

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE QUÍMICA



EVALUACIÓN DEL EFECTO PROTECTOR DE
BIOPELÍCULAS ACTIVAS SOBRE EL DETERIORO
QUÍMICO OXIDATIVO EN ALIMENTOS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA

MIGUEL ANGEL GÓMEZ MÉNDEZ

México, D.F., a

de 2009



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: Profesora: Hilda Elizabeth Calderón Villagómez

SECRETARIO: Profesora: Karla Mercedes Díaz Gutiérrez

1er. SUPLENTE: Profesora: Argelia Sánchez Chinchillas

2° SUPLENTE: Profesor: Juan Carlos Ramírez Orejel

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio 322 y 323, Conjunto E, Facultad de Química, UNAM

ASESOR DEL TEMA:

María de los Ángeles Valdivia López

SUSTENTANTE (S):

Miguel Ángel Gómez Méndez

AGRADECIMIENTOS

A la M. en C. María de los Ángeles Valdivia por su paciencia, confianza, apoyo y por darme la oportunidad de realizar este trabajo. Muchas gracias.

A la Profesora Karla Díaz e Hilda Hinojosa, por el tiempo dedicado en la revisión de esta tesis, por sus valiosas observaciones siempre oportunas y precisas.

A Julieta Sandoval y Juan Carlos Orejel, por su ayuda y sus buenos consejos durante mi estancia en el laboratorio.

A todos mis compañeros del laboratorio 323 con los que compartí muchas tardes de trabajo.

A la Facultad de Química y la Universidad Nacional Autónoma de México por poner a mi alcance las herramientas y conocimientos para ser un profesionalista.

DEDICATORIAS

A Yolanda y Jesús, mis papás, por su esfuerzo y dedicación para que nunca me faltara nada. Por todo el amor que siempre me han dado y que nunca terminaré de agradecer. Este reconocimiento también es para ustedes. Los amo.

A mis abuelos, Tere, José y Jesús, porque siempre han estado muy cerca de mí en cada paso que he dado. Gracias por todo el cariño que me han brindado y sobre todo por creer en mí. Los amo.

A mi hermana favorita, Nan, nunca me cansaré de pelear contigo pero tampoco me cansaré de agradecerte tu confianza y mucho cariño. Gracias hermanita.

A René, por su amistad y apoyo. Te quiero cuñadito.

A Renatita, mi princesa Doo, no importa cuán pequeña seas sabes y entiendes que eres una luz en mi vida. Te amo bebé.

A todos mis primos, por todo lo que hemos pasado juntos, por tantos momentos gratos y por ser parte muy importante de mi vida. Sweet, you are my number one.

A todos mis tíos, que nunca me han dejado solo y que sin importar qué, han estado siempre conmigo. Tere, Jorge, Poncho, Hugo, Angie, Gloria, siempre les estaré agradecido.

A mis amigos Carlos, Carlitos, Rich, Tavo, Hai de, Blanca E. y Ruth, que siempre tienen una sonrisa, un abrazo o un ratito para compartir conmigo. Los quiero.

A Moni y Miguel, sin duda han dejado huella en mi vida, han estado conmigo en las buenas y en las malas, por nada cambiaría un solo de mis recuerdos con ustedes. Gracias por todo. Los quiero.

A Wafo, por tu compañía en tantas noches de desvelo y por ser la mejor mascota de este universo.

Finalmente, a todas aquellas personas que, literalmente, contribuyeron con una semillita de limón para poder desarrollar este proyecto. Mil gracias.

INDICE	PÁGINA
RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN	4
Capítulo 1. ANTECEDENTES	8
1.1 Semillas de limón	10
1.2 Trabajos previos sobre la semilla de limón	11
1.3 Empaques	15
1.3.1 Películas de proteína	17
1.3.2 Empaques activos	18
1.4 Antioxidantes	19
1.4.1 Antioxidantes naturales	22
1.5 Interacciones entre hidroperóxidos y proteínas	25
OBJETIVO GENERAL	27
Objetivo particular	27
Capítulo 2. MATERIALES Y MÉTODOS	28
2.1. Diagrama general de trabajo	28
2.1.1 Obtención de CPSL	28
2.1.2 Formación de biopelículas y pruebas de estabilidad	29
2.2 Obtención del concentrado proteínico de la semilla de limón (CPSL)	30
2.2.1 Extracción de grasa y separación por tamaño de partícula	30
2.2.2 Determinación de proteína cruda	31
2.2.3 Determinación de proteína soluble	31
2.2.4 Obtención del concentrado proteico de semilla de limón	32
2.2.5 Determinación de carbohidratos totales. Fenol-sulfúrico	33
2.3 Extracción de polifenoles de la corteza y pulpa de limón y naranja	33
2.4 Determinación de polifenoles totales	34
2.5 Evaluación de la actividad antioxidante de los extractos polifenólicos	35
2.5.1 Capacidad secuestrante sobre el radical DPPH°	35
2.5.2 Capacidad secuestrante sobre el radical ácido ABTS+°	35
2.6 Formación de biopelículas activas	36
2.6.1 Ensayo cualitativo de formación de películas	37

