



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**ACOPLAMIENTO VÍA ENZIMÁTICA DE
QUERCETINA A PROTEÍNAS DE SEMILLAS DE
CÁRTAMO Y GIRASOL, Y SU APLICACIÓN EN EL
DESARROLLO DE PELÍCULAS ACTIVAS**

T E S I S

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

PRESENTA

BRENDA GARCÍA AYALA



CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX.

2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesora María de los Ángeles Valdivia López

VOCAL: Profesor Alberto Tecante Coronel

SECRETARIO: Profesora Claudia Cecilia Márquez Mota

1er. SUPLENTE: Profesor Alejandro Zavala Rivapalacios

2° SUPLENTE: Profesora Carmina Montiel Pacheco

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA

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

ASESOR DEL TEMA

M. en C. María de los Ángeles Valdivia López

SUSTENTANTE

Brenda García Ayala

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| ÍNDICE | 3 |
| ABREVIATURAS | 6 |
| 1. RESUMEN | 8 |
| 2. INTRODUCCIÓN | 9 |
| 2.1. Objetivos | 11 |
| 2.1.1. Objetivo general | 11 |
| 2.1.2. Objetivos particulares | 11 |
| 3. ANTECEDENTES | 12 |
| 3.1. Cártamo | 12 |
| 3.1.1. Cultivo y producción de cártamo | 12 |
| 3.1.2. Composición química de la semilla de cártamo | 14 |
| 3.1.3. Tortas o harinas proteínicas de cártamo | 14 |
| 3.1.4. Proteína de cártamo | 15 |
| 3.1.5. Compuestos fenólicos del cártamo | 16 |
| 3.2. Girasol | 17 |
| 3.2.1. Cultivo y producción de girasol | 18 |
| 3.2.2. Composición química de la semilla de girasol | 20 |
| 3.2.3. Tortas o harinas proteínicas de girasol | 21 |
| 3.2.4. Proteína de girasol | 21 |
| 3.2.5. Compuestos fenólicos del girasol | 22 |
| 3.3. Extracción de la proteína de semillas oleinosas | 23 |
| 3.4. Envases alimentarios | 24 |
| 3.4.1. Envasado activo de alimentos | 25 |
| 3.5. Películas comestibles y biodegradables a base de biopolímeros | 25 |
| 3.5.1. Funciones y aplicaciones de películas comestibles y biodegradables .. | 26 |
| 3.5.2. Películas proteínicas | 28 |
| 3.6. Deterioro oxidativo de los lípidos en alimentos | 30 |
| 3.6.1. Productos de la oxidación lipídica | 33 |
| 3.7. Antioxidantes | 33 |
| 3.7.1. Clasificación de antioxidantes | 33 |

| | |
|--|-----------|
| 3.7.2. Compuestos fenólicos..... | 35 |
| 3.7.3. Quercetina | 35 |
| 3.8. Enzima peroxidasa..... | 36 |
| 3.8.1. Peroxidasa de rábano picante (HRP) | 36 |
| 3.8.2. Reacciones de acoplamiento mediadas por la enzima peroxidasa | 38 |
| 4. METODOLOGÍA (PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL)..... | 40 |
| 4.1. Métodos | 41 |
| 4.1.1. Caracterización y tratamiento de las semillas | 41 |
| 4.1.2. Obtención y caracterización de los extractos proteínicos (pellets) | 41 |
| 4.1.3. Preparación de las disoluciones proteínicas..... | 44 |
| 4.1.4. Funcionalización de la proteína con quercetina..... | 45 |
| 4.1.5. Análisis de los extractos de proteínicos por resonancia magnética nuclear de protón (RMN ¹ H) | 46 |
| 4.1.6. Evaluación del rendimiento de acoplamiento entre la proteína y el antioxidante | 47 |
| 4.1.7. Determinación de la capacidad antioxidante de las disoluciones proteínicas | 50 |
| 4.1.8. Elaboración y caracterización de las películas proteínicas | 51 |
| 4.1.9. Evaluación de la capacidad protectora de las películas frente al deterioro oxidativo en ajonjolí (pruebas aceleradas) | 54 |
| 4.2. Análisis estadístico..... | 57 |
| 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 58 |
| 5.1. Caracterización de las semillas de cártamo y girasol | 58 |
| 5.2. Separación de fracciones y obtención de la harina de las semillas..... | 59 |
| 5.3. Caracterización de los extractos proteínicos | 60 |
| 5.3.1. Humedad de los extractos proteínicos y proteína total en base seca ... | 60 |
| 5.3.2. Proteína total y soluble de los extractos proteínicos | 61 |
| 5.3.3. Polifenoles totales en los extractos proteínicos | 64 |
| 5.3.4. Evaluación del peso molecular de los extractos proteínicos..... | 66 |
| 5.4. Funcionalización vía enzimática de la proteína con quercetina | 68 |
| 5.4.1. Actividad enzimática de la peroxidasa de rábano picante | 69 |

| | |
|---|-----|
| 5.4.2. Análisis de los extractos de proteínicos por resonancia magnética nuclear de protón (RMN ¹ H) | 70 |
| 5.5. Evaluación del rendimiento de acoplamiento entre la proteína y el antioxidante | 74 |
| 5.5.1. Grupo amino primario libre en las disoluciones proteínicas..... | 75 |
| 5.5.2. Polifenoles totales remanentes en sobrenadantes | 78 |
| 5.5.3. Quercetina remanente en sobrenadantes..... | 82 |
| 5.6. Capacidad antioxidante de las disoluciones proteínicas | 88 |
| 5.6.1. Capacidad antioxidante de las disoluciones proteínicas después de cada tratamiento | 89 |
| 5.6.2. Capacidad antioxidante de las disoluciones elaboradas a partir de la proteína precipitada después de cada tratamiento | 94 |
| 5.7. Caracterización de las películas proteínicas | 99 |
| 5.7.1. Permeabilidad al vapor de agua de las películas proteínicas | 100 |
| 5.8. Pruebas aceleradas: evaluación de la capacidad de protección de las películas frente al deterioro oxidativo en ajonjolí | 104 |
| 5.8.1. Humedad | 104 |
| 5.8.2. Índice de peróxidos..... | 106 |
| 5.8.3. Índice de Kreis | 113 |
| 5.9. Potencial de aplicación de las películas proteínicas | 118 |
| 6. CONCLUSIONES | 120 |
| 7. REFERENCIAS | 122 |
| 8. ANEXOS | 134 |
| 8.1. Balance de masa y proteína del proceso de extracción de proteína de las semillas | 134 |
| 8.2. Reacción de acoplamiento entre un compuesto fenólico y cadenas polipeptídicas | 136 |
| 8.3. Determinación del orden de reacción..... | 137 |
| 8.4. Costo de materias primas | 140 |
| 8.5. Curvas patrón..... | 141 |

ABREVIATURAS

| | |
|--------------------|---|
| ABTS | Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) |
| BHA | Butilhidroxianisol |
| BHT | Butilhidroxitolueno |
| BSA | Albúmina sérica bovina |
| CAO | Capacidad antioxidante |
| CGA | Ácido clorogénico |
| DHA | Dehidroalanina |
| EAG | Equivalentes de ácido gálico |
| EQ | Equivalentes de quercetina |
| ET | Equivalentes de Trolox |
| fNH ₂ | Grupo amino primario libre |
| HPLC | Cromatografía líquida de alta eficacia |
| HR | Humedad relativa |
| HRP | Peroxidasa de rábano picante |
| IK | Índice de Kreis |
| IP | Índice de peróxidos |
| LAL | Lisinoalanina |
| LAN | Lantionina |
| LDPE | Polietileno de baja densidad |
| P | Permeanza |
| PVA | Permeabilidad al vapor de agua |
| PI | Periodo de inducción |
| RMN ¹ H | Resonancia magnética nuclear de protón |
| TBHQ | Terbutilhidroquinona |
| TCA | Ácido tricloroacético |
| TEAC | Capacidad antioxidante equivalente de Trolox |
| TFA-d | Ácido trifluoroacético deuterado |
| TNBS | Ácido trinitrobencenosulfónico |
| WVT | Velocidad de transmisión de vapor de agua |

Disoluciones proteínicas 5% de cártamo o girasol

| | |
|----------|---|
| SC | Disolución proteínica control |
| SE (T1) | Disolución proteínica + Enzima, con tratamiento 1 |
| SE (T2) | Disolución proteínica + Enzima, con tratamiento 2 |
| SEQ (T1) | Disolución proteínica + Enzima + Quercetina, con tratamiento 1 |
| SEQ (T2) | Disolución proteínica + Enzima, + Quercetina, con tratamiento 2 |
| SQ | Disolución proteínica + Quercetina |

Sobrenadantes resultantes de la precipitación de la proteína

| | |
|------------|---|
| S.SC | Sobrenadante proveniente de la disolución proteínica SC |
| S.SE (T1) | Sobrenadante proveniente de la disolución proteínica SE (T1) |
| S.SE (T2) | Sobrenadante proveniente de la disolución proteínica SE (T2) |
| S.SEQ (T1) | Sobrenadante proveniente de la disolución proteínica SEQ (T1) |
| S.SEQ (T2) | Sobrenadante proveniente de la disolución proteínica SEQ (T2) |
| S.SQ | Sobrenadante proveniente de la disolución proteínica SQ |

Disoluciones elaboradas a partir de la proteína precipitada después de cada tratamiento

| | |
|---------------|---|
| (PP)-SC | Disolución elaborada de la proteína precipitada de SC |
| (PP)-SE (T1) | Disolución elaborada de la proteína precipitada de SE (T1) |
| (PP)-SE (T2) | Disolución elaborada de la proteína precipitada de SE (T2) |
| (PP)-SEQ (T1) | Disolución elaborada de la proteína precipitada de SEQ (T1) |
| (PP)-SEQ (T2) | Disolución elaborada de la proteína precipitada de SEQ (T2) |
| (PP)-SQ | Disolución elaborada de la proteína precipitada de SQ |

Películas proteínicas

| | |
|-------|--|
| P.SC | Película elaborada a partir de la disolución proteínica SC |
| P.SEQ | Película elaborada a partir de la disolución proteínica SEQ (T2) |
| P.SQ | Película elaborada a partir de la disolución proteínica SQ |

1. RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue la obtención de películas activas a partir de extractos proteínicos de las semillas de cártamo y girasol y un antioxidante natural, con potencial para retardar los procesos químicos oxidativos de los lípidos en alimentos y alargar su vida útil, con la ventaja de ser materiales biodegradables.

Para ello, una vez obtenido el extracto proteínico de las semillas, se llevó a cabo la funcionalización vía enzimática de la proteína con quercetina, haciendo uso de la peroxidasa de rábano picante (HRP), que a través de un mecanismo de formación de radicales libres, propicia el acoplamiento entre el antioxidante y la proteína. Se evaluó la capacidad antioxidante de la proteína funcionalizada y se elaboraron las películas proteínicas. Se determinó la permeabilidad al vapor de agua de las películas elaboradas y su efecto antioxidante sobre ajonjolí molido, monitoreando la oxidación lipídica a 45 °C y humedad relativa de 45±2 % durante 99 días.

Se encontró que los extractos proteínicos de ambas semillas contienen compuestos fenólicos asociados que proveen actividad antioxidante. Si bien se obtuvo evidencia de que el tratamiento enzimático junto con el tratamiento alcalino conducen al acoplamiento de la proteína con la quercetina añadida y con los compuestos fenólicos del extracto, la reacción implicó una disminución en la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos en disolución.

A pesar de ello, aparentemente el tratamiento enzimático mejora la capacidad de protección de las películas proteínicas de cártamo frente al deterioro oxidativo en el ajonjolí, lo cual fue atribuido en parte a un mayor grado de retención de los antioxidantes en la película. En tanto que para las películas proteínicas de girasol, el tratamiento enzimático resultó ser desfavorable. No obstante, las películas proteínicas en sí, tanto de cártamo como de girasol, presentaron una buena capacidad de protección frente a la oxidación, superior a la del polietileno de baja densidad (LDPE), siendo en general mayor en el caso de las películas proteínicas de girasol, lo cual fue demostrado con apoyo de un análisis cinético.

La permeabilidad al vapor de agua de las películas elaboradas no se vio afectada por el tratamiento enzimático o adición de quercetina.

2. INTRODUCCIÓN

La sociedad moderna no contempla un producto alimenticio comercializado sin un buen material de envase, ya que éste es esencial en su conservación y distribución. Lo anterior se ve reflejado en el hecho de que 60 % de los materiales de envasado que se producen se destinan para los alimentos (Povea y López, 2015). Sin embargo, la gran mayoría de los materiales utilizados en la fabricación de envases para alimentos son plásticos provenientes de una fuente no renovable, petróleo. Además, al no ser biodegradables, una vez que se desechan pasan a formar parte de las grandes cantidades de basura que se acumulan día a día en el planeta (Rubio y Guerrero, 2012); en México los plásticos constituyen 10.09 % de los residuos sólidos urbanos (INEGI, 2013).

Por otro lado, el consumidor exige productos alimenticios más seguros y de mayor calidad, comercializados en envases compatibles con el medio ambiente. Todo ello ha determinado un gran desarrollo tecnológico en el envasado de alimentos para intentar satisfacer dichas demandas, revolucionado los materiales, procesos de fabricación y diseño de los envases, con el fin de conseguir formas más naturales de conservación de los alimentos y de controlar el propio envasado y almacenamiento, para lograr una buena calidad del producto y seguridad para el consumidor (Fernández, 2000).

En los últimos años, muchas investigaciones sobre empaques alimentarios se han enfocado en el desarrollo de películas y recubrimientos con materiales biodegradables. Los materiales más estudiados con este propósito han sido los biopolímeros: proteínas como la caseína, gluten de trigo, zeína de maíz, proteína de soya y proteína de suero de leche; lípidos como monoglicéridos y ceras; además de polisacáridos como alginatos, celulosa, quitosano y almidón. Estos biopolímeros son derivados de fuentes naturales renovables que son completamente biodegradables en un periodo de tiempo considerablemente corto, contribuyendo así a reducir la contaminación ambiental ocasionada por los plásticos convencionales derivados del petróleo (Durango *et al.*, 2011).

Otra innovación en el envasado de alimentos ha sido el desarrollo del envasado activo. Este concepto consiste en conservar los alimentos de tal forma que el envase, el producto y el medio ambiente interactúan para mantener la calidad del producto, así como para incrementar el tiempo de vida útil. Para ello, generalmente el envase sirve como vehículo de algún compuesto activo, como un antioxidante o antimicrobiano (Suppakul *et al.*, 2003).

Por tanto, las aplicaciones de películas y recubrimientos comestibles y biodegradables se han convertido en una herramienta tecnológica útil en la industria alimentaria con ventajas competitivas además de su biocompatibilidad, como la incorporación de compuestos activos en la matriz polimérica que contribuyen al aumento de la vida útil del producto, seguridad alimentaria y el mejoramiento de atributos sensoriales y nutricionales, gracias además a que pueden ayudar a controlar la migración de gases, humedad, lípidos, compuestos volátiles de olor y sabor, además de otros solutos (Ávila y López, 2008; Rojas-Grau *et al.*, 2009).

Debido a la continua demanda de producción de aceite comestible a partir de semillas oleaginosas, existe una gran cantidad de proteína disponible en el subproducto generado, denominado “torta” o “harina”, de la industria del aceite. Se estima que por cada tonelada de semillas de cártamo y girasol producidas a nivel mundial, se producen 0.60-0.67 ton y 0.34-0.35 ton de torta o harina, respectivamente. Estos materiales son renovables y biodegradables. En el área de empaquetado de alimentos, una aplicación potencial de los aislados y concentrados proteínicos obtenidos a partir de dichos subproductos, es la elaboración de películas comestibles y biodegradables (Arntfield, 2004).

2.1. OBJETIVOS

2.1.1. Objetivo general

Obtener películas activas a partir de extractos proteínicos de las semillas de cártamo y girasol y un antioxidante natural, con potencial para retardar la oxidación lipídica de los alimentos.

2.1.2. Objetivos particulares

- Obtener y caracterizar extractos proteínicos de las semillas de cártamo y girasol.
- Funcionalizar las proteínas de cártamo y girasol con un antioxidante natural, vía enzimática.
- Determinar la permeabilidad al vapor de agua de películas elaboradas a partir de las proteínas funcionalizadas y evaluar su capacidad de protección frente al deterioro oxidativo en una matriz alimentaria.

3. ANTECEDENTES

3.1. CÁRTAMO

El cártamo (*Carthamus tinctorius* L.), también conocido como alazor, azafrán bastardo, azafrancillo y azafrán romí, es una planta anual herbácea de la familia Compositae o Asteraceae, que incluye varias plantas importantes del cultivo, tales como alcachofa, girasol, semilla de niger y crisantemo. Es originario de la India y hoy, su cultivo está extendido en todo el mundo, principalmente por su aceite.

El fruto del cártamo es un aquenio, lo que se conoce como semilla de cártamo. Como se observa en la Figura 3.1, la semilla es pequeña, 6.3-10 mm de largo, ligeramente rayada y oblonga, con la parte superior redondeada y usualmente de coloración crema, aunque algunas variedades presentan coloración oscura. La semilla se compone de un núcleo constituido por el embrión, dos cotiledones e incluye al endospermo, rodeado por una cascarilla fibrosa constituida por el tegumento seminal y pericarpio (Pavlov y Todorov, 1996; Whitaker y Tannenbaum, 1977; Bewley *et al.*, 2006).



Figura 3.1. Semillas de cártamo.

3.1.1. Cultivo y producción de cártamo

El cártamo es una especie vegetal que se adapta principalmente a regiones de baja precipitación pluvial y baja humedad relativa. Es un cultivo que crece mejor a temperaturas de 28-35 °C. (Robles, 1991).

Actualmente, Kazajistán es el país con mayor producción de semilla de cártamo con un promedio de 19.7 % de la producción mundial en los años 2010 a 2014,

seguido de India con un 18.12 % y México como tercer productor con un 18.0 %. En la Tabla 3.1 se recogen los datos de la producción y los principales países productores de semilla de cártamo a nivel mundial.

Tabla 3.1. Producción mundial de semilla de cártamo (años 2010-2014).

| País | Producción (ton) | | | | |
|----------------|------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | 2010 | 2011 | 2012 | 2013 | 2014 |
| Kazajistán | 122,240 | 151,210 | 127,210 | 174,900 | 196,000 |
| India | 178,800 | 150,000 | 145,000 | 109,000 | 113,000 |
| México | 97,078 | 130,922 | 257,451 | 91,788 | 144,411 |
| Estados Unidos | 100,400 | 76,960 | 78,900 | 95,360 | 96,640 |
| Argentina | 43,850 | 56,086 | 108,250 | 49,770 | 66,310 |
| Mundial | 686,258 | 711,956 | 878,012 | 754,161 | 903,559 |

Fuente: FAOSTAT, 2016.

En México, el cártamo es uno de los principales cultivos entre las plantas oleaginosas. En 2015, la producción de cártamo en México alcanzó un total de 125,023 ton. Los principales estados productores del país son Sonora, Tamaulipas, Jalisco, Sinaloa y Michoacán, como se muestra en la Figura 3.2.

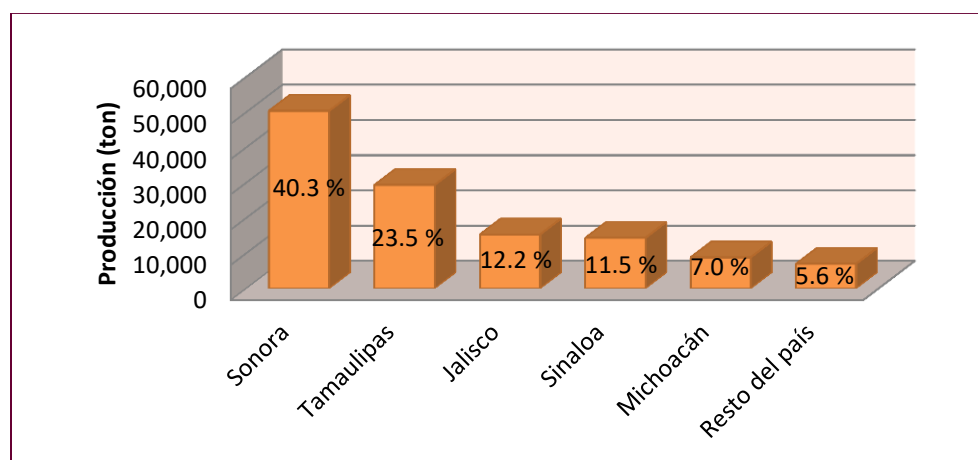


Figura 3.2. Principales estados productores de cártamo en México (2015).

Fuente: SIAP, 2016.

El principal interés en el cultivo de cártamo, es la obtención de su aceite comestible, que es considerado de alta calidad para el consumo humano, ya que

es rico en ácidos grasos insaturados, 70-75 % de ácido linoléico en su aceite si son linolécicas o 70-75 % de ácido oleico si son oleicas, es altamente estable a la oxidación y su consistencia se mantiene igual a bajas temperaturas (Singh y Nimbkar, 2007). El aceite de cártamo también es destinado a otras aplicaciones industriales, como la manufactura de pinturas, barnices, esmaltes y jabón. La semilla es utilizada también como alimento para animales, entera especialmente si su contenido en aceite no es muy alto, o en forma de torta, subproducto de la extracción del aceite (Salunkhe *et al.*, 1992).

3.1.2. Composición química de la semilla de cártamo

La composición química de la semilla de cártamo, depende de la proporción del núcleo y la cascarilla. En general, el núcleo constituye el 55-67 % del peso de la semilla, mientras que la cascarilla constituye el 33-45 % del mismo (Wrigley *et al.*, 2016). Como se muestra en la Tabla 3.2, el aceite, la proteína y las cenizas se concentran en el núcleo, mientras que la fibra se localiza principalmente en la cascarilla, por lo que el descascarillado de las semillas influye significativamente en la composición química de la semilla. La humedad de la semilla de cártamo es usualmente de 7-8 % (Nagaraj, 2009).

Tabla 3.2. Composición química de la semilla de cártamo (% en base seca).

| Muestra | Aceite (%) | Proteína (%) | Fibra (%) | Cenizas (%) | NFE (%) |
|-----------------------|------------|--------------|-----------|-------------|-----------|
| Semilla entera | 36.8-41.0 | 15.4-19.4 | 20.8-22.3 | 2.3-2.6 | 19.0-21.4 |
| Núcleo | 59.0-64.0 | 24.9-29.4 | 1.0-1.6 | 2.6-3.9 | 6.9-9.5 |
| Cascarilla | 1.4-3.2 | 3.8-5.0 | 57.1-60.4 | 1.4-2.2 | 30.6-33.4 |

1. NFE=Extracto libre de nitrógeno (Nitrogen Free Extract).

$\%NFE = 100\% - (\% \text{ Humedad} + \% \text{ Proteína} + \% \text{ Grasa} + \% \text{ Fibra} + \% \text{ Cenizas})$.

Fuente: Betschart *et al.*, 1975.

3.1.3. Tortas o harinas proteínicas de cártamo

La torta o harina que resulta como subproducto de la extracción de aceite es alta en proteína y fibra. Es utilizada principalmente como suplemento proteínico en la

alimentación de ganado y aves. Su composición varía dependiendo del método de extracción de aceite empleado, la variedad y el grado de descascarillado de la semilla. De manera general, si ésta es procedente de semillas de cártamo sin descascarillar, contiene alrededor de 18-22 % de proteína, 22-36 % de fibra y 3-4 % de lípidos remanentes, mientras que la procedente de semillas descascarilladas, contiene 40-70 % de proteína cruda, 4-15 % de fibra cruda y 7-8 % de lípidos remanentes (Pavlov y Todorov, 1996).

La torta o harina no suele usarse para el consumo humano debido a su alto contenido en fibra y por la presencia de factores antinutricionales, glucósidos fenólicos, que imparten sabor amargo y tienen actividad catártica. Sin embargo, ya que estos compuestos son solubles en agua, su remoción puede ser desde 60 % hasta 80 % al realizar extracciones acuosas a la harina y hasta de 95 % en la preparación de aislados proteínicos por precipitación isoeléctrica o micelización. (Pavlov y Todorov, 1996; Paredes-López, 1991). También suelen removerse de manera efectiva tratando a la harina con metanol, amoníaco o β -glucosidasa (Salunkhe *et al.*, 1992; Arntfield, 2004).

3.1.4. Proteína de cártamo

La mayoría de las proteínas presentes en el cártamo son glutelinas, solubles en disoluciones alcalinas. Del total de proteínas en la harina de la semilla desengrasada, 69.0 % son glutelinas, 17.0 % son albúminas solubles en agua y 5.0 % son globulinas solubles en disolución salina, NaCl 1 M, mientras que del total de proteínas en la harina de la semilla descascarillada y desengrasada, 54.5 % son glutelinas, 16.5 % son albúminas y 12.0 % son globulinas. En ambos casos, el contenido de prolaminas solubles en alcohol al 70 % es despreciable, alrededor de 0.2 % (Salunkhe *et al.*, 1992).

Las proteínas de la semilla de cártamo contienen cuatro fracciones con coeficientes de sedimentación 2S, 7S, 12S y 17S, constituyendo 26, 6, 65 y 2 % del total de proteína, respectivamente. La fracción mayoritaria 12S de alto peso molecular, ha sido denominada carmín, con un peso molecular de 240-290 kDa,

mientras que la fracción de bajo peso molecular 2S, ha sido reportada de 13.8-18.5 kDa (Paredes-López, *et al.*, 1994).

La composición de aminoácidos en la semilla de cártamo entera y el núcleo es similar. La proteína de cártamo es rica en ácido glutámico (18-25 %), ácido aspártico (8-12 %) y arginina (9.4 %). Presenta deficiencia en los aminoácidos esenciales lisina (2.7-3.0 %), metionina (1.5-3.5 %), treonina (2.9-3.2 %), triptófano (1.1-1.2 %) e isoleucina (3.5-4.5 %) (Salunkhe *et al.*, 1992).

3.1.5. Compuestos fenólicos del cártamo

Se ha reportado un contenido de compuestos fenólicos de 1.05 % en la semilla de cártamo y de 0.45-0.67 % en la harina de la semilla desengrasada (Paredes-López, 1994; Surmi *et al.*, 2016). Los derivados de serotonina, como el N-(p-coumaroil)-serotonina-7-O-β-D-glucósido, N-feruloilserotonina, N-(p-coumaroil)-serotonina y N-feruloilserotonina-7-O-β-D-glucósido, son los compuestos fenólicos mayoritarios. No obstante, se ha reportado también la presencia de flavonoides, tal como la (-)-epigalocatequina, hasta de 50 % del total de compuestos fenólicos (Yu *et al.*, 2013). En la Figura 3.3 se muestran las estructuras químicas de los compuestos fenólicos mencionados.

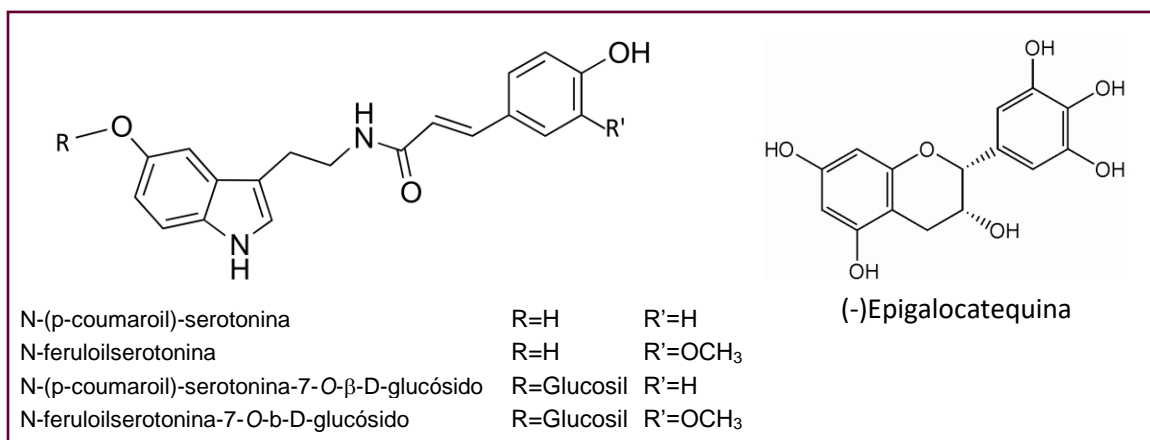


Figura 3.3. Estructura química de compuestos fenólicos en la semilla de cártamo.

Por otro lado, se ha identificado al lignano glucósido sin sabor 2-hidroxi-aracitiina como responsable de la actividad catártica y al lignano glucósido, 1-matairesinol-mono- β -D-glucósido como el responsable del sabor amargo en las semillas de cártamo, cuyas estructuras químicas se muestran en la Figura 3.4. Estos compuestos constituyen 0.49 y 0.11 % del peso de la semilla en base seca, respectivamente. Al encontrarse principalmente en el núcleo, el descascarillado y desengrasado de la semilla provoca que su concentración en las harinas proteínicas sea mayor, de 1.62 y 0.39 %, respectivamente. No obstante, en la preparación de aislados proteínicos, estos compuestos pueden ser parcialmente removidos, constituyendo la 2-hidroxi-aracitiina 0.21 % del producto y el matairesinol monoglucósido 0.06 % del mismo (Salunkhe *et al.*, 1992).

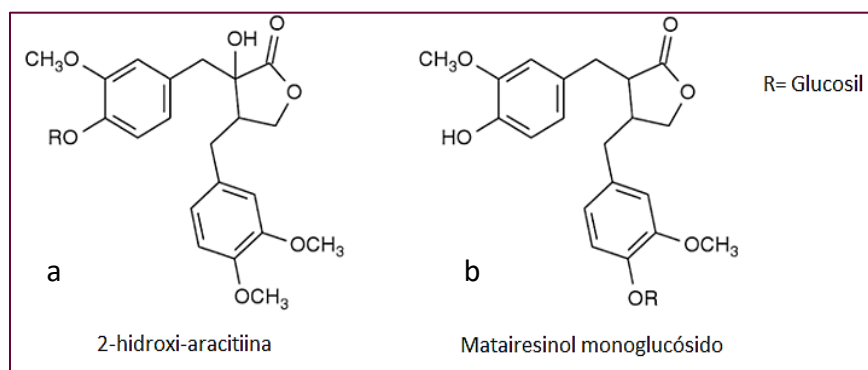


Figura 3.4. Estructura química de los glucósidos fenólicos responsables de la actividad catártica (a) y amargo (b) de la semilla de cártamo.

3.2. GIRASOL

El girasol (*Helianthus annuus* L.) es una planta anual miembro de la familia Compositae o Asteraceae al igual que el cártamo. Se cree originario del suroeste de Estados Unidos y México y hoy en día, su cultivo se ha extendido por todo el mundo, especialmente en Rusia y el este de Europa, donde se ha convertido en una de las principales plantas oleaginosas de cultivo ampliamente utilizada como fuente de obtención de aceite. Las variedades comerciales cultivadas son agrupadas como *H. annuus* variedad *macrocarpus*. (Salunkhe *et al.*, 1992).

El fruto de la planta de girasol, es un aquenio, lo que se conoce como semilla de girasol. Como se observa en la Figura 3.5, la semilla es pequeña, 10-25 mm, con una forma comprimida, oblonga, con una base puntiaguda y la parte superior truncada. El color de la semilla está determinado por los pigmentos en las capas de su cascarilla; la capa exterior puede estar libre de pigmentación o completamente pigmentada, teniendo una coloración café oscuro o negra, o bien, puede presentar un patrón de rayas café oscuro o negro. La semilla se compone de un núcleo constituido por el embrión, dos cotiledones, endospermo y tegumento seminal, rodeado por una cascarilla comprendida por el pericarpio (Salunkhe *et al.*, 1992; Martínez-Force *et al.*, 2015).

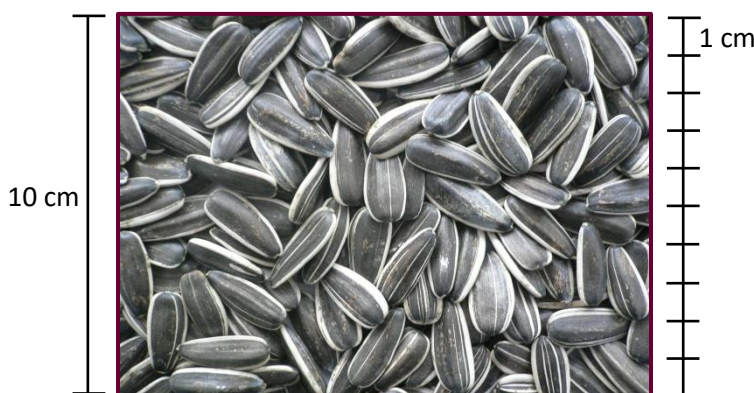


Figura 3.5. Semillas de girasol.

3.2.1. Cultivo y producción de girasol

El girasol es una planta que se cultiva preferentemente en condiciones de baja humedad relativa y se adapta a condiciones de temperatura muy variada, que va desde temperaturas bajas, 13-17 °C, hasta temperaturas más elevadas, 25-30 °C, lo que explica su amplia distribución (Maldonado, 2003).

Actualmente, Ucrania y Rusia son los principales países productores de semilla de girasol con una participación promedio de 21.6 y 20.3 %, respectivamente de la producción mundial en los años 2010 a 2014. En la Tabla 3.3 se recogen los datos de la producción y los principales países productores de semilla de girasol a nivel mundial.

Tabla 3.3. Producción mundial de semilla de girasol (años 2010-2014).

| País | Producción (ton) | | | | |
|-----------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | 2010 | 2011 | 2012 | 2013 | 2014 |
| Ucrania | 6,771,500 | 8,670,500 | 8,387,100 | 11,050,480 | 10,133,750 |
| Rusia | 5,344,820 | 9,697,450 | 7,992,714 | 10,553,689 | 9,033,716 |
| Argentina | 2,232,034 | 3,671,748 | 3,340,520 | 3,104,420 | 2,063,410 |
| China | 2,298,000 | 2,313,000 | 2,322,655 | 2,423,241 | 2,380,000 |
| Rumania | 1,262,926 | 1,789,326 | 1,398,203 | 2,142,087 | 2,189,309 |
| México ⁽¹⁾ | 3,797 | 2,826 | 1,308 | 4,546 | 16,559 |
| Mundial | 33,817,513 | 43,148,569 | 39,540,031 | 47,018,837 | 43,715,165 |

1. Posición no. 46 en 2014; Fuente: FAOSTAT, 2016.

En lo que respecta a México, en términos de producción, el cultivo de girasol ocupa el sexto lugar entre las plantas oleaginosas cultivadas en el país después del cártamo, soya, cacahuete, ajonjolí y canola. Durante los años 2010 a 2013, México ha mantenido una posición en los lugares 60 a 66 como productor de semilla de girasol; no obstante, la producción aumentó casi cuatro veces en el año 2014 comparada con el año anterior y se posicionó en el lugar 46. En 2015, la producción de cártamo en México alcanzó un total de 14,399 ton. Los principales estados productores del país son Zacatecas, Tamaulipas, San Luis Potosí, Jalisco y Guanajuato, como se muestra en la Figura 3.6.

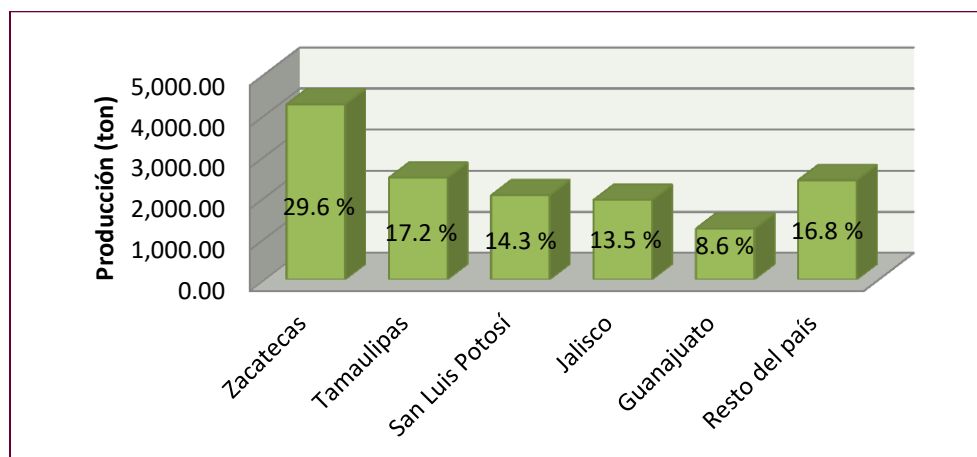


Figura 3.6. Principales estados productores de girasol en México (2015).

Fuente: SIAP, 2016.

El uso principal al cual se destina la semilla de girasol, es a la obtención de aceite comestible e industrial, este último para la preparación de productos como jabones, cosméticos, pinturas y barnices. Una vez extraído el aceite, la torta o harina residual de la semilla se suele utilizar en la alimentación de aves y ganado como alimento concentrado (Salunkhe *et al.*, 1992). Algunas variedades con bajo contenido de aceite se emplean directamente en la alimentación de aves o en la preparación de alimentos para consumo humano (Gallegos y Velazco, 1970).

El aceite de girasol es considerado de alta calidad por presentar un alto contenido en ácidos grasos insaturados oleico y linoléico, que constituyen 16-59 y 32-74 % del aceite, respectivamente. Las variedades modificadas de alto contenido en ácido oleico contienen hasta un 89 % del mismo (Paredes-López 1994). Además, el aceite presenta un alto contenido de vitaminas liposolubles, en particular la vitamina E (α -tocoferol) (Robinson y Everett, 1990).

3.2.2. Composición química de la semilla de girasol

La proporción del núcleo y la cascarilla en las diferentes variedades de girasol cultivadas difieren considerablemente y determina la composición química de la semilla. En términos generales, la cascarilla en las semillas de girasol comerciales constituye 21-30 % de la semilla (Wrigley *et al.*, 2016). Como se muestra en la Tabla 3.4, el aceite y la proteína se encuentran principalmente en el núcleo, mientras que la fibra se encuentra principalmente en la cascarilla. El contenido de humedad de las semillas de girasol es alrededor de 6 %.

Tabla 3.4. Composición química de la semilla de girasol (% en base seca).

| Muestra | Aceite (%) | Proteína (%) | Fibra (%) | Cenizas (%) | NFE (%) |
|-----------------------|------------|--------------|-----------|-------------|-----------|
| Semilla entera | 21.1-49.1 | 13.7-23.4 | 15.2-22.2 | 3.3-4.4 | 13 |
| Núcleo | 41.2-58.5 | 16.4-26.6 | 2.1-10.6 | 2.8-6.0 | 4-6 |
| Cascarilla | 1.3-2.2 | 1.7-6.1 | 62.4-65.2 | 66.7-69.6 | 21.5-22.1 |

1. NFE=Extracto libre de nitrógeno (Nitrogen Free Extract).

$\%NFE = 100 \% - (\% \text{ Humedad} + \% \text{ Proteína} + \% \text{ Grasa} + \% \text{ Fibra} + \% \text{ Cenizas})$.

Fuentes: Paredes-López *et al.*, 1994; Salunkhe *et al.*, 1992.

Cabe mencionar, que las variedades de girasol de alto contenido en aceite, contienen 34-54 % de aceite (Salunkhe *et al.*, 1992).

3.2.3. Tortas o harinas proteínicas de girasol

La semilla desengrasada, da lugar a harinas con un contenido aproximado de 33 % de proteína y 20 % de fibra o más, mientras que la semilla descascarillada y desengrasada de girasol da lugar a harinas con 37.2-56.4 % de proteína y 3.6-13.7 % de fibra (Paredes-López, 1994). En ambos casos, el contenido de lípidos residual es 1-3 % (Pavlov Todorov, 1996). La diferencia en la composición se debe a la variedad de la semilla, el método de extracción de aceite empleado y el grado de descascarillado (Salunkhe *et al.*, 1992).

El uso de los productos proteínicos de girasol en el consumo humano está limitado por la presencia de compuestos fenólicos, principalmente el ácido clorogénico y los productos de su hidrólisis, ácido caféico y ácido quínico, así como los productos de su oxidación, o-quinonas. Estos compuestos tienen un fuerte impacto en las propiedades de la proteína debido a su unión con la misma; particularmente, al ser compuestos cromóforos, representan un problema en la obtención de concentrados y aislados proteínicos sin color, pues imparten una coloración verde oscuro a marrón cuando la harina de girasol es sometida a tratamientos alcalinos ($\text{pH} \geq 7$) (Arntfield, 2004). Debido a ello, se han propuesto métodos para reducir los niveles de dichos compuestos tratando directamente la harina de girasol o incorporando pasos adicionales al proceso de extracción de la proteína, que incluyen extracciones con etanol, metanol, acetona acuosa ácida y butanol ácido (Nwokolo, 1996).

3.2.4. Proteína de girasol

Las proteínas de la semilla de girasol están compuestas por 55-60 % de globulinas, 17-23 % de albuminas, 11-17 % de glutelinas solubles en disoluciones alcalinas y 1-4 % de prolaminas (Salunkhe *et al.*, 1992).

De acuerdo a su coeficiente de sedimentación, se han reportado tres fracciones, 11S, 2S y 7S las cuales constituyen 70, 20 y 10 % del total de proteína, respectivamente (Salunkhe *et al.*, 1992). La fracción mayoritaria de globulinas 11S se conoce como heliantina y su peso molecular es de 300-350 kDa (Applewhite, 1992), mientras que la fracción 2S está constituida por albuminas y presenta un peso molecular de 10-18 kDa (Shabani, 2015). Se ha sugerido que la fracción 7S es producto de la disociación de la fracción 11S (Paredes-López 1994).

La proteína de la semilla de girasol presenta un perfil de aminoácidos similar al de la soya, aunque con menor contenido de lisina, serina, prolina y leucina. Tiene niveles altos de ácido glutámico (21.5 %), ácido aspártico (8.6 %) y arginina (8.2 %) (Nwokolo, 1996). La lisina y leucina son aminoácidos limitantes de la proteína de girasol, cuyo contenido en la misma es de 3.1-3.8 % y 6.1-6.4 %, respectivamente. Hay también una deficiencia en metionina, que está presente en 1.6-2.0 %; no obstante, el contenido de metionina es más alto comparado con la mayoría de otras oleaginosas (Salunkhe *et al.*, 1992).

3.2.5. Compuestos fenólicos del girasol

En la semilla de girasol se encuentran cantidades apreciables de tres principales compuestos fenólicos: ácido clorogénico (CGA) en 1.92-4.68 %, ácido caféico en 0.13 % y ácido quínico en 0.10 % del peso de la semilla en base seca, cuyas estructuras se muestran en la Figura 3.7. (Paredes-López 1994). Del total de compuestos fenólicos, el ácido clorogénico (CGA) representa 70 %, encontrándose en forma libre en 75 %. (Arntfield, 2004).

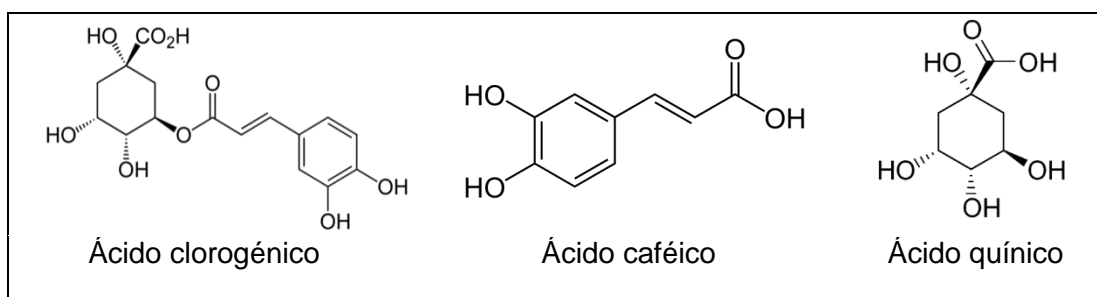


Figura 3.7. Estructura química de los principales compuestos fenólicos en la semilla de girasol.

No obstante, hay un decremento en la concentración de los compuestos fenólicos conforme la semilla es procesada, pues se ha reportado una mayor concentración en la harina de la semilla desengrasada, 4.61 %, en comparación con la concentración presente en la harina de la semilla descascarillada y desengrasada, 2.99 %, así como la presente en los productos proteínicos desengrasados, 1.23 % (Nwokolo, 1996).

3.3. EXTRACCIÓN DE LA PROTEÍNA DE SEMILLAS OLEAGINOSAS

La extracción y el aislamiento de la proteína de semillas oleaginosas convencionalmente se basan en una extracción alcalina seguida de una precipitación isoeléctrica, generando un producto rico en proteína con propiedades funcionales y nutricionales comercializables. Para lograr esto, se emplean diversos procedimientos (Arntfield, 2004):

- a) **Descascarillado.** La cascarilla es removida a través de una molienda o abrasión mecánica. Si la cascarilla es difícil de remover, debe existir un tratamiento previo, por ejemplo un tratamiento hidrotérmico. Con este paso, se logra reducir el contenido de fibra, compuestos fenólicos y algunos factores antinutricionales como el ácido fítico.
- b) **Extracción de aceite.** La mayoría del aceite de las semillas oleaginosas es obtenido mediante prensado y extracción con hexano. El subproducto resultante de las semillas oleaginosas se denomina torta o harina.
- c) **Tratamientos preliminares a la torta o harina.** Son tratamientos empleados para reducir compuestos indeseables en la torta o harina, tal como los compuestos fenólicos.
- d) **Disolución de la proteína.** Se suele emplear una disolución acuosa alcalina debido a la alta solubilidad que presentan las proteínas de las semillas oleaginosas en ésta. El pH de la disolución que se emplea varía entre 9 y 12.5, con mayor rendimiento de extracción asociado a mayores valores de pH. Además, el empleo de sales, principalmente NaCl, puede incrementar la

solubilidad de la proteína en medio alcalino, con lo cual se evita el uso de un pH extremo asociado a cambios estructurales de la proteína.

