni, A., eta Fogliano, V. (2000). A comparison of color formation and Maillard reaction products of a lactose-lysine and lactose-N(alpha)-acetyllysine model system. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 48, 1041-1046.
- Monti, S.M., Ritieni, A., Graziani, G., Randazzo, G., Mannina, L., Segre, A.L., eta Fogliano, V. (1999). LC/MS analysis and antioxidative efficiency of Maillard reaction products from a lactose-lysine model system. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 47, 1506-1513.
- Portes, E., Gardrat, C., Castellan, A., eta Coma, V. (2009). Environmentally friendly films based on chitosan and tetrahydrocurcumin derivative exhibiting antibacterial and antioxidative properties. *Carbohydrate Polymers*, 76, 578-584.
- Samira, S., Thuan-Chew Tan, T.C. eta Azhar, M.E. (2014). Effect of ribose-induced Maillard reaction on physical and mechanical properties of bovine gelatin films prepared by oven drying. *International Food Research Journal*, 21, 269-276.
- Tongnuanchan P., Benjakul, S., eta Prodpran, T. (2013). Physico-chemical properties, morphology and antioxidant activity of film from fish skin gelatin incorporated with root essential oils. *Journal of Food Engineering*, 117, 350-330.

7. Eskerrak eta oharrak

Egileek, Euskal Herriko Unibertsitateak UPV/EHU (GIU15/03 ikerketa taldea) eta Gipuzkoako Foru Aldundiak (OF215/2016 (ES)) emandako diru laguntza eskertzen dute. Alaitz Etxabidek, UPV/EHU-k ikerketarako emandako diru-laguntza (PIF13/008) eta Laboratoire de Chimie des Polymères Organiques (LCPO) ikerketa taldea eskertzen ditu.