2.7 Evaluación de la funcionalidad de las biopelículas activas	37
2.7.1 Extracción de lípidos por lotes	40
2.7.2 Valoración de Na ₂ S ₂ O ₃ para la determinación de peróxidos	40
2.7.3 Determinación del índice de peróxidos	41
2.7.4 Índice de Kreis	41
2.7.5 Factor de protección	42
2.7.6 Digestibilidad <i>in vitro</i>	42
2.7.7 Extracción de proteína soluble en ajonjolí	44
Capítulo 3. RESULTADOS Y DISCUSION	45
3.1 Obtención de las semillas de limón	45
3.2 Molido y desengrasado	45
3.3 Obtención de concentrado proteínico de semilla de limón	46
3.4 Caracterización del concentrado proteínico	48
3.4.1 Proteína cruda total por el método de Kjeldhal	48
3.4.2 Proteína soluble por el método de Lowry	48
3.4.3 Carbohidratos totales por el método fenol sulfúrico	49
3.5 Extracción y cuantificación de antioxidantes presentes en la pulpa y corteza de limón y naranja.	50
3.6 Evaluación de la actividad antioxidante de los extractos polifenólicos	52
3.6.1 Capacidad secuestrante sobre el radical DPPH°	52
3.6.2 Capacidad secuestrante sobre el radical ABTS+°	53
3.7 Formación de biopelículas	55
3.8 Incorporación de la los antioxidantes a las biopelículas	57
3.9 Evaluación de la funcionalidad de las biopelículas activas como barreras protectoras de alimentos	59
3.9.1 Evaluación del deterioro lipídico	59
3.9.2 Evaluación de la proteína soluble	72
3.9.3 Evaluación de la digestibilidad de la proteína de ajonjolí	75
CONCLUSIONES	79
BIBLIOGRAFÍA	82

RESUMEN

A la par del crecimiento de la industrialización de la producción de alimentos, se da de igual manera un aumento en el uso de plásticos para proteger los alimentos. Sin embargo, el manejo y logística de reutilización de estos materiales no se ha desarrollado de igual manera en nuestro país, por lo que las bolsas, cajas, vasos y platos de plástico utilizados para proteger o presentar los alimentos al consumidor, se ha convertido en un problema de contaminación.

En este proyecto se planteó una alternativa para el uso de la semilla de limón, la cual generalmente es desechada sin saber que ésta es una fuente de proteínas de las cuales se pueden elaborar biopelículas que cumplan la función de una barrera protectora similar a los empaques comerciales, con la ventaja de que son biopolímeros que no contaminan y que no requieren tratamiento para ser desechados.

Además de las proteínas, el limón cuenta con antioxidantes, que aunque no son muy populares, poseen una considerable capacidad para retardar la oxidación. De esta manera se estarían aprovechando las cáscaras, pues al igual que las semillas, pocas veces reciben un uso antes de ser desechadas.

A las biopelículas obtenidas a partir de la proteína de la semilla de limón se le adicionó un antioxidante sintético o los extraídos del limón y se probaron como empaque para proteger al ajonjolí tostado, de la oxidación lipídica, por su alto contenido de grasas.

Para corroborar esto, se realizó el monitoreo de la oxidación de lípidos de la semilla de limón durante 2 meses por medio de el Índice de peróxido e Índice de Kreis, además, se observó el comportamiento de la proteína soluble y la digestibilidad, y se comparó con 2 empaques comerciales.

Finalmente las biopelículas activas hechas con proteína de semilla de limón presentaron mejores propiedades como barrera que los empaques sintéticos, pues retardaron la formación de peróxidos y compuestos carbonílicos, previniendo un menor efecto sobre la pérdida de proteína soluble y la digestibilidad.

INTRODUCCIÓN

Desde hace muchas décadas se han venido usando cubiertas y películas para proteger a los alimentos del ataque de microorganismos y para prevenir la pérdida de agua durante el almacenamiento.

Los consumidores demandan no solo una alta calidad de los alimentos, sino que además que estos tengan una larga vida de anaquel, en paralelo a la reducción en el uso de empaques nocivos para el ambiente incrementando el uso de reciclables (Mc Hugh *et al.*, 1993).