- e) **Precipitación de la proteína.** Las proteínas que han sido extraídas empleando disoluciones alcalinas, son precipitadas mediante un ajuste de pH hasta alcanzar el punto isoelectrico de la proteína. El valor de pH usado más comúnmente para el girasol es 4.5 y para el cártamo es de 5 a 6.
- f) **Otros pasos de purificación.** Estos pasos incluyen el lavado con disolución acuosa a pH ajustado después de la precipitación de la proteína, ultrafiltración, uso de resinas de intercambio iónico, entre otros.

3.4. ENVASES ALIMENTARIOS

Un empaque o envase alimentario es todo producto fabricado con materiales de diversa naturaleza que se utiliza para contener, proteger, manipular, distribuir y presentar al alimento, desde materias primas hasta productos acabados, en cualquier fase de la cadena de fabricación, distribución y consumo (Povea, 2015). Los materiales de envase más comunes son el vidrio, metal, plástico y papel.

La capacidad de protección de un envase alimentario se refiere a su capacidad de evitar daños de diversa índole en el producto que contiene, que pueden ser por alteraciones químicas, físicas o biológicas. Esta protección depende en gran parte de las propiedades del envase como barrera frente al oxígeno y la humedad (Povea, 2015).

Los envases pueden ser clasificados, de acuerdo a su nivel, en primarios, secundarios y terciarios (Povea, 2015).

- ✓ **Envase primario.** Aquél que está en contacto directo con el alimento y está destinado a contenerlo desde su fabricación hasta su entrega al consumidor. Es la inicial y principal barrera de protección, encargada de la preservación de la calidad microbiológica, fisicoquímica y organoléptica del alimento, así como de su inocuidad.

- ✓ **Envase secundario.** Aquél que sirve para dar protección adicional al alimento en el envase primario o agrupar un número determinado de envases primarios facilitando el manejo y distribución del producto.
- ✓ **Envase terciario.** Aquél que facilita la manipulación y el transporte de varias unidades de envases primarios o secundarios y se encarga de protegerlos durante su manipulación física, evitando daños inherentes al transporte.

3.4.1. Envasado activo de alimentos

Un envase activo de alimentos es aquél que, además de constituir una barrera física entre el producto y su entorno, desempeña alguna otra función aprovechando las posibles interacciones entre el envase y el alimento con el objetivo de prolongar la vida útil, mejorar su calidad, estabilidad, funcionalidad y/o facilitar el procesado y el consumo del alimento (Durango *et al.*, 2011).

Las técnicas de envasado activo incluyen aquellas en que se realiza una modificación constante de la atmósfera interna del envase, mediante la inclusión de sustancias como absorbentes de oxígeno, de etileno y de CO₂, así como aquellas en que se incorporan aditivos para mejorar la calidad del producto, tal como antimicrobianos, antioxidantes, saborizantes, colorantes u otra sustancia funcional. El componente activo del envase puede ser algún material ajeno incluido en él, o bien, formar parte del material de envasado. En el primer caso, se suele utilizar bolsas o sobres que contienen el componente activo, como un secante, mientras que en el segundo caso, el componente activo se incorpora a la película sintética o comestible, con la ventaja de tener contacto con el producto en toda su superficie (Fernández, 2000).

3.5. PELÍCULAS COMESTIBLES Y BIODEGRADABLES A BASE DE BIOPOLÍMEROS

Ha habido un creciente interés en el desarrollo de películas y recubrimientos comestibles y biodegradables a partir de biopolímeros renovables. La demanda de los consumidores por alimentos de alta calidad, la oportunidad de agregar valor a

materiales subaprovechados de la industria agrícola y la preocupación de un impacto adverso al medio ambiente de empaques elaborados con materiales sintéticos son los principales motores de este interés (Gennadios, 2004).

Los términos película y recubrimiento son usualmente empleados indistintamente. Sin embargo, las películas son estructuras preformadas que se colocan sobre o entre componentes de un alimento, mientras que los recubrimientos son capas delgadas del material que se forman directamente sobre la superficie del alimento por inmersión o rociamiento (Krochta, 2002).

El desarrollo de películas y recubrimientos comestibles y biodegradables implica la utilización de materiales capaces de formar una matriz cohesiva y continua. Los biopolímeros utilizados para tal fin pueden ser polisacáridos como el almidón, celulosa y quitosano; lípidos como ceras, monoglicéridos y ácidos grasos, o bien, proteínas de origen animal o vegetal (Han y Gennadios, 2005).

Las películas comestibles son inherentemente biodegradables, pero las películas biodegradables no son necesariamente comestibles. Para que las películas y recubrimientos puedan ser comestibles, deben ser producidos a partir de biopolímeros comestibles, con un proceso de elaboración apropiado para el procesamiento de alimentos y empleando reactivos, solventes y aditivos grado alimenticio (Han y Gennadios, 2005).

3.5.1. Funciones y aplicaciones de películas comestibles y biodegradables

Las películas comestibles y biodegradables pueden emplearse como cubiertas, envolturas, capas separadoras o cápsulas. Además, pueden potencialmente ser formadas en una caja, cápsula o bolsas (Krochta, 2002).

Muchas de las funciones de las películas y recubrimientos comestibles y biodegradables son las mismas que las de los envases convencionales, pero pueden presentar otras funciones adicionales. Estas deben elegirse según una aplicación específica, tipo de producto alimenticio y sus principales mecanismos de deterioro (Guilbert y Gontard, 2005). En la Tabla 3.5 se enlistan las funciones

principales que desempeñan las películas y recubrimientos comestibles y biodegradables.

Tabla 3.5. Funciones de las películas y recubrimientos comestibles y biodegradables.

| Función | Comestibles | Biodegradables |
|---|--------------------|-----------------------|
| Barrera frente al intercambio de gases humedad, aromas y lípidos entre el alimento y el ambiente externo. | x | x |
| Portación y retención de aditivos funcionales como antimicrobianos, antioxidantes y colorantes. | x | x |
| Portación de nutrimentos y saborizantes. | x | |
| Resistencia a fuerzas mecánicas. | x | x |
| Mejoramiento de características visuales y táctiles en las superficies de los productos. | x | |
| Empaque de aditivos para alimentos instantáneos o bebidas. | x | |

Fuentes: Guilbert y Gontard, 2005; Krochta, 2002.

Las películas y recubrimientos comestibles no tienen la finalidad de eliminar la necesidad de empaques protectores no comestibles; más bien, están destinados a trabajar junto con un envase convencional para la mejora de la calidad y tiempo de vida útil del producto. No obstante, la cantidad de material del empaque convencional puede verse reducido y el remanente del mismo puede ser reciclado más fácilmente; en adición, después de que el empaque convencional es abierto, la película o recubrimiento comestible y biodegradable, puede continuar protegiendo al producto. En contraste, las películas y recubrimientos biodegradables sí están intencionados a un reemplazo de los empaques convencionales no biodegradables (Krochta, 2002).

3.5.2. Películas proteínicas

Las proteínas, abundantemente disponibles a partir de recursos sustentables de origen animal o vegetal, pueden ser empleadas como materia prima para la formación de películas. Entre las proteínas o materias proteínicas, que han sido más ampliamente estudiadas para la elaboración de películas se encuentran:

- ✓ Gluten de trigo
- ✓ Zeína de maíz
- ✓ Aislado de proteína de soya
- ✓ Harina de la semilla de algodón
- ✓ Caseína
- ✓ Concentrados y aislados de proteína de suero
- ✓ Albúmina de huevo
- ✓ Colágeno y gelatina
- ✓ Proteína miofibrilar de pescado

3.5.2.1. Formación y características de las películas proteínicas

Las películas proteínicas son típicamente formadas por evaporación del disolvente a partir de una disolución proteínica, usualmente de 5-10 % m/v, que se extiende en una capa delgada. A este proceso se le conoce como “*solvent casting*” (Gennadios, 2004).

El primer paso en el proceso de formación, es la disolución de la proteína en un medio solvente, que generalmente es agua, etanol o ácido acético, el cual además puede contener otros aditivos (Cuq *et al.*, 1995). Posteriormente, el desarrollo de la estructura de la película durante el secado de las disoluciones implica la formación de una red tridimensional que se estabiliza mediante diversos tipos de enlaces y fuerzas intermoleculares, tal como interacciones electrostáticas, hidrofóbicas, puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals y puentes disulfuro. Estas interacciones dependen de la estructura de la proteína (Rubio y Guerrero, 2012).

Las películas proteínicas deben satisfacer una serie de requisitos funcionales específicos, es decir, propiedades de barrera contra la humedad, gases, solutos, lípidos, entre otros solutos, así como de color y aspecto, mecánicas, no toxicidad, entre otros. Estas propiedades dependen de diversos factores:

- a) *Formulación de la disolución.*** Se refiere a las características y concentración de la proteína y otros componentes presentes en el medio, como plastificantes, agentes de entrecruzamiento y otros aditivos añadidos para mejorar sus características funcionales; el pH, usualmente ajustado lejos del punto isoeléctrico de la proteína para evitar la precipitación de la misma, además de la existencia de condiciones desnaturalizantes.
- b) *Condiciones de formación.*** Se refiere principalmente al tipo de superficie sobre la cual la disolución proteínica es extendida y las condiciones de secado. La temperatura y la humedad relativa son factores determinantes de la velocidad de secado de las disoluciones proteínicas y pueden afectar la estructura y propiedades de la película. En general, un secado rápido impide la formación de asociaciones intermoleculares a través de la estructura de la película debido a la restricción en la movilidad de las cadenas moleculares. (Gennadios, 2004).
- c) *Condiciones de uso.*** Se refiere a las condiciones, como lo es la temperatura y humedad relativa, a las cuales estará expuesta la película, las cuales afectan sus propiedades de barrera y mecánicas principalmente.

De manera general, las películas proteínicas presentan buenas propiedades de barrera al oxígeno, CO₂ y lípidos, pero tienen la desventaja de presentar una alta permeabilidad al vapor de agua debido principalmente a la naturaleza hidrofílica de las proteínas (Montalvo *et al.*, 2012). Además, dado que usualmente requieren plastificación, generalmente muestran menor resistencia a la tracción que plásticos convencionales, pero su elongación depende principalmente del contenido del plastificante. Particularmente, las películas a base de biopolímeros de fuentes agrícolas, como las semillas oleaginosas, son altamente deformables o muy resistentes, no ambas cosas al mismo tiempo (Guilbert y Gontard, 2005).

3.5.2.2. *Plastificantes*

Los plastificantes son compuestos de un peso molecular relativamente bajo que suelen añadirse a las preparaciones proteínicas destinadas a la elaboración de

películas, ya que reducen las fuerzas intermoleculares entre las cadenas poliméricas de la proteína, es decir, reducen la cohesión entre las moléculas al posicionarse entre éstas e interaccionar con las mismas, principalmente mediante puentes de hidrógeno (Durango *et al.*, 2011). Lo anterior implica una disminución en la temperatura de transición vítrea (T_g) del polímero e incrementa el volumen de la estructura y la movilidad de sus moléculas (Han y Gennadios, 2005). Gracias a esto, se puede lograr una mejora en las propiedades mecánicas de la película como flexibilidad, fuerza y resistencia, para evitar su rompimiento durante el manejo y almacenamiento de los alimentos. Los plastificantes más comúnmente empleados en películas proteínicas son los polioles glicerol y sorbitol. Otros compuestos hidrofílicos que han sido empleados son el trietilenglicol, polietilenglicol, propilenglicol, glucosa y sacarosa (Gennadios, 2004).

3.6. DETERIORO OXIDATIVO DE LOS LÍPIDOS EN ALIMENTOS

La oxidación de los lípidos o enranciamiento oxidativo, es una de las principales causas de deterioro de los alimentos y una de las mayores preocupaciones en la industria alimentaria, porque da lugar a la aparición de sabores y olores anómalos, generalmente denominados “a rancio” en los alimentos que contienen grasas, lo cual afecta su calidad organoléptica. Además, disminuye la calidad nutritiva del alimento y se generan productos potencialmente tóxicos (Nawar, 1995).

El deterioro oxidativo se refiere principalmente a la oxidación de los ácidos grasos insaturados libres o esterificados, pero también de otros compuestos como las vitaminas A y E y los carotenoides, que presentan una estructura insaturada. Esta reacción puede llevarse a cabo por dos vías diferentes: la autooxidación y la oxidación fotosensibilizada o fotooxidación (Badui, 2013).

La autooxidación, cuyo mecanismo se describe en la Tabla 3.6, es la reacción entre el oxígeno molecular y los lípidos. Es el proceso más frecuente que provoca el deterioro oxidativo y se trata de una reacción en cadena de radicales libres que incluye tres etapas, las cuales se explican a continuación (Wong, 1995):

- a) **Iniciación:** Ocurre una sustracción homolítica de un átomo de hidrógeno por una especie reactiva, iniciador, formando un radical alquilo.
- b) **Propagación:** El radical alquilo reacciona con el oxígeno y se forma un radical peroxilo, que a su vez, reacciona con un lípido insaturado formando un hidroperóxido y un nuevo radical libre, el cual puede reaccionar también con el oxígeno formando otro radical peroxilo y así sucesivamente.
- c) **Terminación:** Los radicales libres se combinan para formar moléculas con electrones apareados, compuestos no radicalarios.

Tabla 3.6. Mecanismo de autooxidación de los lípidos.

| Etapa | Mecanismo | |
|--------------------|--|-----------------------------------|
| Iniciación | $RH \rightarrow R^{\bullet} + H^{\bullet}$ | Radical libre |
| Propagación | $R^{\bullet} + O_2 \rightarrow ROO^{\bullet}$ $ROO^{\bullet} + RH \rightarrow R^{\bullet} + ROOH$ | Radical peroxilo Hidroperóxido |
| Terminación | $R^{\bullet} + R^{\bullet} \rightarrow RR$ $R^{\bullet} + ROO^{\bullet} \rightarrow ROOR$ $ROO^{\bullet} + ROO^{\bullet} \rightarrow ROOR + O_2$ $RO^{\bullet} + R^{\bullet} \rightarrow ROR$ $2RO^{\bullet} + 2ROO^{\bullet} \rightarrow 2ROOR + O_2$ | Compuestos estables |

Fuente: Badui, 2013.

Como se observa en la Figura 3.8, las reacciones de autooxidación habitualmente presentan un periodo de inducción o iniciación, durante el cual se producen cambios muy pequeños en los lípidos. Este periodo es muy sensible a pequeñas concentraciones de sustancias capaces de acortarlo, prooxidantes, o de sustancias capaces de alargarlo, por ejemplo los antioxidantes (Gordon, 2001).

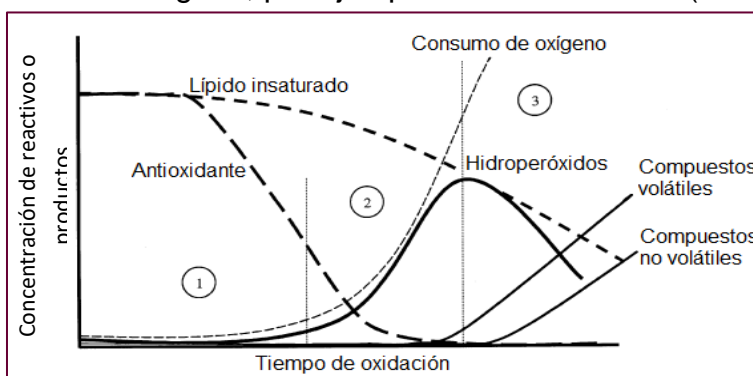


Figura 3.8. Curva cinética típica de autooxidación de lípidos: 1) Iniciación; 2) Propagación; 3) Terminación. Fuente: Kamal-Eldin et al., 2003.

La producción de los primeros radicales libres para iniciar la propagación tiene que ser catalizada. Se ha propuesto que la etapa de iniciación puede producirse por descomposición de un hidroperóxido mediante catálisis por metales o exposición a la luz (Nawar, 1995).

La luz y un agente sensibilizante como la clorofila, pueden provocar la formación de oxígeno singulete (1O_2) a partir del oxígeno en su forma más estable, el oxígeno triplete (3O_2), e iniciar el deterioro oxidativo (Gordon, 2001). El oxígeno en estado singulete es más electrofílico que en estado triplete debido a que los dos electrones más externos tienen espines opuestos y se presenta una fuerte repulsión entre ellos, dando lugar a un estado excitado (Badui, 2013). En el deterioro fotooxidativo, el oxígeno singulete puede reaccionar rápidamente con los dobles enlaces C=C, zonas de densidad electrónica alta. Los hidroperóxidos resultantes pueden escindirse para iniciar la reacción en cadena de radicales libres convencional (Nawar, 1995).

Diversos factores, tanto intrínsecos como extrínsecos, influyen en la oxidación de lípidos en alimentos, promoviendo o inhibiendo la reacción. Estos factores se enlistan en la Tabla 3.7.

Tabla 3.7. Factores que influyen en la oxidación de lípidos.

| Promotores | Inhibidores |
|--------------------------------|----------------------------------|
| × Temperaturas altas | ✓ Refrigeración |
| × Metales como Cu, Fe y Co | ✓ Secuestradores |
| × Peróxidos de grasas oxidadas | ✓ Antioxidantes |
| × Lipooxigenasa | ✓ Escaldado |
| × Presión de oxígeno | ✓ Gas inerte o vacío |
| × Luz | ✓ Empaque opaco |
| × Poliinsaturación | ✓ Hidrogenación de ácidos grasos |
| × Radiaciones ionizantes | insaturados |

Fuente: Badui, 2013.

3.6.1. Productos de la oxidación lipídica

Durante la oxidación de lípidos se generan compuestos que mantienen y aceleran la reacción y se sintetizan sustancias de diferentes pesos moleculares que confieren el olor y sabor típico de grasa oxidada o rancia, además de alteraciones en la viscosidad (Gordon, 2001).

Los hidroperóxidos son productos primarios de la oxidación lipídica, sin sabor ni olor, formados en las fases iniciales de la oxidación. Son relativamente inestables y se descomponen o transforman espontáneamente, o por reacciones catalizadas, a otras sustancias de diferentes pesos moleculares, productos secundarios (Gordon, 2001; Badui, 2013). Estas reacciones incluyen:

- ✓ Formación de dímeros, oligómeros y polímeros.
- ✓ Ruptura, generando productos como aldehídos, alcoholes, cetonas y ácidos.
- ✓ Deshidratación, generando productos como cetoglicéridos.
- ✓ Ciclación, generando hidroperóxidos cíclicos.
- ✓ Reacciones con otras dobles ligaduras, generando productos como epóxidos.

Los productos secundarios a su vez pueden experimentar oxidaciones y posteriores descomposiciones (Nawar, 1995).

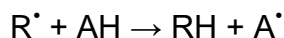
3.7. ANTIOXIDANTES

Los antioxidantes de los alimentos son cualquier sustancia que es capaz de inhibir o retardar el deterioro en el alimento que se produzca como consecuencia de la oxidación (Gordon, 2001). Pueden incorporarse en el alimento o en materiales de envasado de alimentos para controlar la oxidación de componentes grasos y pigmentos, contribuyendo a la conservación de su calidad (Lee, 2005).

3.7.1. Clasificación de antioxidantes

De acuerdo a su mecanismo de acción, existen dos tipos de antioxidantes: primarios y secundarios (Yanishlieva-Maslarova, 2001).

- ✓ **Antioxidantes primarios (inhibidores de la reacción en cadena).** Son aquellos capaces de captar radicales libres, frecuentemente por donación de un electrón al electrón desapareado del radical libre, formándose un radical antioxidante con baja reactividad. Ejemplos: Polifenoles, tocoferoles, butilhidroxitolueno (BHT), butilhidroxianisoll (BHA), terbutilhidroquinona (TBHQ), galato de propilo y carotenoides.



- ✓ **Antioxidantes secundarios (inhibidores preventivos).** Son aquellos que suprimen la formación de radicales libres y especies reactivas de oxígeno a través de diversos mecanismos no relacionados con la captación de radicales libres: quelación de metales pesados, p. ej. oxalatos, ácido fólico, ácido ascórbico y ácido cítrico; descomposición de hidroperóxidos p. ej. tioéteres, metionina, selenio y fosfolípidos; desactivación del oxígeno singulete, p. ej. licopeno y β -caroteno; captación del oxígeno o absorción de la radiación UV. Normalmente sólo poseen actividad antioxidante en presencia de un segundo componente minoritario. Cabe mencionar que algunos antioxidantes primarios pueden actuar también como secundarios.

De acuerdo a su origen, los antioxidantes se clasifican en:

- ✓ **Antioxidantes sintéticos.** Entre ellos destacan el BHA, BHT, TBHQ y los ésteres de ácido gálico como el galato de propilo.
- ✓ **Antioxidantes naturales.** Presentes en prácticamente todas las plantas, microorganismos, hongos y tejidos animales. Entre ellos destacan los carotenoides como el β -caroteno y licopeno; tocoferoles; isoflavonas como la genisteína y daidzeína; ácidos fenólicos como el caféico, clorogénico y gálico; y extractos de especias como clavo y romero (Badui, 2013).

La efectividad como antioxidante de una molécula depende tanto de sus características estructurales, determinantes en su reactividad química frente a radicales peroxilo y otras especies reactivas, así como de otros factores, tales

como la concentración, temperatura, el tipo de sustrato, el estado físico del sistema y la presencia de numerosos componentes que pueden actuar como prooxidantes o sinergistas (Yanishlieva-Maslarova, 2001).

3.7.2. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos representan un gran grupo de moléculas con diferentes propiedades y estructuras químicas. Se encuentran distribuidos ampliamente en los vegetales, ya que son una de las clases más importantes de metabolitos secundarios de las plantas e intervienen como antioxidantes naturales en los alimentos (Porras-Loaiza y López, 2009). Contienen al menos un grupo fenol que puede estar unido a otras estructuras aromáticas o alifáticas. Entre los grupos principales están los flavonoides y los ácidos fenólicos (Yanishlieva-Maslarova, 2001).

La eficacia de los compuestos fenólicos como antioxidantes depende de la reacción del hidrógeno fenólico con los radicales libres y de la estabilidad de los radicales antioxidantes formados por dicha reacción. Lo anterior a su vez está determinado por la posición y grado de hidroxilación, así como de los sustituyentes presentes en su estructura básica (Shi, 2001). La actividad antioxidante es mayor cuando los sustituyentes en las posiciones *orto* y *para* con respecto al grupo hidroxilo incrementan la densidad electrónica del mismo y disminuyen la energía del enlace O-H (Yanishlieva-Maslarova, 2001).

3.7.3. Quercetina

La quercetina, cuya estructura química se muestra en la Figura 3.9, es un polifenol del tipo flavonoide, con estructura $C_6-C_3-C_6$, más específicamente un flavonol, encontrado principalmente como glucósido de quercetina en diversos vegetales (Shi, 2001). Presenta actividad antioxidante en alimentos debido a su capacidad de captar radicales libres y de quelación de iones metálicos (Coşkun *et al.*, 2004). No obstante, los derivados glucósidos de los flavonoides son menos efectivos como antioxidantes que los compuestos aglicona (Yanishlieva-Maslarova, 2001).

En general, en los flavonoides, los grupos hidroxilo libres actúan como captadores de radicales libres y los grupos hidroxilo múltiples, especialmente en el anillo B, aumentan la actividad antioxidante (Yanishlieva-Maslarova, 2001). La presencia de la dihidroxilación en posición *orto* del anillo B contribuye significativamente a una alta estabilidad del radical y juega un rol importante en la deslocalización electrónica necesaria para su actividad antioxidante (Msagati, 2013).

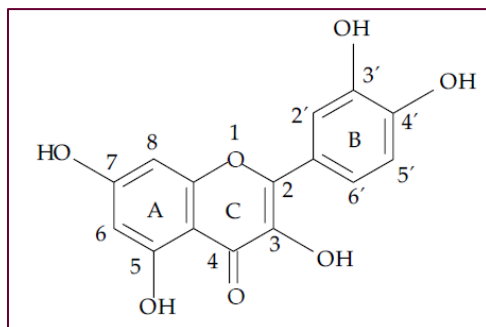


Figura 3.9. Estructura química de la quercetina.

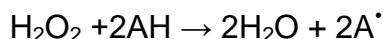
3.8. ENZIMA PEROXIDASA

Las peroxidasas son un diverso grupo de oxidorreductasas que se encuentran distribuidas en el reino vegetal, los tejidos animales y microorganismos. Catalizan la oxidación de un amplio número de sustratos orgánicos e inorgánicos, utilizando principalmente al peróxido de hidrógeno como aceptor de electrones. Como resultado de la oxidación, hay generación de radicales que posteriormente pueden reaccionar con otros sustratos (Buchert *et al.*, 2007).

3.8.1. Peroxidasa de rábano picante (HRP)

La peroxidasa de rábano picante (EC 1.11.1.7), HRP por su nombre en inglés Horseradish peroxidase, es una enzima de la clase III, peroxidasas secretadas por plantas, de la superfamilia peroxidasa-catalasa de las hemo-peroxidasas, que incluye a las peroxidasas de origen bacteriano, fúngico y de plantas. Entre todas las peroxidasas, la peroxidasa de rábano picante ha sido la más estudiada, particularmente la isoenzima C (HRP-C). Se encuentra en la raíz del rábano picante (*Armoracia rusticana*).

La enzima HRP-C se compone de una cadena de 308 residuos de aminoácidos, contiene dos átomos de calcio y un grupo prostético hemo, ferriprotoporfirina IX, unido a la enzima por el residuo His 170. Muchas de las reacciones catalizadas por la HRP pueden ser expresadas por la siguiente ecuación, donde AH es el sustrato reductor y A[•] es el producto radical correspondiente.



Entre los sustratos reductores de la HRP se encuentran los compuestos fenólicos, aminas aromáticas, indoles y sulfonatos (Veitch, 2004).

3.8.1.1. Mecanismo de reacción de la peroxidasa de rábano picante (HRP)

La reacción de la enzima peroxidasa es un proceso cíclico, como se muestra en la Figura 3.10, en el cual, la enzima es oxidada por el peróxido, usualmente peróxido de hidrógeno (H₂O₂), para ser después nuevamente reducida a su forma nativa a través de dos pasos secuenciales que involucra la formación de dos compuestos intermediarios, Compuestos I y Compuesto II (Azevedo *et al.*, 2003).

1. El primer paso del ciclo catalítico consiste en la reacción entre el H₂O₂ y el Fe (III) del grupo hemo de la enzima, ocasionando la escisión del H₂O₂, que conduce a la eliminación de una molécula de agua y la incorporación de un átomo de oxígeno generándose el Compuesto I, el cual contiene el grupo oxoferrilo (Fe(IV)=O) y un radical catiónico porfirínico.
2. El Compuesto I es reducido por una molécula del sustrato reductor (AH) a través de un mecanismo que involucra la transferencia de un solo electrón, dando lugar a la formación del Compuesto II donde el hierro está aún presente como Fe (IV) pero el radical porfirínico ha sido desactivado.
3. El Compuesto II es posteriormente reducido por una segunda molécula del sustrato reductor (AH) dando lugar a la enzima en su forma nativa, donde el hierro está en estado de oxidación +3 (Fe (III)).

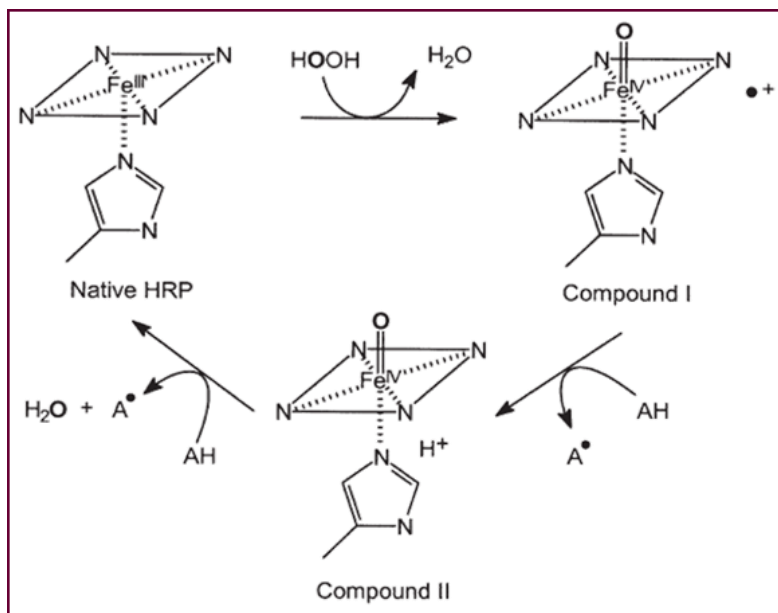


Figura 3.10. Ciclo de reacción de la peroxidasa HRP
Fuente: Azevedo et al., 2003.

3.8.1.2. Aplicaciones de la peroxidasa de rábano picante (HRP)

La enzima HRP es empleada en síntesis orgánica y biotransformaciones, así como en ensayos de acoplamiento enzimático, inmunoensayos y tratamiento de aguas. Algunas de las aplicaciones de la HRP en síntesis orgánica incluyen la N- y O- desalquilación, acoplamiento oxidativo, hidroxilación selectiva y reacciones de transferencia de oxígeno (Veitch, 2004).

3.8.2. Reacciones de acoplamiento mediadas por la enzima peroxidasa

La importancia de las enzimas hemo-peroxidasa en la química de polímeros se debe principalmente a su capacidad de oxidar una gran variedad de moléculas fenólicas generando especies reactivas, radicales fenoxi, lo cual da a lugar a diferentes reacciones de acoplamiento independientes a la enzima que pueden conducir a la formación de polímeros y nuevos materiales (Nyanhongo *et al.*, 2010).

La funcionalización vía enzimática de un polímero puede referirse al acoplamiento de moléculas funcionales a polímeros naturales o sintéticos, o bien, a un proceso

mediante el cual la enzima provoca la activación de la superficie del polímero para posteriores uniones (Nyanhongo *et al.*, 2010).

La peroxidasa es capaz de oxidar moléculas funcionales y grupos del polímero diana, conduciendo a la formación de radicales u otras especies reactivas. El acoplamiento entre estas especies reactivas implica un establecimiento de enlaces covalentes que puede resultar en la formación de homopolímeros, heteropolímeros, entrecruzamientos entre polímeros iguales o diferentes, o bien, en el acoplamiento de moléculas más pequeñas a la superficie del polímero presente (Nyanhongo *et al.*, 2010), como se representa en la Figura 3.11.

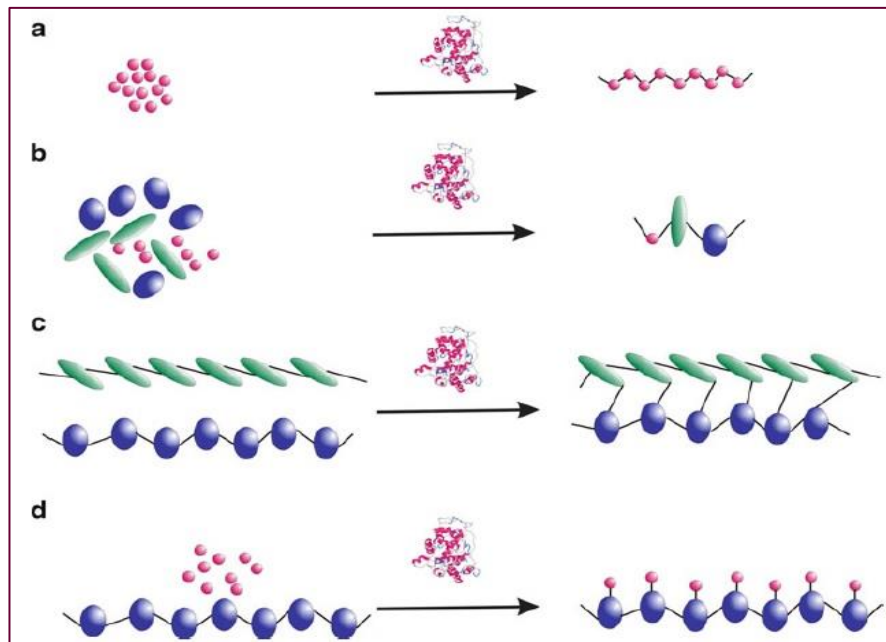


Figura 3.11. Representación esquemática de reacciones de acoplamiento mediadas por la peroxidasa: a) homopolimerización; b) heteropolimerización; c) entrecruzamiento; d) funcionalización de superficie.

Fuente: Nyanhongo *et al.*, 2010.

4. METODOLOGÍA (PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL)

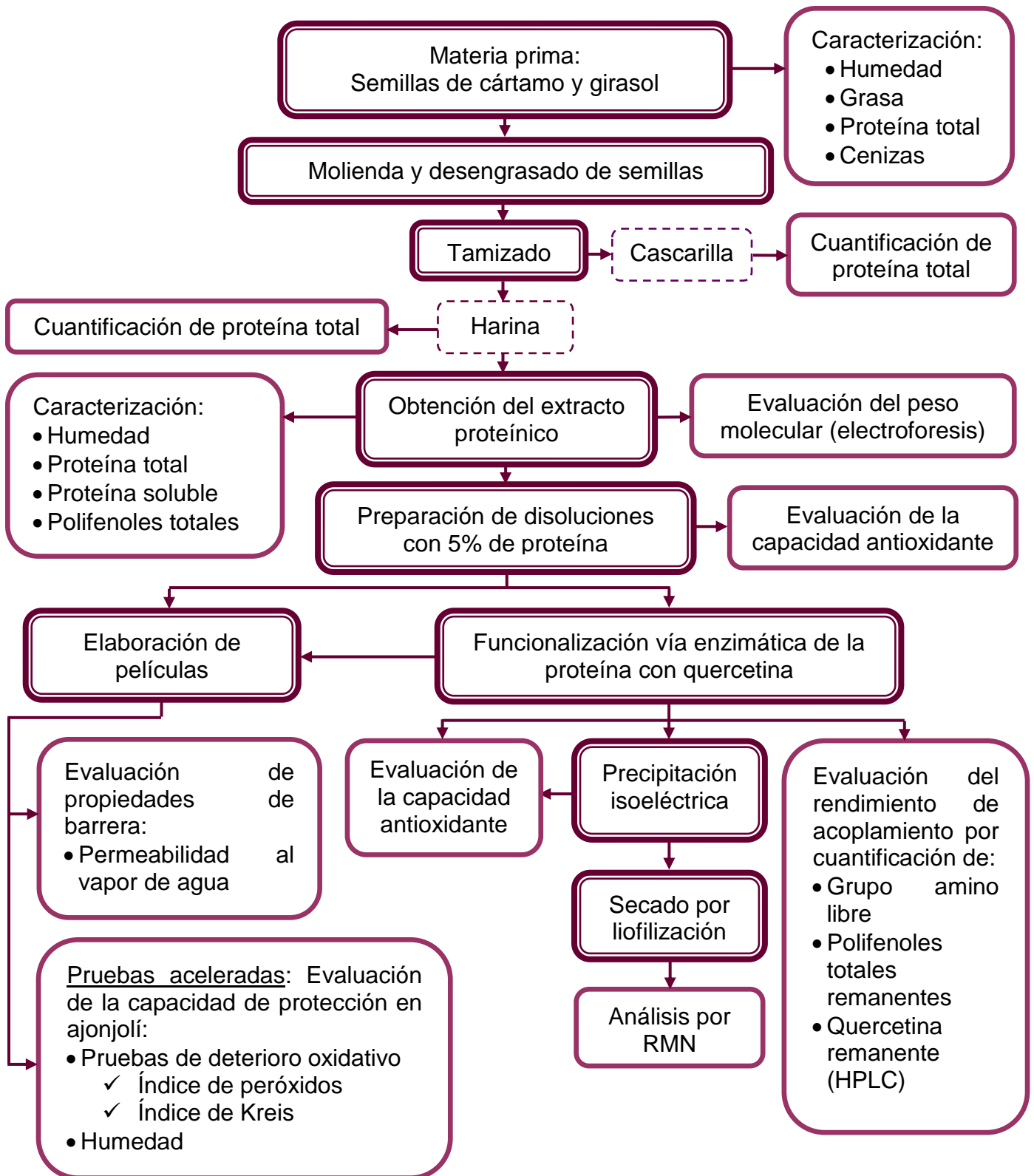


Figura 4.1. Esquema general de la estrategia experimental.

4.1. MÉTODOS

En la Figura 4.1 se muestra el esquema general de la estrategia experimental. A continuación se describen los métodos empleados.

4.1.1. Caracterización y tratamiento de las semillas

La semilla de cártamo se adquirió en el “Mercado Sonora” (colonia Balbuena, delegación Venustiano Carranza, CDMX). La semilla de girasol en el “Mercado Emiliano Zapata” (San Rafael, Coacalco, Estado de México).

4.1.1.1. Humedad. Método de secado en estufa (Nielsen, 2003).

4.1.1.2. Grasa. El contenido de grasa se determinó por método de Soxhlet empleando éter etílico como disolvente.

4.1.1.3. Cenizas. Método de cenizas totales por calcinación (Kirk *et al.*, 2002).

4.1.1.4. Proteína total. Método de Kjeldahl (Método Oficial AOAC 2001.11).

4.1.1.5. Desengrasado de las semillas. Método de Soxhlet, empleando hexano como disolvente.

4.1.1.6. Obtención de la fracción rica en proteína de las semillas

Se tamizó la muestra molida y desengrasada, se separó en dos fracciones y se determinó la proteína total de cada una. Se consideró como “cascarilla” al material retenido en los tamices 20 y 30 y como “harina” al del tamiz 40 en adelante.

4.1.2. Obtención y caracterización de los extractos proteínicos (pellets)

4.1.2.1. Obtención del extracto proteínico

Se suspendió la harina en agua en una relación 1:10, respectivamente. Se agitó por 15 min. Posteriormente el medio se alcalinizó con NaOH 1N hasta pH 11 y se sometió a agitación magnética por 2 h. Se centrifugó a 3075 x g por 15 min. El sólido se volvió a tratar bajo las mismas condiciones, se recolectaron ambos sobrenadantes y el sólido residual desechó. Posteriormente se llevó a cabo una precipitación isoeléctrica de la proteína al acidificar el medio con HCl 1N, para el girasol a pH 4.5 y para el cártamo a pH 5.4. Se agitó durante 1 h y se refrigeró por

24 h. Se centrifugó a 3720 x g por 15 min y se recuperó el extracto proteínico húmedo, pellet.

El rendimiento y merma de la extracción se calcularon con base en la proteína total de la harina empleada y la proteína total obtenida en el pellet y en el sobrenadante, respectivamente, como se muestra a continuación:

$$\% \text{ Rendimiento extractivo} = \frac{m_{\text{pellet}} \times P_{\text{pellet}}}{m_{\text{harina}} \times P_{\text{harina}}} \times 100$$

$$\% \text{ Merma de proteína en sobrenadante} = \frac{V_{\text{sobrenadante}} \times P_{\text{sobrenadante}}}{m_{\text{harina}} \times P_{\text{harina}}} \times 100$$

$$\begin{aligned} \% \text{ Merma de proteína en sólido residual} \\ &= 100 - (\% \text{ Rendimiento extractivo} \\ &+ \% \text{ Merma de proteína en sobrenadante}) \end{aligned}$$

Donde m_{pellet} es la masa obtenida de pellet, P_{pellet} es el contenido de proteína en el pellet en % m/m, m_{harina} es la masa de harina sometida a la extracción, P_{harina} es el contenido de proteína en la harina en % m/m, $V_{\text{sobrenadante}}$ es el volumen de sobrenadante producido en la extracción en mL y $P_{\text{sobrenadante}}$ es el contenido de proteína en el sobrenadante en % m/v.

4.1.2.2. Humedad. Método de secado en estufa a vacío (Nielsen, 2003).

4.1.2.3. Proteína total. Método de Kjeldahl (Método Oficial AOAC 2001.11)

4.1.2.4. Proteína soluble. Método de Lowry utilizando albúmina sérica bovina (BSA) como estándar (Lowry *et al.*, 1951).

4.1.2.5. Polifenoles totales

Se empleó el ensayo Folin-Ciocalteu basado en la reacción de óxido-reducción en medio alcalino entre los compuestos fenólicos y los ácidos fosfomolibdico y fosfotúngstico, formando óxidos de tungsteno y molibdeno de coloración azul con absorción máxima a 765 nm (García, 1990).

Para la prueba, una muestra de pellet se suspendió en agua en una relación 1:10, respectivamente. Posteriormente se adicionó ácido tricloroacético (TCA) 10 % en

una relación 1:2, respectivamente, para precipitar la proteína. La mezcla se filtró y el filtrado se consideró como el extracto de polifenoles, el cual fue neutralizado con NaOH 2N pH 6.5-7.5.

A continuación se tomaron 0.5 mL del extracto, se adicionaron 2.5 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu diluido 1:10 en agua destilada y 2 mL de Na₂CO₃ 7.5 %. Se incubó 60 min en oscuridad y se midió la absorbancia a 765 nm en un espectrofotómetro (BECKMAN DU®-65) (Skerget *et al.*, 2005).

Se trazó una curva patrón de ácido gálico en metanol 80 % de 10-80 ppm y los resultados se expresaron como mg de equivalentes de ácido gálico (EAG)/g pellet y como mg de equivalentes de ácido gálico (EAG)/g proteína extraída.

4.1.2.6. Determinación del peso molecular de los extractos proteínicos

Se llevó a cabo una electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) de acuerdo al método de Laemmli (He, 2011) en un sistema para electroforesis (Bio-Rad Mini-PROTEAN®), mostrado en la Figura 4.2.

El gel concentrador se preparó al 4 % y el gel separador al 12 % con un espesor de 0.75 mm. Se utilizó un buffer de corrida Tris-Glicina pH 8.3 y un buffer de muestra 4X (Tris-HCl 0.25M, pH 6.8, SDS 8 %, azul de bromofenol 0.04 %, glicerol 25 % y β-mercaptoetanol 5 %).

Los extractos proteínicos se disolvieron en medio alcalino y en tubos Eppendorf se preparó 1 mL de cada muestra mezclando la disolución proteínica con buffer de muestra en una relación 3:1, respectivamente, obteniendo una concentración final de 1.5 mg de proteína soluble/mL. Los tubos Eppendorf se colocaron en un baño maría en ebullición durante 5 min y se centrifugó a 17 000 x g por 15 s a temperatura ambiente, ≈23 °C.

Posteriormente, en cada carril se colocaron 20 µL de muestra y en los carriles extremos se colocaron 7 µL de marcador de peso molecular (ColorBurst™ Electrophoresis Marker, Sigma-Aldrich). La electroforesis se llevó a cabo a 60 V los primeros 15 min y posteriormente a 180 V durante aproximadamente 1.5 h. El gel obtenido se sumergió en una disolución de tinción de azul de Coomassie R-250 y se incubó con un suave movimiento rotatorio durante 1.5 h a temperatura

ambiente, ≈ 23 °C. Finalmente, el gel fue decolorado con 2 a 3 lavados empleando una disolución de decoloración rápida de metanol 40 %, ácido acético 10 % y agua destilada 50 %. Se tomó una imagen del gel y se analizó con el software Image Lab 3.0 (Bio-Rad) para la estimación del peso molecular de los extractos proteínicos.

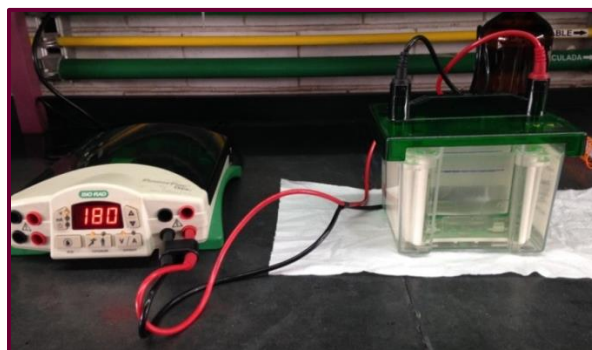


Figura 4.2. Sistema de electroforesis Bio-Rad Mini-PROTEAN®.

4.1.3. Preparación de las disoluciones proteínicas

Una vez conocido el contenido proteínico del pellet, éste se suspendió en agua destilada, se sometió a agitación magnética y posteriormente se solubilizó alcalinizando el medio con NaOH 1N hasta pH 9 o pH 11. Una vez disuelta la proteína, se agregó agua destilada hasta alcanzar un volumen tal que la concentración de la proteína en disolución fuese 5 %. Dicha disolución fue filtrada para eliminar residuos sólidos presentes. La formulación de las disoluciones proteínicas se describe en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1. Formulación de las disoluciones proteínicas.

| Disolución proteínica | Proteína (%) | Quercetina ⁽¹⁾ (µg/mL) | Enzima peroxidasa ⁽²⁾ (U/mL) | H ₂ O ₂ 5 % ⁽³⁾ (µL/mL) |
|-----------------------|--------------|-----------------------------------|---|--|
| SC | 5 | 0 | 0 | 0 |
| SE | 5 | 0 | 0.04 | 1.2 |
| SEQ | 5 | 20 | 0.04 | 1.2 |
| SQ | 5 | 20 | 0 | 0 |

1. La quercetina (Sigma-Aldrich) se disolvió previamente en etanol 96 %.

2. Enzima disuelta en buffer de fosfatos 0.1M, pH 6.5-7.

3. Volumen de H₂O₂ agregado cada 10 min, durante 1 h.

Las disoluciones control, SC, y las disoluciones adicionadas con quercetina sin tratamiento enzimático, SQ, se sometieron a agitación magnética a una temperatura de 40-45 °C por 30 min. Las disoluciones en las cuales se llevó a cabo un tratamiento enzimático con y sin adición de quercetina, SE y SEQ respectivamente, se sometieron a dos tratamientos diferentes, descritos en el apartado 4.1.4.