Algunos biopolímeros, entre ellos los polisacáridos, proteínas y lípidos han sido utilizados para la fabricación de películas biodegradables. Sin embargo las proteínas, por ser una barrera efectiva para lípidos, oxígeno y aroma, además de tener una

humedad relativa (RH) baja, han sido más comúnmente usadas para la elaboración de películas que el resto de moléculas formadoras de biopolímeros (Arvanitoyannis *et al.*, 1997).

Los materiales con los que se construyen las biopelículas, como muchos tipos de polímeros sintéticos necesitan reforzar algunas de sus características para tener las propiedades físicas y mecánicas que requiere una película adherible para alimentos. Para mejorar estas propiedades se han utilizado polioles, mono/di u oligosacaridos, lípidos y sus derivados para que aumenten las fuerzas intermoleculares y hagan a las películas más resistentes (Choi y Han, 2001).

El Limón (*Citrus limon*) es parte del grupo de frutas denominado cítricos, este grupo es de los que más alto potencial productivo a nivel mundial tienen alcanzando un 22% de la producción de frutas. En México los cítricos ocupan el 40% de la superficie de producción frutícola, este tipo de limón es muy apreciado por su acidez, se produce en la Costa del Pacífico, desde Colima hasta Oaxaca.

El limón se particulariza por la acidez que muestra su jugo, su gran tamaño y la abundancia de aceite en la cáscara. En las condiciones en que se manejan los cultivos actualmente, se obtienen producciones promedio de 9.5 toneladas por hectárea, siendo que en condiciones óptimas pudiera ser de hasta 30 toneladas.

Dentro de las 2,228,886 toneladas de limón, producidas en nuestro país el primer semestre del año 2009, se generaron 1,203,598 toneladas de residuos totales,

incluyendo cáscaras, el bagazo y las semillas. Esta cantidad representa el 53% del total del fruto producido en ese año que fue aprovechado (SIAP, 2009).

Según datos de la FAO, en 2008 se produjeron un total de 93.25 millones de toneladas de limones y limas en el mundo, de las cuales México ocupa el primer lugar como productor con el 10.97%, seguido de la India (10.35%), Estados Unidos (9.1%) e Irán (8.1%). Sin embargo de la producción se consume solo el 45% del fruto en forma de jugo o pulpa, generando millones de toneladas de cáscara, bagazo y semillas a pesar de que es uno de los productos de mayor aprovechamiento integral (Herrera, 2006).

El aceite esencial del limón, es uno de los aceites más ricos en vitaminas, contiene sobretodo vitamina C y caroteno, que es una forma de vitamina A, terpenos (limoneno, felandreno, pineno, sequiterpenos, citrol, citronelol, linalol), acetatos de linalol y geraniol, aldehídos, etc. La esencia es obtenida de la parte exterior del pericarpio o corteza de la fruta. Son necesarios 4000 limones para obtener 1 Kg de aceite esencial (Juscafresa, 1992).

Tiene innumerables propiedades: es el ingrediente básico en la industria de perfumes y se utiliza además, en jabones, desinfectantes y productos similares. También tiene importancia en la medicina, tanto por su sabor como por su efecto calmante del dolor y su valor fisiológico. En caso de los aditivos, son combinados con los alimentos para producir ciertas modificaciones que impliquen conservación, color, reforzamiento del sabor y estabilización. De la cáscara también se obtienen pectinas y bases para bebidas, la pulpa es destinada principalmente para la preparación de mermeladas y el bagazo y semillas para extraer aceite. Las semillas contienen hasta un 16% de

proteína la cual puede ser aprovechada para la elaboración de biopelículas protectoras de alimentos (Bartholomew y Walton, 1990).

En este proyecto se busca una alternativa para la utilización de la semilla de limón como materia prima para la elaboración de biopolímeros que brinden una acción protectora a los alimentos.

Capítulo 1. Antecedentes

El limonero se cree que es originario de Asia menor de donde fue importado a Europa por los árabes y de ahí se introdujo a América del Norte una vez que pasó por las Islas de Haití. En Europa era muy popular ya que mezclado con cantidades de agua producía una bebida que era considerada de las mejores para aplacar la sed en los calurosos días de verano (Juscafresa, 1992).