4.1.4. Funcionalización de la proteína con quercetina

Se llevaron a cabo dos tratamientos enzimáticos para la funcionalización de la proteína con quercetina. El mismo tratamiento se llevó a cabo en las disoluciones proteínicas sin adición de quercetina para la determinación del rendimiento de acoplamiento entre la quercetina y la proteína, así como la evaluación de la capacidad antioxidante.

4.1.4.1. Tratamiento 1 (T1)

La disolución proteínica 5 %, concentración empleada para la elaboración de películas, se sometió a agitación magnética a una temperatura de 40-45 °C por 10 min. Posteriormente se añadió quercetina disuelta en etanol 96 % hasta una concentración de 20 µg/mL de disolución proteínica y disolución de la enzima peroxidasa de rábano picante 0.1-0.2 mg/mL (Peroxidase from horseradish Type I, Sigma-Aldrich) en una cantidad estandarizada para obtener 0.04 U/mL de disolución proteínica. Se mantuvo la agitación magnética y dicha temperatura durante 1 h agregando 1.2 µL H₂O₂ 5 %/mL de disolución proteínica cada 10 min y 30 min adicionales sin agregar H₂O₂.

4.1.4.2. Tratamiento 2 (T2)

Se llevó a cabo el mismo procedimiento que en el tratamiento 1, pero una vez transcurrido el tiempo de reacción, la enzima se inactivó, sometiendo la disolución proteínica a 76-80 °C por 15 min con agitación constante.

4.1.4.3. Actividad enzimática de la peroxidasa

Se midió la actividad enzimática de la peroxidasa con el fin de estandarizar la cantidad de unidades de actividad enzimática (U) por utilizar en el proceso de funcionalización de la proteína.

Se tomó 1 mL de disolución de enzima peroxidasa adecuadamente diluida y se agregaron 3.8 mL de buffer de fosfatos 0.1 M, pH 6.5-7.0, 1 mL de guayacol 40 mM, sustrato reductor, y 0.2 mL de H₂O₂, sustrato oxidante. Se agitó, se dejó reaccionar por 5 min y se midió la absorbancia de la disolución a 470 nm en un espectrofotómetro (BECKMAN DU®-65), la cual adquiere una coloración rojo ladrillo debido al producto generado, tetraguayacol. Como blanco de reactivos, se preparó una disolución con 1 mL del buffer empleado en lugar de la muestra.

La actividad enzimática se calculó mediante la siguiente manera:

$$\frac{U}{\text{mL}} = \frac{\mu\text{mol Tetraguayacol}}{\text{min} \times \text{mL}} = \frac{A_{470}}{\varepsilon \times L \times t} \times \frac{V \text{ ensayo}}{V \text{ sol. enzima}}$$
$$\frac{U}{\text{g sólido}} = \frac{U}{\text{mL sol. enzima}} \times \frac{V \text{ sol. enzima}}{W}$$

Donde U es unidad de actividad enzimática, A_{470} es la absorbancia medida a los 5 min, ε es el coeficiente de extinción molar del tetraguayacol ($26.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), t es tiempo en minutos, L es el ancho de la celda (1 cm), V es volumen en mL y W es la masa de polvo liofilizado de la enzima comercial en g.

4.1.5. Análisis de los extractos de proteínicos por resonancia magnética nuclear de protón (RMN¹H)

Una vez funcionalizada la proteína, se llevó a cabo una precipitación isoeléctrica y se realizó un lavado con una disolución acuosa de pH igual al punto isoeléctrico de la proteína correspondiente en una relación 1:2, respectivamente. Se centrifugó a 3720 x g por 10 min y se repitió el procedimiento de lavado. El extracto proteínico resultante y el control se sometieron a ultracongelación por 24 h y una posterior deshidratación empleando un liofilizador (LABCONCO FreeZone), con una presión de 0.100 mbar por 24 h. Las muestras fueron analizadas por resonancia magnética nuclear de protón (RMN¹H) en la Unidad de Servicios de Apoyo la

Investigación y a la Industria (USAI) de la Facultad de Química, UNAM. Las muestras fueron disueltas en ácido trifluoroacético deuterado (TFA-d) y dióxido de deuterio (D₂O). Se utilizó un equipo Agilent MR a 400 MHz, empleando tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Los datos obtenidos fueron procesados con el software Mest-ReNova 8.1.

4.1.6. Evaluación del rendimiento de acoplamiento entre la proteína y el antioxidante

4.1.6.1. Cuantificación del grupo amino primario libre

Con base en la suposición de un posible acoplamiento de los compuestos fenólicos con los grupos amino primario presentes en la proteína, se evaluó de manera indirecta el acoplamiento entre dichos compuestos mediante la cuantificación de los grupos amino primario libres en las disoluciones proteínicas.

La concentración del grupo amino primario libre en las disoluciones proteínicas fue cuantificada por la reacción con el ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS) el cual, en medio alcalino, reacciona con grupos amino primario vía sustitución nucleofílica aromática bimolecular, que resulta en la formación del complejo Meisenheimer y trinitrofenil amina, producto con coloración amarilla (Gyarmati *et al.*, 2015).

Siguiendo el método descrito por Krasaechol *et al.*, 2008, se tomaron 40 µL de disolución proteínica y se añadieron 1.96 mL de buffer de tetraborato de sodio 0.1 M, pH 9.3 y 40 µL de ácido trinitrobenzenosulfónico (Sigma-Aldrich) 0.03 M. Se agitó y se dejó reposar por 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se midió la absorbancia de la disolución a 420 nm en un espectrofotómetro (BECKMAN DU®-65).

La concentración de grupos amino primario libres se calculó se la siguiente manera:

$$fNH_2 \left(\frac{\text{mmol}}{100 \text{ g proteína}} \right) = \frac{A_{420} \times 1000}{\epsilon \times L} \times \frac{V \text{ ensayo}}{W} \times 100 \text{ g proteína}$$

Donde fNH_2 son los grupos amino primario libres, A_{420} es la absorbancia de la disolución medida a los 30 min, ϵ es el coeficiente de extinción molar del grupo amino primario libre reportado por Krasaechol *et al.*, 2008 ($20\,300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), L es el ancho de la celda (1 cm), $V \text{ ensayo}$ es el volumen total de disolución en la celda (0.002040 L) y W es la masa de la proteína en g que se encuentra en la celda.

4.1.6.2. Cuantificación de polifenoles totales remanentes

El rendimiento de acoplamiento polifenoles-proteína se calculó a partir de la cuantificación de polifenoles totales remanentes en el sobrenadante tras la precipitación de la proteína.

Se tomaron 5 mL de disolución proteínica 5 % y se adicionaron 10 mL de ácido tricloroacético (TCA) 10 % para precipitar la proteína. La mezcla se filtró y el filtrado se consideró como el extracto de polifenoles, el cual fue neutralizado con NaOH 2N hasta pH 6.5-7.5. A partir de este extracto, se realizó la cuantificación de polifenoles totales por medio del ensayo de Folin-Ciocalteu como se describió en el apartado 4.1.2.5. Se trazó una curva patrón de quercetina (Sigma-Aldrich) en etanol 96 % de 5 a 50 ppm y los resultados se expresaron como μg equivalentes de quercetina/mL de disolución proteínica original ($\mu\text{g EQ/mL}$).

Los polifenoles totales remanentes en el sobrenadante de la disolución control se consideraron como el 100 % de polifenoles inherentes del extracto disponibles presentes en la disolución, mientras que los polifenoles remanentes en los sobrenadantes de las disoluciones tratadas con enzima, con y sin adición de quercetina, así como los remanentes en el sobrenadante de las disoluciones con quercetina añadida sin tratamiento enzimático, se consideraron como los polifenoles no acoplados a la proteína.

El rendimiento de la reacción de acoplamiento entre polifenoles-proteína se calculó como se muestra a continuación:

$$\% \text{ Acoplamiento de polifenoles inherentes del extracto} = \left(1 - \frac{P_{S.SE}}{P_{S.SC}}\right) \times 100$$

$$\% \text{ Acoplamiento de quercetina añadida} = \left(1 - \frac{(P_{S.SEQ} - P_{S.SE})}{Q_A}\right) \times 100$$

$$\% \text{ Acoplamiento total de polifenoles} = \left(1 - \frac{P_{S.SEQ}}{P_{S.SC} + Q_A}\right) \times 100$$

Donde $P_{S.SC}$ son los polifenoles totales en sobrenadante de la disolución control (SC), $P_{S.SE}$ son los polifenoles en sobrenadante de la disolución proteínica tratada con enzima (SE), $P_{S.SEQ}$ son los polifenoles en sobrenadante de la disolución proteínica tratada con enzima y con adición de quercetina (SEQ) y Q_A es la quercetina total agregada a la disolución proteínica.

Además, se determinó el porcentaje de quercetina añadida que se acopla a la proteína sin tratamiento enzimático.

$$\% \text{ Acoplamiento de quercetina añadida} = \left(1 - \frac{P_{S.SQ} - P_{S.SC}}{Q_A}\right) \times 100$$

Donde $P_{S.SQ}$ son los polifenoles totales en sobrenadante de la disolución proteínica con quercetina añadida sin tratamiento enzimático (SQ).

4.1.6.3. Cuantificación de quercetina remanente por HPLC

Se cuantificó la quercetina remanente en sobrenadantes de las disoluciones proteínicas SC, SEQ (T2) y SQ tras la precipitación de la proteína con TCA 10 % mediante HPLC (equipo Waters: bomba modelo 515, detector dual de absorbancia modelo 2487). Las condiciones de ensayo se reportan en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2. Condiciones de ensayo empleadas para HPLC.

| | |
|--------------------|--|
| Columna | C 18 (ACE® HPLC Columns) |
| Fase móvil | Ácido acético al 1 % (70 %), acetonitrilo (22 %) e isopropanol (8 %) |
| Loop | 50 µL |
| Detección | Absorbancia UV, a 320 nm |
| Flujo | 0.5 mL/min |
| Temperatura | Ambiente, ~ 23 °C |

Debido a que la quercetina añadida a las disoluciones proteínicas se encuentra a una concentración de 20 ppm y para la precipitación de la proteína la muestra se diluye 1:5, la concentración máxima de quercetina añadida que puede estar presente en el sobrenadante es de 4 ppm, quercetina no acoplada a proteína. Por tanto, se utilizó como estándar una disolución de quercetina 4 ppm. Los resultados se expresaron como μg Quercetina/mL de disolución proteínica original.

El rendimiento de acoplamiento de quercetina, añadida y presente en el extracto, a la proteína, se calculó como se muestra a continuación:

$$\% \text{ Acoplamiento de quercetina} = \left(1 - \frac{Q_{S.SEQ}}{Q_A + Q_{S.SC}}\right) \times 100$$

Donde $Q_{S.SEQ}$ es la quercetina remanente en sobrenadante de la disolución proteínica tratada enzimáticamente y con adición de quercetina (SEQ), $Q_{S.SC}$ es la quercetina en sobrenadante de la disolución proteínica control (SC) y Q_A es la quercetina total agregada.

Adicionalmente, se determinó el porcentaje de quercetina, añadida y presente en el extracto, que se acopla a la proteína sin tratamiento enzimático:

$$\% \text{ Acoplamiento de quercetina} = \left(1 - \frac{Q_{S.SQ}}{Q_A + Q_{S.SC}}\right) \times 100$$

Donde $Q_{S.SQ}$ es la quercetina en sobrenadante de la disolución proteínica con quercetina añadida sin tratamiento enzimático (SQ), Q_A es la quercetina total agregada y $Q_{S.SC}$ es la quercetina en sobrenadante de la disolución proteínica control (SC), considerada como la presente en el extracto.

4.1.7. Determinación de la capacidad antioxidante de las disoluciones proteínicas

Se determinó la capacidad de las muestras de capturar al radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$. El radical fue generado mediante la oxidación de ABTS (Sigma-Aldrich) 7 mM con persulfato de potasio 2.45 mM en disolución acuosa, incubando la disolución en oscuridad a temperatura ambiente por 16 h. Posteriormente, el radical fue diluido

con agua hasta obtenerse una absorbancia de 0.70 ± 0.03 a 734 nm, la cual fue medida en un espectrofotómetro (BECKMAN DU®-65).

Las muestras se diluyeron 1:25 con buffer de fosfatos 0.01 M, pH 7.4 y se hicieron reaccionar durante 10 min con disolución de radical ABTS^{•+} de absorbancia 0.70 ± 0.03 a 734 nm. Como blanco de reacción se utilizó buffer de fosfatos 0.01 M, pH 7.4 en lugar de la muestra (Salgado *et al.*, 2011). Como control positivo se utilizó una disolución de quercetina en etanol 96 % 150 ppm.

El porcentaje de capacidad antioxidante (%CAO) fue determinado mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ CAO} = \frac{A_{\text{blanco}} - A_{\text{muestra}}}{A_{\text{blanco}}} \times 100$$

Donde A_{blanco} es la absorbancia a 734 nm del blanco de reacción a los 10 min y A_{muestra} es la absorbancia a 734 nm de la muestra a los 10 min.

Se trazó una curva patrón de Trolox (Sigma-Aldrich) en etanol 96 %, con concentraciones de 10 a 450 ppm, bajo las mismas condiciones de ensayo. Haciendo uso de dicha curva, los resultados fueron expresados como valores TEAC (capacidad antioxidante equivalente de Trolox) en μmol equivalentes de Trolox/ g proteína ($\mu\text{mol ET/g}$ proteína).

4.1.8. Elaboración y caracterización de las películas proteínicas

4.1.8.1. Elaboración de las películas proteínicas

El pH de la disolución proteínica 5 % fue ajustado a pH 11 empleando NaOH 1N. Se sometió a agitación magnética y se calentó en un baño maría hasta una temperatura de 40-45 °C. Una vez alcanzada la temperatura, se agregó la mezcla de plastificantes, glicerol + sorbitol, en proporción 1:1, a 2.5 % del total de la disolución. Se mantuvo en agitación por 30 min a 40-45 °C. Posteriormente, la disolución se vertió en moldes en una proporción de 0.5 mL/cm^2 . Se dejó secar a temperatura ambiente, $\sim 23 \text{ }^\circ\text{C}$, durante 4 a 5 días.

4.1.8.1. Acondicionamiento de las películas

Las películas proteínicas fueron acondicionadas durante 48 h previamente a su caracterización; permeabilidad al vapor de agua, masa y espesor, en un desecador a 23 ± 2 °C y una humedad relativa de 51 ± 3 %, empleando una disolución saturada de nitrato de magnesio ($\text{MgNO}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$). Dichas condiciones fueron medidas con un termohigrometro (Oakton modelo 35700-10). Para la medición del espesor se empleó un micrómetro (Fowler®, 0-1”). En la Figura 4.3 se muestran las películas en acondicionamiento.

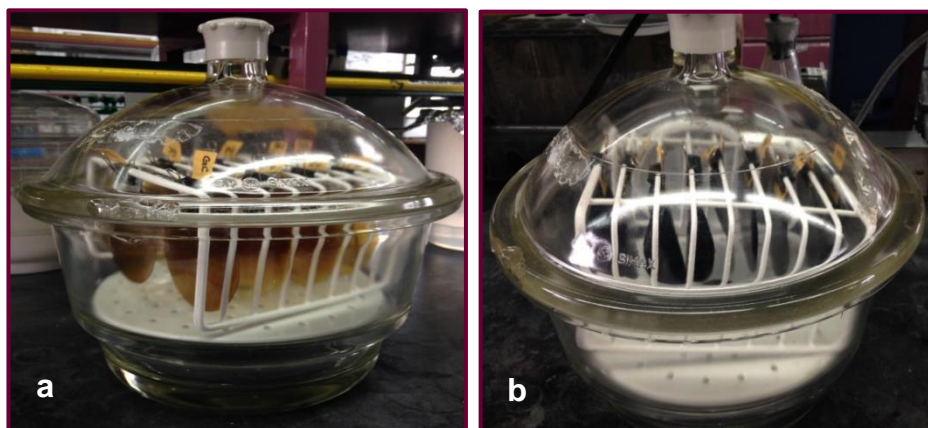


Figura 4.3. Películas proteínicas de cártamo (a) y girasol (b) en acondicionamiento dentro del desecador.

4.1.8.2. Permeabilidad al vapor de agua (PVA)

Se determinó con el método ASTM E 96/E 96M-05 (2005), en el cual se registra el cambio de masa debido a la transferencia de humedad a través de un material en un tiempo determinado.

Las películas proteínicas, previamente acondicionadas por 48 h a una humedad relativa de 51 ± 3 % y una temperatura de 23 ± 2 °C, fueron recortadas de forma circular con un diámetro de 6.9 cm y se les determinó el espesor con un micrómetro de precisión 0.0001 in. Se pusieron en celdas de acrílico con una abertura circular de 5.7 cm de diámetro, las cuales contenían alrededor de 55 g de cloruro de calcio anhidro (CaCl_2). Posteriormente, las celdas fueron selladas herméticamente con un aro de silicón y tornillos.

Se midió la masa inicial de cada celda con la película y las celdas fueron colocadas en un desecador con una disolución saturada de nitrato de magnesio

(MgNO₃•6H₂O), como se muestra en la Figura 4.4. Se hicieron determinaciones periódicas de la masa de cada celda durante 9 días, registrando además la humedad relativa y la temperatura con un termohigrometro (Oakton modelo 35700-10). Las condiciones de la prueba fueron: H_R= 50±2 % y T=22±2 °C. Se consideró la humedad relativa en la celda de permeación como 0 %.

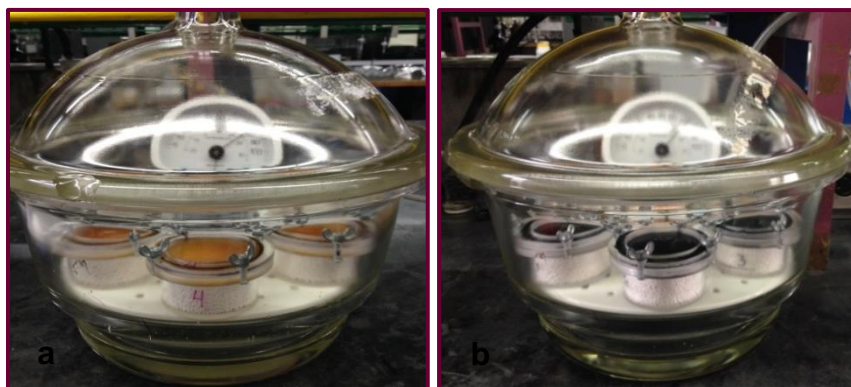


Figura 4.4. Pruebas de permeabilidad al vapor de agua de las películas proteínicas de cártamo (a) y girasol (b).

Los valores de permeabilidad al vapor de agua (PVA) se obtuvieron de la siguiente manera:

a) Se construyó una gráfica de la masa de la celda en función del tiempo (m x t) y se hizo una regresión lineal. Los coeficientes de correlación promedio obtenidos fueron; r= 0.9983, 0.9981 y 0.9992 para las películas P.SC, P.SEQ y P.SQ de cártamo, respectivamente; r= 0.9965, 0.9992 y 0.9982 para las películas P.SC, P.SEQ y P.SQ de girasol, respectivamente, y 0.9975 para la película de LDPE (Ziploc®).

b) Se calculó la velocidad de transmisión de vapor de agua (WVT).

$$WVT \left(\frac{\text{g}}{\text{s} * \text{m}^2} \right) = \frac{(\Delta m / \Delta t)}{A}$$

Donde ($\Delta m / \Delta t$) es la pendiente de la línea recta obtenida de la gráfica m x t (g s⁻¹) y A es el área de transmisión del vapor de agua (m²).

c) Se calculó la permeanza (P):

$$P \left(\frac{\text{g}}{\text{s} * \text{m}^2 * \text{Pa}} \right) = \frac{WVT}{S \times (R_1 - R_2)}$$

Donde WVT es la velocidad de transmisión de vapor de agua ($\text{g s}^{-1} \text{m}^{-2}$), S es la presión de vapor de saturación a la temperatura de prueba (Pa), R_1 es la humedad relativa en el desecador y R_2 es la humedad relativa en la celda de permeación.

d) Se calculó la permeabilidad al vapor de agua (PVA):

$$\text{PVA} \left(\frac{\text{g} * \text{m}}{\text{s} * \text{m}^2 * \text{Pa}} \right) = P \times e$$

Donde P es la permeanza ($\text{g s}^{-1} \text{m}^{-2} \text{Pa}^{-1}$) y e es el espesor de la película (m).

4.1.9. Evaluación de la capacidad protectora de las películas frente al deterioro oxidativo en ajonjolí (pruebas aceleradas)

Se empacaron aproximadamente 15 g de ajonjolí molido en cada película elaborada, P.SC, P.SEQ y P.SQ. Para fines comparativos, también se empacó ajonjolí molido en bolsas de LDPE (Reynolds®). Se eligió esta matriz alimenticia ya que presenta un elevado contenido de aceite, entre 48 y 50 %, en cuya composición predominan los ácidos grasos insaturados oleico, 38-49 %, y linoleico, 37-46 % (Paredes-López, 1994), propensos a la oxidación.

Los empacados se almacenaron en una cámara climática (Thermo Scientific™ Forma™), con humedad relativa y temperatura controlada de 45 ± 2 % y 45 °C, respectivamente, como se muestra en la Figura 4.5.

Periódicamente, se hicieron pruebas en el alimento de deterioro oxidativo, índice de peróxidos e índice de Kreis, así como la determinación de humedad durante 99 días.



Figura 4.5. Ajonjolí empacado con películas proteínicas de cártamo y girasol y bolsas LDPE (Reynolds ®) en la cámara climática.

4.1.9.1. Humedad. Método de secado en estufa (Nielsen, 2003).

4.1.9.2. Extracción del aceite de ajonjolí

Se pesaron (7.0-7.5) g de muestra de ajonjolí molido y se agregó hexano en una relación 1:5, respectivamente. Se mantuvo en agitación durante 25 min. Se dejó sedimentar y se filtró. Se repitió el procedimiento y se recolectaron los filtrados. El disolvente se evaporó en un baño de agua a 40 °C en una campana de extracción.

4.1.9.3. Índice de Peróxidos

Se empleó un método colorimétrico basado en la oxidación del Fe (II) a Fe (III) por los peróxidos de la muestra y su determinación mediante la producción de un color rojo debido a la formación de un complejo entre el tiocianato de amonio y el Fe (III) (Kirk *et al.*, 2002).

Se pesaron 0.001-0.1 g del aceite extraído del ajonjolí y se disolvieron en 10 mL de una mezcla de diclorometano/metanol 70:30. Posteriormente se adicionaron 0.05 mL de una disolución de tiocianato de amonio 30 % y se midió la absorbancia

a 500 nm (E_0) frente a un blanco de disolventes en un espectrofotómetro (BECKMAN DU®-65). Después se agregaron 0.05 mL de una disolución de cloruro ferroso (FeCl_2) 0.35 % en HCl 0.2 M, se mezcló y, después de exactamente 5 min, se tomó la lectura de absorbancia a 500 nm (E_2). Simultáneamente, se hizo la determinación a los 5 min de haber agregado 0.05 mL de FeCl_2 al blanco (E_1).

Se trazó una curva de calibración con cloruro férrico (FeCl_3) disuelto en diclorometano/metanol (70:30) de 5 a 50 $\mu\text{g Fe}/10 \text{ mL}$. La curva se preparó mezclando 10 mL de cada dilución de FeCl_3 con 0.05 mL de tiocianato de amonio 30 % y 0.05 mL de HCl 0.2 M, midiendo la absorbancia a 500 nm.

El índice de peróxidos (IP) se obtuvo de la siguiente manera:

$$\text{IP} \left(\frac{\text{mEq}}{\text{kg}} \right) = \frac{m}{W \times 55.84}$$

Donde W es la masa de la muestra de aceite en g, 55.84 es el peso molecular del Fe y m son los $\mu\text{g Fe}/10 \text{ mL}$ obtenidos a partir de la curva de calibración utilizando la absorbancia una vez corregida por los blancos.

$$A_{\text{corr.}} = E_2 - (E_1 + E_0)$$

4.1.9.3. Índice de Kreis

El método se basa en la producción de color rojo debido a la reacción entre el fluoroglucinol con el aldehído epihidrial o aldehído malónico de la grasa oxidada en medio ácido (Kirk *et al.*, 2002).

Se disolvieron 50-500 mg de aceite extraído del ajonjolí en 5 mL de diclorometano. Después se añadieron 10 mL de ácido tricloroacético (TCA) 30 % en ácido acético glacial y 1 mL de fluoroglucinol al 1 % en ácido acético. Se agitó y la disolución se incubó en un baño de agua a 45 °C por 15 min. Posteriormente se dejó enfriar y se agregaron 4 mL de etanol 96 %, tras lo cual, se midió la absorbancia a 540 nm frente a un blanco de reactivos.

El índice de Kreis se expresó como Abs 540 nm/ g de aceite.

4.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las determinaciones se realizaron por triplicado y se expresaron como valor promedio \pm desviación estándar.

En los resultados de las determinaciones respecto a la caracterización de los extractos proteínicos, la evaluación del acoplamiento entre el antioxidante y la proteína, la evaluación de la capacidad antioxidante de las disoluciones proteínicas, así como la caracterización de las películas elaboradas, se realizó un análisis de varianza (ANOVA), y las medias fueron evaluadas mediante un análisis de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un nivel de significancia $\alpha=0.05$. Para ello se empleó el software Microsoft Excel $\text{\textcircled{R}}$ 2010.

En el análisis cinético de los parámetros de oxidación lipídica, las desviaciones estándar de las pendientes de las regresiones lineales se obtuvieron con el software Microsoft Excel $\text{\textcircled{R}}$ 2010. Se empleó la prueba t-Student, $\alpha=0.05$ para determinar la diferencia significativa entre las pendientes, de acuerdo a Cohen *et al.*, 2003, utilizando el software Free Statistics Calculator 4.0.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. CARACTERIZACIÓN DE LAS SEMILLAS DE CÁRTAMO Y GIRASOL

En la Tabla 5.1, donde se muestra el análisis químico proximal de las semillas de cártamo y girasol empleadas, se observa que ambas semillas presentan un contenido proteínico similar. El contenido de proteína coincide además con el reportado en ambos casos; en el caso del cártamo, se ha reportado 14-23 % de proteína (Wrigley *et al.*, 2016) y en el caso del girasol 14-25 % de proteína (Salunkhe *et al.*, 1992). No obstante, respecto al resultado de contenido de grasa obtenido, el del cártamo concuerda más con lo reportado en la literatura de 35 %, en comparación con el del girasol, cuyo contenido en aceite se reporta alrededor del 30 % (Sala y Barroeta, 2003).

Tabla 5.1. Análisis químico proximal de las semillas de cártamo y girasol.

| Semilla | CÁRTAMO | GIRASOL |
|---|------------|------------|
| Humedad (%) | 5.33±0.23 | 6.05±0.08 |
| Grasa (%) | 33.08±2.51 | 22.55±0.95 |
| Proteína (%) ⁽¹⁾ | 15.44±0.30 | 16.53±0.84 |
| Cenizas (%) | 2.12±0.04 | 2.58±0.14 |
| Carbohidratos (%) ⁽²⁾ | 44.03±1.01 | 52.29±0.39 |

1. ANOVA $\alpha=0.05$: No existe diferencia significativa.

2. Carbohidratos calculados por diferencia.

La diferencia en la composición puede deberse a distintas condiciones de cultivo, así como a la variedad de la semilla. Particularmente, en el caso del girasol existen variedades denominadas “girasol de confitería” con menor contenido de aceite, alrededor de 20 %, y mayor proporción de cascarilla, alrededor de 47 %, que presentan una relación inversa (Salunkhe *et al.*, 1994; González-Pérez y Vereijken, 2007). Por tanto, es probable que el girasol empleado pertenezca a este tipo de variedad, lo cual se ve reflejado también en el alto contenido de carbohidratos obtenido por diferencia, donde está incluido el contenido de fibra, la cual se encuentra principalmente en la cascarilla.

5.2. SEPARACIÓN DE FRACCIONES Y OBTENCIÓN DE LA HARINA DE LAS SEMILLAS

Para la extracción y aprovechamiento de la proteína de las semillas, es importante la extracción del aceite y el descascarillado. Por ello, una vez que las semillas fueron desengrasadas, se separaron en dos fracciones para obtener una fracción alta en proteína y otra constituida principalmente por la cascarilla, ya que la cascarilla de las semillas presenta un bajo contenido proteínico, en el caso de la cascarilla de cártamo se ha reportado 3.5-4.5 % de proteína (Pavlov y Todorov, 1996) y en la de girasol 1.7-6.1 % de proteína (Salunkhe *et al.*, 1992).

De acuerdo a los resultados descritos en la Tabla 5.2, la proporción de harina obtenida, g harina/100 g semilla, es similar para ambas semillas a pesar de que, tras la molienda, extracción de aceite y tamizado, hubo una mayor pérdida de peso en el caso de la semilla de cártamo, 36.05 %, comparada con la pérdida de peso en el caso del girasol, 26.18 %, lo cual se debe a que en el caso del girasol, la proporción de la fracción de cascarilla fue mayor.

Tabla 5.2. Proporción y proteína total de las fracciones de las semillas.

| Fracción desengrasada | CÁRTAMO | | GIRASOL | |
|-----------------------|------------------------------|-----------------------------------|------------------------------|-----------------------------------|
| | Proporción (g/100 g semilla) | Proteína total en la fracción (%) | Proporción (g/100 g semilla) | Proteína total en la fracción (%) |
| Cascarilla | 32.75±0.72 ^b | 8.29±0.14 ^A | 40.11±2.84 ^a | 6.98±0.24 ^B |
| Harina ⁽¹⁾ | 31.20±0.55 ^z | 39.60±0.94 ^Z | 33.71±2.57 ^z | 38.07±0.56 ^Z |

*Letras diferentes indican que existe diferencia significativa, $\alpha=0.05$ ($a>b$; $A>B$)
1. No existe diferencia significativa, $\alpha=0.05$.

Como era de esperarse, en ambos casos el contenido de proteína en la harina fue mayor que el contenido de proteína en la cascarilla. Además, éste fue similar entre las semillas, esperando así rendimientos de extracción semejantes. No obstante, es menor al reportado en otras harinas de semillas desengrasadas y descascarilladas. En el caso del cártamo se han reportado contenidos proteínicos de alrededor de 40 % y en las de girasol de 53 % (Pavlov y Todorov, 1996); sin

embargo, la composición de las harinas es muy variable, ya que depende en gran medida del grado de descascarillado. Posiblemente, de haberse tenido un mayor grado de descascarillado y haberse realizado previamente al desengrasado, el contenido proteínico en la harina sería mayor, ya que la eficiencia de la extracción de aceite es mayor cuando se realiza a partir de las semillas descascarilladas (Salunkhe *et al.*, 1992).

Cabe mencionar que hay una menor pérdida de proteína en el caso del cártamo, pues el contenido proteínico de la harina representa el 80.02 % de la proteína total de la semilla, mientras que el contenido proteínico de la harina de girasol, representa el 77.63 % de la proteína total de la semilla, reportada en la tabla 5.1. En el anexo 8.1 se muestra el balance de masa y proteína del proceso de extracción de proteína a partir de las semillas limpias.

5.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS EXTRACTOS PROTEÍNICOS

5.3.1. Humedad de los extractos proteínicos y proteína total en base seca

Se determinó la humedad a los extractos proteínicos, pellets, de ambas semillas obtenidos al realizar un doble tratamiento alcalino, observando que el pellet de cártamo presenta menor humedad comparado con el de girasol como se muestra en la Tabla 5.3. Esto puede ser debido principalmente a que la proteína de cártamo se ha reportado con menor capacidad de retención de agua comparada con la de girasol (Paredes-López *et al.*, 1994).

Tabla 5.3. Humedad de los extractos proteínicos y proteína total en base seca.

| Pellet | CÁRTAMO | GIRASOL |
|--|---------------------------|---------------------------|
| Humedad del pellet (%) ⁽¹⁾ | 58.64 ± 3.31 ^b | 70.48 ± 1.29 ^a |
| Proteína total en el pellet en base seca (g proteína/100 g pellet base seca) ⁽¹⁾ | 91.98 ± 0.34 ^A | 79.85 ± 0.11 ^B |

1. Letras diferentes indican que existe diferencia significativa, $\alpha=0.05$ ($a>b$; $A>B$).

Además, se cuantificó proteína total del extracto después de someterlo a un secado en estufa de vacío. Los resultados son acordes al contenido proteínico

reportado en aislados de proteína de las semillas, cuya preparación involucra también una precipitación isoelectrica de la proteína y un proceso de secado. En el caso del cártamo se ha reportado un 77.5-97.4 % de proteína y en el caso de girasol un 76.9-84.9 % (Paredes-López *et al.*, 1994).

Sin embargo, los extractos proteínicos de ambas semillas se trabajaron sin someterlos a un proceso de secado y su caracterización final fue realizada en base húmeda. En la Figura 5.1 se observa el aspecto de los extractos proteínicos en base húmeda.

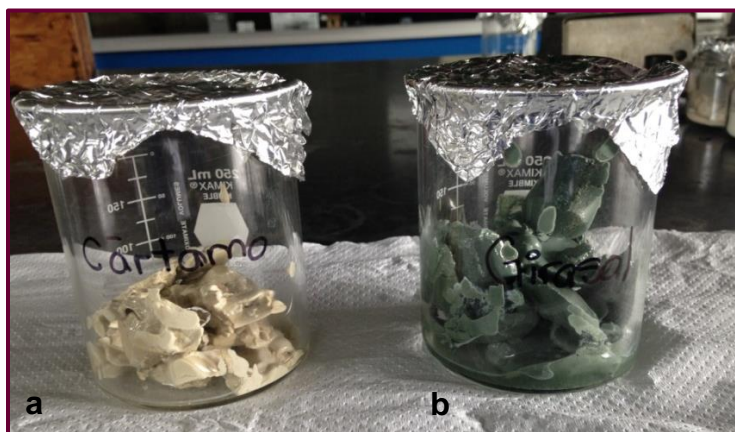


Figura 5.1. Extractos proteínicos de cártamo (a) y girasol (b).

5.3.2. Proteína total y soluble de los extractos proteínicos

En las Tablas 5.4 y 5.5 se muestra la caracterización de los extractos proteínicos, pellets, obtenidos con respecto a la proteína total y soluble en los mismos, así como el rendimiento de extracción de proteína. En primera instancia, se obtuvo mayor cantidad de proteína a partir de 100 g de harina de cártamo comparada con la de girasol, lo cual era de esperarse ya que la harina de cártamo es más alta en proteína.

Por otra parte, el rendimiento de extracción de proteína aumentó con un doble tratamiento alcalino a la harina; en el caso del cártamo aumentó 12.23 % y en el caso del girasol 22.8 %, por lo que se consideró viable este segundo tratamiento alcalino para ambas semillas. El rendimiento de extracción de proteína de cártamo fue mayor en 8.25 % comparado con el de la proteína de girasol.

Tabla 5.4. Proteína del pellet de cártamo y rendimiento de extracción.

| # de tratamientos alcalinos al sólido | | x 1 | x 2 |
|--|-------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Extracto proteínico (Pellet) | g pellet/100 g harina | 70.46±1.00 | 79.04±4.22 |
| | Proteína total (%) | 35.75±1.11 | 38.04±2.14 |
| | Proteína soluble (%) | 34.95±0.82 | 35.45±1.85 |
| Rendimiento extractivo (%) ⁽¹⁾ | | 63.61±0.85 ^{b,z} | 75.84±4.16 ^{a,z} |
| g proteína/100g harina ⁽¹⁾ | | 25.19±1.06 ^{b,z} | 30.03±1.65 ^{a,z} |
| Sobrenadante | mL sobrenadante/ 100 g harina | 710.0±1.0 | 1520.2±18.9 |
| | Proteína total (%) | 0.43±0.01 | 0.28±0.05 |
| | Proteína soluble (%) | 0.67±0.01 | 0.37 ±0.04 |
| Merma de proteína (%) ⁽¹⁾ | | 7.71±0.47 ^{b,y} | 9.98±0.12 ^{a,z} |
| Merma de proteína en sólido residual (%) ⁽¹⁾ | | 29.42±1.32 ^{b,y} | 15.38±1.00 ^{a,y} |

*Rendimiento extractivo y merma calculado con base a la proteína de la harina.

1. Letras diferentes indican que existe diferencia significativa, $\alpha=0.05$: Comparación entre # tratamientos: a>b. Comparación entre proteínas z>y; Z>Y (ver Tabla 5.5).

Tabla 5.5. Proteína del pellet de girasol y rendimiento de extracción.

| # de tratamientos alcalinos al sólido | | x 1 | x2 |
|--|-------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Extracto proteínico (Pellet) | g pellet/100 g harina | 80.99±1.00 | 109.53±2.45 |
| | Proteína total (%) | 17.50±0.49 | 23.57±0.43 |
| | Proteína soluble (%) | 15.02±0.37 | 21.40±0.63 |
| Rendimiento extractivo (%) ⁽¹⁾ | | 44.79±0.79 ^{b,y} | 67.59±1.36 ^{a,y} |
| g proteína/100 g harina ⁽¹⁾ | | 14.17±0.75 ^{b,y} | 25.73±0.52 ^{a,y} |
| Sobrenadante | mL sobrenadante/ 100 g harina | 592.0±1.0 | 1111.2±1.8 |
| | Proteína total (%) | 1.08±0.01 | 0.24±0.03 |
| | Proteína soluble (%) | 0.99±0.02 | 0.19±0.05 |
| Merma de proteína en sobrenadante (%) ⁽¹⁾ | | 20.21±0.02 ^{a,z} | 7.78±1.92 ^{b,z} |
| Merma de proteína en sólido residual (%) ⁽¹⁾ | | 35.00±0.82 ^{a,z} | 23.36±1.52 ^{b,z} |

*Rendimiento extractivo y merma calculado con base a la proteína de la harina.

1. Letras diferentes indican que existe diferencia significativa, $\alpha=0.05$: Comparación entre # tratamientos: a>b. Comparación entre proteínas z>y; Z>Y (ver Tabla 5.4).

La proteína que no es extraída se pierde en el sólido desechado tras el tratamiento alcalino y en el sobrenadante. En el caso del cártamo, la pérdida de proteína en sobrenadante aumenta al hacer el doble tratamiento alcalino, pero disminuye la pérdida de proteína en el sólido residual, lo que sugiere que sí se disuelve una mayor cantidad de proteína al repetir el tratamiento alcalino, pero al hacer la precipitación isoeléctrica, la proporción de proteína precipitada es menor. Es por ello que el aumento en el rendimiento extractivo es menor en el caso del cártamo comparado con el del girasol, ya que en este último, la pérdida de proteína en sobrenadante disminuye al hacer el doble tratamiento alcalino.

En el caso del cártamo, el rendimiento extractivo obtenido es similar a otros estudios en que se realizó también una extracción alcalina a la harina desengrasada seguida de una precipitación isoeléctrica, con rendimientos reportados de 70 % (Sağiroğlu *et al.*, 2005) y de 72 % (Madrigal y Ortega, 2002). En el caso del girasol, el rendimiento extractivo fue más alto en comparación con otros estudios que emplearon de igual manera harina de semillas desengrasadas de girasol, con rendimientos reportados de 63 % (Pickardt *et al.*, 2011) y de 51.7 % (Yust *et al.*, 2003).

La diferencia en los rendimientos obtenidos con los reportados por otros autores, son debidas a las distintas condiciones de extracción empleadas, dado que se ha visto que, por ejemplo, al aumentar el pH, la solubilidad de la proteína es mayor, (Salgado *et al.*, 2011), lo que puede conducir a un mayor rendimiento según las condiciones en las que es precipitada la proteína, pues el pH de precipitación es también crucial. Así mismo, se ha estudiado que al emplear NaCl en concentraciones alrededor de 7.5 %, la extracción de proteína se ve favorecida. Otros factores que afectan el rendimiento son el tiempo al que se somete a la extracción, así como la temperatura en que se lleva a cabo (Ivanova *et al.*, 2013).

Respecto al contenido de proteína soluble, en el extracto de cártamo éste representa 93.19 % respecto a la proteína total, mientras que en el extracto de girasol, representa 90.79 %. Por tanto, en el extracto proteínico de girasol es probable que haya una mayor proporción de compuestos nitrogenados no

proteínicos. Otra explicación es que parte de la proteína extraída no se disolvió de nuevo, lo que se vio reflejado en su cuantificación, posiblemente debido a una desnaturalización y agregación parcial de la proteína, pues el cambio de pH es uno de los factores que altera la estructura de una proteína de forma reversible o irreversible (Rodríguez y Magro, 2008).

La importancia de cuantificar la proteína soluble radica en la funcionalidad que puedan tener, lo cual determina su aplicación, como lo es para la elaboración de películas, ya que se requiere disolver a la proteína a pH alcalino con el fin de modificar el arreglo de la proteína y formar una red tridimensional estabilizada mediante nuevos enlaces intermoleculares (Montalvo *et al.*, 2012). Por tanto, dado que hay una diferencia en el contenido de proteína soluble en los extractos proteínicos de las semillas de cártamo y girasol, las propiedades de las películas resultantes, tales como de barrera a gases y vapor de agua, así como sus propiedades mecánicas, pueden ser diferentes, además de la diferencia debida a la naturaleza misma de la proteína.

5.3.3. Polifenoles totales en los extractos proteínicos

En la Tabla 5.6 se muestra el contenido de polifenoles totales expresados como mg de equivalentes de ácido gálico EAG por unidad de masa del pellet, así como de proteína extraída en el mismo.

Tabla 5.6. Cuantificación de polifenoles totales en los extractos proteínicos.

| Extracto proteínico | CÁRTAMO | | GIRASOL | | |
|--|--------------------------|------------------|-------------------|------------------|-------------------|
| | # tratamientos alcalinos | x 1 | x 2 | x 1 | x 2 |
| Polifenoles totales (mg EAG/g pellet) | | 2.00±0.09 | 5.01±0.09 | 1.29±0.01 | 2.04±0.07 |
| mg EAG/g proteína extraída ⁽¹⁾ | | 5.45±0.09 b,z | 13.18±0.25 a,Z | 4.77±0.22 B,y | 10.78±0.09 A,Y |

*EAG=equivalentes de ácido gálico.

1. Letras diferentes indican que existe diferencia significativa, $\alpha=0.05$ (Comparación entre # tratamientos alcalinos: $a>b$; $A>B$. Comparación entre proteínas: $z>y$; $Z>Y$).

De acuerdo a lo mencionado en el apartado 5.3.2, resulta conveniente, en términos de rendimiento extractivo de proteína, un doble tratamiento alcalino a la harina. Dicho tratamiento influyó también en el contenido de polifenoles totales en los extractos proteínicos, pues éste aumentó como se puede observar la Tabla 5.6. Dado que los polifenoles poseen actividad antioxidante (Skerget *et al.*, 2005), esto puede representar una ventaja, ya que se pretende obtener películas activas antioxidantes a partir de los extractos proteínicos y estos compuestos pueden contribuir a la capacidad antioxidante de las películas, además de la debida a la posible presencia de oligopéptidos o biopéptidos activos que también pueden contribuir a la misma.

Sin embargo, la presencia de compuestos fenólicos implica también que los extractos proteínicos den lugar a películas coloridas, siendo en el caso del girasol donde es más notorio, ya que se obtuvieron disoluciones proteínicas color verde oscuro a pH básico y en consecuencia, películas de igual color, como se muestra en el apartado 5.7. Lo anterior se debe a la presencia del ácido clorogénico, compuesto fenólico mayoritario en la semilla de girasol que representa 70 % de los compuestos fenólicos (Pickardt *et al.*, 2011). Al igual que otros compuestos fenólicos, el ácido clorogénico es oxidado en medio alcalino y se forma la quinona correspondiente, misma puede unirse covalentemente a grupos reactivos en las moléculas de proteína o puede co-precipitar con la misma en su punto isoeléctrico debido a interacciones por puentes de hidrógeno (Paredes-López *et al.*, 1994); por tanto, una vez que el extracto proteínico se somete nuevamente a pH alcalino, el compuesto fenólico oxidado produce una fuerte coloración verde a marrón (Pickardt *et al.*, 2011).

En el caso del cártamo, se ha reportado un contenido de polifenoles totales de alrededor de 1.05 % en la semilla (Paredes-López, 1991), de los cuales, aproximadamente el 50 % son flavonoides (Yu *et al.*, 2013). Por tanto, es probable que estos compuestos den la coloración amarillo-ámbar de las disoluciones proteínicas a un pH básico, debido de igual manera a su oxidación, lo cual es observado también en las películas elaboradas, como se muestra en el apartado 5.7.

5.3.4. Evaluación del peso molecular de los extractos proteínicos

En el gel de electroforesis, Figura 5.2, se puede observar en los carriles 2 a 4, correspondientes a la proteína de cártamo, bandas de pesos moleculares de un amplio intervalo; las de 19.1 a 55.6 kDa, pueden corresponder a subunidades producto de la disociación de la fracción proteínica mayoritaria de alto peso molecular 12S, denominada carmín, reportada con un peso molecular de 240-290 kDa y que constituye 60-65 % de la proteína (Rajendran y Prakash, 1987). Las bandas de 8.3-15.7 kDa pueden ser correspondientes a la segunda fracción mayoritaria, 2S, de albuminas de bajo peso molecular, reportadas en un intervalo de 13.8-18.5 kDa y que constituyen 26 % de la proteína, o bien, a subunidades más pequeñas de acuerdo al esquema de disociación de la fracción 12S: $11-12S \rightleftharpoons 7S \rightleftharpoons 4S \rightarrow 2S$ (Paredes-López, *et al.*, 1994; Rajendran y Prakash 1988). Se ha reportado la presencia de hasta 13 subunidades de la proteína de cártamo, con pesos moleculares en un intervalo de 14.7 a 88 kDa (Salunkhe *et al.*, 1992).

En los carriles 5 a 7, correspondientes a la proteína de girasol, se aprecian bandas de 55.3-56.3 kDa, de 28.7-38.8 kDa y de 20.1-26.8 kDa. De acuerdo a otros estudios, las primeras corresponden a las subunidades α - β de la fracción de globulinas 11S denominada heliantinina, fracción proteínica mayoritaria de la semilla de girasol con un peso molecular de 300-350 kDa y que representa 40 % hasta 90 % de la proteína total, constituida por 6 subunidades α - β de 55-65 kDa (Shabani y Mohammad, 2014). Las otras son las correspondientes a las cadenas polipeptídicas ácidas α de 30-44 kDa y a las cadenas polipeptídicas básicas β de 21-27 kDa (Shabani y Mohammad, 2014; Žilić *et al.*, 2010), las cuales aparecen debido a la presencia de β -mercaptoetanol (BME), un agente reductor que rompe el enlace disulfuro que une dichas cadenas (Salgado, 2014). Las bandas de 200 kDa, corresponden a fracciones proteínicas que resultan de la disociación parcial de la fracción 11S (Shabani, 2015). Las bandas de 8.6-17.9 kDa, corresponden a la fracción de albúminas de bajo peso molecular 2S (segunda fracción proteínica mayoritaria, 10-30 % del total) conformada por 8 unidades simples cuyos pesos moleculares han sido reportados de 10-18 kDa (Shabani, 2015; Arntfield, 2004), o a la fracción 2S resultado de la disociación de la 11S (Suryaprakash, 1997).

En ambos casos, se colocó la misma muestra de proteína en tres carriles.

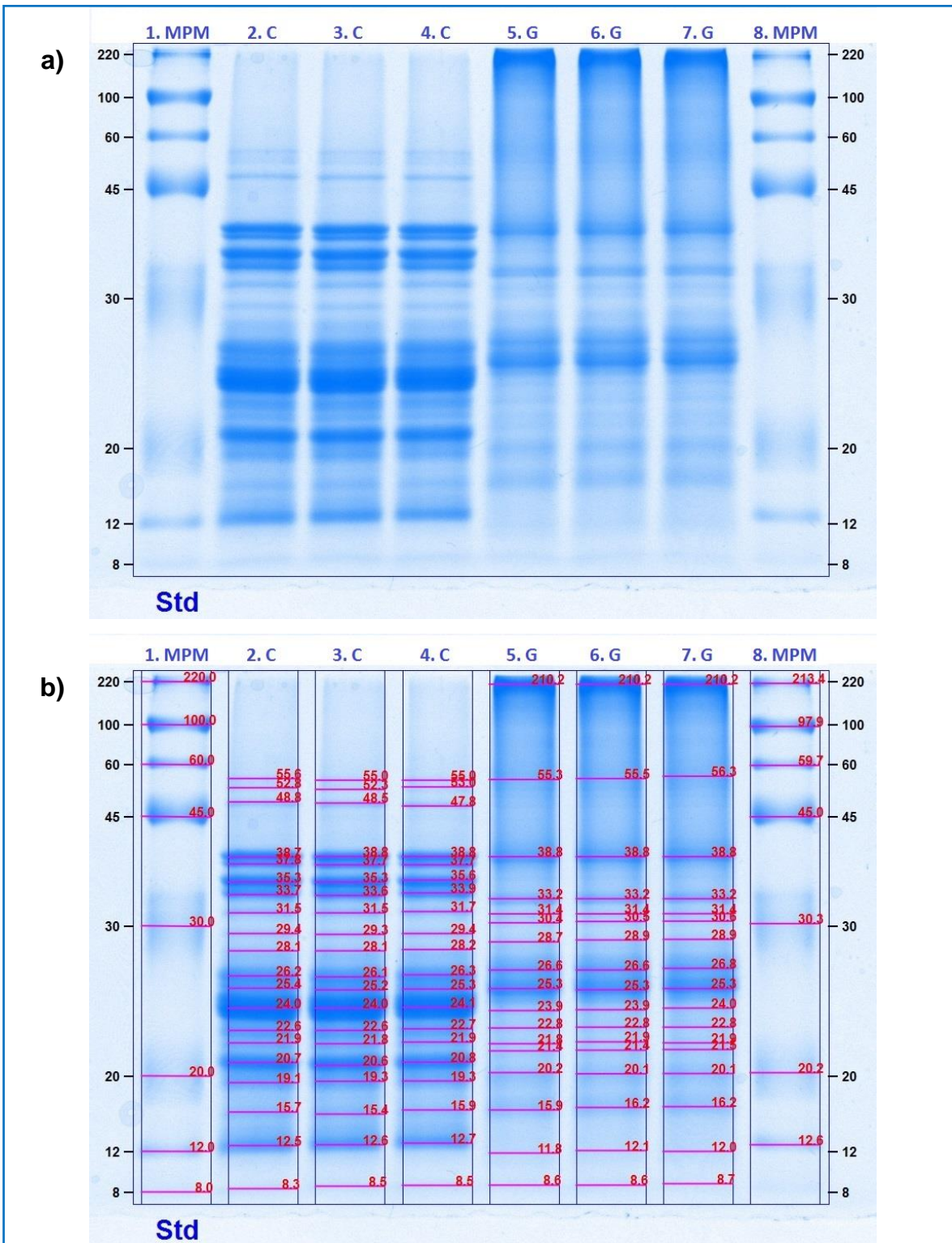


Figura 5.2. Gel de electroforesis sin señalamiento de bandas (a) y con señalamiento de bandas (b). Carriles 1 y 8) ColorBurst™ Electrophoresis Marker; 2-4) Proteína de cártamo; 5-7) Proteína de girasol.

Es importante conocer el peso molecular de las proteínas presentes en los extractos, ya que es una característica que determina su funcionalidad. En el caso de la formación de las películas proteínicas, se ha establecido que la cohesión de las mismas se ve favorecida por un orden superior de las cadenas. Por tanto, la presencia de fracciones de un elevado peso molecular en los extractos, junto con una solvatación del polímero, es favorable para la formación de las películas (Ávila y López, 2008). Particularmente en el caso del extracto proteínico de girasol, la presencia de la fracción de bajo peso molecular 2S es de importancia debido a que el ácido clorogénico se asocia preferentemente con esta fracción, sin cambiar significativamente su peso molecular. Esto resulta en la desfavorable producción de color verde observada en los extractos proteínicos (Arntfield, 2004).

5.4. FUNCIONALIZACIÓN VÍA ENZIMÁTICA DE LA PROTEÍNA CON QUERCETINA

Como se describió en el apartado 5.3.3, los extractos proteínicos de cártamo y de girasol empleados para llevar a cabo la reacción de acoplamiento de quercetina a la proteína vía enzimática, tienen un contenido de polifenoles proveniente de las semillas de 13.18 y 10.78 mg EAG/g de proteína extraída, respectivamente. Estos compuestos fenólicos inherentes del extracto pueden estar asociados a la proteína de forma reversible, mediante puentes de hidrógeno principalmente, además de interacciones iónicas e hidrofóbicas (Ozidal *et al.*, 2013), o pueden estar asociados de manera irreversible, es decir, mediante enlaces covalentes formados debido al tratamiento alcalino durante el proceso de extracción (Wildermuth *et al.*, 2016; Ozidal *et al.*, 2013).

Lo anterior se debe a que, en medio alcalino, los compuestos fenólicos pueden ser oxidados a radicales libres y quinonas en presencia de oxígeno. Las quinonas son altamente reactivas y susceptibles a un ataque nucleofílico por los grupos sulfhidrilo (-SH) y ϵ -amino (-NH₂) de los residuos de aminoácidos cisteína y lisina de la proteína, así como el grupo α -amino terminal de las cadenas polipeptídicas, conduciendo a la formación de enlaces covalentes C-N y/o C-S (Ozidal *et al.*, 2013;

Damodaran, 1993). Esta reacción se ejemplifica en la Figura 8.3 del anexo 8.2 con la quercetina y el grupo amino de una cadena polipeptídica, la cual ha sido previamente reportada por Ozdal *et al.*, 2013 para el ácido caféico.

Por tanto, en las disoluciones proteínicas 5 %, además de la quercetina agregada, los polifenoles inherentes del extracto que se asociaron de manera reversible y co-precipitaron con la proteína, también pueden participar en la reacción de acoplamiento que se lleva a cabo posteriormente a pH 9 o pH 11.

Por ende, la generación de radicales libres y quinonas por oxidación de los compuestos fenólicos, paso inicial en la reacción de acoplamiento, puede llevarse a cabo tanto vía química a pH alcalino como enzimática, al tratarse las disoluciones con peroxidasa (HRP). Esto último gracias a que la HRP es una enzima capaz de catalizar la oxidación de una amplia gama de sustratos fenólicos que interactúan a través del borde δ -meso del grupo hemo, formando los radicales libres y quinonas correspondientes (Kwon *et al.*, 2016). Estos compuestos generados son propensos a participar en reacciones de condensación entre sí o formar enlaces covalentes con la proteína (Ozdal *et al.*, 2013; Wildermuth *et al.*, 2016), que puede conducir a su funcionalización.

5.4.1. Actividad enzimática de la peroxidasa de rábano picante

En la Tabla 5.7, se muestran los resultados de actividad enzimática de la peroxidasa de rábano picante (HRP), empleada para llevar a cabo la reacción de acoplamiento de quercetina a las proteínas de cártamo y girasol. La cantidad de enzima utilizada en la reacción de acoplamiento, se estandarizó a 0.04 U/mL de disolución proteínica. No obstante, esta actividad no refleja la que tiene la enzima en las disoluciones proteínicas, pues tanto el sustrato como las condiciones de trabajo son diferentes, ya que para la reacción de acoplamiento se empleó una temperatura de 40-45 °C y diferente pH, 9 y 11, que son factores que afectan la actividad enzimática.

Se ha reportado que las condiciones óptimas de trabajo de la HRP son pH 6-6.5 y una temperatura alrededor de 40 °C (Sarika *et al.*, 2015). Además, la enzima es

más estable en un intervalo de pH de 5 a 11, por lo que muy probablemente la enzima tuviese mayor actividad durante la reacción de acoplamiento enzimático en las disoluciones proteínicas a pH 9 comparadas con las disoluciones proteínicas a pH 11, dado que es más cercano al pH óptimo para la enzima.

Tabla 5.7. Actividad enzimática de la peroxidasa de rábano picante (HRP).

| No. De ensayo | [Disolución de enzima] (mg polvo/mL) | Actividad volumétrica enzimática (U/mL) | Actividad enzimática del polvo liofilizado (U/mg) |
|---------------|--------------------------------------|---|---|
| 1 | 0.01 | 1.01 ± 0.06 | 100.96 ± 6.25 |
| 2 | 0.01 | 0.85 ± 0.02 | 85.45 ± 1.66 |
| 3 | 0.01 | 0.73 ± 0.01 | 72.78 ± 1.08 |
| 4 | 0.18 | 11.89 ± 0.75 | 66.06 ± 4.15 |
| 5 | 0.17 | 11.31 ± 0.01 | 66.50 ± 0.08 |
| 6 | 0.20 | 15.26 ± 0.11 | 76.30 ± 0.56 |
| | | Promedio | 77.64 ± 13.89 |

* $U = \mu\text{mol tetraguayacol}/\text{min}$; Condiciones de ensayo: T . ambiente, pH 7.0.

5.4.2. Análisis de los extractos de proteínicos por resonancia magnética nuclear de protón (RMN¹H)

Se llevó a cabo un análisis por resonancia magnética nuclear de protón (RMN¹H) de los extractos proteínicos control y de proteína funcionalizada; la reacción de acoplamiento vía enzimática en dichas muestras fue llevada a cabo a pH 9, donde se esperaba una mayor actividad de la enzima y por consiguiente, un mayor acoplamiento de quercetina a la proteína.

En los espectros de RMN¹H se observan señales o picos, que son las absorciones de energía como una función de la intensidad del campo magnético aplicado. Estas señales están dadas por los protones con diferente desplazamiento químico, resultado de la protección y desprotección electrónica (Wade, 2012).

En los cuatro espectros obtenidos, Figuras 3 a 6, aparece una señal en campo bajo, a la izquierda, con un desplazamiento químico (δ) entre 11 y 12 ppm, que

corresponde al disolvente empleado, ácido trifluoroacético deuterado (TFA-d), que normalmente presenta un δ de 11.3-11.5 ppm (Claridge, 1999). Por otro lado, las señales que aparecen en campo alto, a la derecha, con un δ entre 0 y 6 ppm corresponden a los protones de los diferentes residuos de aminoácidos de la proteína que están más protegidos, es decir, rodeados por electrones que los protegen o “apantallan” del campo magnético (Wade, 2012).

Para ambos casos, proteína de cártamo y proteína de girasol, tanto en los espectros de RMN¹H de los extractos proteínicos control como los de proteína funcionalizada, se observa en campo bajo un conjunto de señales de protones que están más desprotegidos, con un δ entre 7 y 9 ppm, donde normalmente aparecen las señales típicas de protones de los compuestos fenólicos y otros compuestos aromáticos (Wade, 2012), siendo en este intervalo donde se esperaría observar las señales protónicas de la quercetina.

Por tanto, el análisis por RMN¹H no proporcionó información útil que diera indicio de la presencia de quercetina en los extractos de proteína funcionalizada que fuese comparable con los extractos proteínicos control, ya que aparecen las mismas señales entre 7 y 8 ppm principalmente, debido a la presencia inherente de compuestos fenólicos en los extractos proteínicos cuyas señales protónicas se solapan con las correspondientes a las de protones de quercetina, si la hay. Además, puede existir un solapamiento adicional con los protones de residuos de aminoácidos aromáticos de la proteína, fenilalanina, tirosina y triptófano, que en conjunto representan 6.6-11.0 % y 7.9-11.0 % de la proteína de cártamo y girasol, respectivamente (Paredes-López, 1994).

No obstante, aun cuando se hubiese observado una diferencia en las señales de los extractos proteínicos control y los extractos de proteína funcionalizada, dando indicio de la presencia de quercetina, no sería concluyente respecto a la existencia de un enlace covalente entre la quercetina y la proteína, solamente indicaría la presencia de la misma en el extracto proteínico que, como se mencionó anteriormente, también puede estar asociada a la proteína por puentes de hidrógeno.

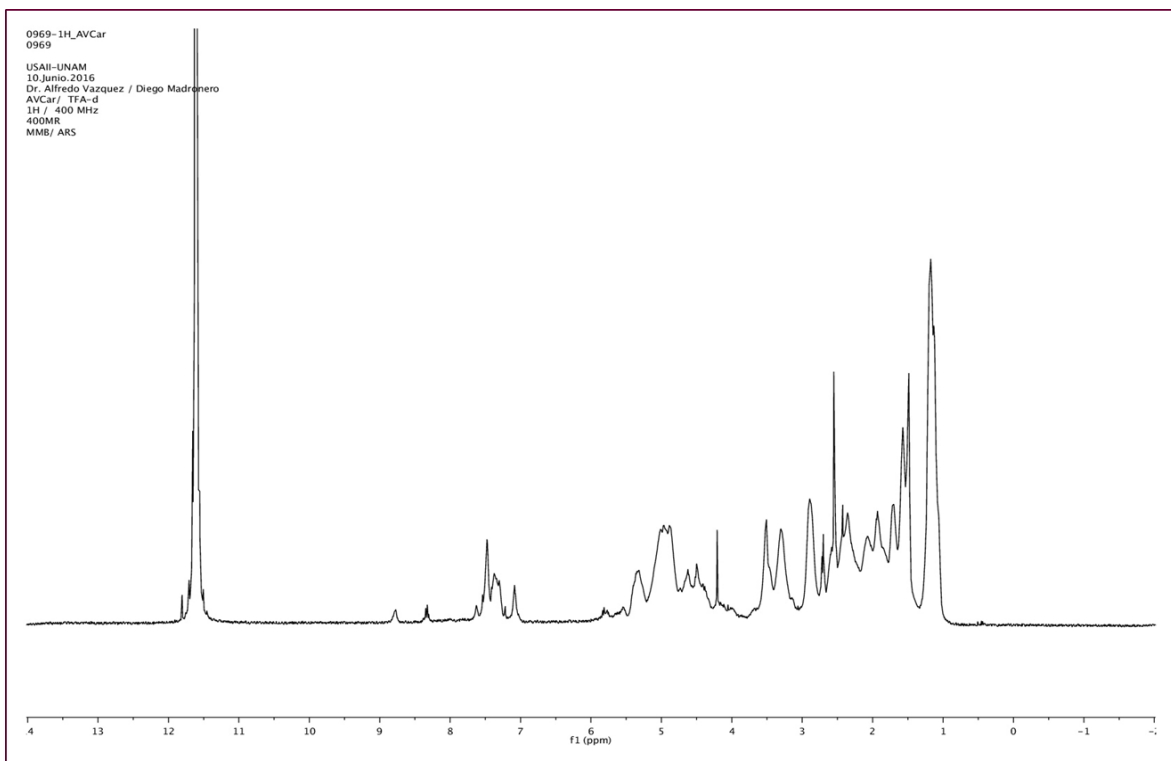


Figura 5.3. Espectro de RMN¹H del extracto de proteína de cártamo control.

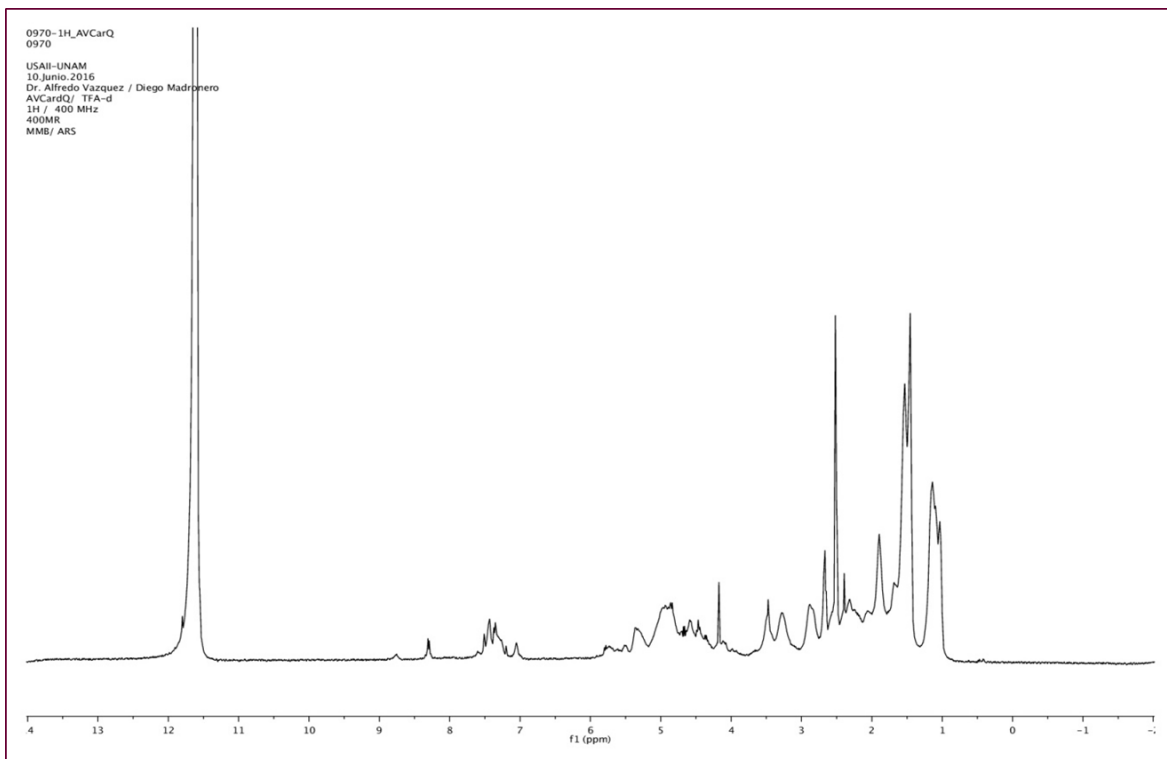


Figura 5.4. Espectro de RMN¹H del extracto de proteína de cártamo funcionalizada.

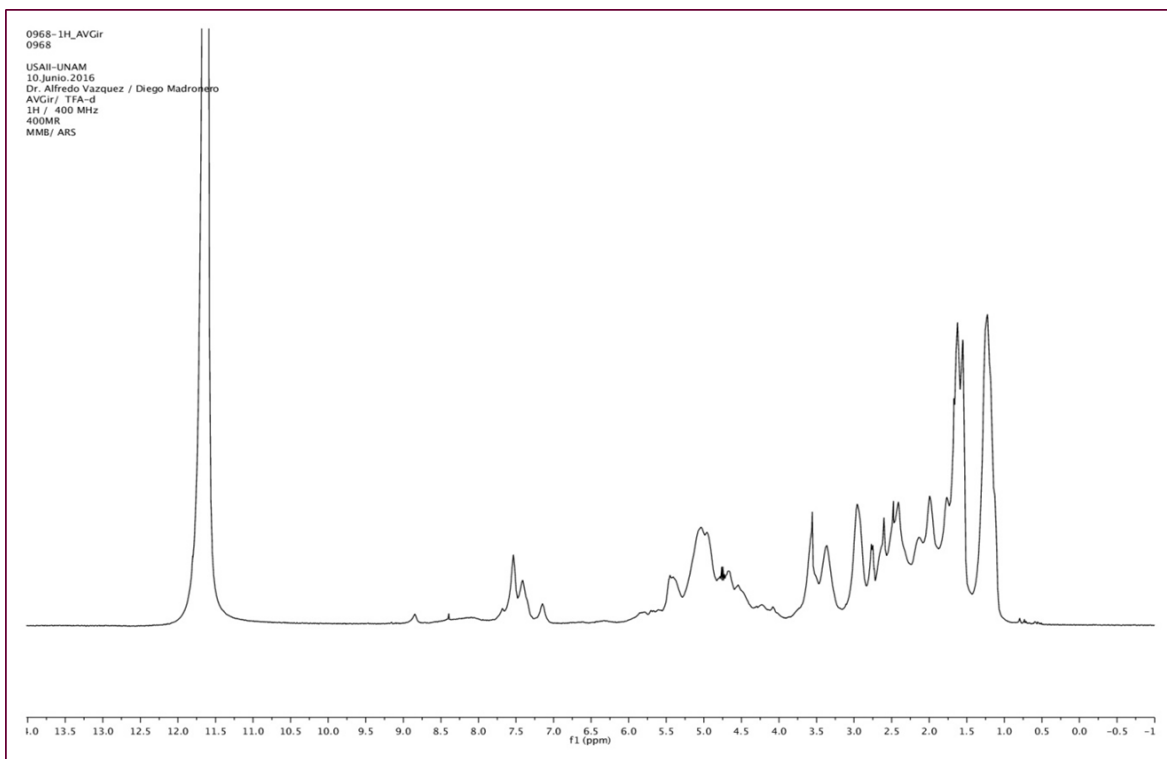


Figura 5.5. Espectro de RMN^1H del extracto de proteína de girasol control.

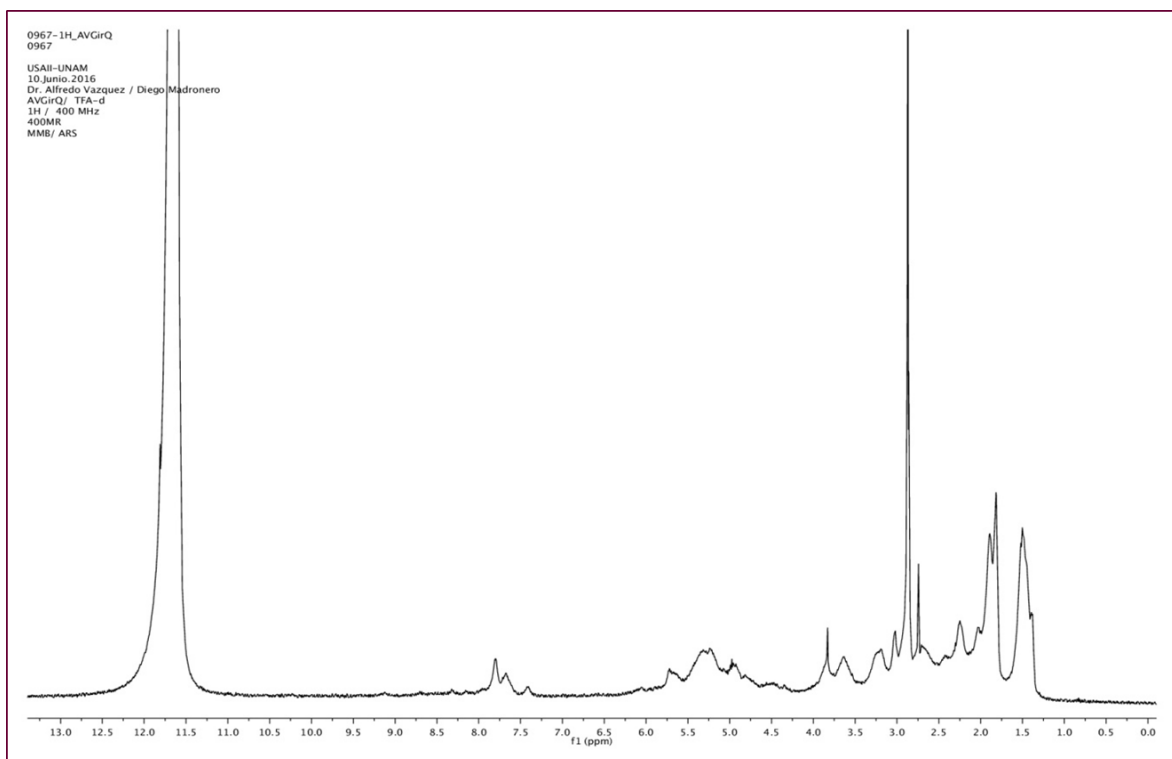


Figura 5.6. Espectro de RMN^1H del extracto de proteína de girasol funcionalizada.

5.5. EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DE ACOPLAMIENTO ENTRE LA PROTEÍNA Y EL ANTIOXIDANTE

Para evaluar la reacción de acoplamiento vía enzimática de los compuestos fenólicos a la proteína, se llevó a cabo la cuantificación del grupo amino primario libre en las disoluciones proteínicas sometidas a los diferentes tratamientos, ya que posiblemente los grupos amino primarios de la proteína están implicados en la reacción. Además, se hizo una determinación del rendimiento de acoplamiento entre la proteína y la quercetina, así como entre la proteína y los compuestos fenólicos inherentes del extracto, mediante la cuantificación de polifenoles totales y de quercetina remanentes en el sobrenadante tras la precipitación de la proteína con ácido tricloroacético (TCA) 10 % después de llevado a cabo el tratamiento enzimático. Esto significa que se cuantificaron los compuestos fenólicos no asociados a la proteína y que por consiguiente, no precipitan con la misma.

Sin embargo, como se mencionó anteriormente, los compuestos fenólicos inherentes del extracto pudieron haber formado enlaces covalentes con la proteína durante el tratamiento alcalino en el proceso de extracción. Además, debido a la precipitación de la proteína con TCA, es probable que algunos compuestos hayan co-precipitado con la misma, ya que a pH ácido los compuestos fenólicos y la proteína interaccionan fuertemente mediante puentes de hidrógeno (Pirie, 2011).

No obstante, este problema se ve resuelto por el hecho de que, al realizar las determinaciones en las disoluciones control, se están cuantificando los compuestos fenólicos que no se asociaron a la proteína covalentemente durante el proceso de extracción y aquellos que tampoco se asociaron a la misma durante su precipitación con TCA. Por tanto, dichos compuestos representan el 100 % de los compuestos inherentes del extracto que se encuentran disponibles para participar en reacciones de acoplamiento al inicio del tratamiento enzimático, tratamiento 1 (T1) o tratamiento 2 (T2), así como al inicio del tratamiento al que sólo se agregó la quercetina por inmersión.

5.5.1. Grupo amino primario libre en las disoluciones proteínicas

En la Tabla 5.8 se muestran los resultados obtenidos de la cuantificación de grupo amino primario libre (fNH₂) en las disoluciones proteínicas de cártamo y girasol, respectivamente. Básicamente, estos grupos son los correspondientes a los grupos amino N-terminal de las cadenas polipeptídicas de la muestra y los correspondientes al grupo ε-amino de los residuos de lisina, presentes en 2.2-4.2 % en la proteína de cártamo y 3.0-4.2 % en la proteína de girasol (Paredes-López *et al.*, 1994).

En primera instancia, se aprecia una menor concentración de fNH₂ en el caso de las disoluciones de girasol, lo cual puede ser debido a que la proteína presenta pesos moleculares mayores en comparación con la proteína de cártamo, como se describió en el apartado 5.3.4, por lo que la concentración de grupos α-amino terminales en las disoluciones proteínicas 5 % posiblemente sea menor.

Tabla 5.8. Cuantificación de grupo amino primario libre (fNH₂) en las disoluciones proteínicas.

| Disolución | CÁRTAMO | | GIRASOL | |
|------------|--|------------------------------------|--|----------------------|
| | (mol fNH ₂ /100 g proteína) | | (mol fNH ₂ /100 g proteína) | |
| | pH 9 ⁽¹⁾ | pH 11 ⁽¹⁾ | pH 9 ⁽¹⁾ | pH 11 ⁽²⁾ |
| SC | 10.30±0.18 ^a | 7.41±0.11 ^A | 6.72±0.40 ^z | 4.88±0.20 |
| SE (T1) | 5.17±0.36 ^c | 4.65±0.35 ^C | 4.54±0.37 ^y | 3.76±0.14 |
| SE (T2) | 6.01±0.28 ^c | 6.69±0.37 ^B | 5.03±0.62 ^y | 4.72±0.48 |
| SEQ (T1) | 5.50±0.27 ^c | 4.58±0.33 ^C | 4.68±0.32 ^y | 3.74±0.06 |
| SEQ (T2) | 5.84±0.36 ^c | 6.49±0.24 ^B | 4.78±0.34 ^y | 4.09±0.01 |
| SQ | 7.68±0.62 ^b | 7.06±0.10 ^{A^B} | 5.13±0.45 ^y | 4.41±0.67 |

1. Letras diferentes indican que existe diferencia significativa, α=0.05 (Cártamo pH 9: a>b>c; pH 11: A>B>C; Girasol pH 9: z>y).

2. ANOVA α=0.05: No existe diferencia significativa.

En ambos casos, las disoluciones control y con adición de quercetina sin tratamiento enzimático, SC y SQ, respectivamente, tratadas a pH 9 por 30 min a 45 °C, presentan una concentración de grupos fNH₂ mayor comparada con las disoluciones a pH 11 bajo el mismo tiempo y temperatura. Lo anterior se atribuyó a

una posible formación de entrecruzamientos de lisinoalanina, que tiene lugar cuando las proteínas son expuestas a pH alcalino y temperaturas alrededor de 50 °C (Sikorski, 2007). Por tanto, el tratamiento a pH 11 posiblemente dio lugar a un mayor grado de entrecruzamientos de este tipo en comparación con el tratamiento a pH 9, reduciéndose en mayor medida la concentración de fNH₂.

Estos entrecruzamientos se basan en las reacciones de β-eliminación en los residuos de cisteína (Cys), serina (Ser) fosfoserina (SerP) o triptófano (Thr) dando lugar a la formación de residuos de dehidroalanina (DHA), que también puede formarse a partir de los residuos de cistina a través de un mecanismo de una sola etapa con liberación de azufre y iones sulfuro. Los residuos de DHA reaccionan con grupos nucleofílicos a través del doble enlace activo y de esta manera se forman los entrecruzamientos lisinoalanina (LAL), así como de lantionina (LAN), a partir de la adición de los grupos ε-amino y sulfhidrilo de los residuos de lisina y cisteína, respectivamente (Damodaran, 1993; Sikorski, 2007). Los aminoácidos entrecruzados LAL y LAN se determinan usualmente mediante cromatografía de Gas-Líquido y espectrometría de masas (Hasegawa e Iwata, 1982).

En las disoluciones tratadas enzimáticamente, es probable entonces que los grupos fNH₂ también formaran entrecruzamientos de lisinoalanina. Sin embargo, se observa un efecto significativo del tratamiento enzimático sobre la concentración del grupo fNH₂, indicio de un acoplamiento vía enzimática de la quercetina o de los compuestos fenólicos inherentes del extracto a la proteína.

En el caso de las disoluciones proteínicas de cártamo sometidas a tratamiento enzimático, T1 y T2, con y sin adición de quercetina, SE y SEQ, respectivamente, tanto a pH 9 como a pH 11 la concentración de fNH₂ se vio reducida en más de 40 % respecto a la concentración de fNH₂ en la disolución control, SC, como se muestra en la Tabla 5.9, lo cual fue atribuido al acoplamiento de estos grupos con los compuestos fenólicos. Además, la disminución de fNH₂ fue significativamente mayor en las disoluciones proteínicas SE (T1) y SEQ (T1) a pH 11, debido a que la reacción de acoplamiento vía enzimática continuó.

En las disoluciones proteínicas de girasol sometidas a tratamiento enzimático, la diferencia en la concentración de fNH₂ respecto al control fue significativa sólo a pH 9, lo que se atribuye a una mayor actividad enzimática, con la cual, la disminución del grupo fNH₂ es mayor de 25 %, como se muestra en la Tabla 5.10. Sin embargo, aunque a pH 11 se presentó también cierto porcentaje de disminución del grupo fNH₂ en las disoluciones tratadas enzimáticamente respecto al control, la diferencia en la concentración de fNH₂ no fue significativa.

Tabla 5.9. Disminución del grupo amino libre en las disoluciones proteínicas de cártamo después de los diferentes tratamientos.

| [Quercetina] (ppm) | Tratamiento | % Disminución de fNH ₂ | |
|-----------------------|----------------------------|-----------------------------------|-------|
| | | pH 9 | pH 11 |
| 0 (SE) | Tratamiento 1 (T1) | 49.79 | 37.25 |
| | Tratamiento 2 (T2) | 41.66 | 9.77 |
| 20 (SEQ y SQ) | Sin tratamiento enzimático | 25.46 | 4.73 |
| | Tratamiento 1 (T1) | 46.63 | 38.16 |
| | Tratamiento 2 (T2) | 43.32 | 12.39 |

Tabla 5.10. Disminución del grupo amino libre en las disoluciones proteínicas de girasol después de los diferentes tratamientos.

| [Quercetina] (ppm) | Tratamiento | % Disminución de fNH ₂ | |
|-----------------------|----------------------------|-----------------------------------|-------|
| | | pH 9 | pH 11 |
| 0 (SE) | Tratamiento 1 (T1) | 32.40 | 23.05 |
| | Tratamiento 2 (T2) | 25.17 | 3.36 |
| 20 (SEQ y SQ) | Sin tratamiento enzimático | 23.63 | 9.67 |
| | Tratamiento 1 (T1) | 30.31 | 23.46 |
| | Tratamiento 2 (T2) | 28.89 | 16.25 |

Por otro lado, la concentración de fNH₂ en las disoluciones proteínicas con adición de quercetina sin tratamiento enzimático, SQ, tanto de cártamo como de girasol, también presentó diferencia significativa respecto a las disoluciones control SC a pH 9, observado como porcentaje de disminución en las Tablas 5.9 y 5.10. Esto

sugiere que, en ambos casos, la presencia de un mayor contenido de compuestos fenólicos da lugar a un mayor asociamiento de los mismos con los grupos fNH₂ a través de un mecanismo inicial de oxidación no enzimático de los compuestos fenólicos, seguido de una reacción de adición nucleofílica por parte de los grupos fNH₂ de la proteína.

5.5.2. Polifenoles totales remanentes en sobrenadantes

En la Tabla 5.11 se muestran los resultados de la cuantificación de polifenoles totales remanentes en el sobrenadante tras la precipitación de la proteína con ácido tricloroacético (TCA) 10 %. Aquellos provenientes de las disoluciones control, S.SC, representan los polifenoles no asociados a la proteína al inicio de cada tratamiento. Se observa en ambos casos que existe una diferencia significativa en el contenido de polifenoles totales en los sobrenadantes de las disoluciones a las que se aplicó un tratamiento enzimático, T1 o T2, con y sin adición de quercetina, S.SEQ y S.SE, respectivamente, comparado con el contenido en los sobrenadantes S.SC.

Tabla 5.11. Polifenoles totales remanentes en sobrenadantes.

| Sobrenadante | CÁRTAMO | | GIRASOL | |
|-------------------|-----------------------------------|--------------------------|-----------------------------------|--------------------------|
| | (µg EQ/mL disolución proteínica). | | (µg EQ/mL disolución proteínica). | |
| | pH 9 ⁽²⁾ | pH 11 ⁽²⁾ | pH 9 ⁽²⁾ | pH 11 ⁽²⁾ |
| S.SC | 149.77±1.86 ^b | 145.58±2.07 ^B | 113.31±5.05 ^y | 98.91±0.01 ^Y |
| S.SE (T1) | 48.83±0.53 ^c | 122.77±1.85 ^D | 42.26±0.27 ^w | 70.01±1.32 ^V |
| S.SE (T2) | 47.95±5.58 ^c | 132.55±2.20 ^C | 43.95±2.13 ^{xw} | 83.42±1.30 ^X |
| S.SEQ (T1) | 49.02±1.33 ^c | 126.63±1.89 ^D | 47.33±2.25 ^{xw} | 75.63±0.22 ^W |
| S.SEQ (T2) | 48.27±0.27 ^c | 142.44±3.98 ^B | 48.83±0.01 ^x | 83.67±0.87 ^X |
| S.SQ | 165.31±1.95 ^a | 163.36±2.07 ^A | 126.97±3.56 ^z | 112.58±0.01 ^Z |

*EQ=Equivalentes de quercetina.

1. Contenido expresado por unidad de disolución proteínica, contemplando la dilución 1:5 del sobrenadante a partir de la disolución proteínica 5 %.
2. Letras diferentes indican que existe diferencia significativa, $\alpha=0.05$ (Cártamo pH 9: a>b>c; pH 11: A>B>C>D. Girasol pH 9: z>y>x>w; pH 11: Z>Y>X>W>V).

Lo anterior es un indicio de que después del tratamiento con la peroxidasa, existe un acoplamiento de polifenoles a la proteína y que en el mismo, no sólo participa la quercetina, sino también los polifenoles inherentes en el extracto como se señaló antes. Este acoplamiento es además mayor a pH 9 que a pH 11, descrito en términos de rendimiento en las Tablas 5.12 y 5.13, lo que concuerda con lo establecido en el apartado 5.4.1, es decir, al tenerse un pH de trabajo más cercano al óptimo para la enzima, la reacción fue más efectiva.

Además, en ambos casos, cártamo y girasol, el contenido de polifenoles totales en S.SEQ (T2) y S.SE (T2), con la enzima inactivada, es significativamente mayor comparado con S.SEQ (T1) y S.SE (T1), respectivamente, cuando las disoluciones proteínicas fueron tratadas a pH 11. Lo anterior indica un mayor acoplamiento cuando no se lleva a cabo la inactivación térmica de la enzima, habiendo entonces una actividad catalítica posterior a 1.5 h de reacción. No obstante, a pH 9 donde presuntamente la enzima tiene más actividad, no hubo una diferencia significativa debida a la inactivación térmica de la enzima.

Por otro lado, como era de esperarse, los sobrenadantes S.SQ a ambos valores de pH presentan un contenido de polifenoles superior a los demás, ya que se agregó quercetina sin la presencia de la HRP, por lo que no hay en este caso un acoplamiento mediado enzimáticamente. Los rendimientos de acoplamiento con y sin tratamiento enzimático de la quercetina se muestran en las Tablas 5.12 y 5.13.

A pesar de que los polifenoles pueden acoplarse a los grupos reactivos de la proteína, no sólo a causa de la actividad catalítica de la enzima sino también debido al tratamiento alcalino, el hecho de obtenerse en general un mayor porcentaje de acoplamiento de polifenoles a la proteína en las disoluciones sometidas a un tratamiento enzimático a pH 9, comparado con las disoluciones con un tratamiento enzimático a pH 11, da pauta para suponer que el acoplamiento de los polifenoles en medio alcalino se ve aún más favorecido gracias a la presencia de la enzima, ya que es a pH 9 donde la HRP tiene mayor actividad catalítica.

Tabla 5.12. Rendimiento de acoplamiento de polifenoles a la proteína de cártamo.

| Tratamiento | Polifenoles acoplados | % Rendimiento de acoplamiento | |
|-----------------------------------|------------------------|-------------------------------|-------|
| | | pH 9 | pH 11 |
| Sin tratamiento enzimático | Quercetina | 22.31 | 11.10 |
| Tratamiento 1 (T1) | Inherentes al extracto | 67.39 | 15.67 |
| | Quercetina | 99.06 | 80.70 |
| | Totales | 71.12 | 23.52 |
| Tratamiento 2 (T2) | Inherentes al extracto | 67.98 | 6.89 |
| | Quercetina | 98.40 | 65.53 |
| | Totales | 71.57 | 13.97 |

Tabla 5.13. Rendimiento de acoplamiento de polifenoles a la proteína de girasol.

| Tratamiento | Polifenoles acoplados | % Rendimiento de acoplamiento | |
|-----------------------------------|------------------------|-------------------------------|-------|
| | | pH 9 | pH 11 |
| Sin tratamiento enzimático | Quercetina | 31.69 | 31.65 |
| Tratamiento 1 (T1) | Inherentes al extracto | 62.71 | 29.22 |
| | Quercetina | 74.62 | 71.93 |
| | Totales | 64.50 | 36.40 |
| Tratamiento 2 (T2) | Inherentes al extracto | 61.21 | 15.66 |
| | Quercetina | 75.56 | 98.75 |
| | Totales | 63.37 | 29.63 |

Es importante destacar que el acoplamiento aparente de los polifenoles a la proteína, no implica necesariamente que éstos se acoplen a los grupos reactivos de la misma de manera individual. Existe la posibilidad también de una asociación entre la proteína con dímeros, oligómeros o polímeros, a veces denominados taninos, de compuestos fenólicos, resultado de un acoplamiento oxidativo entre los mismos (Ozidal *et al.*, 2013; Damodaran, 1993). Cuando el compuesto fenólico es oxidado a un radical fenoxi existe una deslocalización electrónica; el electrón

desapareado está parcialmente localizado en el átomo de oxígeno y parcialmente en los átomos de carbono del anillo aromático en las posiciones *orto* y *para* con respecto al grupo hidroxilo (Casella *et al.*, 2010). Por tanto, el acoplamiento de radicales fenólicos conduce a la formación de diversos compuestos a través de enlaces C-C y C-O (Casella *et al.*, 2010; Ortiz de Montellano, 2010).

Por otro lado, los residuos de tirosina están presentes en la proteína de cártamo en 2.0 % y en la proteína de girasol en 2.5 % (Paredes-López *et al.*, 1991). Estos residuos contienen un grupo fenol y ha sido reportada la aplicación de la HRP para su oxidación, con el propósito de llevar a cabo reacciones de entrecruzamiento de proteínas a través de dos o tres residuos de tirosina por acoplamiento de los radicales generados (Heck *et al.*, 2013, Arntfield, 2004, Damodaran, 1993). Por tanto, se propone como uno de los mecanismos de acoplamiento entre los compuestos fenólicos y la proteína la formación de enlaces covalentes C-C o C-O a través de los radicales fenoxi generados por oxidación de los compuestos fenólicos en el medio y los generados a partir de los residuos de tirosina, como se muestra en la Figura 5.7.

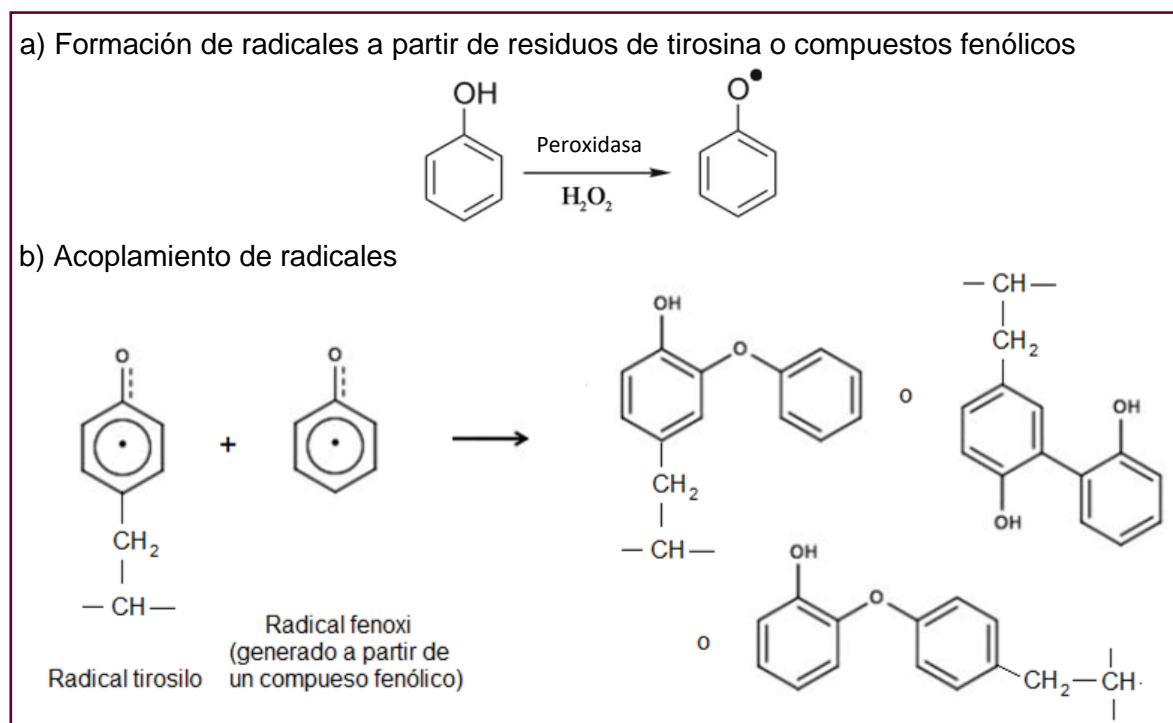


Figura 5.7. Mecanismo de acoplamiento propuesto entre residuos de tirosina de la proteína y compuestos fenólicos.