El limonero es un árbol de cierto desarrollo, de ramaje divergente y porte entre erecto y pendulante, flexible y regularmente espinoso. De hojas persistentes, ovales, oblongas, dentadas, gruesas fragantes de peciolo desnudo y un verde brillante. Flores hermafroditas relativamente pequeñas, de color blanco rosado, más o menos fragantes y por lo general dispuestas en ramillete y florescencia, dando lugar a un fruto ovoidal atenuado en sus dos extremos y mamelado en el extremo superior, de corteza delgada y verdosa y saturada de vesículas oleaginosas y fragantes. La pulpa es jugosa, acidula, aromática y las semillas están cubiertas por una membrana. El limón posee una acidez total de 5-8 %, que es elevada, y un contenido bajo de sólidos totales, 7-9 %, en comparación con otros cítricos comercialmente importantes (Bartholomew y Walton, 1990).

En la tabla 1 se encuentra la composición del limón, además del aporte energético que es de 44 calorías se destaca que el componente mayoritario del fruto es el agua. Los carbohidratos forman el segundo componente, mientras que el resto de los componentes no supera el 1% cada uno. En la tabla 2 se encuentra la composición

del jugo de limón, en la cual se destaca el alto contenido de ácido cítrico y lo cual explica que la acidez de este fruto sea superior a la de los demás cítricos.

Tabla 1: Composición del limón.

Componente	(g/100g)
Agua	91.7
Hidratos de carbono	6.9
Proteína	0.3
Grasa	0.6

Fuente: Martínez, 1999

Tabla 2: Composición del jugo de limón

Componente	(g/100g)
Acido cítrico	7.50
Acido málico	0.60
Sacarosa	0.50
Azúcar invertida	1.8
Citrato cálcico	1.00
Citrato potásico	1.00
Hierro	trazas
Fósforo	trazas

Fuente: Martínez, 1999

1.1 Semillas de limón

Las semillas de limón están cubiertas de una capa dura de lignocelulosa, están situadas dentro de dos filas en el endocarpio, justo alrededor del eje central, cada segmento contiene algunas semillas. El número de semillas en el limón varía considerablemente. Se han hecho estudios en los cuales en el 70 % de la muestras se han encontrado 2.0 – 2.4 semillas, en un 16 % se encontraron semillas sin desarrollar y en el resto no se encontraron semillas. Las semillas representan el 0.1 - 0.2 % en peso del limón (Bartholomew y Walton, 1999).

Los lípidos presentes en la semilla de limón no son muy comercializados. De los lípidos presentes en las semillas, se encuentran como aceites 30-50%. En la semilla se localizan principalmente ácidos grasos saturados: palmítico (20%), esteárico (4%), araquidónico (0.9%). Además de ácidos grasos insaturados: linoléico (36.5%), linolénico (0.6%) y oleico (36.6%). Dentro de los aceites esenciales, el principal constituyente es la δ -limonina que es uno de los compuestos responsables en el sabor y aroma del limón (Fennema, 2005).

En cuanto al contenido de proteínas, este corresponde a un 17 -21 % (Tabla 3) en peso seco de la semilla, siendo las globulinas las que se encuentran mayoritariamente.

Tabla 3: Composición química de la semilla fresca, en base húmeda

Componente	Concentración (g/100 g)
Agua	39.0 – 43.6
Grasa	19.5 – 23.5
Proteína	8.6 – 16.6
Fibra	4.6 – 7.2
Compuestos no nitrogenados	5.7 – 6.4
Cenizas	1.7 – 2.3

Fuente: Braverman, 1997

De las semillas de limón es posible obtener peroxidadasas, que ya se encuentra comercializándose y es un producto de buena calidad a pesar de que muchas veces se desecha (Bartholomew y Walton, 1999).

1.2 Trabajos previos sobre la semilla de limón

En 2008 Luis Alvarado, con el fin de conocer la influencia de los pesos moleculares que presentan las proteínas del concentrado proteínico en la formación de películas así como las propiedades que posteriormente presentarán, realizó una electroforesis. En este estudio encontró fundamentalmente 5 fracciones proteínicas de bajo peso molecular. En tabla 4 se muestran los pesos y fracciones proteínicas promedio.

Tabla 4: Cantidades relativas de las fracciones del concentrado proteínico de semilla de limón (CPSL). (Alvarado, 2008)

Peso molecular (kDa)	Cantidad relativa (%)
48.343	5.87
38.052	8.03
30.465	2.09
21.099	31.2
13.583	26.5

Las fracciones más grandes tienen pesos de 48.34 kDa y 38.05 kDa, pero la cantidad relativa es de 5.87 % y 8.03 % respectivamente, que representan impurezas de la proteína. Sin embargo también existe fracciones de menor tamaño con apenas 21.09kDa y 13.583 kDa que son las más abundantes conformando el 31.2% y 26.5%, respectivamente del total de la proteína.