5.5.3. Quercetina remanente en sobrenadantes

Pese a que con la cuantificación de polifenoles totales se puede elucidar un rendimiento de acoplamiento de la quercetina a la proteína, es mediante la cuantificación de quercetina por HPLC remanente en los sobrenadantes con que se puede obtener un dato más certero. En la Tabla 5.14 se reportan los resultados obtenidos de dicha cuantificación, utilizando sólo los sobrenadantes provenientes de las disoluciones a pH 9, en las que se inactivó la enzima tras 1.5 h de reacción, S.SEQ (T2), para determinar el rendimiento de acoplamiento de la quercetina debido a la actividad de la enzima.

El contenido de quercetina en los sobrenadantes control, S.SC de cártamo y girasol, proviene de las semillas; en el caso del girasol no se encontró un reporte sobre el contenido de quercetina, sugiriendo que es insignificante, mientras que en la semilla de cártamo ha sido reportado como 1.75 % del total de compuestos fenólicos (Yu *et al.*, 2013).

Tabla 5.14. Cuantificación de quercetina remanente en los sobrenadantes. ⁽¹⁾

| Sobrena- dante | CÁRTAMO | GIRASOL |
|-------------------|--|--|
| | [Quercetina] ppm ⁽²⁾ (µg/mL disolución proteínica) | [Quercetina] ppm ⁽²⁾ (µg/mL disolución proteínica) |
| S.SC | 0.628 ± 0.036 ^b | 0.222 ± 0.014 ^A |
| S.SEQ (T2) | 0.000 ± 0.001 ^b | 0.215 ± 0.014 ^A |
| S.SQ | 4.862 ± 0.277 ^a | 0.019 ± 0.019 ^B |

1. Contenido expresado por unidad de disolución proteínica, contemplando la dilución 1:5 del sobrenadante a partir de la disolución proteínica 5 %.

2. Letras diferentes significan que existe diferencia significativa, $\alpha=0.05$ (Cártamo: $a>b$; Girasol: $A>B$).

En ambos casos, el contenido de quercetina en los sobrenadantes S.SEQ (T2), es menor que la concentración de quercetina añadida que se esperaría tener de no haber existido un acoplamiento, es decir, 20 ppm, indicio de un acoplamiento mediado por la HRP; en el caso del cártamo fue de 100 %, mientras que en el caso del girasol fue de 98.94 %, como se muestra en la Tabla 5.15.

Por otra parte, en el caso del girasol, el contenido de quercetina en S.SQ fue menor que 20 ppm, pero también menor al contenido en S.SC y S.SEQ (T2), un resultado inconsistente ya que se esperaría que sin intervención de la enzima el contenido de quercetina en S.SQ fuese mayor. Lo anterior se debe probablemente a un acoplamiento por el pH alcalino. A esto también se le atribuye el hecho de que el sobrenadante S.SQ en el caso del cártamo presentara también un contenido de quercetina menor que 20 ppm, aunque en este caso el contenido de quercetina en S.SQ sí fue mayor a S.SC y S.SEQ (T2), ya que no hubo un acoplamiento de quercetina mediado por la HRP.

Los resultados de rendimiento de acoplamiento de quercetina a la proteína calculado mediante la determinación de quercetina remanente en sobrenadantes se muestran en la Tabla 5.15. Dichos resultados indican que con la cuantificación de polifenoles totales remanentes descritos en el apartado 5.5.2, el rendimiento se subestimó, lo que sugiere que la quercetina puede reemplazar a otros compuestos fenólicos en su acoplamiento.

Tabla 5.15. Rendimiento de acoplamiento de quercetina a la proteína, pH 9.

| Tratamiento | CÁRTAMO | GIRASOL |
|---------------------------------|-------------------------------|---------|
| | % Rendimiento de acoplamiento | |
| Sin tratamiento enzimático | 76.46 | 99.91 |
| Con tratamiento enzimático (T2) | 100.00 | 98.94 |

Los resultados descritos se pueden visualizar a través de los cromatogramas de los sobrenadantes resultantes de la precipitación de la proteína, diluidos 1:5 respecto a la disolución proteínica original, correspondientes a las Figuras 5.8 a 5.15. A pesar de que la señal del estándar de quercetina a 4 ppm, Figura 5.16, aparece con un tiempo de retención de 21.3 min, se consideró que la señal de la misma en los sobrenadantes aparecía alrededor de 21.9 min en el caso del cártamo y 21.0 en el caso del girasol, resultado obtenido en el cromatograma de los sobrenadantes control con adición de quercetina a 4 ppm. Esta modificación en el tiempo de retención se atribuye a posibles interacciones entre la quercetina y el resto de los compuestos presentes en el sobrenadante.

Los compuestos correspondientes al resto de las señales o picos resueltos no fueron identificados.

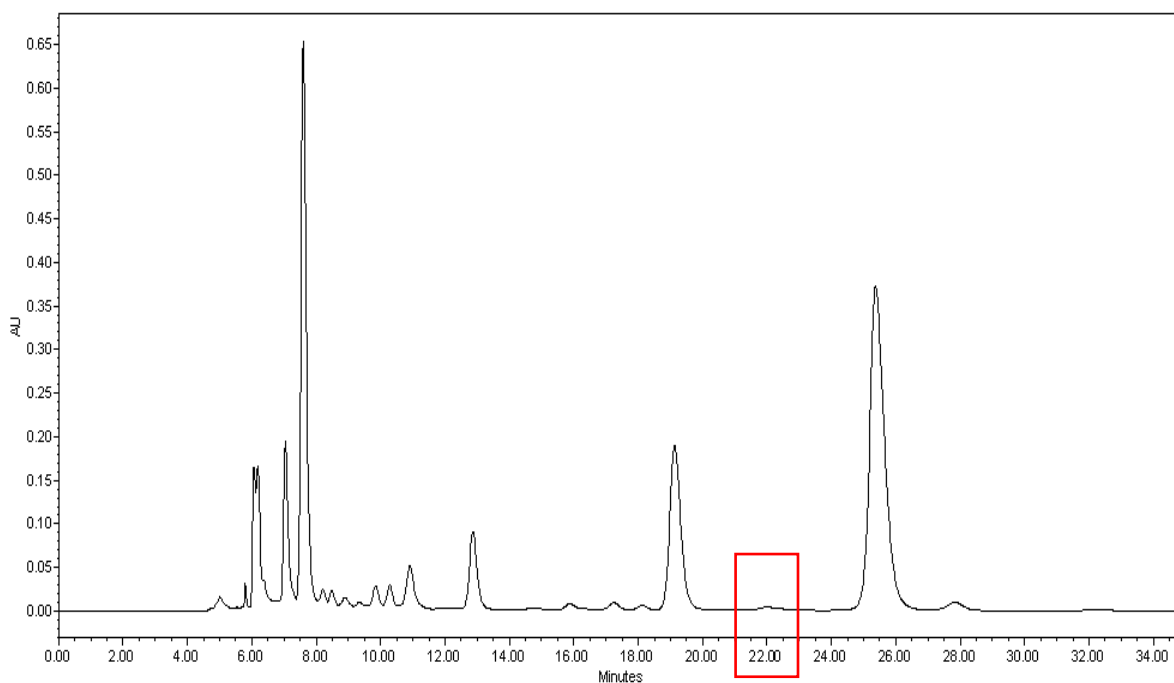


Figura 5.8. Cromatograma del sobrenadante de la disolución proteínica control de cártamo (S.SC).

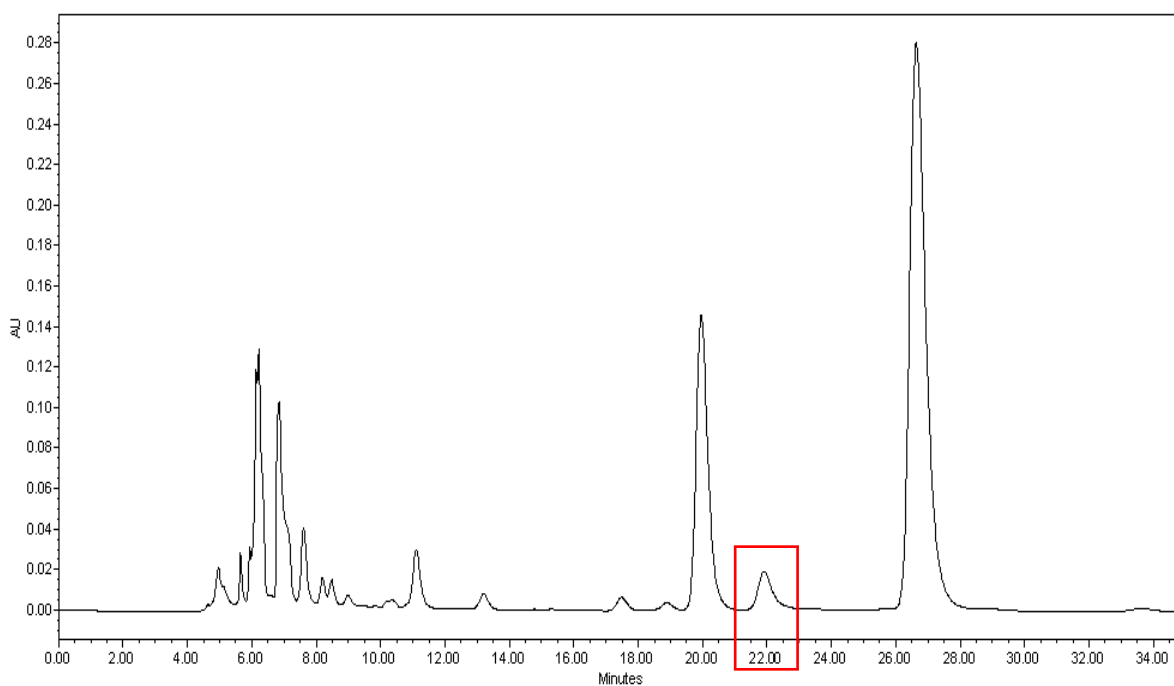


Figura 5.9. Cromatograma del sobrenadante de la disolución proteínica control de cártamo + quercetina a 4 ppm (S.SC+Q).

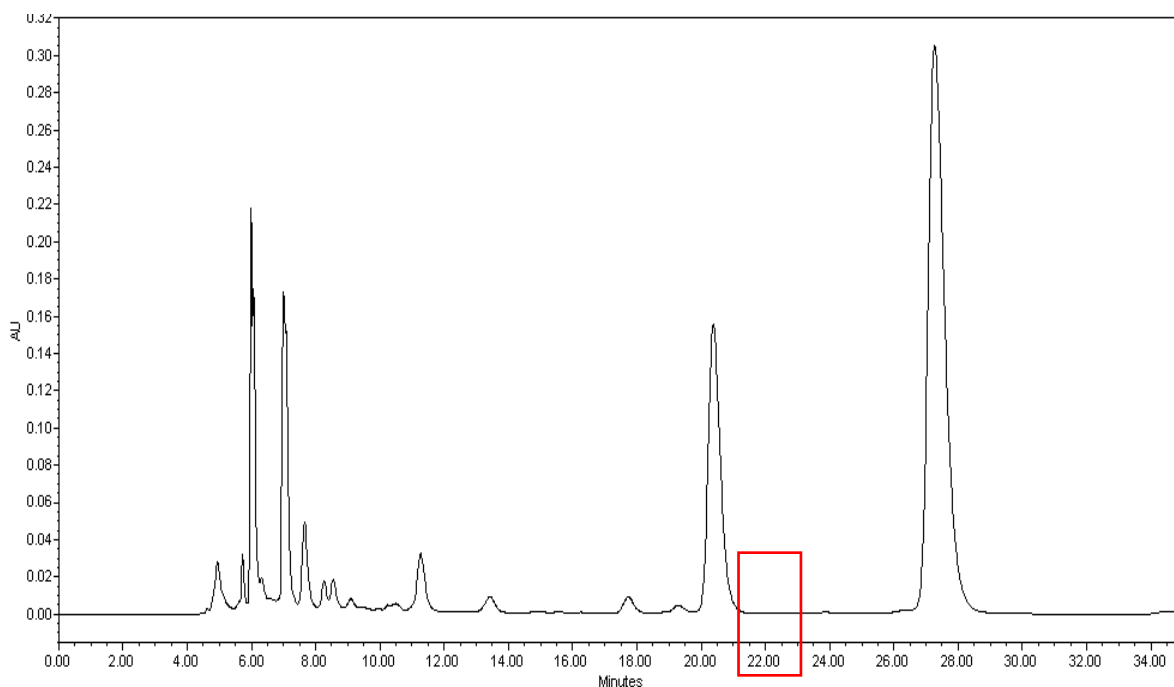


Figura 5.10. Cromatograma del sobrenadante de la disolución proteínica de cártamo funcionalizada con quercetina (S.SEQ).

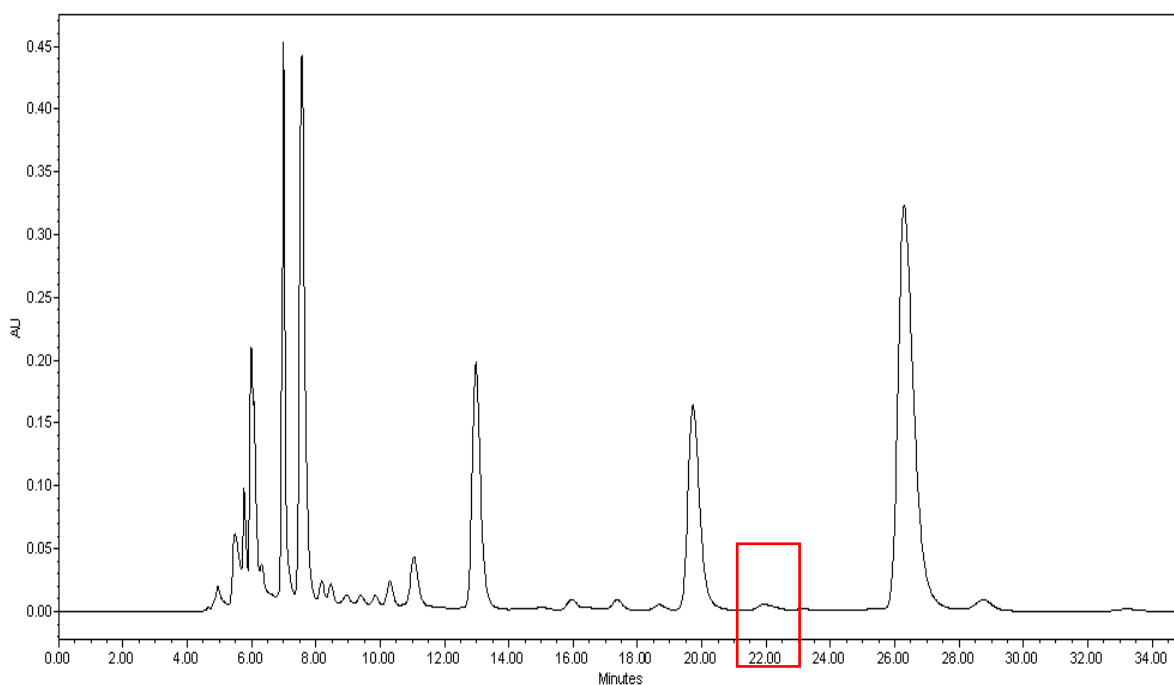


Figura 5.11. Cromatograma del sobrenadante de la disolución proteínica de cártamo con quercetina inmersa (S.SQ).

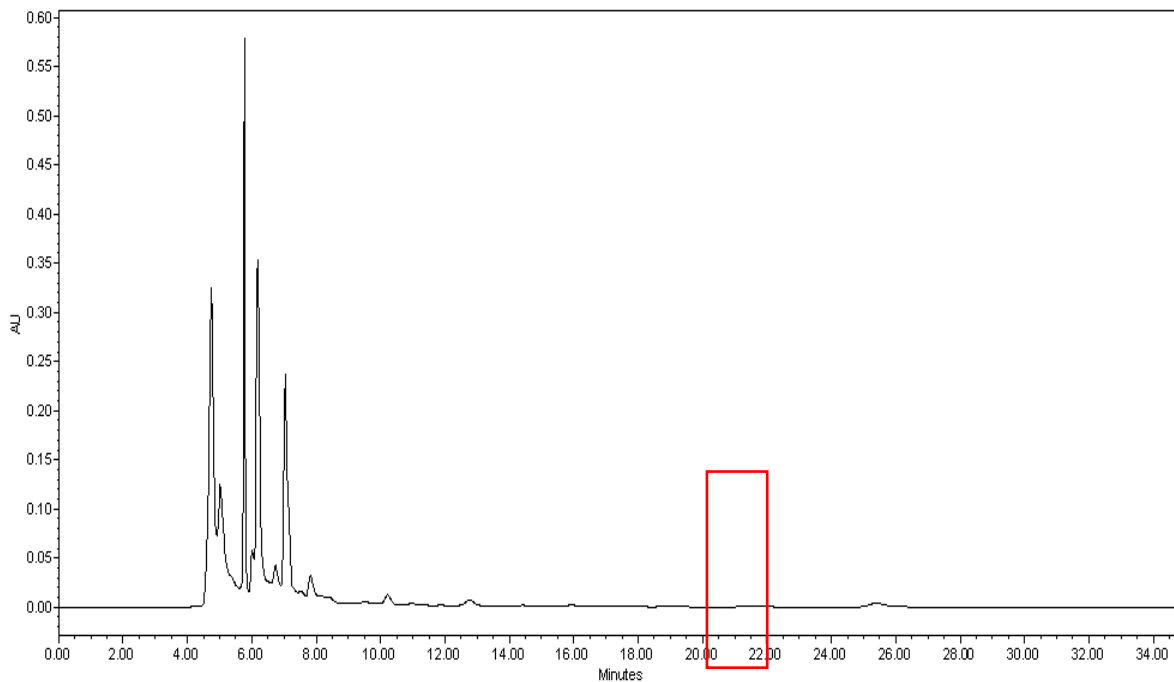


Figura 5.12. Cromatograma del sobrenadante de la disolución proteínica control de girasol (S.SC).

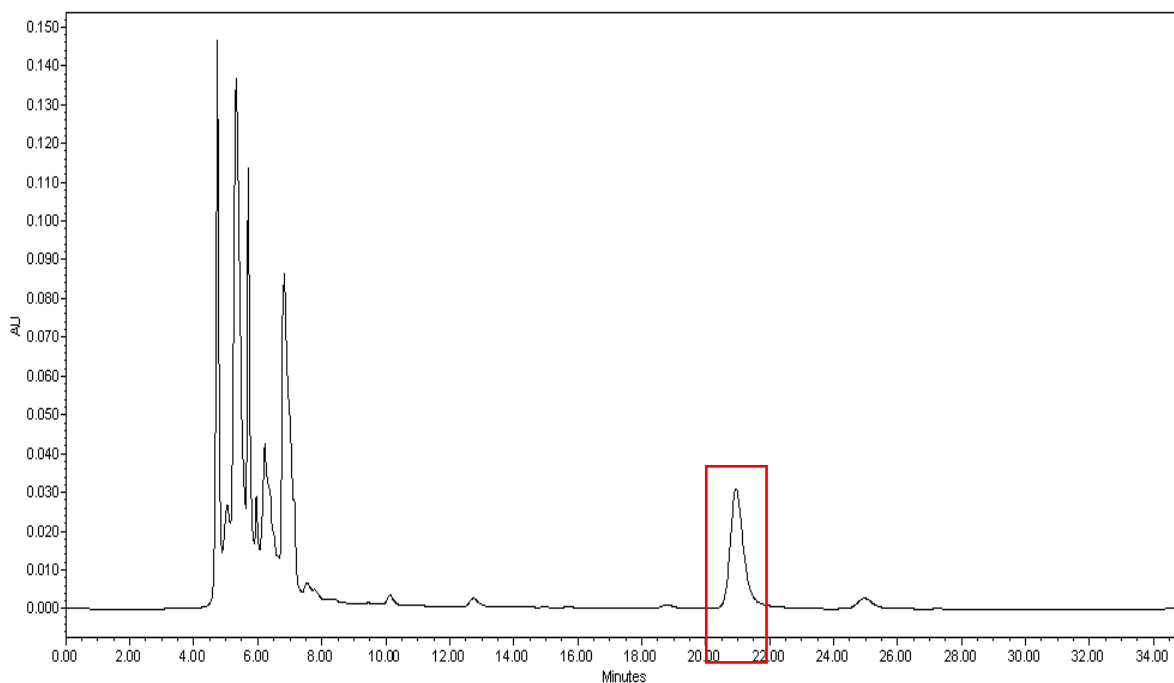


Figura 5.13. Cromatograma del sobrenadante de la disolución proteínica control de girasol + quercetina a 4 ppm (S.SC+Q).

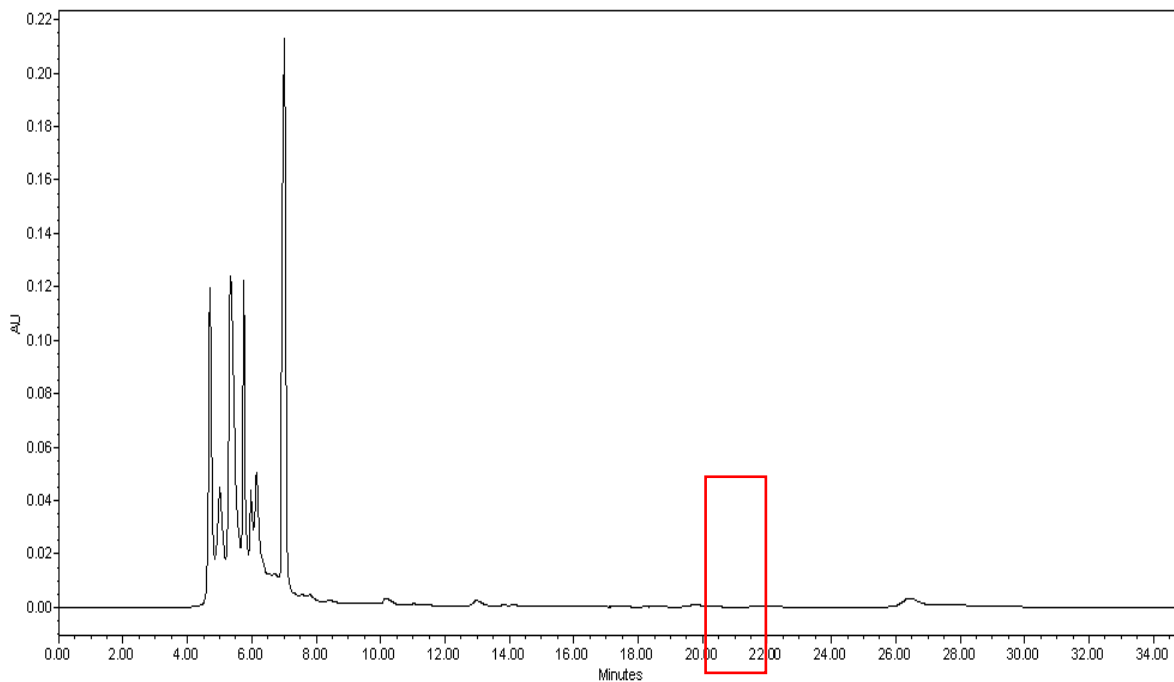


Figura 5.14. Cromatograma del sobrenadante de la disolución proteínica de girasol funcionalizada con quercetina (S.SEQ).

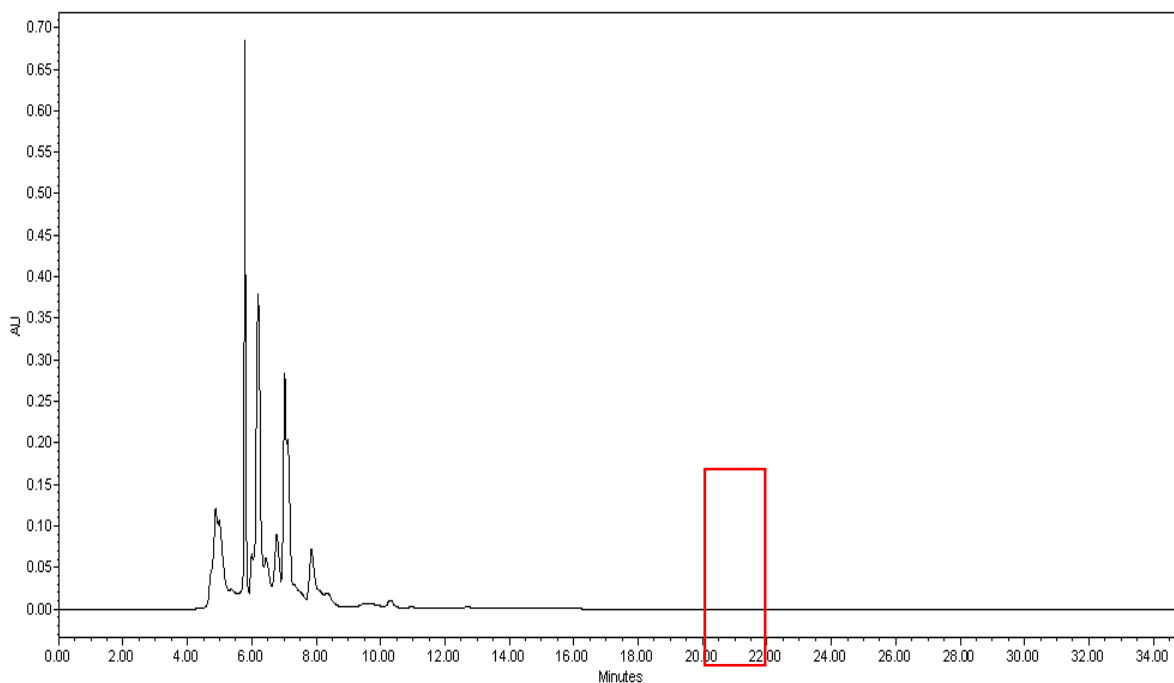


Figura 5.15. Cromatograma del sobrenadante de la disolución proteínica de girasol con quercetina inmersa (S.SQ).

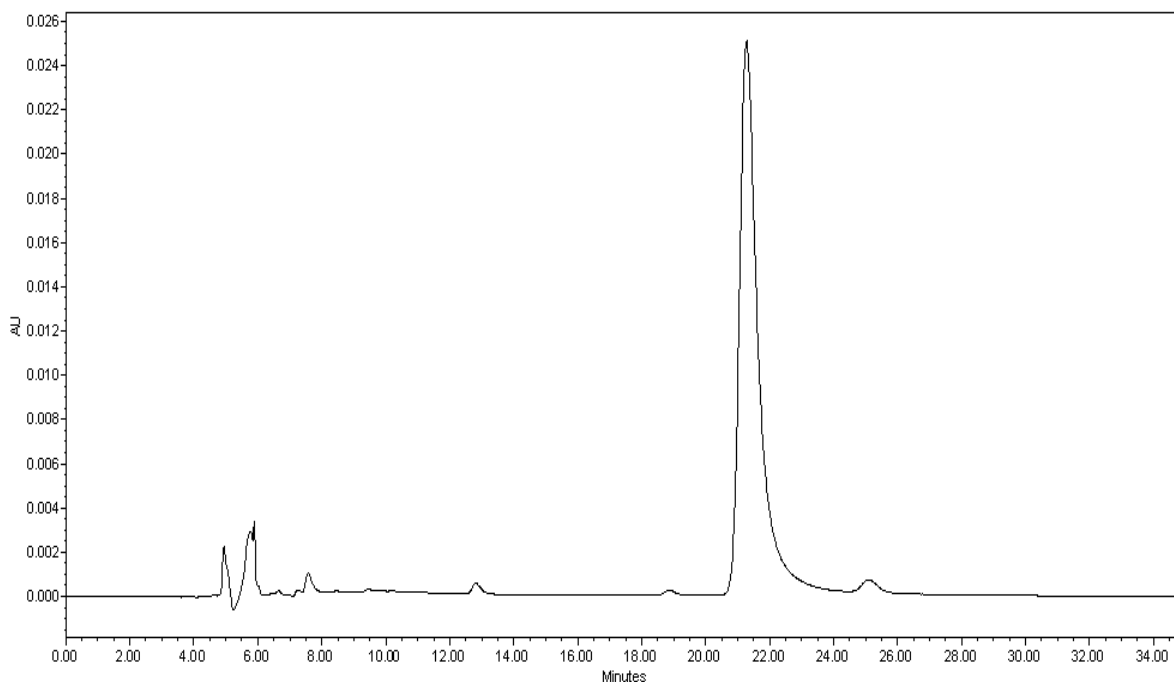


Figura 5.16. Cromatograma de la disolución de quercetina a 4 ppm.

En resumen, estos resultados ponen en evidencia que el acoplamiento mediado por la enzima HRP representa una vía factible para funcionalizar a la proteína con la quercetina. Lo siguiente es demostrar que el compuesto acoplado presenta actividad antioxidante.

5.6. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LAS DISOLUCIONES PROTEÍNICAS

Las interacciones fenoles-proteína modifican las propiedades estructurales, químicas y funcionales tanto de la proteína como de los compuestos fenólicos. En el caso de los compuestos fenólicos, dichas interacciones pueden modificar su capacidad antioxidante, que generalmente se ve reducida en comparación con la que presentan en su forma libre (Ozidal *et al.*, 2013). Lo anterior es provocado por los cambios estructurales, puesto que el tipo y posición de los sustituyentes en el anillo fenólico son determinantes para la manifestación de su actividad antioxidante, siendo ésta más efectiva cuando los sustituyentes son electrodonadores (Msagati, 2013 y Dunford, 2016).

Sin embargo, con respecto a la proteína, su acoplamiento a los polifenoles puede resultar en su funcionalización, en este caso, puede exhibir actividad antioxidante adicional a la que puede presentar si hay presencia de péptidos activos que contribuyan también a la misma. Este efecto se podría vislumbrar separando los compuestos fenólicos no acoplados a la proteína por medio de un enlace covalente al finalizar cada tratamiento.

Por tanto, se determinó la capacidad antioxidante mediante el ensayo ABTS de las disoluciones proteínicas después de cada tratamiento, así como de la proteína precipitada y lavada proveniente de las anteriores.

5.6.1. Capacidad antioxidante de las disoluciones proteínicas después de cada tratamiento

En las Tablas 5.16 y 5.17 se reporta la capacidad antioxidante de las disoluciones proteínicas control, de las tratadas enzimáticamente con y sin adición de quercetina, así como de las disoluciones a las que se agregó quercetina sin tratamiento enzimático, tanto a pH 9 como a pH 11. En las Figuras 5.17 a 5.20 se observa el seguimiento en la disminución del radical ABTS^{•+} durante 10 min como resultado de la actividad antioxidante de las disoluciones con dilución 1:25.

En primera instancia, la capacidad antioxidante exhibida por las disoluciones control de ambas proteínas, cártamo y girasol, se debe principalmente a la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos inherentes del extracto. Además, en las disoluciones proteínicas de cártamo, esta actividad tiende a ser mayor que en las de girasol, lo cual es atribuido a que el extracto de proteína de cártamo presenta un contenido de polifenoles totales mayor al del extracto proteínico de girasol, como se señaló en el apartado 5.3.3.

Tabla 5.16. Capacidad antioxidante de las disoluciones proteínicas de cártamo.

| Disolución | pH 9 | | pH 11 | |
|------------|----------------------|--|----------------------|--|
| | % CAO ⁽¹⁾ | TEAC ($\mu\text{mol ET/g}$ proteína) ⁽²⁾ | % CAO ⁽¹⁾ | TEAC ($\mu\text{mol ET/g}$ proteína) ⁽³⁾ |
| SC | 79.19 \pm 5.24 | 206.73 \pm 13.34 ^{a b} | 77.19 \pm 6.30 | 201.65 \pm 16.06 |
| SE (T1) | 59.65 \pm 1.24 | 156.95 \pm 3.16 ^c | 72.71 \pm 11.78 | 190.23 \pm 30.00 |
| SE (T2) | 69.13 \pm 5.22 | 181.12 \pm 13.31 ^{b c} | 77.52 \pm 4.98 | 202.47 \pm 12.69 |
| SEQ (T1) | 62.88 \pm 3.12 | 165.19 \pm 7.94 ^c | 75.01 \pm 8.09 | 196.09 \pm 20.61 |
| SEQ (T2) | 69.06 \pm 3.09 | 180.94 \pm 7.87 ^b | 78.40 \pm 6.12 | 204.71 \pm 15.58 |
| SQ | 84.22 \pm 6.98 | 219.55 \pm 17.19 ^a | 80.71 \pm 3.70 | 210.62 \pm 9.44 |

TEAC= Capacidad antioxidante equivalente de Trolox; ET= Equivalentes de Trolox

1. Muestras diluidas 1:25 de la disolución proteínica 5 %.

2. Letras diferentes indican que existe diferencia significativa, $\alpha=0.05$ ($a>b>c$).

3. ANOVA $\alpha=0.05$: No existe diferencia significativa.

Tabla 5.17. Capacidad antioxidante de las disoluciones proteínicas de girasol.

| Disolución | pH 9 | | pH 11 | |
|------------|----------------------|--|----------------------|--|
| | % CAO ⁽¹⁾ | TEAC ($\mu\text{mol ET/g}$ proteína) ⁽²⁾ | % CAO ⁽¹⁾ | TEAC ($\mu\text{mol ET/g}$ proteína) ⁽³⁾ |
| SC | 75.28 \pm 2.83 | 196.76 \pm 7.22 ^a | 66.75 \pm 6.01 | 175.04 \pm 15.30 |
| SE (T1) | 57.84 \pm 5.33 | 152.36 \pm 13.58 ^c | 63.43 \pm 6.81 | 166.59 \pm 17.34 |
| SE (T2) | 66.22 \pm 0.48 | 173.69 \pm 1.23 ^b | 65.70 \pm 9.86 | 172.37 \pm 25.12 |
| SEQ (T1) | 57.82 \pm 3.35 | 152.31 \pm 8.53 ^c | 66.57 \pm 6.90 | 174.60 \pm 17.57 |
| SEQ (T2) | 71.29 \pm 2.17 | 186.62 \pm 5.53 ^{a b} | 70.84 \pm 11.01 | 185.47 \pm 28.04 |
| SQ | 79.16 \pm 2.89 | 206.66 \pm 7.35 ^a | 73.91 \pm 6.63 | 193.28 \pm 16.88 |

TEAC= Capacidad antioxidante equivalente de Trolox. ET= Equivalentes de Trolox

1. Muestras diluidas 1:25 de la disolución proteínica 5 %.

2. Letras diferentes indican que existe diferencia significativa, $\alpha=0.05$ ($a>b>c$).

3. ANOVA $\alpha=0.05$: No existe diferencia significativa.

Como se observa en las Tablas 5.16 y 5.17, en las disoluciones proteínicas tratadas enzimáticamente sin adición de quercetina, SE (T1) y SE (T2) a pH 9, tanto en el caso del cártamo como en el de girasol, hay una diferencia significativa con respecto a las disoluciones control, SC, habiendo una reducción en la capacidad antioxidante resultado de la actividad enzimática, aunado al hecho de que los polifenoles experimentan reacciones oxidativas en medio alcalino. Por esto mismo, las disoluciones SEQ (T2) y SQ no presentaron una capacidad antioxidante mayor que las disoluciones SC a pesar de haber agregado quercetina, ya sea que se hayan acoplado a la proteína o no.

La generación de radicales libres y quinonas a causa de la actividad catalítica de la HRP, así como por el pH alcalino, conduce, por un lado, al acoplamiento entre los compuestos fenólicos con la proteína y por otro, a la condensación de dichos compuestos entre sí, resultando en la formación de dímeros, oligómeros y polímeros que tienden a presentar un potencial de reducción menor y algunos incluso llegan a ser insolubles. Lo anterior implica una disminución en la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos comparada con la actividad que presentan en forma libre, debido a los cambios en su estructura (Wilfred y Nicholson, 2008; Casella *et al.*, 2010; Torres-Duarte y Vázquez-Duhalt, 2010).

Además, en contraste con las disoluciones SEQ (T2), las disoluciones SEQ (T1) para ambos casos presentaron una disminución significativa en la capacidad antioxidante, lo cual es atribuido a una actividad catalítica de la HRP posterior a 1.5 h de reacción, que provocó una disminución mayor en la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos.

Por otro lado, entre las disoluciones tratadas a pH 11 no hay diferencia significativa en la capacidad antioxidante y aparentemente es mayor que en las disoluciones tratadas a pH 9, reafirmando el hecho de que la HRP presenta una pobre actividad catalítica bajo estas condiciones.

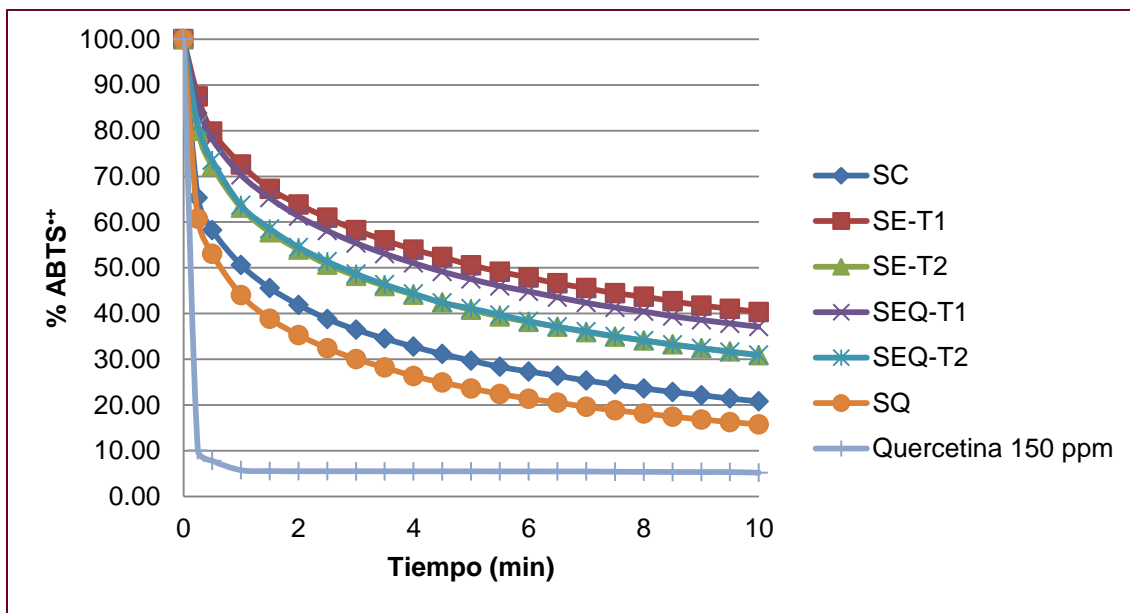


Figura 5.17. Cinética de la actividad antioxidante de las disoluciones proteínicas de cártamo tratadas a pH 9, diluidas 1:25.

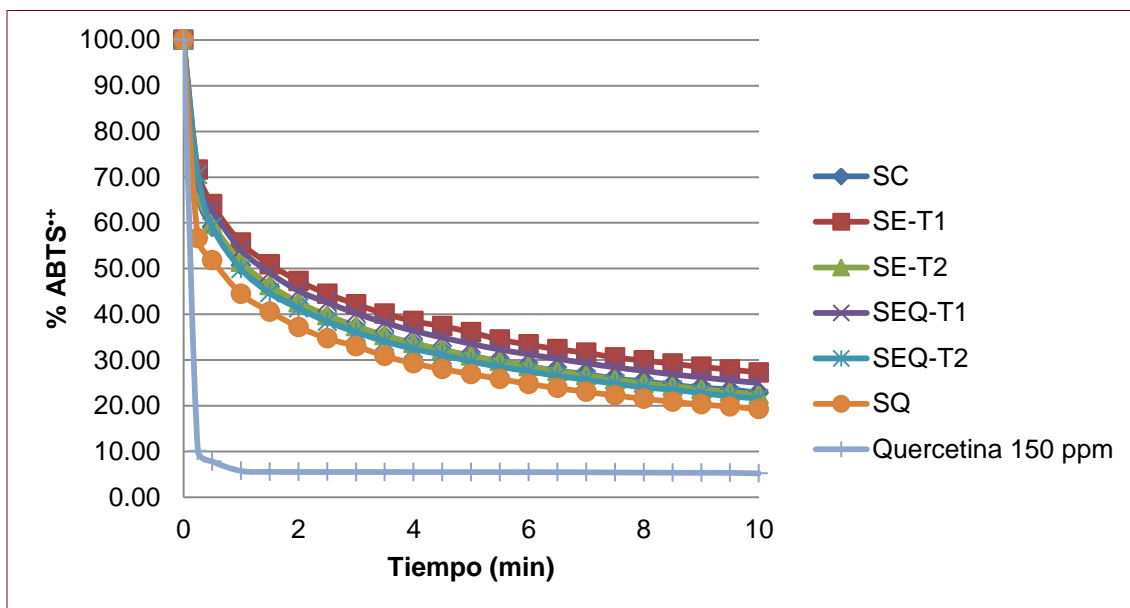


Figura 5.18. Cinética de la actividad antioxidante de las disoluciones proteínicas de cártamo tratadas a pH 11, diluidas 1:25.

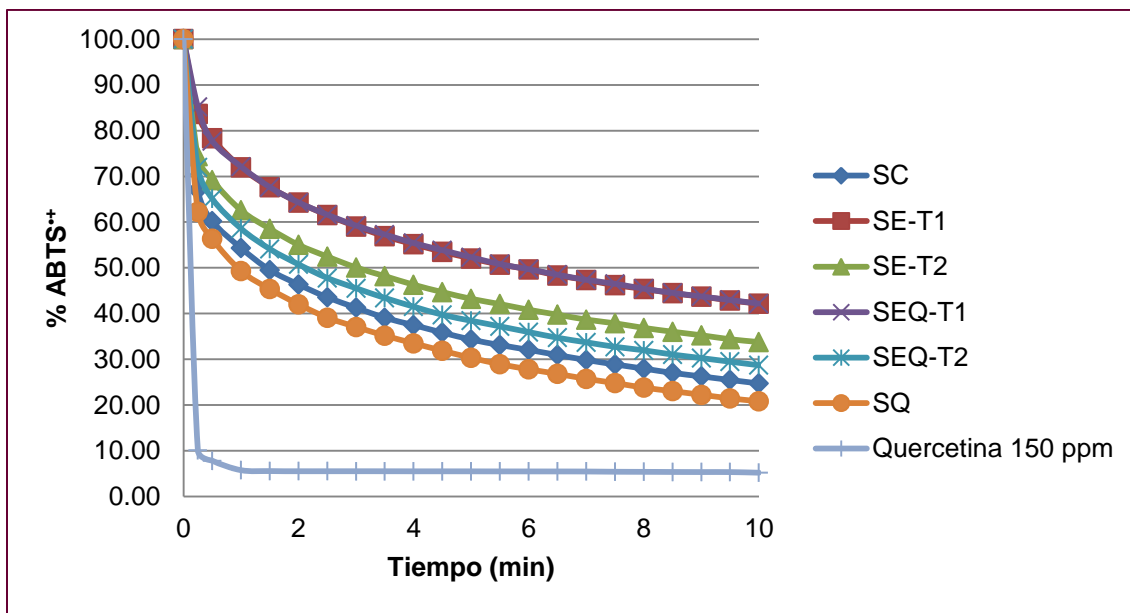


Figura 5.19. Cinética de la actividad antioxidante de las disoluciones proteínicas de girasol tratadas a pH 9, diluidas 1:25.

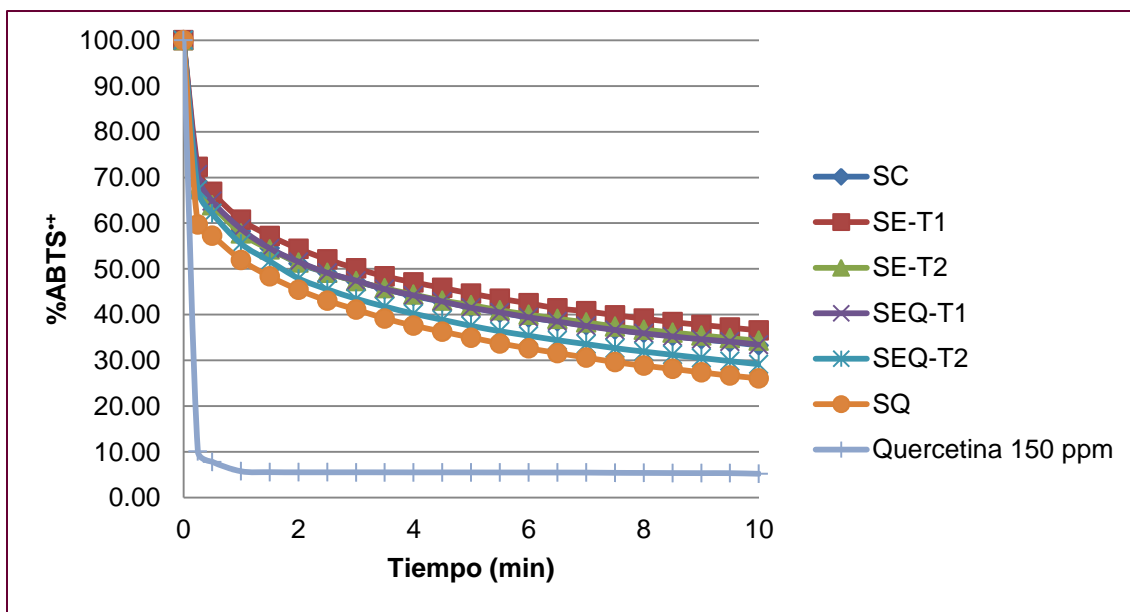


Figura 5.20. Cinética de la actividad antioxidante de las disoluciones proteínicas de girasol tratadas a pH 11, diluidas 1:25.