Además se encontró que esta últimas fracciones se unen a las más grandes mediante interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno y enlaces disulfuro aumentando el tamaño de la red, y así, aunado a la acción del plastificante se obtiene una red estable y resistente.

De igual manera se determinó mediante micrografía electrónica de barrido que las películas elaboradas con concentrado proteínico de semilla de limón (CPSL) están formadas por capas en las cuales se da la interacción del plastificante con la proteína.

En cuanto a la permeabilidad al vapor de agua (PVA) y al oxígeno (PO), las biopelículas elaboradas a partir del CPSL se compararon con biopelículas

elaboradas con otra fuente proteínica y con empaques sintéticos de uso comercial. A continuación se presentan los resultados.

Tabla 5: Permeabilidad al vapor de agua de las películas elaboradas con CPSL y otros empaques sintéticos (Alvarado, 2008)

Tipo de Película		PVA ng/Pa*s*m*10 ³	CV (%)	PVA relativa con respecto a LDPE
CPSL 5% (W/V)	Glicerol 50%(w/w)	2.12 ■ ^a	13.18	11.6
	Sorbitol 75% (w/w)	0.54 ■ ^a	18.803	3
Empaques Sintéticos	Ziplok (LDPE)	0.18 ▲ ^a	2.61	1
	Egapack (PVC)	0.28 ▲ ^a	5.67	1.5
Concentrado de proteína de semilla de chía 5% (w/v)	Glicerol 50%(w/w)	1.32 ●	16.92	7.3
	Sorbitol 75% (w/w)	1.00 ●	15.12	5.5

■ Promedio de 3 réplicas

▲ Promedio 5 réplicas

● Hernández, 2007,

Letras iguales indican que no existe diferencia significativa

LDPE: Polietileno de baja densidad

PVC: Policloruro de vinilo

De la Tabla 5 se observó que las películas elaboradas con CPSL presentaron una PVA superior a la del empaque Ziplok, siendo la mejor la que tenía como plastificante sorbitol (75%), teniendo una PVA 3 veces mayor que el empaque sintético, sin embargo, comparado con las biopelículas de concentrado de proteína de semilla de chía presento mejores resultados, siendo aproximadamente la mitad de la PVA de estas.

Tabla 6: Permeabilidad al oxígeno de las películas elaboradas con CPSL y otros empaques sintéticos (Alvarado, 2008).

Tipo de Película		PO cm ³ μm/m ² d KPa	CV (%)	PO relativa con respecto a metilcelulosa
CPSL 5% (W/V)	Glicerol 50%(w/w)	19.37 ■ _a	7.74	2.84
	Sorbitol 75% (w/w)	17.6 ■ _a	5.39	2.58
Empaques Sintéticos	Zipplok (LDPE)	57.85 ▲ _a	5.68	8.5
	Metilcelulosa	6.8 ▲ _a	36	1
Concentrado de proteína de semilla de chía 5% (w/v)	Glicerol 50%(w/w)	17.79 •	1.58	2.61
	Sorbitol 75% (w/w)	16.27 ♠	15.12	2.39

■ Promedio de 3 réplicas

▲ Promedio 3 réplicas

• Hong et al, 2005

♠ Sothornit *et al.*, 2006

Letras iguales indican que no existe diferencia significativa

De la tabla 6 se observó que las películas elaboradas con concentrado de proteína de semilla de chía y CPSL presentaron valores muy similares de PO, y se puede considerar que los valores obtenidos son bajos en comparación con los que presenta una película de origen sintético como la LDPE.

Con todo esto, se planteó que las películas obtenidas a partir de la proteína de la semilla de limón presentan buenas características cuando son aplicadas para la protección de alimentos.

1.3 Empaques

Según la Asociación Mexicana de Envase y Embalaje (AMEE) en 2008 esta industria era valuada en 490 millones de pesos. El 75% de los productos terminados requieren envase. De éstos, 90% son utilizados para alimentos y bebidas. En México se fabrican anualmente 8,500,000 toneladas de envases; se distribuyen de la siguiente manera: vidrio, 38%; papel y cartón, 26%; plástico, 16%; madera, 14%; metal, 6%.

Dentro del proceso de elaboración de alimentos a nivel industrial, sin importar que exista o no un método de conservación durante su elaboración, su tiempo de vida útil va a depender de un eficiente proceso de empaçado.

Procesos tales como el secado y la congelación serían ineficientes sin un empaçado, esto para controlar los efectos producidos por el oxígeno, la luz vapor de agua, microorganismos y otros posibles contaminantes.