5.6.2. Capacidad antioxidante de las disoluciones elaboradas a partir de la proteína precipitada después de cada tratamiento

En las Tablas 5.18 y 5.19 se reporta la actividad antioxidante de las disoluciones elaboradas a partir de la proteína precipitada después de cada tratamiento, eliminando así parte de los compuestos fenólicos no acoplados a la misma. En las Figuras 5.21 a 5.24 se observa el seguimiento en la disminución del radical ABTS^{•+} durante 10 min como resultado de la actividad antioxidante de las disoluciones. Para que fuese comparable con los resultados del apartado 5.6.1, después de la precipitación el volumen fue restaurado y se trabajaron también con una dilución 1:25 con respecto a la disolución proteínica original.

Haciendo dicha comparación, en general es notable una menor capacidad antioxidante de estas disoluciones, lo cual fue lo esperado, pues se eliminan compuestos fenólicos no acoplados a la proteína que contribuyen a la actividad antioxidante en las disoluciones proteínicas originales al 5 %.

Tabla 5.18. Capacidad antioxidante de las disoluciones proteínicas de cártamo tras la precipitación isoelectrónica.

| Disolución | pH 9 | | pH 11 | |
|---------------|----------------------|--|----------------------|--|
| | % CAO ⁽¹⁾ | TEAC ($\mu\text{mol ET/g}$ proteína) ⁽²⁾ | % CAO ⁽¹⁾ | TEAC ($\mu\text{mol ET/g}$ proteína) ⁽²⁾ |
| (PP)-SC | 64.24 \pm 1.30 | 168.66 \pm 3.32 ^{b c} | 51.04 \pm 3.60 | 135.03 \pm 9.18 ^B |
| (PP)-SE (T1) | 57.86 \pm 1.36 | 152.39 \pm 3.46 ^d | 45.61 \pm 4.96 | 121.21 \pm 12.04 ^B |
| (PP)-SE (T2) | 61.89 \pm 1.29 | 162.66 \pm 3.30 ^c | 52.73 \pm 3.72 | 139.33 \pm 9.46 ^{A B} |
| (PP)-SEQ (T1) | 64.77 \pm 1.54 | 170.00 \pm 3.92 ^b | 45.02 \pm 4.90 | 119.71 \pm 12.48 ^B |
| (PP)-SEQ (T2) | 65.34 \pm 1.31 | 171.46 \pm 3.32 ^b | 53.30 \pm 3.78 | 140.79 \pm 9.62 ^{A B} |
| (PP)-SQ | 71.63 \pm 1.25 | 187.47 \pm 3.18 ^a | 62.07 \pm 5.04 | 163.12 \pm 12.83 ^A |

1. Muestras diluidas 1:25 respecto a la disolución proteínica original de 5 %.

2. Letras diferentes indican que existe diferencia significativa, $\alpha=0.05$ (pH 9: a>b>c; pH 11: A>B).

Tabla 5.19. Capacidad antioxidante de las disoluciones proteínicas de girasol tras la precipitación isoelectrica.

| Disolución | pH 9 | | pH 11 | |
|---------------|----------------------|---|----------------------|---|
| | % CAO ⁽¹⁾ | TEAC ($\mu\text{mol ET/g}$ proteína) | % CAO ⁽¹⁾ | TEAC ($\mu\text{mol ET/g}$ proteína) |
| (PP)-SC | 49.74 \pm 1.18 | 131.72 \pm 3.00 ^c | 44.92 \pm 2.94 | 119.46 \pm 7.48 ^B |
| (PP)-SE (T1) | 44.45 \pm 1.08 | 118.25 \pm 2.76 ^d | 44.42 \pm 1.99 | 118.18 \pm 5.06 ^B |
| (PP)-SE (T2) | 57.70 \pm 1.52 | 151.99 \pm 3.86 ^b | 46.45 \pm 1.80 | 123.34 \pm 4.59 ^B |
| (PP)-SEQ (T1) | 51.05 \pm 1.26 | 135.06 \pm 3.21 ^c | 47.31 \pm 1.73 | 125.53 \pm 4.40 ^B |
| (PP)-SEQ (T2) | 59.95 \pm 1.44 | 157.73 \pm 3.68 ^{a b} | 53.86 \pm 1.06 | 142.21 \pm 2.71 ^A |
| (PP)-SQ | 61.78 \pm 1.37 | 162.40 \pm 3.49 ^a | 58.34 \pm 2.13 | 153.62 \pm 5.44 ^A |

1. Muestras diluidas 1:25 respecto a la disolución proteínica original de 5 %.

2. Letras diferentes indican que existe diferencia significativa, $\alpha=0.05$ (pH 9: a>b>c>d; pH 11: A>B).

En el caso de las disoluciones de proteína que fueron tratadas con la HRP a pH 9, es de suponer una mejora en la capacidad antioxidante de la proteína debido a un mayor acoplamiento con los compuestos fenólicos. No obstante, como se muestra en la Tabla 5.19, dicha diferencia fue significativa sólo en el caso del girasol, donde las disoluciones (PP)-SE (T2) y (PP)-SEQ (T2) presentaron mayor capacidad antioxidante que la disolución control (PP)-SC. En el caso del cártamo, como se observa en la Tabla 5.18, los valores de capacidad antioxidante de las disoluciones (PP)-SEQ (T2) y (PP)-SEQ (T1) fueron superiores al de la disolución control (PP)-SC, pero la diferencia no fue significativa.

Es probable que en ciertos casos la diferencia no haya sido más evidente debido a la interferencia de compuestos fenólicos que pudieron co-precipitar con la proteína, gracias al establecimiento de interacciones reversibles por puentes de hidrógeno, favorecido por el procedimiento de precipitación isoelectrica a pH ácido. Por tanto, estos compuestos pueden contribuir en la capacidad antioxidante de las nuevas disoluciones sin estar unidos covalentemente con la proteína.

A lo anterior se le atribuye también el hecho de que las disoluciones (PP)-SQ presentaron mayor capacidad antioxidante, a pesar de haberse establecido en el apartado 5.5.2 que el acoplamiento es menor sin un tratamiento enzimático, pues al estar asociados los compuestos fenólicos con la proteína principalmente de forma reversible, la actividad antioxidante de los mismos puede no estar afectada al no haber una modificación en su estructura.

Por otro lado, el que las disoluciones (PP)-SE (T1) (PP)-SEQ (T1) presentaran en general una capacidad antioxidante menor a las disoluciones (PP)-SE (T1) y (PP)-SEQ (T2), respectivamente, confirma que la actividad enzimática posterior a 1.5 h de reacción puede resultar contraproducente debido a otras reacciones oxidativas, tal como el acoplamiento de los polifenoles entre sí. Sin embargo, en algunos casos la diferencia no fue significativa, como se describe en las Tablas 5.18 y 5.19.

En cuanto a las disoluciones de pH 11, de las disoluciones tratadas enzimáticamente, sólo la disolución (PP)-SEQ (T2) de girasol presentó una capacidad antioxidante mayor que el control (PP)-SC, atribuida a la actividad que pudiera presentar la HRP y a la posible oxidación química previa al acoplamiento de los compuestos fenólicos, además de que la quercetina añadida, al igual que otros compuestos fenólicos, pudo co-precipitar con la proteína y contribuir a la actividad antioxidante de la disolución.

Es importante señalar que la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos, depende de su capacidad para la donación de electrones (Yanishlieva-Maslarova, 2001). Por tanto, la capacidad antioxidante de compuestos fenólicos acoplados a la proteína dependerá de la estructura final generada. En el caso de un resto difenol, presente también en la quercetina, se ha reportado la regeneración de hidroquinona tras la formación de enlaces C-N o C-S con los grupos reactivos de la proteína (Ozidal *et al.*, 2013).

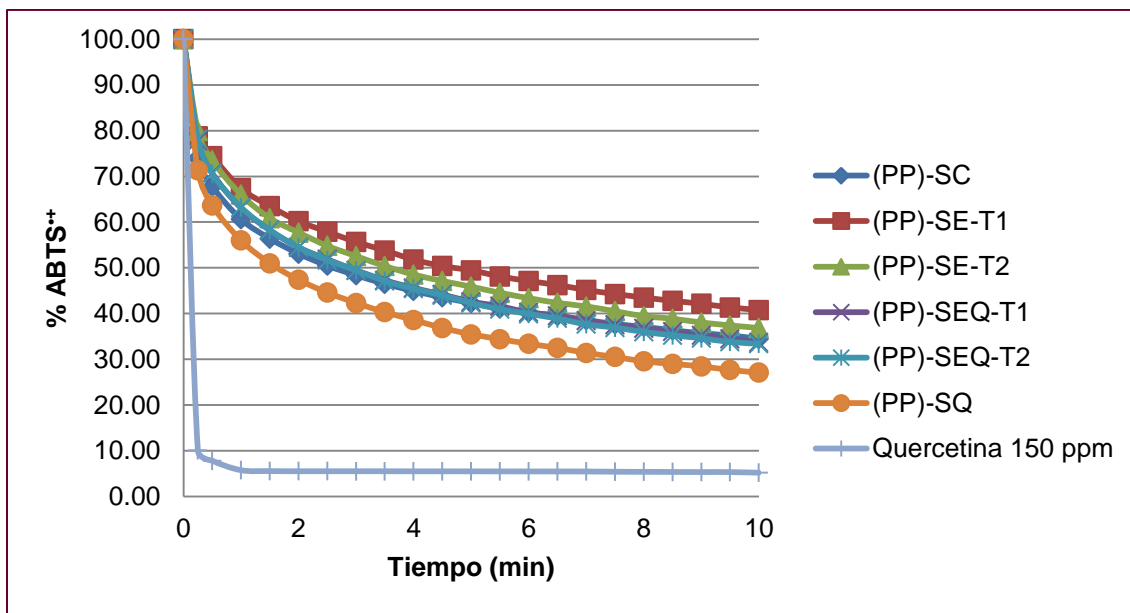


Figura 5.21. Cinética de la actividad antioxidante de las disoluciones proteínicas de cártamo tras precipitación isoelectrónica tratadas a pH 9, diluidas 1:25.

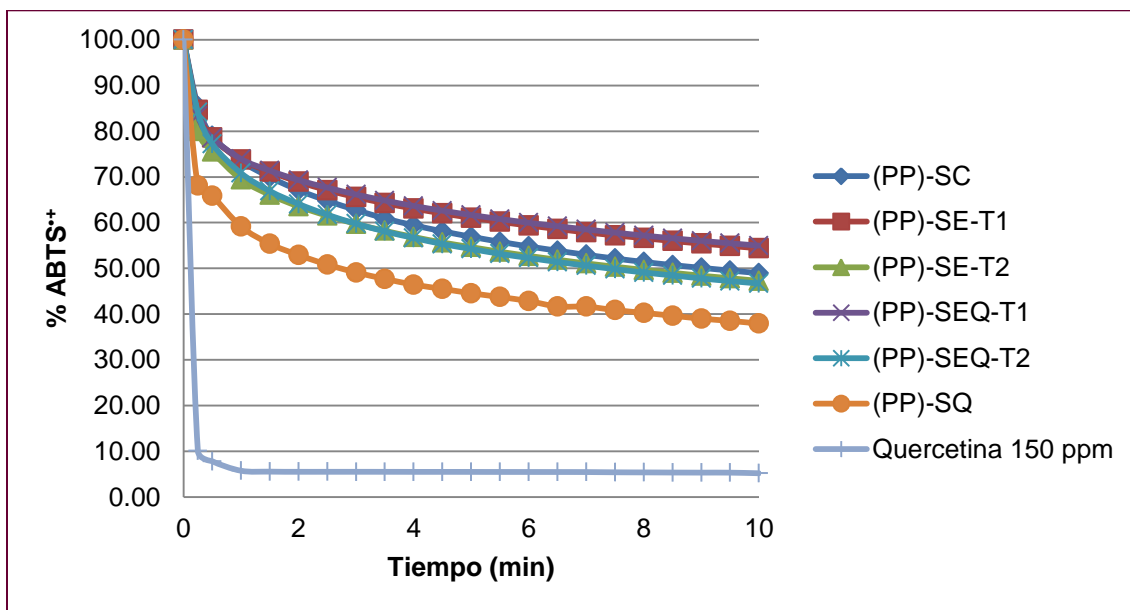


Figura 5.22. Cinética de la actividad antioxidante de las disoluciones proteínicas de cártamo tras precipitación isoelectrónica tratadas a pH 11, diluidas 1:25.

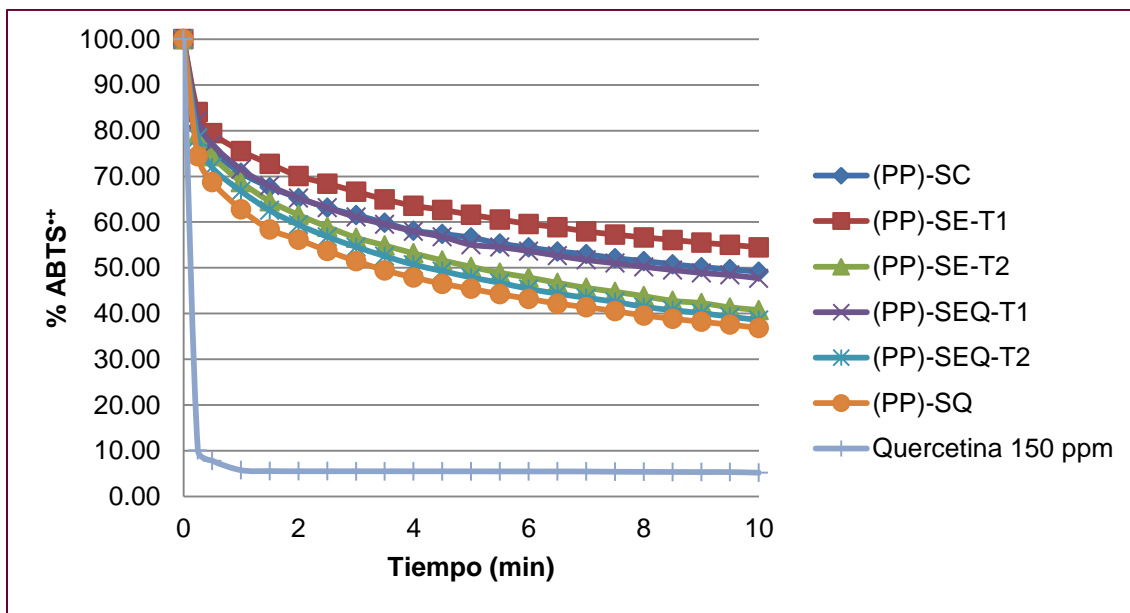


Figura 5.23. Cinética de la actividad antioxidante de las disoluciones proteínicas de girasol tras precipitación isoelectrica tratadas a pH 9, diluidas 1:25.

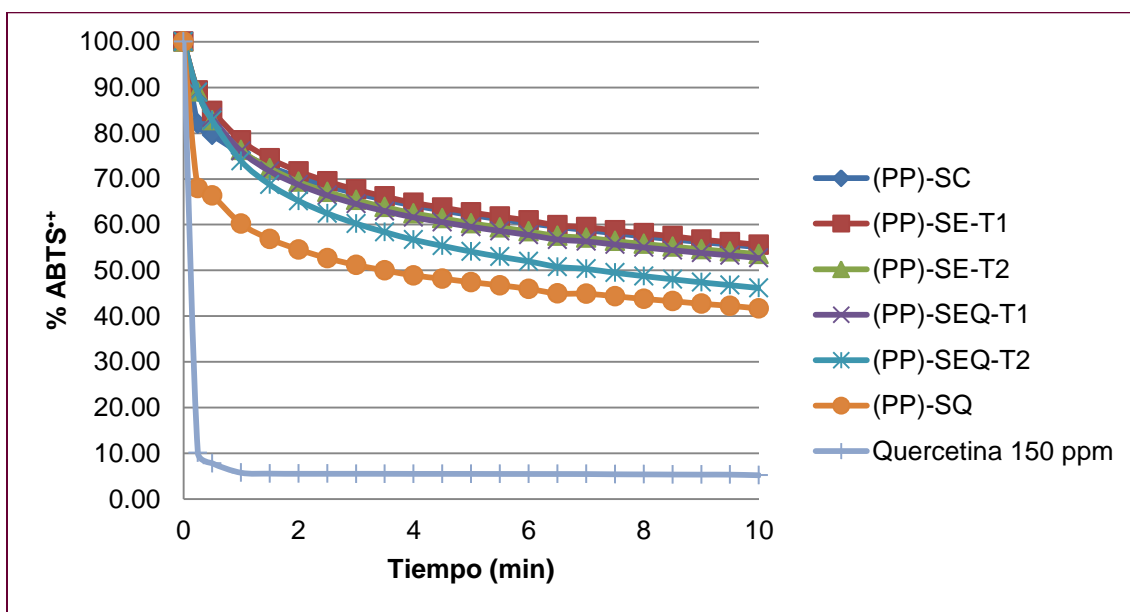


Figura 5.24. Cinética de la actividad antioxidante de las disoluciones proteínicas de girasol tras precipitación isoelectrica tratadas a pH 11, diluidas 1:25.

5.7. CARACTERIZACIÓN DE LAS PELÍCULAS PROTEÍNICAS

Las propiedades de las películas proteínicas dependen del grado de las interacciones proteína-proteína, necesarias para formar una red tridimensional continua, así como de las interacciones de la proteína con otras moléculas pequeñas, incluyendo el agua, plastificante y otros aditivos dispersados en el medio (Han y Gennadios, 2005). Las interacciones proteína-proteína dependen a su vez del grado de extensión de las cadenas polipeptídicas, determinado por el tipo de estructura de la proteína y la secuencia de aminoácidos. En el caso de las proteínas de cártamo y girasol, la estructura es globular, por lo que la proteína debe ser desnaturalizada con calor, ácido, base o solventes para formar estructuras extendidas y establecer las interacciones necesarias para la formación de la película (Krochta, 1997).

Por otra parte, las interacciones entre los compuestos fenólicos y las proteínas globulares pueden cambiar la carga neta en la superficie de la proteína y aumentar su peso molecular, lo cual puede influir en sus propiedades funcionales (González-Pérez y Vereijken, 2007; Malik y Saini, 2017).

Las películas se elaboraron a partir de las disoluciones proteínicas tratadas a pH 9, ajustando el pH a 11. En el caso de las películas tratadas enzimáticamente y con adición de quercetina, sólo se emplearon las disoluciones en las cuales la enzima fue inactivada después de 1.5 h de reacción, tratamiento 2, lo cual se consideró conveniente para que no se presentara una actividad enzimática posterior que resultara desfavorable con respecto a la capacidad antioxidante de la disolución proteínica, como se describió en el apartado 5.6.

En general, la apariencia de las películas fue similar sin importar si se adicionó quercetina o no y sin importar el tratamiento. Las películas proteínicas de cártamo exhibieron una coloración amarillo-ámbar y fueron translúcidas, como se observa en la Figura 5.25, mientras que las de girasol presentaron una coloración verde oscuro y fueron muy poco translúcidas, como se aprecia en la Figura 5.26. Dicha coloración se debe a la presencia de compuestos fenólicos en los pellets a partir de los cuales se realizaron las disoluciones formadoras de película, que imparten

color cuando son oxidados en medio alcalino (Munin y Edwards-Lévy, 2011). Particularmente en el caso del girasol, la coloración verde oscuro es atribuida a la oxidación del ácido clorogénico (Wildermuth *et al.*, 2016).



Figura 5.25. Película proteínica de cártamo.



Figura 5.26. Película proteínica de girasol.

Adicionalmente, a las películas elaboradas se les determinó la masa y el espesor después de un acondicionamiento a 51 ± 3 % HR y 23 ± 2 °C. Los resultados se muestran en la Tabla 5.20.

Tabla 5.20. Masa y espesor de las películas proteínicas elaboradas a pH 11.

| PELÍCULA | CÁRTAMO | | GIRASOL | |
|--------------|--|-----------------------------|--|-----------------------------|
| | Masa por unidad de área (mg/cm ²) ⁽¹⁾ | Espesor (mm) ⁽¹⁾ | Masa por unidad de área (mg/cm ²) ⁽¹⁾ | Espesor (mm) ⁽¹⁾ |
| P.SC | 39.95±0.33 | 0.35±0.04 | 40.18±0.59 | 0.41±0.01 |
| P.SEQ | 40.23±1.12 | 0.39±0.03 | 39.85±0.24 | 0.35±0.05 |
| P.SQ | 41.73±0.36 | 0.30±0.04 | 39.35±0.91 | 0.34±0.01 |

1. ANOVA $\alpha=0.05$: No existe diferencia significativa.

5.7.1. Permeabilidad al vapor de agua de las películas proteínicas

La transferencia de masa debido a un gradiente de presión o concentración tiene efectos importantes sobre la calidad y seguridad de los productos alimenticios. Las principales sustancias permeables en este contexto son el vapor de agua, el oxígeno y el dióxido de carbono. Por lo tanto, la velocidad de transmisión de

dichas sustancias a través del material de empaque se determina comúnmente en la industria para evaluar el rendimiento del mismo. (Han y Scanlon, 2005).

La permeación del vapor de agua y de gases involucra la disolución del permeante en la matriz de la película y su difusión a través de la misma bajo un gradiente de concentración, seguido de su liberación en el lado opuesto de la película (Cuq *et al.*, 1995); a este mecanismo se le conoce también como difusión activada (Montalvo *et al.*, 2012). No obstante, en las películas proteínicas puede presentarse adicionalmente un mecanismo de difusión capilar si se trata de un material poroso o presenta imperfecciones como canales o fisuras, por lo que el paso de la sustancia a través de estas es libre (Montalvo *et al.*, 2012; Chao y Rizvi, 1988).

Se llevaron a cabo pruebas de permeabilidad al vapor de agua (PVA) de las películas proteínicas P.SC, P.SEQ y P.SQ elaboradas a pH 11, así como de una película de LDPE (Ziploc®) con fines comparativos. Los valores obtenidos de permeabilidad se reportan en la Tabla 5.21.

Tabla 5.21. Permeabilidad al vapor de agua de las películas proteínicas y LDPE.

| Película ⁽²⁾ (Elaboración a pH 11) | | Permeanza (P) $\left(\frac{\text{g}}{\text{s}\cdot\text{m}^2\cdot\text{Pa}}\right)$ | Permeabilidad (PVA) $\left(\frac{\text{g}\cdot\text{m}}{\text{s}\cdot\text{m}^2\cdot\text{Pa}}\right)^{(3)}$ |
|--|-------------------|--|---|
| CÁRTAMO | P.SC | $(5.98 \pm 1.00) \times 10^{-9}$ | $(2.12 \pm 0.19) \times 10^{-12} \text{ a}$ |
| | P.SEQ (T2) | $(5.59 \pm 0.69) \times 10^{-9}$ | $(2.15 \pm 0.11) \times 10^{-12} \text{ a}$ |
| | P.SQ | $(7.82 \pm 1.07) \times 10^{-9}$ | $(2.39 \pm 0.64) \times 10^{-12} \text{ a}$ |
| GIRASOL | P.SC | $(4.59 \pm 1.25) \times 10^{-9}$ | $(1.88 \pm 0.49) \times 10^{-12} \text{ a}$ |
| | P.SEQ | $(5.91 \pm 0.48) \times 10^{-9}$ | $(2.05 \pm 0.11) \times 10^{-12} \text{ a}$ |
| | P.SQ | $(7.03 \pm 0.23) \times 10^{-9}$ | $(2.38 \pm 0.01) \times 10^{-12} \text{ a}$ |
| LDPE (Ziploc®) | | $(1.10 \pm 0.59) \times 10^{-9}$ | $(2.94 \pm 1.58) \times 10^{-14} \text{ b}$ |

1. Condiciones de ensayo: 22 ± 2 °C y HR= $(50 \pm 2)/0$ %.

2. Espesor de las películas proteínicas reportado en la Tabla 20; Espesor de la película LDPE (Ziploc®)= 0.0267 ± 0.0015 mm

3. Letras diferentes indican que existe diferencia significativa, $\alpha=0.05$ ($a>b$).

No se obtuvo una diferencia significativa en los resultados de permeabilidad al vapor de agua de las películas elaboradas a causa de los diferentes tratamientos, tanto en el caso de las películas proteínicas de cártamo como las de girasol. Sin embargo, como era de esperarse, al comparar estos valores con el obtenido para la película de LDPE (Ziploc®), si hubo una diferencia significativa. Las películas proteínicas elaboradas presentan una permeabilidad al vapor de agua (PVA) mayor por dos órdenes de magnitud.

Lo anterior es debido a que la naturaleza hidrofílica de la proteína, así como la presencia de plastificantes hidrofílicos, ocasionan una baja efectividad de la película formada como barrera frente al vapor de agua (Guilbert y Gontard, 2005). La PVA de la mayoría de las películas proteínicas es mayor que la de los plásticos comunes (Han y Gennadios, 2005), éstas exhiben un valor de PVA mayor en aproximadamente dos a cuatro órdenes de magnitud en comparación con el LDPE (Arntfield, 2004); esto es congruente con los resultados obtenidos.

Cabe señalar que estrictamente no es correcto reportar un valor de permeabilidad para las películas proteínicas, ya que éste sólo es reportado cuando el material es homogéneo (ASTM, 2005). En este caso, la elaboración de las películas no es completamente controlada, en referencia principalmente a la superficie en la que se extiende la disolución formadora de película, las condiciones de temperatura y humedad relativa de secado, ventilación, entre otros factores. En consecuencia, la película puede no ser homogénea con respecto a su espesor y de composición no uniforme en su extensión. No obstante, al realizar el cálculo de permeabilidad, los valores pueden ser más fácilmente comparados al contemplarse el espesor de las películas, reportado en la Tabla 5.20.

Así, comparando los resultados de PVA obtenidos de las películas elaboradas con los mostrados en la Tabla 5.22, correspondientes a valores reportados en otros estudios para películas proteínicas con similitud en la relación de proteína y plastificante, así como de temperatura, las películas proteínicas de cártamo y girasol presentan una permeabilidad menor por dos a tres órdenes de magnitud.

Tabla 5.22. Permeabilidad al vapor de agua reportada para otras películas proteínicas y LDPE.

| Proteína/plastificante: | Condiciones de ensayo | PVA $\left(\frac{\text{g}\cdot\text{m}}{\text{s}\cdot\text{m}^2\cdot\text{Pa}}\right)$ |
|---|-----------------------|--|
| Girasol:Gly (3.3:1) ^(1,2) | 20 °C, 70/0 %HR | 1.13-1.45 x 10 ⁻¹⁰ |
| Soya:Gly (1.7:1) ⁽³⁾ | 25 °C, 50/100 %HR | 1.78 x 10 ⁻⁰⁹ |
| Zeína de maíz:PEG+Gly (2.6:1) ⁽³⁾ | 25 °C, 50/100 %HR | 1.24 x 10 ⁻⁰⁹ |
| Gluten de trigo:Gly(2.5:1) ⁽³⁾ | 26 °C, 50/100 %HR | 1.25 x 10 ⁻⁰⁹ |
| Caseínato:Gly (2:1) ^(3,4) | 23 °C, 55/72 %HR | 2.20-3.59 x 10 ⁻⁰⁹ |
| Proteína del suero:Gly (2:1) ⁽³⁾ | 23 °C, 55/73 %HR | 3.37 x 10 ⁻⁰⁹ |
| Albúmina de huevo:Gly o Sor (2:1) ⁽³⁾ | 25 °C, 50/70 %HR | 1.37-2.96 x 10 ⁻⁰⁹ |
| Prot. miofibrilar de pescado:Gly (1.9:1) ⁽³⁾ | 20 °C, 100/0 %HR | 7.06 x 10 ⁻¹¹ |
| LDPE ⁽³⁾ | 28 °C, 0/100 %HR | 3.59 x 10 ⁻¹³ |
| LDPE ⁽⁵⁾ | 25 °C, 90/0 %HR | 6.00 x 10 ⁻¹⁰ |

Nota: Gly=glicerol, Sor=sorbitol y PEG=polietilenglicol; % HR (arriba/abajo) de la película.

Fuentes: 1. Salgado et al., 2013; 2. Salgado et al., 2010; 3. Krochta, 2002; 4. Krochta, 1997; 5. Chanda y Roy, 2007.

Sin embargo, además de la diferencia debida a la proteína, formulación, espesor de la película y proceso de elaboración, las condiciones de temperatura y humedad relativa durante el ensayo pueden influir mucho en el resultado. Particularmente, una humedad relativa alta implica un aumento en la absorción de agua por parte de la película proteínica y, en consecuencia, un aumento en la plastificación, ya que el agua misma actúa como plastificante al disminuir la temperatura de transición vítrea (T_g) (Arntfield, 2004; Han y Gennadios, 2005). En consecuencia, se promueve la difusión del vapor de agua en la matriz polimérica debido a una mayor movilidad entre las cadenas de proteína (Han y Gennadios, 2005). De acuerdo a lo anterior, es probable que el hecho de haber realizado las pruebas a 50 % de HR en la cámara, condujera a un resultado menor de PVA comparado con otras películas proteínicas.

De igual manera, la diferencia en el valor de PVA de la película LDPE obtenido, mostrado en la Tabla 5.21, con los reportados en la literatura, mostrados en la Tabla 5.22, se atribuyeron a las diferentes condiciones de ensayo.

5.8. PRUEBAS ACELERADAS: EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE PROTECCIÓN DE LAS PELÍCULAS FRENTE AL DETERIORO OXIDATIVO EN AJONJOLÍ

Con el objetivo de evaluar la capacidad de protección de las películas frente al deterioro oxidativo en un alimento, se hicieron determinaciones periódicas del índice de peróxidos e índice de Kreis en ajonjolí molido empacado en las películas proteínicas elaboradas de cártamo y girasol durante 99 días. Estos empacados se almacenaron en la cámara climática con condiciones que propiciaran la oxidación lipídica, 45 °C y 45 % HR. Además, para fines comparativos, también se empacó ajonjolí molido en una bolsa de LDPE (Reynolds®), que es un material de empaque común para alimentos (Arntfield, 2004).

Así mismo, se consideró conveniente realizar determinaciones de humedad en la matriz alimenticia, ya que es un factor que podría propiciar las reacciones de deterioro oxidativo, aunque no es un índice del mismo.

5.8.1. Humedad

En las Figuras 5.27 y 5.28 se puede observar el seguimiento en el contenido de humedad del ajonjolí molido empacado en las películas proteínicas y la bolsa de LDPE (Reynolds®), el cual osciló entre 3 y 3.5 % aproximadamente.

El contenido de humedad promedio se reporta en la Tabla 5.23, donde se observa que no hay diferencia significativa en la humedad del ajonjolí molido empacado en las películas proteínicas, pero ésta es mayor a la humedad del ajonjolí empacado en la bolsa de LDPE durante los 99 días de almacenamiento. Esto era lo esperado, ya que el LDPE presenta una mayor resistencia a la transferencia de humedad entre el alimento y ambiente.

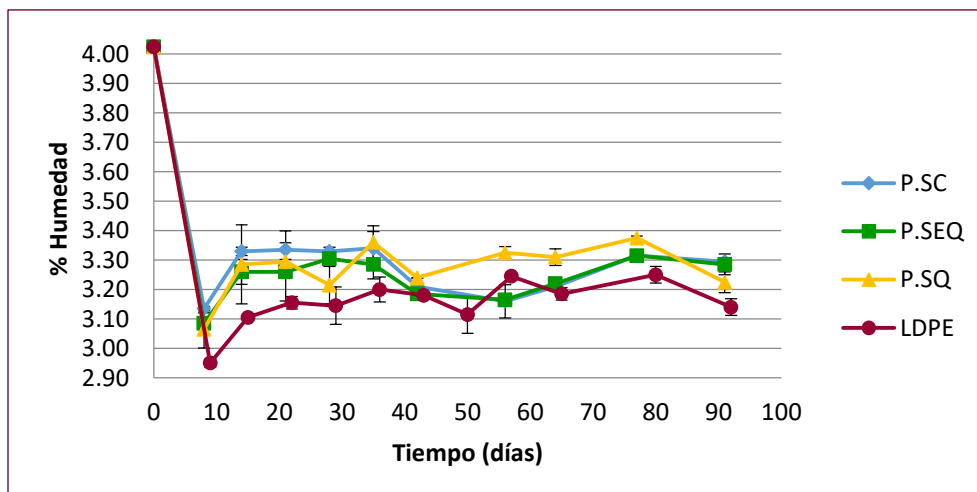


Figura 5.27. Seguimiento del contenido de humedad en ajonjolí molido empacado en películas proteínicas de cártamo.

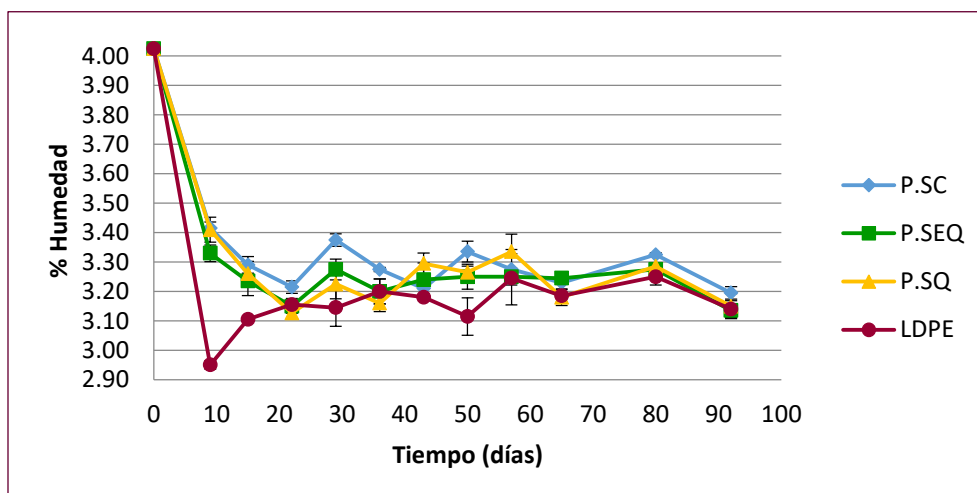


Figura 5.28. Seguimiento del contenido de humedad en ajonjolí molido empacado en películas proteínicas de girasol.

Tabla 5.23. Humedad promedio del ajonjolí molido durante el almacenamiento.

| Película | CÁRTAMO | GIRASOL |
|----------|-------------------------------------|--------------------------|
| | % Humedad promedio ^(1,2) | |
| P.SC | 3.26 ± 0.24 ^a | 3.29 ± 0.22 ^a |
| P.SEQ | 3.23 ± 0.25 ^a | 3.25 ± 0.23 ^a |
| P. SQ | 3.27 ± 0.24 ^a | 3.25 ± 0.24 ^a |
| LDPE | 3.16 ± 0.27 ^b | |

1. Valores de humedad no contemplando el dato a tiempo 0.

2. Letras diferentes indican que existe diferencia significativa, $\alpha=0.05$ ($a>b$).

5.8.2. Índice de peróxidos

La formación de hidroperóxidos tiene lugar durante la iniciación y propagación del proceso de autooxidación de lípidos. En las Figuras 5.29 y 5.30 se puede observar el seguimiento en el índice de peróxidos (IP) del ajonjolí molido empacado en las películas proteínicas y en la bolsa de LDPE (Reynolds®).

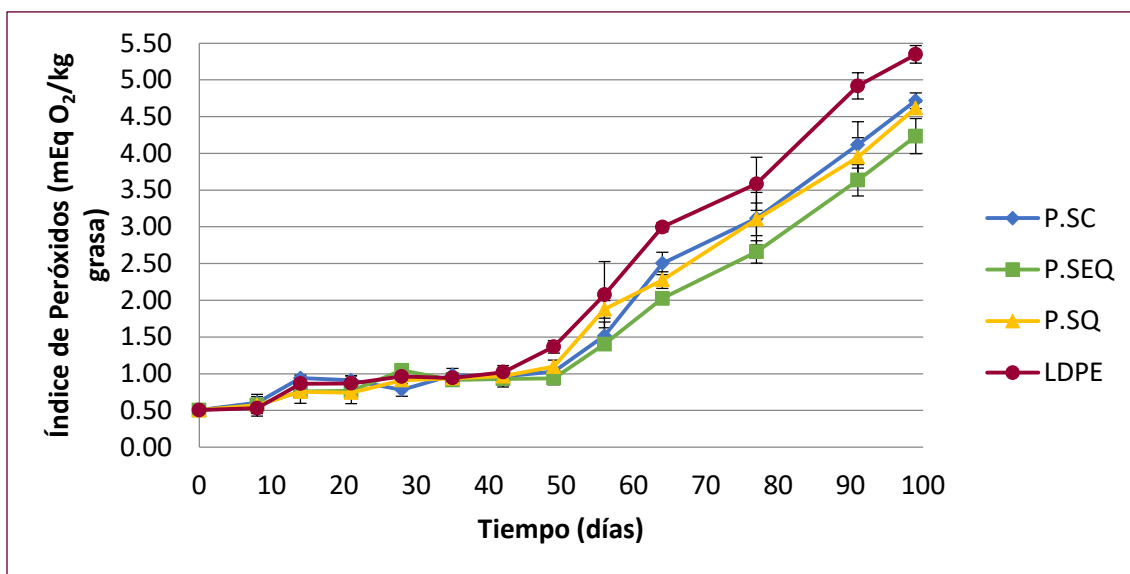


Figura 5.29. Seguimiento del índice de peróxidos en ajonjolí molido empacado en películas proteínicas de cártamo.

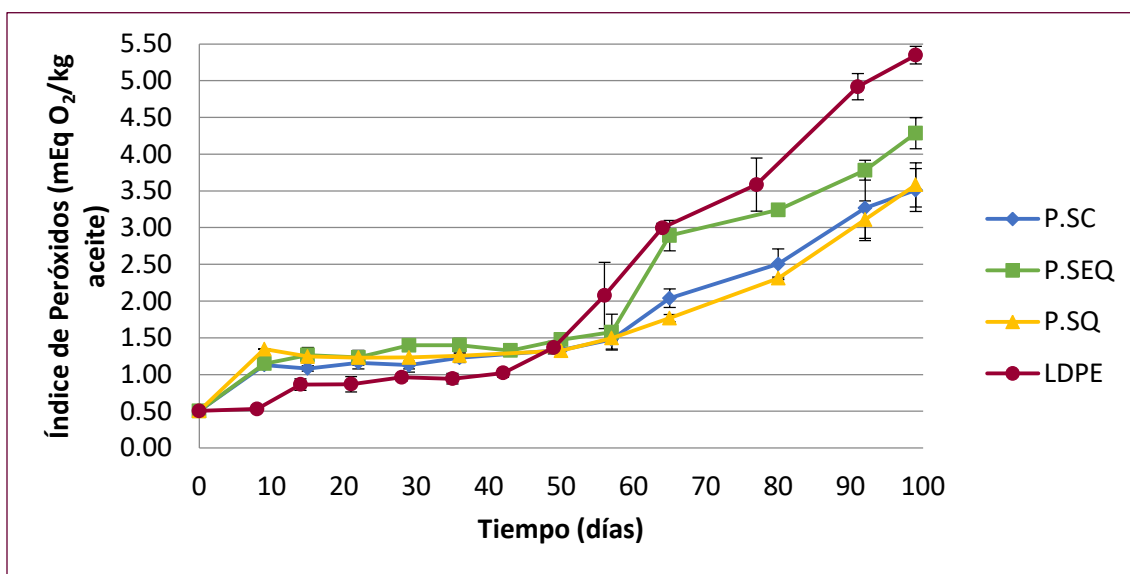


Figura 5.30. Seguimiento del índice de peróxidos en ajonjolí molido empacado en películas proteínicas de girasol.

Los resultados sugieren que el proceso de oxidación lipídica en el ajonjolí se encuentra en una etapa temprana, tanto el empaçado en las películas proteínicas como en la bolsa de LDPE, ya que el valor límite de IP aceptable generalmente es de 10-15 mEq O₂/kg para aceites comestibles (Decker, 2010) y el valor de IP esperado en un aceite vegetal rancio es de 20-40 mEq O₂/kg (Kirk *et al.*, 2002; Tunde-Akintunde *et al.*, 2012); estos valores no se alcanzaron en el periodo de prueba.

Lo anterior es atribuido, en primer lugar, al bajo valor de IP inicial de la muestra, 0.50 mEq O₂/kg, que concuerda con lo reportado en otros estudios para la semilla de ajonjolí, de 0.06-2.7 mEq O₂/kg aceite (Gharby *et al.*, 2015; Tunde-Akintunde *et al.*, 2012). Esto es debido a la alta estabilidad que puede tener el aceite de ajonjolí gracias a la presencia de antioxidantes liposolubles en la semilla, como los lignanos sesamin y sesamolin, presentes en la semilla en 0.32-0.59 % y 0.14-0.48 %, respectivamente, además de tocoferoles (Nagaraj, 2009).

En el caso del ajonjolí empaçado en las bolsas de LDPE, la estabilidad en el aceite se atribuyó además a un menor contenido de humedad en la muestra, como se señaló en el apartado 5.8.1. Si bien ha sido reportado que el agua presente en una matriz alimenticia puede tener un efecto protector frente a la oxidación lipídica, un bajo contenido de humedad puede implicar también una menor movilidad en los reactivos y el proceso de deterioro oxidativo llega a ser más lento (Ortolá *et al.*, 1998). Sin embargo, los valores indicaron una mayor formación de peróxidos en comparación con el ajonjolí empaçado en las películas proteínicas, ya que en estas últimas, hay presencia de antioxidantes naturales, compuestos fenólicos.

La estabilidad de los lípidos del ajonjolí empaçado en las películas proteínicas, también podría ser debida a una baja permeabilidad al oxígeno, pues ha sido reportado que las películas a base de proteínas presentan una buena propiedad de barrera frente al oxígeno en condiciones de humedad relativa baja a intermedia (Han y Gennadios *et al.*, 2005; Krochta, 2002). Sin embargo, esto tendría que demostrarse con pruebas de permeabilidad al O₂ sobre las películas elaboradas.

Se propone además que las posibles reacciones de entrecruzamiento de proteínas tienen un efecto favorable en la capacidad de protección de las películas, ya que pueden llegar a reducir la permeabilidad al oxígeno (Krochta, 2002). Esto podría tener lugar en todas las disoluciones formadoras de película, mediante la formación de entrecruzamientos lisinoalanina y lantionina por el pH alcalino.

Por otro lado, ha sido reportada la formación de otro tipo de entrecruzamiento de proteínas, que involucra el acoplamiento de un grupo difenol oxidado, o-quinona, con la proteína a través de los grupos -SH y -NH₂. Una vez formado el enlace covalente con el anillo fenólico y con regeneración de la hidroquinona, ésta puede volver a oxidarse y unirse a una segunda cadena polipeptídica, dando como resultado un entrecruzamiento; o bien, puede llevar a cabo una reacción de dimerización con otro compuesto fenólico acoplado a otra cadena de proteína, conduciendo de igual manera a un enlace cruzado (Ozidal *et al.*, 2013). Lo anterior se ilustra en la Figura 8.3 del anexo 8.2.

Por tanto, a este fenómeno podría también deberse el hecho de que las películas P.SEQ de cártamo aparentemente presentaran una mejora en la capacidad de protección frente al deterioro oxidativo, señalado en el siguiente apartado, ya que el tratamiento con peroxidasa (HRP) puede favorecer este último tipo de entrecruzamientos entre las proteínas y adicionalmente, promover los entrecruzamientos a través de residuos de tirosina (Casella *et al.*, 2010. Damodaran, 1993). No obstante, lo anterior también se tendría que corroborar mediante pruebas de permeabilidad al oxígeno.

5.8.2.1. Análisis cinético de la formación de peróxidos

Debido a que las reacciones implicadas en la pérdida de calidad de los alimentos generalmente son clasificadas como reacciones de orden 0, 1 o 2 (Boekel, 2008), el orden de reacción aparente de la formación de peróxidos fue propuesto mediante un análisis de regresión lineal para cada modelo cinético de reacción y, con base en los coeficientes de correlación lineal, se determinó el modelo que más

se ajustara a los datos experimentales para la mayoría de los casos. Esto se indica en el anexo 8.3.1.

En las Figuras 5.31 y 5.32 se observa que la formación de peróxidos presenta dos periodos con constantes de rapidez diferentes, que se ajustan a un orden de reacción 0, lo cual indica que no depende de la concentración de los reactivos. Las constantes de rapidez y el periodo de inducción calculados a partir de los datos obtenidos se reportan en la Tabla 5.24.

Las reacciones de orden cero son reportadas con frecuencia en las reacciones de formación de producto cuando la concentración de éste en la matriz alimentaria es baja comparada con los reactivos. Los reactivos están entonces en un exceso, por lo que su concentración permanece efectivamente constante durante el periodo de observación y la rapidez parece ser independiente de la misma (Boekel, 2008).

Tabla 5.24. Constantes de rapidez de formación de peróxidos.

| PELÍCULA | | PI ⁽¹⁾ (d) | Orden 0 | |
|----------|-------|--------------------------|--|--|
| | | | [P] = [P] ₀ + kt | |
| | | | $k_1 \left(\frac{\text{mEq O}_2}{\text{kg}\cdot\text{d}} \right)$ (2,4) | $k_2 \left(\frac{\text{mEq O}_2}{\text{kg}\cdot\text{d}} \right)$ (3,4) |
| CÁRTAMO | P.SC | 0-48 | 0.0093 ± 0.0026 ^{a,y} | 0.0723 ± 0.0038 ^{AB,z} |
| | P.SEQ | 0-50 | 0.0095 ± 0.0024 ^{a,y} | 0.0645 ± 0.0018 ^{B,z} |
| | P.SQ | 0-46 | 0.0117 ± 0.0011 ^{a,y} | 0.0665 ± 0.0028 ^{B,z} |
| GIRASOL | P.SC | 0-55 | 0.0124 ± 0.0043 ^{a,y} | 0.0458 ± 0.0025 ^{C,z} |
| | P.SEQ | 0-51 | 0.0142 ± 0.0044 ^{a,y} | 0.0566 ± 0.0072 ^{BC,z} |
| | P.SQ | 0-58 | 0.0103 ± 0.0062 ^{a,y} | 0.0459 ± 0.0038 ^{C,z} |
| LDPE | | 0-43 | 0.0127 ± 0.0026 ^{a,y} | 0.0779 ± 0.0033 ^{A,z} |

* [P]= mEq O₂/kg aceite.