Hoy en día los empaques no juegan un rol pasivo dentro de la conservación de los alimentos, se ha incrementado su papel en la conservación y en mantener la calidad y la seguridad de los alimentos a través de la cadena de distribución. Los empaques activos son aquellos que pueden intervenir o tener un control sobre los procesos fisiológicos (respiración de fruta fresca y vegetales), procesos químicos (deterioro de los lípidos), procesos físicos (deshidratación), aspectos microbiológicos y contaminación (Ahvenanien, 2003).

Dentro de los empaques activos, se tienen tres categorías: absorbentes, con sistemas de liberación de aditivos (antioxidantes, conservadores, saborizantes). Los

absorbentes son aquellos que retienen compuestos no deseados como el oxígeno, el bióxido de carbono, el etileno, o agua en exceso, y evitar que entren en contacto con los alimentos. Los empaques con sistema de liberación añaden o emiten compuestos hacia el alimento, como pueden ser antioxidantes o conservadores (Ahvenainen, 2003).

Así mismo la creciente demanda por alimentos procesados en el mercado, aumenta la cantidad generada de desechos provenientes de empaque de alimentos, lo que genera una preocupación por el impacto ambiental que traiga consigo.

Hace apenas veinte años todos los desechos de empaque eran enviados a rellenos sanitarios o a incineración, ya que solo se reciclaban el vidrio y el papel. Sin embargo, con el crecimiento en la producción de plásticos surge la necesidad de reciclar este material. La complejidad se da en la recolección de este material, así como la tecnología necesaria para reciclarlo, en adición, la preocupación por la salud obliga a rehusar estos plásticos reciclados en productos no alimenticios. Recientemente el PET se ha tratado de rehusar como empaque de alimentos, esta aplicación requiere de un mayor conocimiento sobre la posible contaminación esto con el fin de disminuir los riesgos de salud al consumidor.

1.3.1 Películas de proteína

Las películas de proteína se adhieren fácilmente a superficies hidrofílicas pero en la mayoría de los casos no son resistentes a la difusión de agua. Una desventaja de las películas hechas con proteínas es que estas son muy susceptibles a cambio de pH por lo que deben delimitarse a las condiciones óptimas de su formación (Reyes, 2006).

Las películas de proteína son superiores a las películas hechas de polisacáridos porque las proteínas están compuestas por 20 aminoácidos diferentes y poseen una estructura específica, la cual le confiere una amplia variedad de propiedades funcionales (Guilbert *et al.*, 1997).

Para que se forme una película hecha de proteína, se parte de una suspensión o dispersión de la misma, utilizando como disolventes etanol, agua y mezclas, los cuales posteriormente son evaporados para utilizar la proteína.

Una vez que se tiene la proteína, otro componente primordial es el plastificante, el cual se define como una molécula de volatilidad baja y de naturaleza química similar a la del polímero formador de películas (en este caso de proteína). Cuando se adiciona un plastificante a un material polimérico conlleva a la modificación de la estructura tridimensional, disminución de fuerzas atractivas intramoleculares y al incremento de volumen libre y movilidad de la cadena (Young *et al.*, 2001).

La selección de un plastificante para películas basadas en proteínas es de gran importancia, ya que esto afecta a las propiedades fisicoquímicas de la película

(Guilbert et al, 1997). El peso molecular, el número y posición de los grupos hidroxilo de un plastificante son las variables que afectan su habilidad para plastificar a un polímero basado en proteínas. Los plastificantes utilizados para la obtención de películas incluyen mono/di u oligosacaridos, polioles, y lípidos y sus derivados (Choi y Han, 2001).

1.3.2 Empaques activos

Definición: sistema en el cual el empaque, el producto y el medio interactúan para prolongar la vida de anaquel, asegurar la inocuidad y las propiedades sensoriales, las cuales mantienen la calidad del producto. Hay básicamente dos tipos:

- ✓ empaque antimicrobiano ya que este tiene como objetivo aplicar sistemas de liberación en forma controlada de un agente antimicrobiano de la película al alimento (Hui *et al.*, 2006).
- ✓ denominado tal cual empaque activo, donde se utilizan compuestos que remuevan el oxígeno, absorban la humedad y generen etanol o CO₂, y compuestos con acción antioxidante que estabilicen los radicales producidos durante la peroxidación lipídica.

En la actualidad, la tecnología de empaques activos utilizada para la alimentación son los elaborados con removedores de oxígeno. Estos son capaces de eliminar el

oxígeno que existe entre la cabeza del envase y el producto a permear a través del material de embalaje durante el almacenamiento (Charles *et al.*, 2006).

La incorporación de antioxidantes en materiales de empaque se ha vuelto popular desde que la oxidación es el mayor problema que afecta la calidad de los alimentos. Puesto que la oxidación se inicia por lo general en la superficie de los alimentos. La incorporación de antioxidantes en los empaques es una prometedora manera de proteger a los alimentos de la rancidez (Jongjareonrak *et al.*, 2008).