1. PI= Periodo de inducción, obtenido a partir del punto de intersección de las líneas de regresión de las Figuras 5.31 y 5.32 (Shim y Lee, 2011).

2. k_1 = Constante de rapidez inicial, orden 0, $t=PI$.

3. k_2 = Constante de rapidez en la etapa de propagación, orden 0.

4. Letras diferentes indican que existe diferencia significativa, $\alpha=0.05$ (comparación entre películas: $a>b$, $A>B>C$; comparación entre k_1 y k_2 : $z>y$).

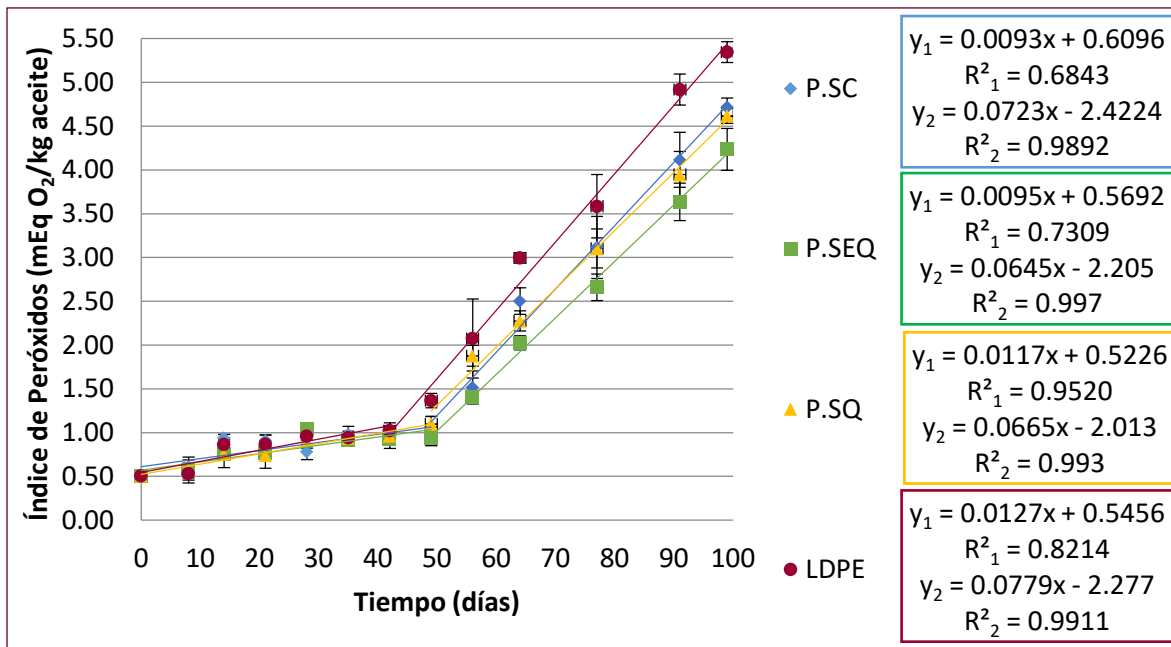


Figura 5.31. Cinética de orden 0 de dos periodos en la formación de peróxidos en ajonjolí molido empacado en películas proteínicas de cártamo.

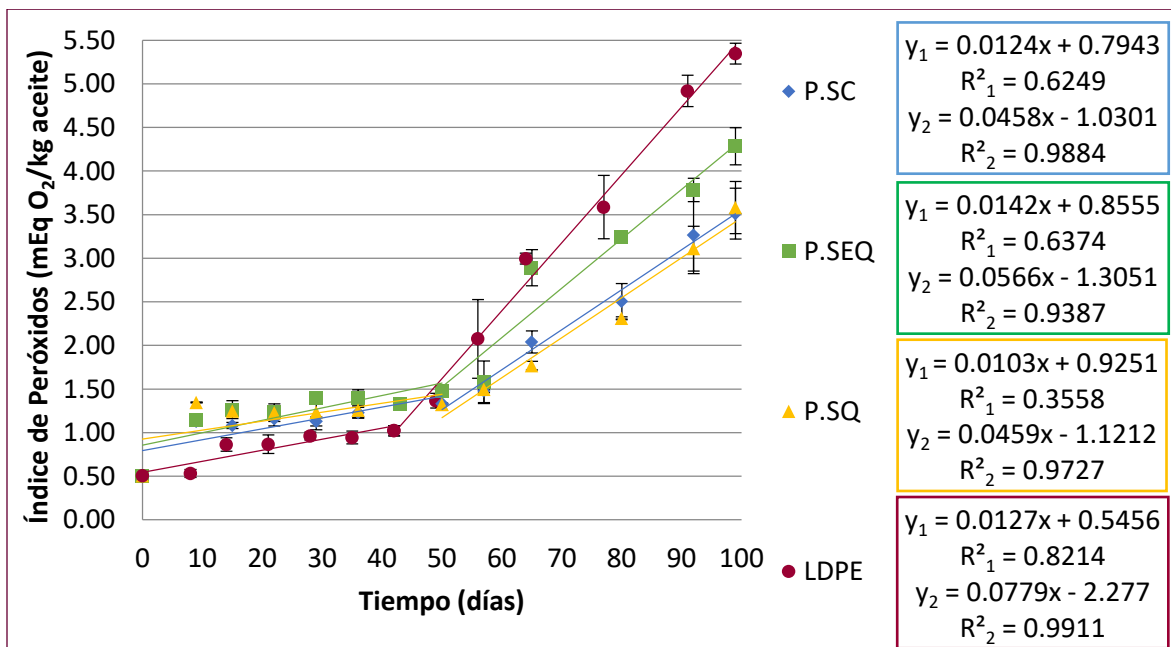


Figura 5.32. Cinética de orden 0 de dos periodos en la formación de peróxidos en ajonjolí molido empacado en películas proteínicas de girasol.

En todos los casos, la constante de rapidez inicial, k_1 , correspondiente al PI, fue menor en comparación con la constante de rapidez en la etapa de propagación de la oxidación lipídica, k_2 , lo cual es debido a que una vez que se forman los primeros hidroperóxidos, aumenta la rapidez de la oxidación lipídica por la generación de radicales a partir de la descomposición de estos compuestos (Kamal-Eldin *et al.*, 2003). Esto es similar a lo reportado por Shim y Lee, 2011, así como por Okpala *et al.*, 2016, quienes evaluaron el IP en matrices alimentarias en dos periodos con un orden de reacción 0.

Al comparar todos los valores obtenidos de la constante de rapidez inicial k_1 , no se obtuvo una diferencia significativa. Esto significa que la rapidez de formación de peróxidos fue prácticamente la misma durante el periodo de inducción (PI) en todos los casos.

Sin embargo, el PI fue menor al emplear las bolsas de LDPE comparado con el obtenido al emplear las películas proteínicas, pues la presencia de antioxidantes en estas últimas prolonga el PI, donde ejercen su actividad inhibitoria de la reacción en cadena de radicales libres (Gordon, 2001; Yanishlieva-Maslarova, 2001). Además, la constante de rapidez en la propagación, k_2 fue mayor con el empleo de LDPE, posiblemente también debido a una mayor permeabilidad al oxígeno.

Por otra parte, las constantes de rapidez k_2 , fueron en general más altas con las películas proteínicas de cártamo en comparación con las películas proteínicas de girasol, lo cual condujo a una mayor formación de peróxidos en el ajonjolí al término de la prueba, pues el cambio en la rapidez de reacción al término del PI fue superior. En el caso de las películas P.SC, P.SEQ y P.SQ de cártamo, la rapidez aumentó 7.8, 6.8, y 5.7 veces, respectivamente, mientras que en el caso de las películas P.SC, P.SEQ y P.SQ de girasol, la rapidez aumentó 3.7, 4.0 y 4.5 veces, respectivamente.

No obstante, el tratamiento enzimático y adición de quercetina a las disoluciones proteínicas de cártamo favoreció la capacidad de protección de las películas formadas P.SEQ frente al deterioro oxidativo, reflejado en un periodo de inducción

más largo que el obtenido con las películas control, P.SC, y con las películas con quercetina añadida sin tratamiento enzimático, P.SQ de cártamo, por 2 y 4 días, respectivamente. Aunque el valor de la constante de rapidez k_2 tendió a ser menor con la película P.SEQ de cártamo en comparación con las constantes k_2 de las películas P.SC y P.SQ, la diferencia no fue significativa.

Lo anterior se atribuye a que, pese a una menor capacidad antioxidante de las disoluciones SEQ (T2) en comparación con las disoluciones SC y SQ, como se señaló en el apartado 5.6.1, el acoplamiento de compuestos fenólicos a la proteína de la película implica su retención en la superficie, limitando su difusión hacia el núcleo del alimento. Dicha retención provoca el mantenimiento de una concentración local alta de los antioxidantes que puede conducir a una mayor eficacia (Cuq *et al.*, 1995; Han y Gennadios, 2005). Se ha establecido que cuando los antioxidantes son inmovilizados sobre una superficie polimérica por medio de enlaces covalentes, pueden ejercer su actividad por contacto directo con la matriz alimenticia sin transferencia de masa, por lo que su actividad se limita a la superficie de contacto solamente (Gómez-Estaca *et al.*, 2014).

Por otra parte, no se apreció una mejora en la capacidad de protección de las películas proteínicas P.SEQ de girasol debida al tratamiento enzimático en comparación con las películas P.SC y P.SQ, de hecho, el efecto fue desfavorable, ya que se obtuvo un PI más corto por 4 y 7 días, respectivamente. Además, pese a no haber diferencia significativa en los valores de las constantes de rapidez k_2 obtenidas con las películas proteínicas de girasol, ésta tendió a ser mayor con la película P.SEQ, lo que condujo a una mayor formación de peróxidos al término de la prueba. Esto se atribuyó en parte a que, como se mencionó, las disoluciones SEQ (T2) en general presentaron una menor capacidad antioxidante, por lo que posiblemente el efecto de concentración en la superficie de los compuestos fenólicos no haya tenido un impacto suficiente, pues el rendimiento de acoplamiento total de polifenoles a la proteína de girasol, incluyendo los inherentes del extracto, es menor comparado con el caso del cártamo, como se señaló en el apartado 5.5.2.

5.8.3. Índice de Kreis

Dado que los hidroperóxidos se descomponen y se generan productos finales de la oxidación lipídica, como aldehídos, cetonas, alcoholes, entre otros compuestos, el índice de peróxidos no necesariamente refleja el grado de oxidación de los lípidos (Decker, 2010). Por tanto, el seguimiento del deterioro oxidativo suele acompañarse de otras pruebas, como el índice de Kreis, que indica la formación de aldehído malónico o epihidrinal (Kirk *et al.*, 2002).

En las Figuras 5.33 y 5.34 se puede observar el seguimiento del índice de Kreis (IK) en el ajonjolí molido empacado con las películas proteínicas y en la bolsa de LDPE (Reynolds®).

Se aprecia en general que los valores e IK son mayores al emplear bolsas de LDPE en comparación con las películas proteínicas. Además, en el caso del girasol, los valores de IK obtenidos con la película P.SEQ fueron notablemente mayores en comparación con los obtenidos con las películas P.SC y P.SQ. Estos resultados fueron congruentes con los valores de IP obtenidos mostrados en apartado 5.8.2, ya que al formarse más hidroperóxidos, se espera que la formación de compuestos aldehídos sea también mayor, indicando una mayor oxidación lipídica.

La capacidad de protección de películas proteínicas de girasol frente al deterioro oxidativo en un alimento, sin adición alguna de aditivos antioxidantes, ya ha sido reportada por Salgado *et al.*, 2013, encontrando que las películas de girasol presentan actividad antioxidante atribuida principalmente a los compuestos fenólicos provenientes de la semilla que se asocian a la proteína. Además, se ha propuesto que, gracias a la coloración de las películas proteínicas, éstas podrían estar actuando como una barrera contra la luz, factor que promueve la oxidación lipídica (Salgado *et al.* 2012).

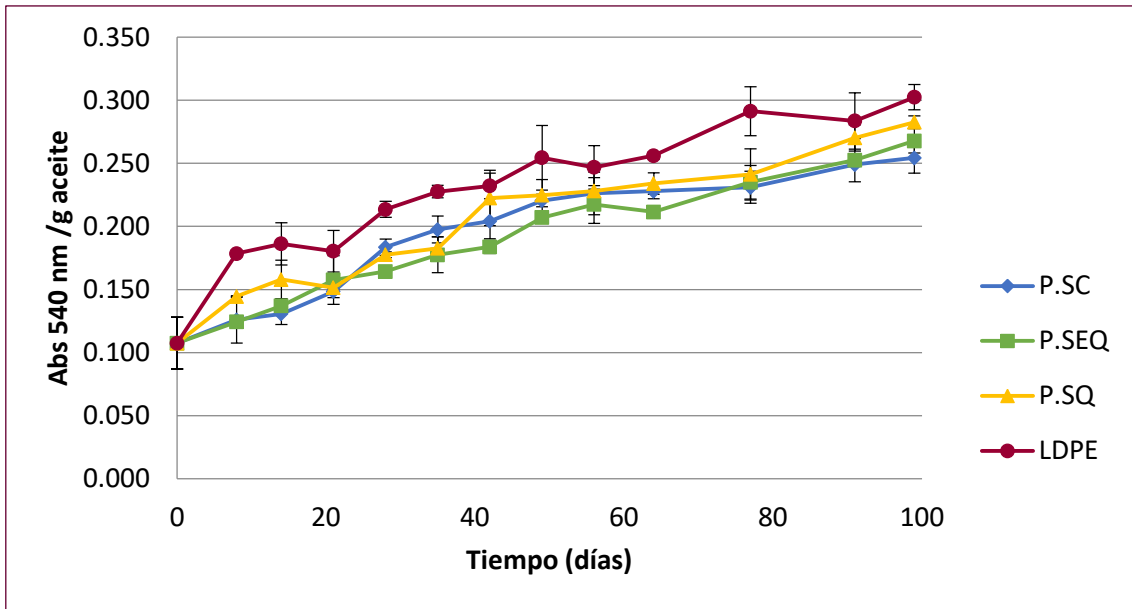


Figura 5.33. Seguimiento del índice Kreis en ajonjolí molido empacado en películas proteínicas de cártamo.

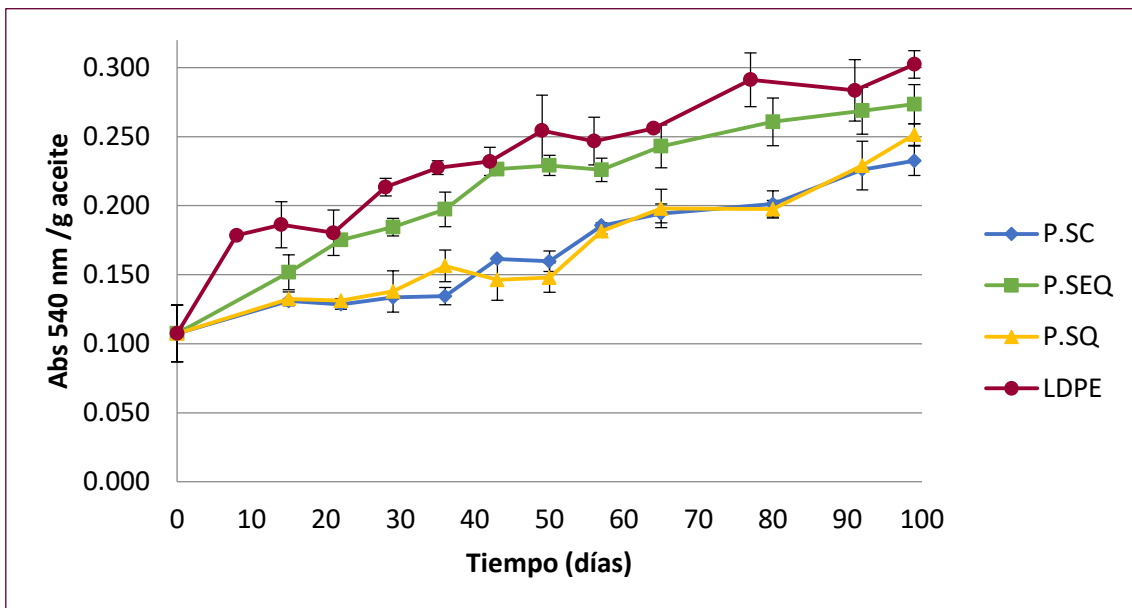


Figura 5.34. Seguimiento del índice Kreis en ajonjolí molido empacado en películas proteínicas de girasol.

5.8.3.1. Análisis cinético del índice de Kreis

Se propuso un orden aparente de reacción del índice de Kreis mediante un análisis de regresión lineal para los modelos cinéticos de reacción de orden 0, 1 y 2. Con base en los coeficientes de correlación lineal, se determinó el modelo que más se ajustara a los datos experimentales para la mayoría de los casos. Esto se indica en el anexo 8.3.2.

En las Figuras 5.35 y 5.36 se observa que el comportamiento cinético del índice de Kreis (IK) se ajusta a un orden de reacción 0. Las constantes de rapidez, k , se reportan en la Tabla 5.25.

Tabla 5.25. Constantes de rapidez del índice de Kreis.

| PELÍCULA | Orden 0: $[P] = [P]_0 + kt$ | |
|----------|--|----------------------------------|
| | CÁRTAMO | GIRASOL |
| | $k \left(\frac{\text{Abs (540 nm)}}{\text{g} \cdot \text{d}} \right) (1,2)$ | |
| P.SC | $(1.49 \pm 0.15) \times 10^{-3}$ | $(1.31 \pm 0.08) \times 10^{-3}$ |
| P.SEQ | $(1.55 \pm 0.07) \times 10^{-3}$ | $(1.57 \pm 0.14) \times 10^{-3}$ |
| P.SQ | $(1.62 \pm 0.12) \times 10^{-3}$ | $(1.36 \pm 0.11) \times 10^{-3}$ |
| LDPE | $(1.63 \pm 0.18) \times 10^{-3}$ | |

* $[P]$ =Absorbancia a 540 nm/ g de aceite (Abs (540 nm)/g).

1. k =Constante de rapidez de reacción, orden 0, $t=0-99$ d.

2. No existe diferencia significativa, $\alpha=0.05$.

Los valores de las constantes de rapidez, k , del índice de Kreis, no mostraron diferencia significativa con el empleo de las películas proteínicas o las bolsas de LDPE, lo cual fue atribuido a que durante el periodo de prueba, se obtuvo un aumento general en el IK entre 0.15 y 0.20 Abs 540 nm / g de aceite, del inicio al final de la prueba, indicio de que, como se señaló en el apartado 5.8.2, el proceso oxidativo del ajonjolí molido se encuentra en una etapa temprana, pues la formación de los productos secundarios, que se presenta en las fases de propagación y terminación, es pobre.

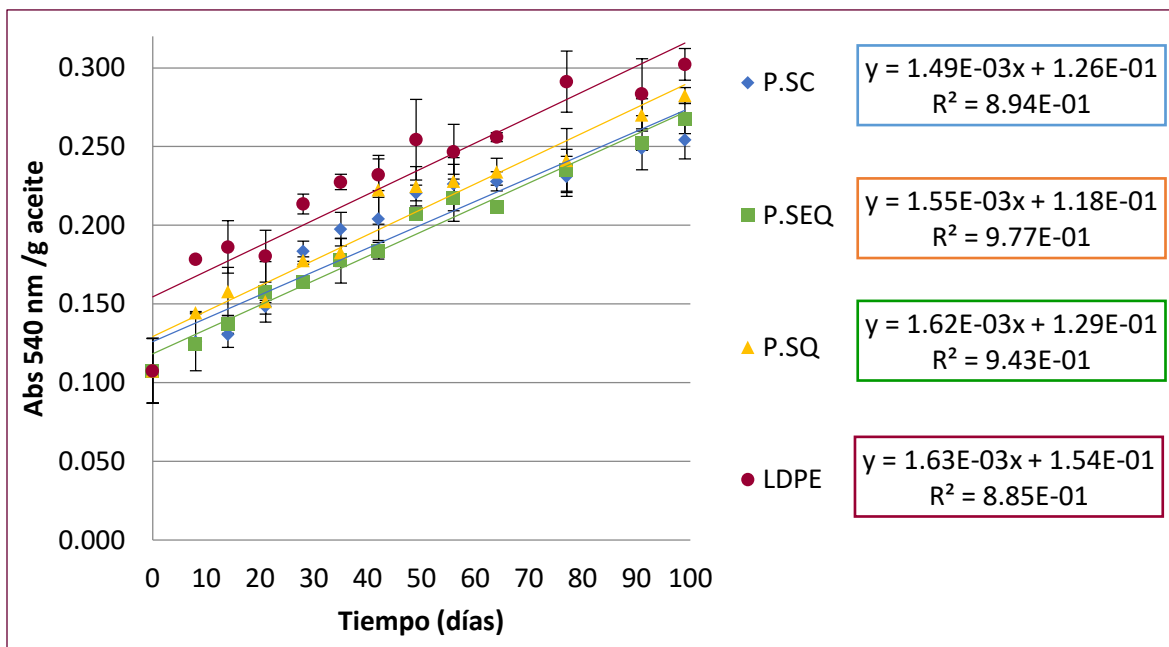


Figura 5.35. Cinética de orden uno del índice de Kreis en ajonjolí molido empacado en películas proteínicas de cártamo.

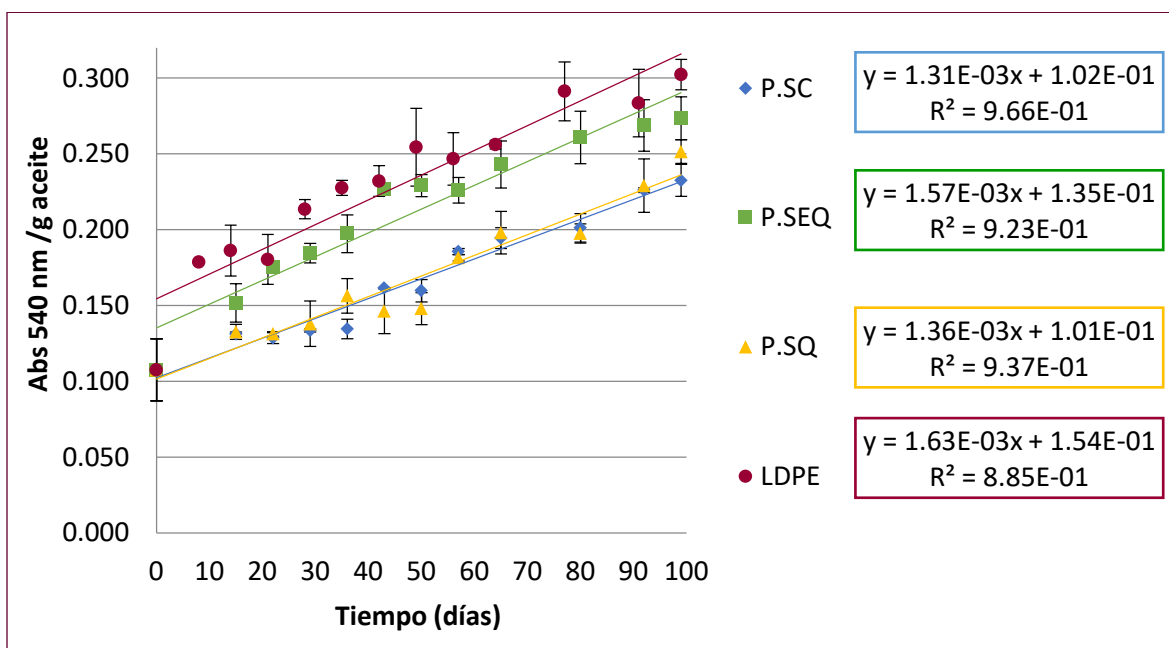


Figura 5.36. Cinética de orden uno del índice de Kreis en ajonjolí molido empacado en películas proteínicas de girasol.

Se han reportado valores a los 49 días en el índice de peróxidos e índice de Kreis de 80-90 mEq O₂/kg aceite y 1.4-1.6 Abs/g aceite, respectivamente, en ajonjolí empacado en películas proteínicas de piel de pollo sin actividad antioxidante y de 30-40 mEq O₂/kg aceite y 0.4-0.5 Abs/g aceite en ajonjolí empacado en estas películas funcionalizadas con ácido caféico con actividad antioxidante. Las condiciones de prueba fueron de 22 °C y 70 % HR (Arizmendi, 2016).

Con base en lo anterior, se reafirma también lo estipulado para las películas proteínicas elaboradas, es decir, sin un tratamiento enzimático ni adición de quercetina, éstas presentan ya una actividad antioxidante dada por los compuestos fenólicos inherentes del extracto proteínico, pues los resultados, particularmente los de índice de Kreis, se asemejan más a los correspondientes a las películas proteínicas de pollo funcionalizadas con ácido caféico.

En lo que respecta a las películas P.SC y P. SQ, tanto de cártamo como de girasol, no se aprecia una diferencia en los valores de índice de peróxidos o de índice de Kreis, ni sus respectivas constantes de rapidez, debida a la adición de quercetina, probablemente porque la cantidad de quercetina añadida a las disoluciones proteínicas, 20 ppm, es baja comparado con el contenido de polifenoles totales provenientes del extracto proteínico.

5.9. POTENCIAL DE APLICACIÓN DE LAS PELÍCULAS PROTEÍNICAS

La elección de un material de empaque depende de la naturaleza del producto alimenticio, las condiciones de almacenamiento y distribución, así como del objetivo deseado y la aplicación específica, a partir de lo cual, se requerirán determinadas propiedades y características del material de empaque (Petersen *et al.*, 1999; Quezada-Gallo, 2009).

En el caso particular de las películas proteínicas, su baja capacidad de barrera frente al vapor de agua limita su potencial de aplicación en el empaquetado de alimentos. Ha sido sugerido que éste se centre en el control de intercambio de humedad en alimentos frescos a corto plazo, p.ej. frutas, además de alimentos de baja humedad como los frutos secos (Cuq *et al.*, 1995). No obstante, la permeabilidad al vapor de agua de las películas proteínicas podría reducirse mediante la incorporación de componentes lipídicos, dando lugar a la formación de películas compuestas, emulsionadas o tipo bi o multicapa, o bien, podrían utilizarse en la fabricación de envases multicapa empleando también materiales convencionales (Buffo y Han, 2005; Han y Gennadios, 2005).

Por otro lado, una de las principales ventajas de las películas proteínicas de cártamo y girasol es la presencia de compuestos fenólicos con actividad antioxidante en la formulación, gracias a lo cual pueden actuar como películas activas capaz de retardar el deterioro oxidativo en alimentos, como se observó en el caso del ajonjolí (apartado 5.8). Sumado a lo anterior, ha sido reportado que las películas proteínicas en general presentan una baja permeabilidad al oxígeno (Arntfield, 2004). De esta manera, las películas podrían tener un mayor potencial de uso en frutos secos con un alto contenido lipídico, tal como almendras, nueces, anacardos, cacahuates, avellanas y pistachos, así como para saborizantes en polvo (Buffo y Han, 2005; Wildermuth, 2016).

Eventualmente, siempre que los componentes empleados en su elaboración sean de grado alimentario y el proceso de fabricación sea adecuado para alimentos, las películas podrían llegar a ser comestibles. Sin embargo, lo anterior dependerá de si no sufrió alguna alteración química con la que pierda dicha característica y a sus propiedades organolépticas (Guilbert y Gontard, 2005).

Otra de las ventajas que presentan las películas proteínicas es su biodegradabilidad, haciéndolas compatibles con el medio ambiente. Si bien el objetivo de su empleo puede no ser la sustitución de empaques de plástico convencionales, sí podría contribuir a disminuir su uso o facilitar el reciclaje de los mismos (Dangaran *et al.*, 2009).

No obstante, el uso potencial de las películas proteínicas depende de muchos otros factores en los cuales es necesario profundizar el estudio. Estos factores incluyen su desempeño como barrera a sustancias como O₂ y CO₂, propiedades mecánicas, estabilidad, seguridad, atributos funcionales, calidad óptica, requisitos de producción, aceptación sensorial, biodegradación y costo (Adeodato *et al.*, 2011; Haugaard y Mortensen, 2003).

El costo de las películas proteínicas en general, proyectado a una producción a gran escala, se estima ser de 3 hasta 6 veces mayor en comparación con materiales plásticos convencionales como el LDPE (Petersen *et al.*, 1999), el cual tiene un costo actual alrededor de \$37.9/kg de película (Don Ramis, 2017). Al calcular el costo de la materia prima empleada para las películas de cártamo y girasol elaboradas, detallado en el anexo 8.4, se obtuvo un costo de \$117.3/kg y \$124.3/kg, respectivamente, el cual que se ve incrementado por el tratamiento enzimático y adición de quercetina en 67 % y 64 %, respectivamente.

Sin embargo, el costo depende también del proceso de elaboración. Se ha establecido que el proceso de elaboración de películas proteínicas por extrusión puede representar un menor costo en comparación con el proceso por “*solvent casting*”, ya que es más rápido y necesita de menor energía al no evaporarse una gran cantidad de disolvente. No obstante, se requeriría de estudios respecto a las propiedades termoplásticas de la proteína y de las características de la película resultante (Dangaran *et al.*, 2009; Krochta, 2002).

En resumen, hace falta también un análisis adecuado del costo-beneficio sobre el potencial de uso de las películas proteínicas, considerando las ventajas antes mencionadas que podría representar su empleo.

6. CONCLUSIONES

- ✓ La extracción de las proteínas de cártamo y girasol es viable mediante un doble tratamiento alcalino y precipitación isoeléctrica a partir de una harina rica en proteína con la cascarilla removida, ya que se obtienen rendimientos extractivos relativamente altos.
- ✓ La evaluación del peso molecular de la proteína de cártamo y girasol, a partir de los extractos proteínicos, se puede lograr fácilmente mediante una electroforesis de proteínas en condiciones desnaturizantes.
- ✓ En el proceso de extracción de la proteína de las semillas de cártamo y girasol, ésta se asocia con compuestos fenólicos de la semilla, lo que implica su presencia en el extracto proteínico.
- ✓ El acoplamiento de compuestos fenólicos a las proteínas de cártamo y girasol es factible empleando la enzima peroxidasa HRP.
- ✓ La presencia de compuestos fenólicos inherentes del extracto en las disoluciones proteínicas contribuyen a su capacidad antioxidante, pero pueden interferir con la evaluación del rendimiento de acoplamiento entre la proteína y el antioxidante añadido, en este caso quercetina.
- ✓ La técnica de RMN¹H no es adecuada para la evaluación de un acoplamiento entre el antioxidante añadido y la proteína si ésta se encuentra asociada a otros compuestos fenólicos, ya que existe una interferencia de señales.
- ✓ El acoplamiento de la quercetina a la proteína puede ser evaluado de manera más certera mediante una técnica en que se discriminen otros compuestos fenólicos, como el HPLC.
- ✓ Los compuestos fenólicos inherentes del extracto representan también una interferencia en la evaluación del efecto del acoplamiento en la capacidad antioxidante de la proteína, ya que no se pueden separar por completo aun cuando no se encuentran unidos covalentemente a la misma. Esto podría solucionarse si se obtuviera un extracto proteínico con una cantidad reducida de compuestos fenólicos mediante algún tratamiento previo a la harina, como una extracción con solventes eficiente.

- ✓ Los compuestos fenólicos asociados a la proteína de cártamo y girasol pueden influir en las características de la película resultante. En términos de apariencia, el efecto más notable es la coloración exhibida por las películas.
- ✓ El tratamiento enzimático o la adición de quercetina no afecta la permeabilidad al vapor de agua de las películas proteínicas de cártamo o de girasol.
- ✓ Las películas proteínicas de cártamo y girasol presentan una buena capacidad de protección frente al deterioro oxidativo, atribuida a la presencia de antioxidantes naturales y a una posible baja permeabilidad al oxígeno. Además, esta capacidad de protección fue superior a la del LDPE, que es un material común en el empaque de alimentos.
- ✓ El tratamiento enzimático puede ser conveniente respecto a la capacidad de protección de la película proteínica frente al deterioro oxidativo si existe un efecto de concentración en la superficie de los compuestos fenólicos importante o si ocurre algún cambio estructural en la red de la proteína que la favorezca.
- ✓ El proceso oxidativo de la matriz alimenticia en una etapa temprana dificulta el establecimiento de una diferencia significativa en la capacidad de protección de las películas elaboradas. Esto podría solucionarse si se emplearan condiciones de almacenamiento más severas para los empaques de temperatura y humedad relativa, que aceleraran más el deterioro oxidativo o bien, empleando una matriz alimenticia con un tiempo de vida útil más corto.

7. REFERENCIAS

1. Adeodato, M., Altenhofen, M., Oliveira L., Masumi, M. (2011). Natural-based plasticizers and biopolymer films: A review. *European Polymer Journal*, 47(3), 254-263.
2. Applewhite, T. 1993. *Proceedings of the World Conference on Oilseed Technology and Utilization*. Budapest: The American Oil Chemists Society.
3. Arizmendi, N. C. (2016). *Desarrollo de películas activas por unión química de colágeno de piel de pollo a polifenoles de la chía* (tesis de licenciatura). Facultad de Química, UNAM. Ciudad de México.
4. Arntfield, S. 2004. Proteins from oil-producing plants. **En:** R. Yada ed. *Proteins in Food Processing*. Cambridge: CRC Press, 146-175.
5. ASTM E96/E96M-05 (2005). Standard test methods for water vapor transmission of materials. **En:** *Annual Book of ASTM Standards 2005, Vol. 4*. Philadelphia, PA: American Society for Testing and Materials.
6. Ávila, R. y López, A. (2008). Aplicación de sustancias antimicrobianas a películas y recubrimientos comestibles. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*. 2(2), 4-13.
7. Azevedo, A. M., Martins, V. C., Prazeres, M. F., Vojinovic, V., Cabral, J. M. S. y Fonseca, L. P. (2003). Horseradish peroxidase: a valuable tool in biotechnology. *Biotechnology Annual Review*, 9, 199-247.
8. Badui, S. 2013. *Química de los Alimentos*. Quinta Edición. Estado de México: Pearson Educación.
9. Betschart, A., Lyon, C. K. y Kohler, G. O. 1975. Sunflower, safflower, sesame and castor protein. **En:** N. W. Pirie ed. *Food Protein Sources*. Cambridge: Cambridge University Press, 79-104.
10. Bewley, J. D., Black, M. y Halmer P. 2006. *The Encyclopedia of Seeds: Science, Technology and Uses*. London: CAB International.
11. Boekel, M. (2008). Kinetic Modeling of Food Quality: A Critical Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 7, 144-158.
12. Buchert, J., Selinheimo, E., Kruus, K., Mattinen, M., Lantto, R. y Autio, K. 2007. Using crosslinking enzymes to improve textural and other properties of food.

- En:** R. Rastall ed. *Novel enzymes for food applications*. Cambridge: CRC Press, 101-139.
13. Buffo, R. A. y Han, J. H. 2005. Edible films and coatings from plant origin proteins. **En:** J. H. Han ed. *Innovations in Food Packaging*. San Diego California: Elsevier Academic Press, 277-300.
14. Casella, L., Monzani, E. y Nicolis, S. 2010. Potential Applications of Peroxidases in the Fine Chemical Industries. **En:** E. Torres y M. Ayala eds. *Biocatalysis Based on Heme Peroxidases*. Heidelberg: Springer-Verlag, 111-153.
15. Chanda, M. y Roy, S. K. 2007. *Plastics Technology Handbook*. Cuarta Edición. New York: CRC Press.
16. Chao, R. R. y Rizvi S. S. H. 1988. Oxygen and Water Vapor Transport Through Polymeric Film. **En:** J. H. Hotchkiss ed. *Food and Packaging Interactions*. New York: American Chemical Society, 217-242.
17. Claridge, T. D. W. 1999. *High Resolution Techniques in Organic Chemistry*. Oxford: Elsevier Ltd.
18. Cohen, P., West, S. G., & Aiken, L. S. 2003. *Applied multiple regression/correlation analysis for the behavioral sciences*. Tercera edición. Mahwah, New Jersey: Lawrence Erlbaum Associates, Publishers.
19. Coşkun, O., Kanter, M., Armutçu, F., Çetin, K., Kaybolmaz, B., Yazgan, Ö. (2004). Protective effects of quercetin, a flavonoid antioxidant, in absolute ethanol-induced acute gastric ulcer. *European Journal of General Medicine*. 1(3), 37-42.
20. Cuq, B., Gontard, N. y Guilbert, S. 1995. Edible films and coatings as active layers. **En:** M. L. Rooney ed. *Active Food Packaging*. Londres: Springer Science & Business Media Dordrecht, 111-142.
21. Damodaran, S. 1993. Aminoácidos, péptidos y proteínas. **En:** O. R. Fennema. *Química de los Alimentos*. Segunda Edición. Zaragoza: ACRIBIA, 383-511.
22. Danganan, K., Tomasula, P. M. y Qi, P. 2009. Structure and Function of Protein-Based Edible Films and Coatings. **En:** M. D. Embuscado y K. C. Huber

- eds. *Edible Films and Coatings for Food Applications*. New York: Springer Science+Business Media, 25-56.
23. Decker, E., Elias, R. J. y McClements D. J. 2010. *Oxidation in Food and Beverages and Antioxidant Application*. Vol. 2. Philadelphia: Woodhead Publishing.
24. Don Ramis. 2017. *Lista de precios de distribuidora Don Ramis*. [En línea]. (Actualizado al 10 de febrero del 2017). Disponible en: <http://www.donramis.com.mx/precios.php> (Último acceso el 15 de febrero del 2017).
25. Dunford, H. B. 2016. Heme Peroxidase Kinetics. **En:** E. Raven y B. Dunford eds. *Heme Peroxidases*. London: The Royal Society of Chemistry, 99-112.
26. Durango, A., Soares, N., Arteaga, M. (2011). Filmes y revestimientos comestibles como empaques activos biodegradables en la conservación de alimentos. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 9(1), 112-118.
27. FAOSTAT. 2016. *Crops*. [En línea] (Actualizado al 31 de diciembre de 2014). Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> (Último acceso el 22 de noviembre del 2016).
28. Fernández, M. (2000). Revisión: Envasado activo de los alimentos. *Food Science and Technology International*. 97(6), 96-108.
29. Gallegos, C. y Velázco, T. 1970. *El Cultivo de Girasol en la Mesa Central*. México, D. F: Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, SAG.
30. García, J. 1990. *Técnicas analíticas para vinos*. Barcelona: Romanyà Valls S. A.
31. Gennadios, A. 2004. Edible films and coatings from proteins. **En:** R. W. Yada ed. *Proteins in Food Processing*. Cambridge: CRC Press, 442-467.
32. Gómez-Estaca, J., López-de-Castillo, C., Hernández-Muñoz, P., Catalá, R. y Gavara, R. (2014). Advances in antioxidant active food packaging. *Trends in Food Science & Technology*, 35, 42-51.

33. González-Pérez, S. y Vereijken J. M. (2007). Review Sunflower proteins: overview of their physicochemical, structural and functional properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87, 2173–2191.
34. González-Pérez, S. y Vereijken J. M. (2007). Review Sunflower proteins: overview of their physicochemical, structural and functional properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87, 2173–2191.
35. Gordon, M. H. 2001. El desarrollo del enranciamiento oxidativo en los alimentos. **En:** J. Pokorny, N. Yanishlieva y M. Gordon eds. *Antioxidantes de los Alimentos: Aplicaciones Prácticas*. Zaragoza: Editorial ACRIBIA S. A., 23-58.
36. Graü, M., Fortuny, S. y Belloso, M. (2009). Edible Coatings to Incorporate Active Ingredients to Fresh-Cut Fruits: A Review. *Trends in Food Science y Technology*, 20 (1), 438-447.
37. Guilbert, S. y Gontard, N. 2005. Agro-polymers for edible and biodegradable films: review of agricultural polymeric materials, physical and mechanical characteristics. **En:** J. H. Han ed. *Innovations in Food Packaging*. San Diego California: Elsevier Academic Press, 263-276.
38. Gyarmati, B., Hegyesi, N., Pukánszky, B. y Szilágyi, A. (2015). A colourimetric method for the determination of the degree of chemical cross-linking in aspartic acid-based polymer gels. *Polymer Letters*, 9(2), 154-164.
39. Han, J. H. y Gennadios, A. 2005. Edible films and coatings: a review. **En:** J. H. Han ed. *Innovations in Food Packaging*. San Diego California: Elsevier Academic Press, 239-262.
40. Han, J. H. y Scanlon, M. G. 2005. Mass transfer of gas and solute through packaging materials. **En:** J. H. Han ed. *Innovations in Food Packaging*. San Diego California: Elsevier Academic Press, 12-23.
41. Hasegawa, K. e Iwata, S. (1982). Gas Chromatography-Mass Spectrometry of Lysinoalanine and the Related Crosslinked Amino Acids in Alkali-treated Food Proteins. *Agricultural and Biological Chemistry*, 46(10), 2513-2520.

42. Haugaard, V. K. y Mortensen, G. 2003. Biobased food packaging. **En:** B. Mattsson y U. Sonesson eds. *Environmentally-friendly food processing*. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 192-216.
43. He, F. (2011). *Laemmli-SDS-PAGE Bio-protocol Bio101*. [En línea] (Actualizado al 6 de mayo del 2011). Disponible en: <http://www.bio-protocol.org/e80> [Último acceso el 23 de marzo del 2016].
44. Heck, T., Faccio, G. y Richter, M. (2013). Enzyme-catalyzed protein crosslinking. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 97(1), 461-475.
45. INEGI. 2014. *Anuario estadístico y geográfico de los Estados Unidos Mexicanos*. [En línea] (Actualizado al 31 diciembre de 2013). Disponible en: <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/sisept/default.aspx?t=mamb311&s=est&c=33223> (Último acceso el 04 de diciembre del 2016).
46. Ivanova, P., Chalova, V., Koleva, L., Pishtiyski, I. y Perifanova, M. (2013). Optimizatiob of protein extraction from sunflower meal produced in Bulgaria. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*. 18 (2), 153-160.
47. Kamal-Eldin, A. 2003. *Lipid Oxidation Pathways*. Washington, D. C: AOCS Press, Champaign, IL.
48. Kirk, R., Sawyer, R. y Egan, H. 2002. *Composición y Análisis de Alimentos de Pearson*. Segunda Edición. México D. F.: Compañía Editorial Continental S.A. de C.V.
49. Krasaechol, N., Sanguandeeikul, R., Duangmal, K. y Owusu-Apenten, R. K. (2008). Structure and functional properties of modified threadfin bream sarcoplasmic protein. *Food Chemistry*, 107, 1-10.
50. Krochta, J. M. 1997. Edible Protein Films and Coatings. **En:** S. Damodaran y A. Paraf eds. *Food Proteins and their Applications*. New York: Marcel Dekker Inc., 529-550.
51. Krochta, J. M. 2002. Proteins as raw materials for films and coatings: Definitions, current status, and opportunities. **En:** A. Gennadios ed. *Protein Based Films and Coatings*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1-41.

52. Kwon, H., Moody, P. C. E. y Raven, E. I. 2016. Understanding the Reactivity and Interactions of Peroxidases with Substrates. **En:** E. Raven y B. Dunford eds. *Heme Peroxidases*. London: The Royal Society of Chemistry, 47-70.
53. Lee, D. S. 2005. Packaging containing natural antimicrobial or antioxidative agents. **En:** J. H. Han ed. *Inovations in Food Packaging*. Oxford: Elsevier, 108-122.
54. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. y Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275
55. Madrigal, L. y Ortega, M. (2002). Obtainment of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) protein concentrate for its use in milk replacers for calves. *Cuban Journal of Agricultural Science*. 36 (2), 203-207.
56. Maldonado, R. 2003. *Establecimiento de una composta comunitaria en San Andres Cholula y determinación del efecto de sus lixiviados en un cultivo de girasol (Helianthus annuus)* (tesis de licenciatura). Puebla: Universidad de las Américas, Puebla.
57. Malik, M. A. y Saini, C. S. (2017). Polyphenol removal from sunflower seed and kernel: Effect on functional and rheological properties of protein isolates. *Food Hydrocolloids*, 63, 705-715.
58. Martínez-Force, E. Dunford, N. T. y Salas, J. J. 2015. *Sunflower: Chemistry, Production, Processing, and Utilization*. Urbana, IL:AOCS Press.
59. Montalvo, C., López, A., Palou, E. (2012). Películas comestibles de proteína: características, propiedades y aplicaciones. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 6(2), 32-46.
60. Msagati, T. A. M. 2013. *Chemistry of Food Additives and Preservatives*. Oxford: Wiley-Blackwell.
61. Munin, A. y Edwards-Lévy, F. (2011). *Encapsulation of Natural Polyphenolic Compounds; a Review*. *Pharmaceutics*, 3, 793-829.
62. Nagaraj, G. 2009. *Oilseeds: Properties, Processing, Products and Procedures*. New Delhi: New India Publishing Agency.

63. Nawar, W. W. 1995. Lípidos. **En:** O. R. Fennema. *Química de los Alimentos*. Segunda Edición. Zaragoza: ACRIBIA, 270-382.
64. Nielsen, S. 2003. *Food Analysis Laboratory Manual*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
65. Nwokolo, E. 1996. Sunflower (*Helianthus annuus L.*). **En:** E. Nwokolo y J. Smartt eds. *Food and Feed from Legumes and Oilseeds*. Londres: Chapman & Hall, 258-269.
66. Nyanhongo, G.S., Prasetyo, E. N., Kudanga, T. y Guebitz, G. 2010. Grafting of Functional Molecules: Insights into Peroxidase-Derived Materials. **En:** E. Torres y M. Ayala eds. *Biocatalysis Based on Heme Peroxidases*. Heidelberg: Springer-Verlag, 155-177.
67. Okpala, C. O. R., Bono, G., Geraci, M. L. Sardo, G., Vitale, S. y Schaschke. (2016). Lipid oxidation kinetics of ozone-processed shrimp during iced storage using peroxide value measurements. *Food Bioscience*, 16, 5-10.
68. Ortolá, M. D., Gutiérrez, C. L., Chiralt, A. y Fito, P. (1998). Kinetic study of lipid oxidation in roasted coffee. *Food Science and Technology International*, 4, 67-73.
69. Ortiz de Montellano, P. R. 2010. Catalytic Mechanisms of Heme Peroxidases. **En:** E. Torres y M. Ayala eds. *Biocatalysis Based on Heme Peroxidases*. Heidelberg: Springer-Verlag, 79-107.
70. Ozdal, T., Capanoglu, E. y Altay, F. (2013). A review on protein–phenolic interactions and associated changes. *Food Research International*, 51, 954–970.
71. Paredes-López, O. 1991. *Safflower Proteins for Food Use*. **En:** Hudson B.J.F. ed. *Developments in Food Proteins-7*. New York: Elsevier Science Publishers LTD, 1-33.
72. Paredes-Lopez, O., Guzman-Maldonado, H. y Ordorica-Falomir, C. 1994. Food proteins from emerging seed sources. **En:** B. J. F. Hudson ed. *New and Developing Sources of Food Proteins*. Londres: Springer Science & Business Media Dordrecht.

73. Pavlov, D.C. y Todorov N. A. 1996. Safflower (*Carthamus tinctorius* L.). **En:** E. Nwokolo y J. Smartt eds. *Food and Feed from Legumes and Oilseeds*. Londres: Chapman & Hall, 245-257.
74. Petersen, K., Nielsen, P. V., Bertelsen, G., Lawther, M., Olsen, M. B., Nilsson, N. H. y Mortensen, G. (1999). Potential of biobased materials for food packaging. *Trends in Food Science & Technology*, 10, 52-68.
75. Pickardt, C., Hager, T., Eisner, P., Carle, R. y Kammerer, D. R. (2011). Isoelectric protein precipitation from mild-acidic extracts de-oiled sunflower (*Helianthus annuus* L.) press cake. *European Food Research and Technology*, 233 (1), 31-44.
76. Pickardt, C., Weisz, G., Eisner, P., Kammerer, D., Neidhart, S., Carle, R. (2011). Processing of low polyphenol protein isolates from residues of sunflower seed oil production. *Procedia Food Science*, 1, 1417-1424.
77. Pirie, N. y Swaminathan, M. 2011. *Food protein sources*. Cambridge: Cambridge University Press.
78. Povea, I. y López, A. 2015. *La función del envase en la conservación de alimentos*. Bogotá: Ediciones Unisalle.
79. Quezada-Gallo, J. A. 2009. Delivery of Food Additives and Antimicrobials Using Edible Films and Coatings. **En:** M. D. Embuscado y K. C. Huber eds. *Edible Films and Coatings for Food Applications*. New York: Springer Science+Business Media, 315-333.
80. Rajendran, S. y Prakash, V. (1987). Association-Dissociation and Denaturation-Renaturation of High-molecular-Weight Protein: Carmin from Safflower Seed (*Carthamus tinctorius* L.) in Alkaline Solution. *Journal of Protein Chemistry*, 7(6), 689-712.
81. Robinson, K. E. P. y Everett, N. P. 1990. Sunflower (*Helianthus annuus* L.): Establishment of cultures, transformation and the regeneration of plants. **En:** Y. P. S. Bajaj ed. *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 10: Legumes and Oilseed Crops I*. Berlin: Springer-Verlag, 434-452.
82. Robles, R. 1991. *Producción de Oleaginosas y Textiles*. Tercera Edición. México D. F: Editorial Limusa S. A. de C. V.

83. Rodríguez, V. y Magro, E. 2008. *Bases de la Alimentación Humana*. La Coruña: Gesbiblo S.L.
84. Rojas-Grau, M. A., R. Soliva-Fortuny y M. Martín-Belloso (2009). Edible Coatings to Incorporate Active Ingredients to Fresh-Cut Fruits: A Review. *Trends in Food Science y Technology*, 20 (1), 438-447.
85. Rubio, R. y Guerrero, J. (2012). Polímeros utilizados para la elaboración de películas biodegradables. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*. 6(2), 173-181.
86. Sağıroğlu, A., Şatana, A. y Özcan, H. 2005. Biochemical and Functional Properties of Proteins from Safflower Seeds. **En:** E. Esendal, J. Bergman, N. Kandemir, R. Johnson y A. Corleto eds. *VI International Safflower Conference*. Istanbul: Cabdirect.
87. Salgado, P. (2014). *Proteínas de Girasol: aislamiento, caracterización y aplicación en la industria alimentaria* (tesis doctoral). Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina.
88. Salgado, P. R., López-Caballero, M. E., Gómez-Guillén, M. C., Mauri, A. N. y Montero, M. P. (2013). Sunflower protein films incorporated with clove essential oil have potential application for the preservation of fish patties. *Food Hydrocolloids*, 33, 74-84.
89. Salgado, P. R., López-Caballero, M. E., Gómez-Guillén, M. C., Mauri, A. N. y Montero, M. P. (2012). Exploration of the antioxidant and antimicrobial capacity of two sunflower protein concentrate films with naturally present phenolic compounds. *Food Hydrocolloids*, 29, 374-381.
90. Salgado, P. R., Molina, S. E., Petruccelli, S. y Mauri, A. N. (2010). Biodegradable sunflower protein films naturally activated with antioxidant compounds. *Food Hydrocolloids*, 24, 525–533.
91. Salgado, P.R., Molina, S. E. Petruccelli, S. y Mauri, A. N. (2011). Sunflower Protein Concentrates and Isolates Prepared from Oil Cakes Have High Water Solubility and Antioxidant Capacity. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 88, 351–360.

92. Salunkhe, D., Chavan, J., Adsule, R., Kadam, S. (1992). *World oilseeds. Chemistry, Technology and Utilization*. New York: Van Nostrand Reinhold.
93. Sarika, D., Kumar, P., Arshad, S. y Sukumaran, M. (2015). Purification and Evaluation of Horseradish Peroxidase Activity. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 4(7), 367-375.
94. Shabani A. y Mohammad, F. (2014). Optical Density Utilization in Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Seed Extracted Protein Evaluation and Characterization. *Biotechnology*, 13, 74-79.
95. Shabani, A. (2015). Using an integrated-spectrophotometric and 2-DE-method in the evaluation and characterization of seed extracted protein in Sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Discovery proteins*, 3, 5-11.
96. Shi, H. 2001. Introducción a los antioxidantes naturales. **En:** J. Pokorny, N. Yanishlieva y M. Gordon eds. *Antioxidantes de los Alimentos: Aplicaciones Prácticas*. Zaragoza: Editorial ACRIBIA S. A., 141-173.
97. Shim, S. D., y Lee, S. J. (2011). Shelf-life prediction of perilla oil by considering the induction period of lipid oxidation. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113, 904–909.
98. SIAP. 2016. *Anuario Estadístico de la Producción Agrícola*. [En línea] (Actualizado al 31 de diciembre de 2015). Disponible en: http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola_siap_gb/icultivo/index.jsp (Último acceso el 26 de noviembre del 2016).
99. Sikorski, Z.E. 2007. The Role of Proteins in Food. **En:** Z. E. Sikorski ed. *Chemical and Functional Properties of Food Components*. Tercera Edición. New York: CRC Press, 129-176.
100. Singh, V. y Nimbkar, N. 2007. Safflower (*Carthamus tinctorius* L.). **En:** R. J. Singh ed. *Genetic Resources Chromosome Engineering, and Crop Improvement, Vol. 4*. New York: CRC Press, 167-194.
101. Skerget, M., Kotnik, P., Hadolin, M., Hras, A., Simonic, M., Knez, Z. (2005). Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chemistry*, 89, 191-198.

102. Suppakul, P., Miltz, J., Sonneveld, K. y Bigger, S.W. (2003). Active packaging technologies with an emphasis on antimicrobial packaging and its applications. *Concise Reviews and Hypotheses in Food Science*. 68(2), 408-418.
103. Surmi, N. Y., Dengawy, R. A. H. y Khalifa, A. H. (2016). Chemical and Nutritional Aspects of Some Safflower Seed Varieties. *Journal of Food Processing and Technology*, 7(5), 585-589.
104. Suryaprakash, P. (1997). *Studies on proteins of sunflower seed (Helianthus annuus L.): Structural stability and interaction with polyphenols* (tesis doctoral). University of Mysore, Mysore, India.
105. Torres, J., Batista, P., Silva, M., Donizete, C. y Duarte, A. (2016). Enzymatic oxidation of phenolic compounds in coffee processing wastewater. *Water Science & Technology*, 73(1), 39-45.
106. Torres-Duarte, C. y Vazquez-Duhalt, R. 2010. Applications and Prospective of Peroxidase Biocatalysis in the Environmental Field. **En:** E. Torres y M. Ayala eds. *Biocatalysis Based on Heme Peroxidases*. Heidelberg: Springer-Verlag, 179-206.
107. Tunde-Akintunde, T. Y., Oke, M. O. y Akintunde, B. O. 2012. Sesame Seed. **En:** U. G. Akpan ed. *Oilseeds*. Rijeka: InTech.
108. Veitch, N. C. (2004). Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry*, 65, 249-259.
109. Wade, L. G. 2012. *Química Orgánica, Vol. 1*. Séptima Edición. México D. F.: Pearson Educación.
110. Whitaker, J. R. y Tannenbaum, S. R. 1977. *Food Proteins*. Michigan: Avi Publishing Company.
111. Wildermuth, S. R., Young, E. E. y Were, L. M. (2016). Chlorogenic Acid Oxidation and Its Reaction with Sunflower Proteins to Form Green-Colored Complexes. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15, 829-843.
112. Wilfred, V. y Nicholson, R. 2008. *Phenolic Compound Biochemistry*. West Lafayette, IN: Springer Science & Business Media B.V.

113. Wong, G. D. 1995. *Química de los Alimentos: Mecanismos y Teoría*. Zaragoza: Editorial ACRIBIA S. A.
114. Wrigley, C., Corke, H., Seetharaman, K. y Faubion, J. 2016. *Encyclopedia of Food Grains*. Segunda edición. Oxford. Elsevier.
115. Yanishlieva-Maslarova, N. V. 2001. Inhibición de la oxidación. **En:** J. Pokorny, N. Yanishlieva y M. Gordon eds. *Antioxidantes de los Alimentos: Aplicaciones Prácticas*. Zaragoza: Editorial ACRIBIA S. A., 7-21.
116. Yu, S., Lee, Y., Kim, J., Kang, S., Lee, S., Jang, J., Lee, O. (2013). Phenolic Composition, Antioxidant Activity and Anti-Adipogenic Effect of Hot Water Extract from Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) Seed. *Nutrients*. 5(12), 4894-4907.
117. Yust, M., Pedroche, J., Megías, C., Girón-Calle, M., Alaiz, M. y Vioque, J. (2003). Improvement of protein extraction from sunflower meal by hydrolysis with alcalase. *Grasas y Aceites*. 54 (4), 419-423.
118. Žilić, S., Barać, M. Pešić, M., Crevar, M., Stanojević, S., Nišavić, A., Saratlić, G. y Tolimir, M. (2010). Characterization of sunflower seed and kernel proteins. *HELIA*, 33(52), 103-114.

8. ANEXOS

8.1. BALANCE DE MASA Y PROTEÍNA DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA DE LAS SEMILLAS

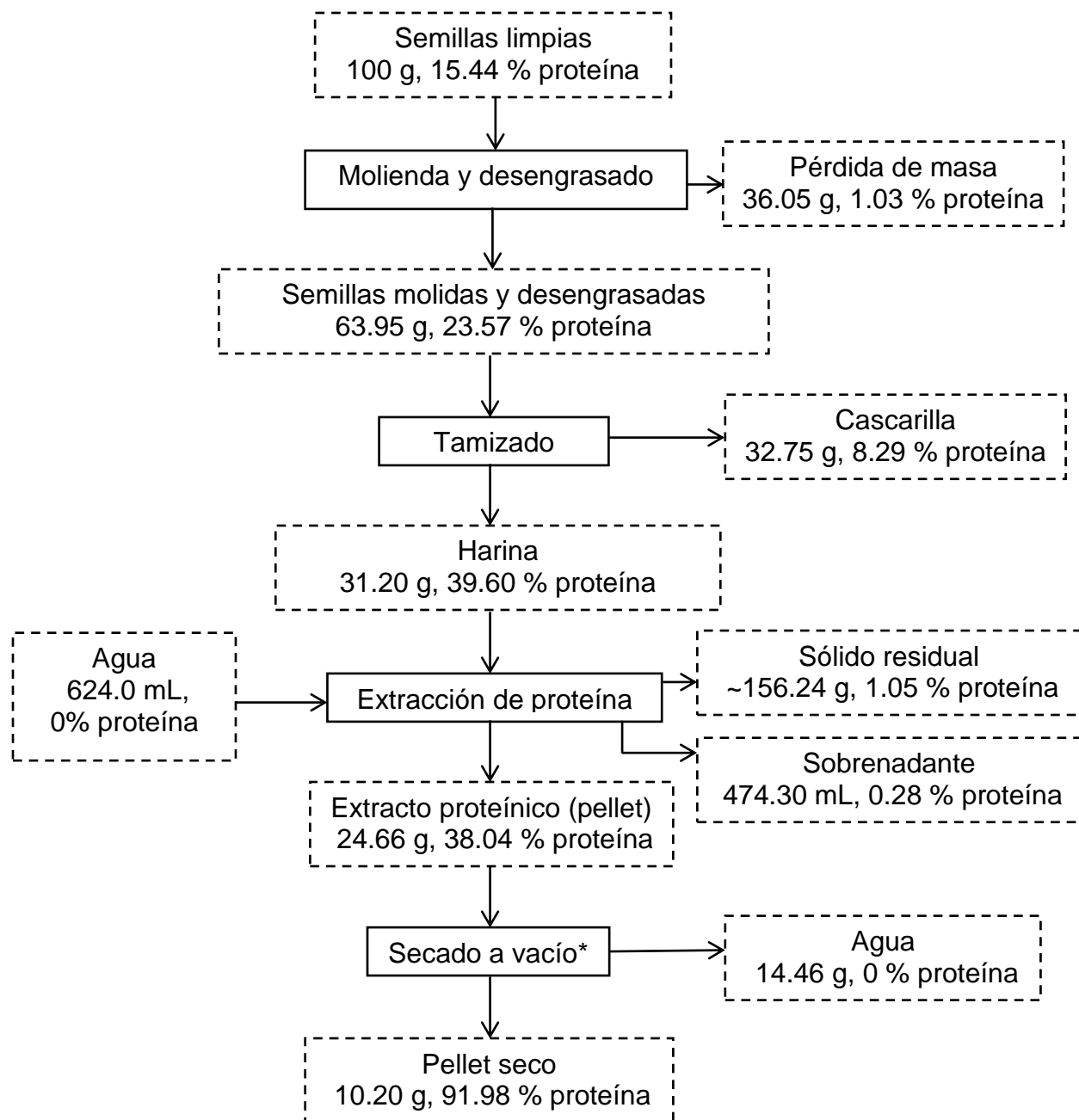


Figura 8.1. Balance de masa y proteína del proceso de extracción de proteína de cártamo con doble tratamiento alcalino (x2).

***Nota:** El proceso de secado a vacío sólo se realizó para la determinación de humedad del pellet.

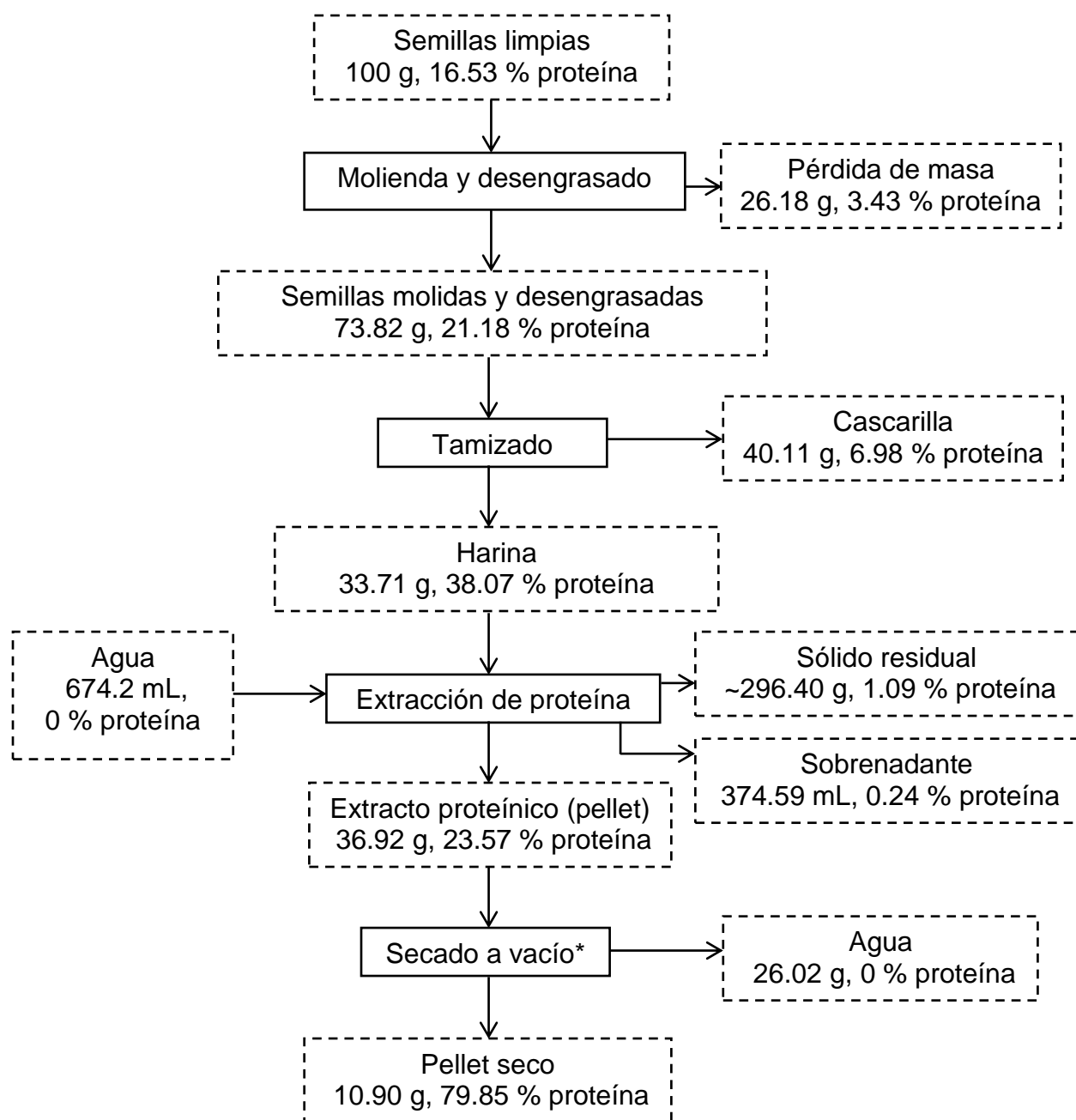


Figura 8.2. Balance de masa y proteína del proceso de extracción de proteína de girasol con doble tratamiento alcalino (x2).

***Nota:** El proceso de secado a vacío sólo se realizó para la determinación de humedad del pellet.

8.2. REACCIÓN DE ACOPLAMIENTO ENTRE UN COMPUESTO FENÓLICO Y CADENAS POLIPEPTÍDICAS

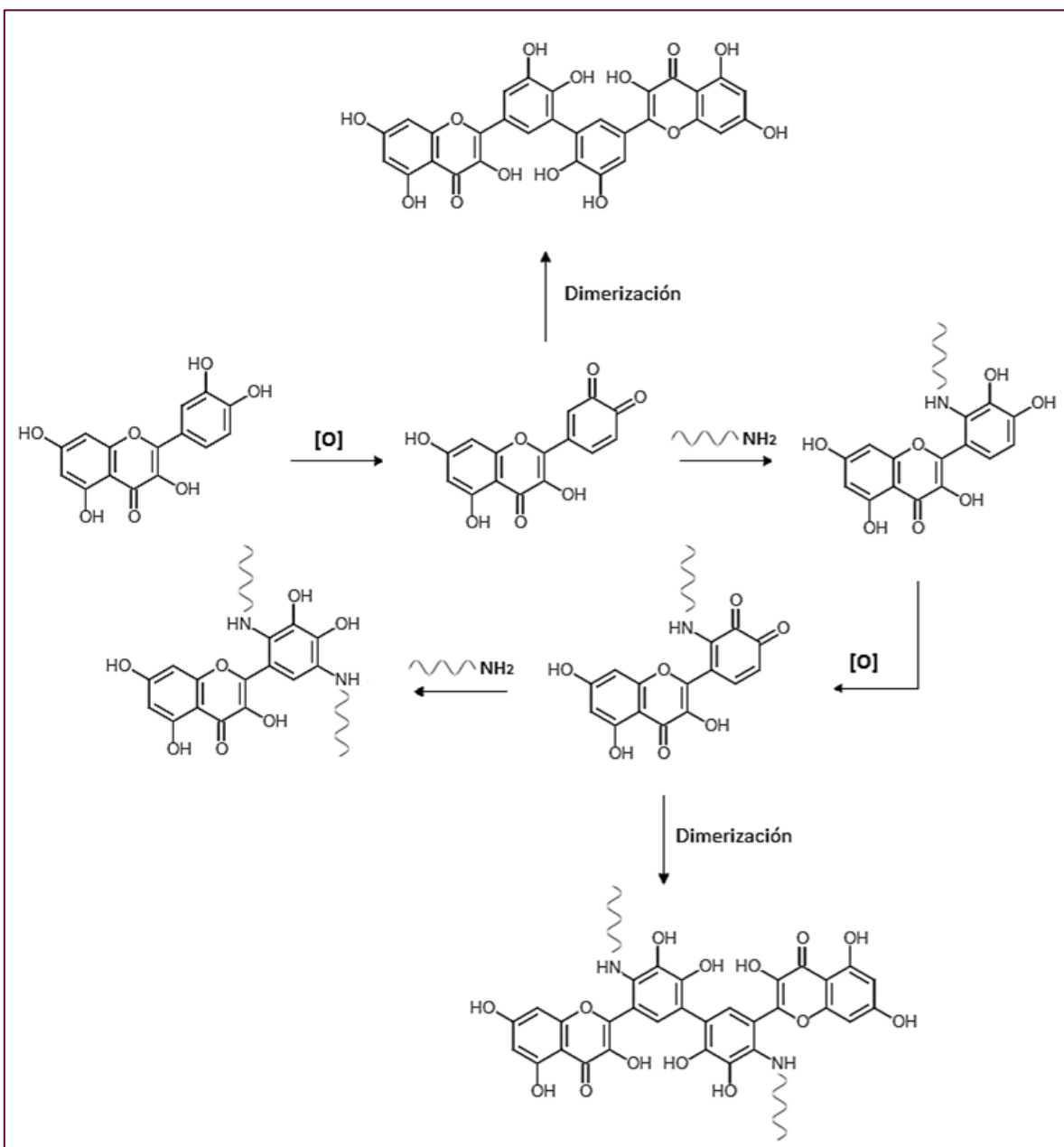


Figura 8.3. Posibles reacciones de acoplamiento oxidativo entre la quercetina y el grupo amino de cadenas polipeptídicas.
Adaptado de Ozdal et al., 2013.

8.3. DETERMINACIÓN DEL ORDEN DE REACCIÓN

Rapidez de reacción de formación de producto: $\frac{d[P]}{dt} = k[P]^n$

Donde n= orden de reacción y [P] = concentración de producto

8.3.1. Determinación del orden aparente de reacción del índice de peróxidos

a) Evaluación de los datos de la etapa inicial, periodo de inducción

Suponiendo reacción de orden 0

Modelo: $[P] = [P]_0 + kt$

Tabla 8.1. Valores de r, orden 0.

| Película | | r |
|----------|-------|--------|
| CÁRTAMO | P.SC | 0.8272 |
| | P.SEQ | 0.8549 |
| | P.SQ | 0.9757 |
| GIRASOL | P.SC | 0.7905 |
| | P.SEQ | 0.7984 |
| | P.SQ | 0.5965 |
| LDPE | | 0.9063 |

Suponiendo reacción de orden 1

Modelo: $[P] = [P]_0 e^{kt}$

$\ln[P] = \ln[P]_0 + kt$

Tabla 8.2. Valores de r, orden 1.

| Película | | r |
|----------|-------|--------|
| CÁRTAMO | P.SC | 0.8179 |
| | P.SEQ | 0.8640 |
| | P.SQ | 0.9616 |
| GIRASOL | P.SC | 0.7348 |
| | P.SEQ | 0.7416 |
| | P.SQ | 0.5992 |
| LDPE | | 0.8854 |

Suponiendo reacción de orden 2

Modelo: $[P] = \frac{[P]_0}{1-kt[P]_0}$; $\frac{1}{[P]} = \frac{1}{[P]_0} - kt$

Tabla 8.3. Valores de r, orden 2.

| Película | | r |
|----------|-------|---------|
| CÁRTAMO | P.SC | -0.8055 |
| | P.SEQ | -0.8619 |
| | P.SQ | -0.9378 |
| GIRASOL | P.SC | -0.6873 |
| | P.SEQ | -0.6905 |
| | P.SQ | -0.5998 |
| LDPE | | -0.8654 |

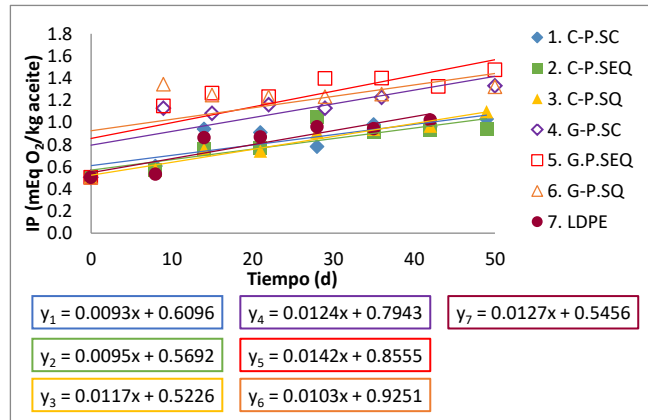


Figura 8.4. Regresión lineal IP, orden 0.

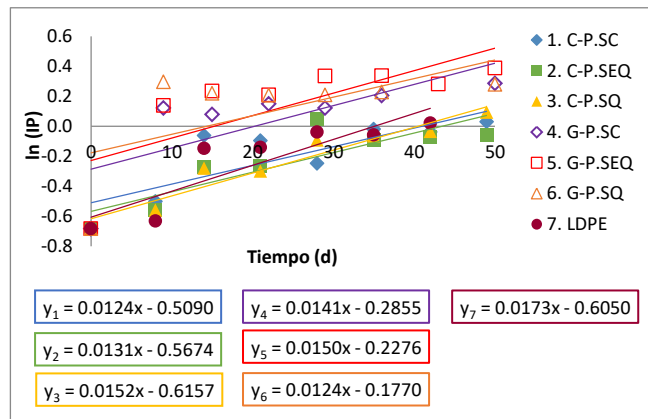


Figura 8.5. Regresión lineal IP, orden 1.

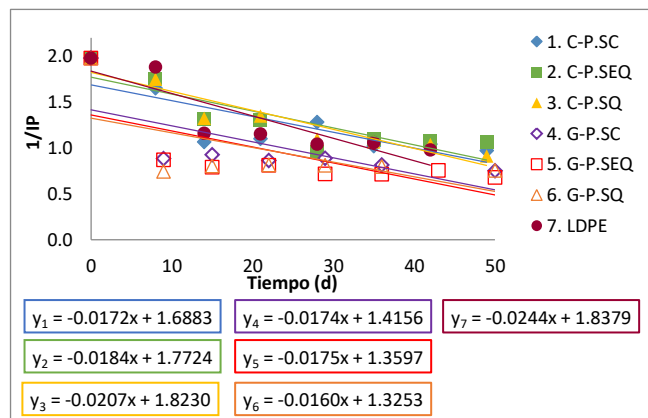


Figura 8.6. Regresión lineal IP, orden 2.

b) Evaluación de los datos de la etapa de propagación

Suponiendo reacción de orden 0

Modelo: $[P] = [P]_0 + kt$

Tabla 8.4. Valores de r, orden 0.

| Película | | r |
|----------------|--------------|--------|
| CÁRTAMO | P.SC | 0.9946 |
| | P.SEQ | 0.9985 |
| | P.SQ | 0.9965 |
| GIRASOL | P.SC | 0.9942 |
| | P.SEQ | 0.9689 |
| | P.SQ | 0.9863 |
| LDPE | | 0.9955 |

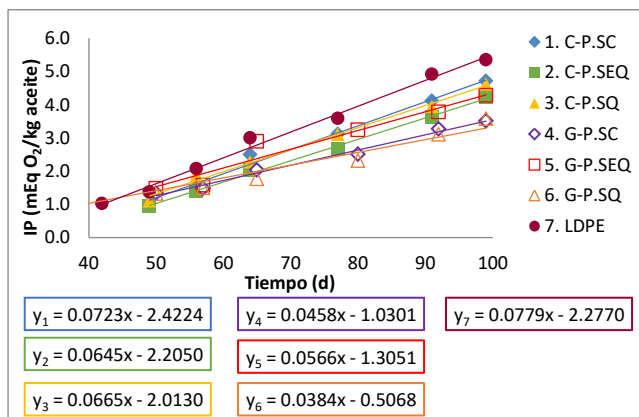


Figura 8.7. Regresión lineal IP, orden 0.

Suponiendo reacción de orden 1

Modelo: $[P] = [P]_0 e^{kt}$

$\ln[P] = \ln[P]_0 + kt$

Tabla 8.5. Valores de r, orden 1.

| Película | | r |
|----------------|--------------|--------|
| CÁRTAMO | P.SC | 0.9617 |
| | P.SEQ | 0.9778 |
| | P.SQ | 0.9648 |
| GIRASOL | P.SC | 0.9896 |
| | P.SEQ | 0.9411 |
| | P.SQ | 0.9987 |
| LDPE | | 0.9665 |

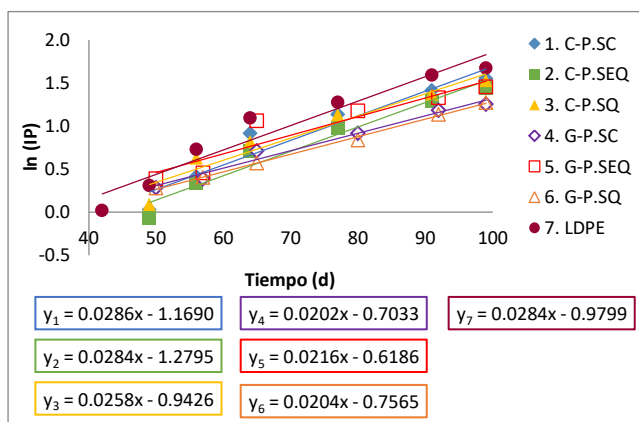


Figura 8.8. Regresión lineal IP, orden 1.

Suponiendo reacción de orden 2

Modelo: $[P] = \frac{[P]_0}{1 - kt[P]_0}$

$\frac{1}{[P]} = \frac{1}{[P]_0} - kt$

Tabla 8.6. Valores de r, orden 2.

| Película | | r |
|----------------|--------------|---------|
| CÁRTAMO | P.SC | -0.8932 |
| | P.SEQ | -0.9130 |
| | P.SQ | -0.8862 |
| GIRASOL | P.SC | -0.9701 |
| | P.SEQ | -0.9064 |
| | P.SQ | -0.9958 |
| LDPE | | -0.8961 |

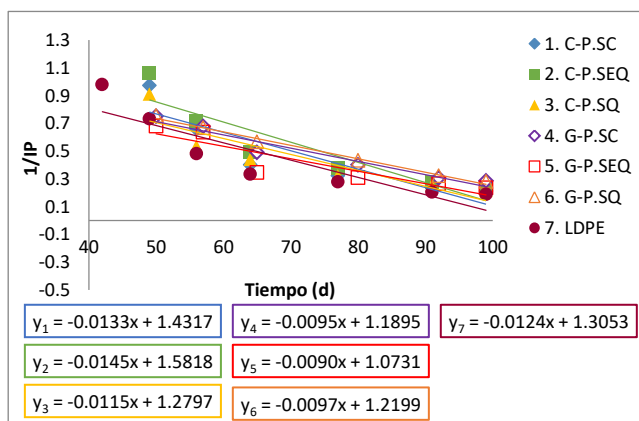


Figura 8.9. Regresión lineal IP, orden 2.

8.3.2. Determinación del orden aparente de reacción del índice de Kreis

Suponiendo reacción de orden 0

Modelo: $[P] = [P]_0 + kt$

Tabla 8.7. Valores de r, orden 0.

| Película | | r |
|----------|-------|--------|
| CÁRTAMO | P.SC | 0.9457 |
| | P.SEQ | 0.9886 |
| | P.SQ | 0.9709 |
| GIRASOL | P.SC | 0.9830 |
| | P.SEQ | 0.9609 |
| | P.SQ | 0.9677 |
| LDPE | | 0.9409 |

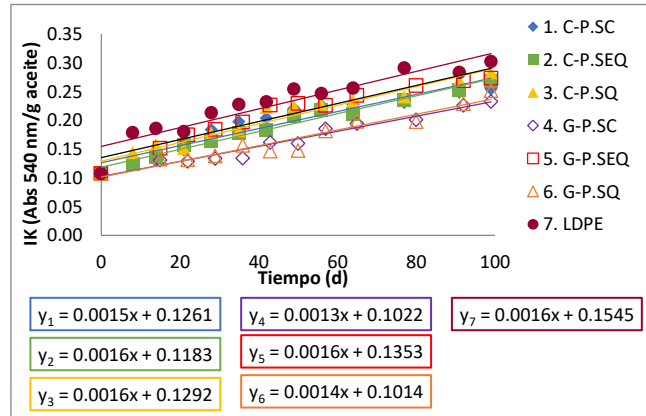


Figura 8.10. Regresión lineal IP, orden 0.

Suponiendo reacción de orden 1

Modelo: $[P] = [P]_0 e^{kt}$

$\ln[P] = \ln[P]_0 + kt$

Tabla 8.8. Valores de r, orden 1.

| Película | | r |
|----------|-------|--------|
| CÁRTAMO | P.SC | 0.9156 |
| | P.SEQ | 0.9662 |
| | P.SQ | 0.9403 |
| GIRASOL | P.SC | 0.9815 |
| | P.SEQ | 0.9180 |
| | P.SQ | 0.9756 |
| LDPE | | 0.8794 |

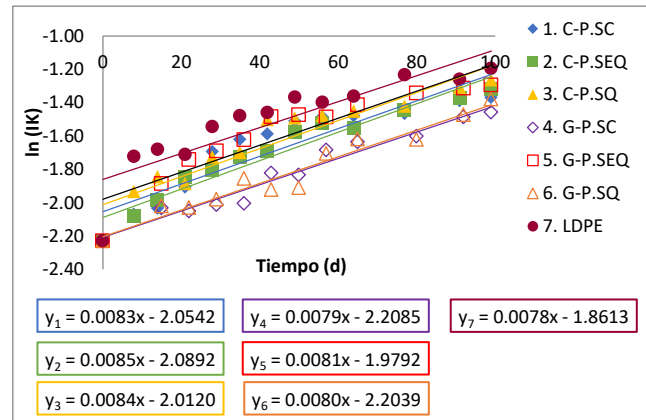


Figura 8.11. Regresión lineal IP, orden 1.

Suponiendo reacción de orden 2

Modelo: $[P] = \frac{[P]_0}{1 - kt[P]_0}$

$\frac{1}{[P]} = \frac{1}{[P]_0} + kt$

Tabla 8.9. Valores de r, orden 2.

| Película | | r |
|----------|-------|---------|
| CÁRTAMO | P.SC | -0.8789 |
| | P.SEQ | -0.9272 |
| | P.SQ | -0.8896 |
| GIRASOL | P.SC | -0.9700 |
| | P.SEQ | -0.8560 |
| | P.SQ | -0.9685 |
| LDPE | | -0.7910 |

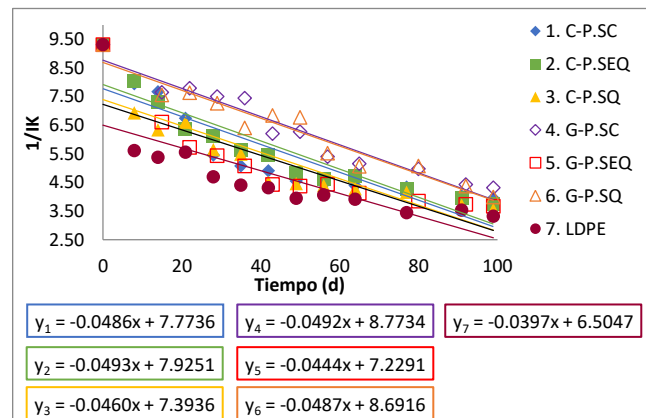


Figura 8.12. Regresión lineal IP, orden 2.

8.4. COSTO DE MATERIAS PRIMAS

Tabla 8.10. Costo de materia prima para las películas proteínicas.

| Materia prima | | Precio | Cantidad requerida por kg película ⁽¹⁾ | Costo (\$ m.n./kg película) |
|---|---------|----------------|--|--------------------------------|
| Proteína ⁽²⁾ | Cártamo | \$66.35/kg | 621.58 kg | 41.24 |
| | Girasol | \$77.55/kg | 621.58 kg | 48.21 |
| Glicerol anhidro ⁽³⁾ | | \$48.08/kg | 155.40 kg | 7.47 |
| Sorbitol (≥98 %) ⁽⁴⁾ | | \$441.60/kg | 155.40 kg | 68.62 |
| Quercetina (≥95 %) ⁽⁴⁾ | | \$0.05/mg | 248.63 mg | 11.80 |
| Enzima HRP ⁽⁴⁾ (polvo liofilizado) | | \$10.13/mg | 6.41 mg | 64.90 |
| H ₂ O ₂ 30 % ⁽³⁾ | | \$0.14/mL | 17.40 mL | 2.44 |
| TOTAL | | Cártamo | (P.SC) | 117.34 |
| | | | (P.SEQ) | 196.47 |
| | | Girasol | (P.SC) | 124.30 |
| | | | (P.SEQ) | 203.43 |

1. Masa promedio de la película: 0.402kg/m²; disolución empleada: 5 L/m².

1. Precio calculado (Ver tabla 8.11).

2. J.T. Baker (<https://www.avantormaterials.com/Products/Brands/J-T-Baker.aspx>).

3. Sigma-Aldrich (<http://www.sigmaaldrich.com/mexico.html>).

Tabla 8.11. Cálculo del precio de las proteínas de cártamo y girasol.

| Semilla | CÁRTAMO | GIRASOL |
|---|----------|----------|
| Precio harina (\$ m.n./ton) ⁽¹⁾ | 7,076.48 | 7,076.48 |
| Proteína en harina (%) ⁽¹⁾ | 50 | 48 |
| Rendimiento extractivo (%) ⁽²⁾ | 75.84 | 67.59 |
| kg proteína extraíble/ton harina ⁽²⁾ | 379.20 | 324.43 |
| Precio proteína (\$ m.n./kg proteína extraíble) | 18.66 | 21.81 |
| Precio proteína (\$ m.n./kg proteína en aislado) ⁽³⁾ | 66.35 | 77.55 |

1. Sunita Exports (<https://sunitaexports.trustpass.alibaba.com/>).

2. De acuerdo al rendimiento extractivo obtenido experimentalmente.

3. El aislamiento aumenta alrededor de 3.56 veces el valor de la proteína.

Debido a que no se encontraron datos reportados sobre precios de aislados de proteína de cártamo o girasol, para el aumento en el costo de la proteína por el aislamiento se tomó como referencia los precios de la harina de soya, \$9,098.3/ton, 43 % proteína (M&T Ltd) y el aislado de proteína de soya, \$32,349.6/ton, 90 % proteína (Anhui Suntran Chemical Co., Ltd).

El rendimiento de extracción de la proteína a nivel laboratorio es generalmente mayor en comparación con el rendimiento a nivel comercial (Paredes-López, 1991), por lo que la proteína extraíble por tonelada de harina podría ser menor.

8.5. CURVAS PATRÓN

8.5.1. Curva patrón para la cuantificación de proteína soluble

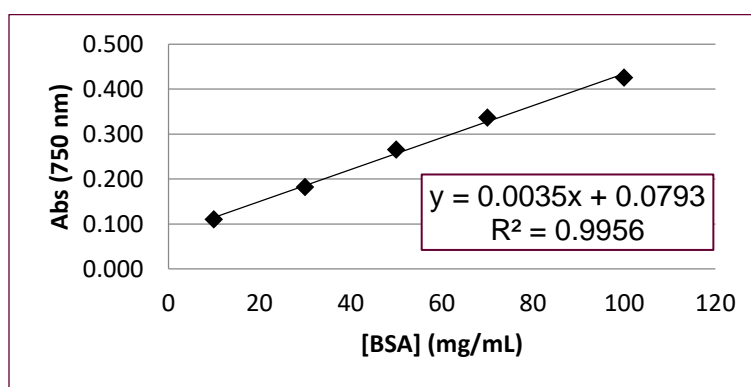


Figura 8.13. Curva patrón de BSA para la determinación de proteína soluble por el método de Lowry.

8.5.2. Curvas patrón para la cuantificación de polifenoles totales

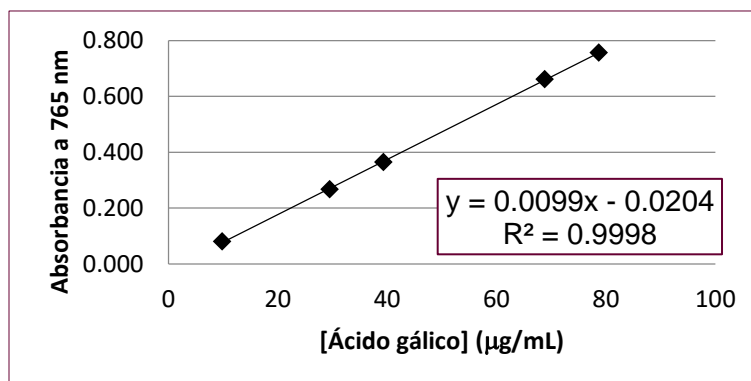


Figura 8.14. Curva patrón de ácido gálico para polifenoles totales.

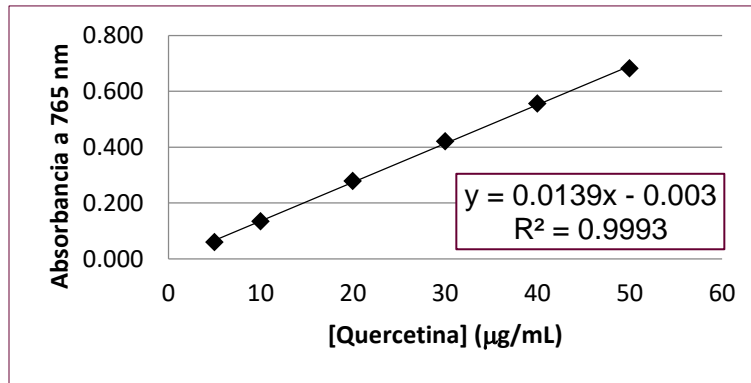


Figura 8.15. Curva patrón de quercetina para polifenoles totales.

8.5.3. Curva patrón de Trolox para el ensayo ABTS

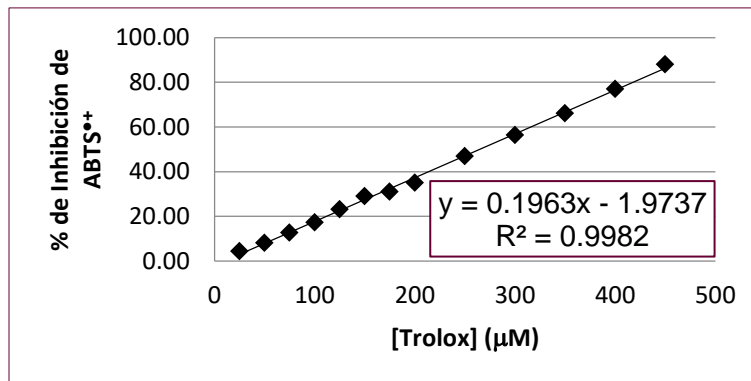


Figura 8.16. Curva patrón de Trolox para el ensayo ABTS.

8.5.4. Curva patrón de Fe(III) para índice de peróxidos

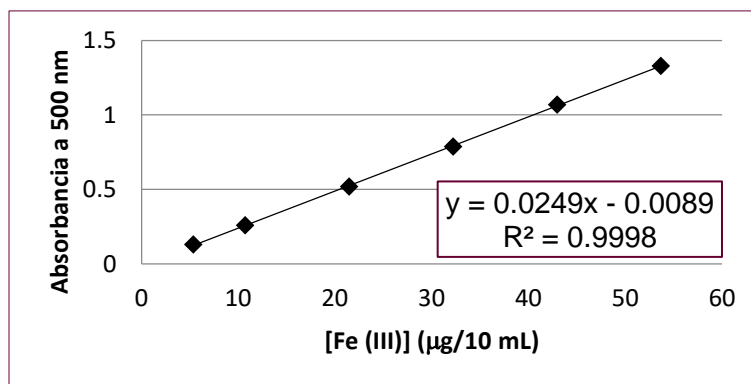


Figura 8.17. Curva patrón de Fe (III) para la determinación del índice de peróxidos.