1.4 Antioxidantes

Un antioxidante es una sustancia que cuando se presenta en bajas concentraciones comparada con el sustrato oxidable, previene significativamente la oxidación de dicho sustrato. Durante el almacenamiento de grasas y aceites así como de otros alimentos que contienen grasas, la oxidación lipídica es la mayor causa de deterioro de calidad de los alimentos y conlleva al amplio uso de diversos antioxidantes. Las grasas insaturadas son, particularmente sensibles a este tipo de daño.

Existen literalmente cientos de compuestos, tanto naturales como sintéticos, con propiedades antioxidantes. Por su empleo en alimentos deben cumplir ciertos requerimientos obvios, no siendo el menor de ellos el que sean seguros para la salud. Los principales antioxidantes utilizados habitualmente en alimentos son los fenoles mono o polihídricos con varios sustituyentes en el anillo (figura 1).

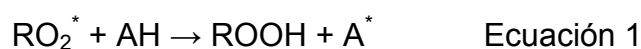
Los polifenoles previenen la formación de peróxidos e hidroperóxidos y consecuentemente se interrumpe la cadena de reacciones oxidativas. Los

antioxidantes sintéticos más ampliamente utilizados son BHA y BHT, son ligeramente volátiles y se descomponen fácilmente a elevadas temperaturas.

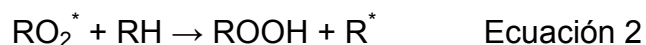
Las etapas que comprenden la oxidación de los lípidos se han estudiado ampliamente. La etapa de iniciación, con la formación de radicales libres puede retardarse utilizando sustancias que descompongan a los peróxidos, agentes que acomplejen los metales o inhibidores del oxígeno singulete. Sin embargo, como no se puede eliminar totalmente las trazas de iniciadores metálicos y de peróxidos, la mayoría de los estudios han concentrado su atención de la acción de los aceptores de radicales libres.

Se ha postulado que los antioxidantes inhiben la reacción en cadena actuando como donadores de hidrógeno o como aceptores de radicales libres.

El mecanismo básico puede visualizarse como una competición entre la reacción de inhibición:



Y la reacción de propagación de la cadena



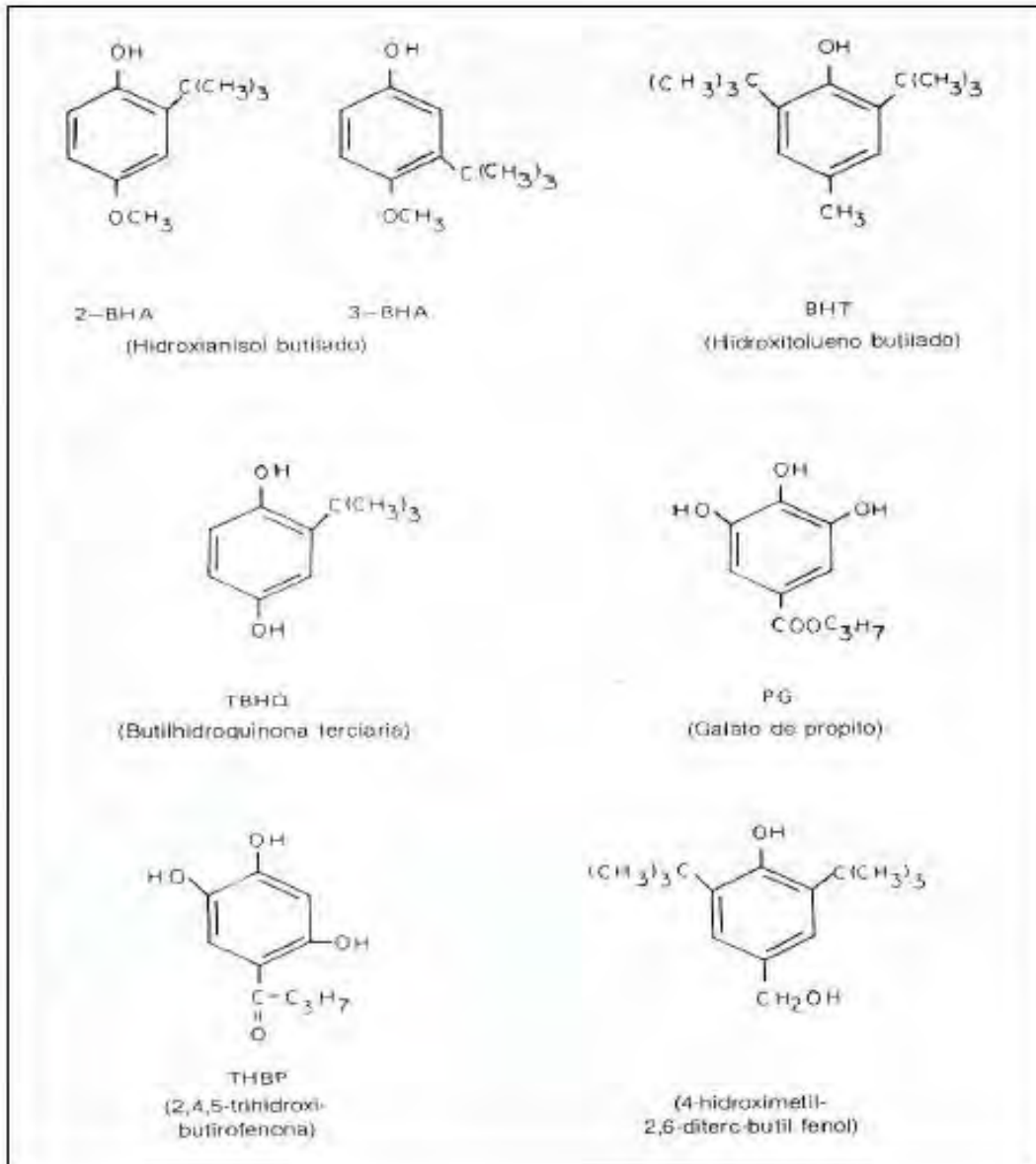


Figura1: Principales antioxidantes utilizados en los alimentos (Fennema, 2005)

La eficacia de los antioxidantes depende de muchos factores, como la energía de activación, las constantes de velocidad, el potencial redox, la facilidad con la que se puede destruir o perder el antioxidante y su solubilidad. En las dos reacciones de competición discutidas anteriormente (ecuaciones 1 y 2), ambas exotérmicas; la energía de activación aumenta al aumentar las energías de disociación de los

enlaces A-H y R-H y, por tanto, la eficiencia del antioxidante (AH) aumenta al disminuir la fuerza del enlace AH. Sin embargo, idealmente, el radical libre antioxidante resultante no debe iniciar por sí mismo la formación de nuevos radicales libres o ser sujeto de una rápida oxidación por una reacción en cadena. A este respecto los antioxidantes fenólicos ocupan una situación privilegiada. Son excelentes donadores de electrones o de hidrógeno y además sus radicales intermedios son relativamente estables debido a la deslocalización por resonancia y la falta de posiciones apropiadas para ser atacados por el oxígeno molecular (Fennema, 2005).

1.4.1 Antioxidantes naturales

El creciente conocimiento acerca de los efectos de promoción de la salud de los antioxidantes en los alimentos cotidianos, en combinación con la hipótesis de que un número de conservadores sintéticos pueden tener efectos peligrosos, ha dado lugar a múltiples investigaciones en el campo de los antioxidantes naturales. Hasta ahora la mayor atención se ha prestado a los aditivos alimentarios obtenidos a partir de plantas aromáticas como el romero y los extractos de salvia (Peschel *et al.*, 2006). Además se ha incrementado la preferencia de los consumidores para evitar los aditivos sintéticos a favor de los que se perciben como naturales, debido a su mayor seguridad y menor toxicidad (Nerin *et al.*, 2008). Los extractos de salvia o romero, otras hierbas, especias, cultivos de cereales, cortezas y raíces son fuentes de

compuestos naturales con actividad antioxidante. Estos compuestos son tocoferoles, fosfolípidos, aminoácidos, péptidos y compuestos fenólicos (Matthäus, 2002).

Los extractos de plantas y especias ricos en polifenoles son de gran interés para la industria alimentaria ya que tienen la capacidad de retardar la degradación oxidativa de lípidos y por lo tanto de mejorar la calidad y el valor nutritivo de los alimentos (Amarowicz *et al.*, 2004).

Los polifenoles más comunes responsables de este efecto de protección son flavonoides y derivados de ácido cinámico que se encuentran de forma abundante en el reino vegetal (Taga *et al.*, 1984). Los polifenoles están presentes en las plantas como un grupo muy amplio de estructuras químicas. Los compuestos fenólicos se presentan en la naturaleza conjugados con mono y polisacáridos, así como con otros grupos funcionales como ésteres y metil-ésteres. En general, los fenoles vegetales presentan estructuras complejas y pueden ser reconocidos con facilidad como componentes de la madera, semillas y pigmentos de flores y frutos (Reyes, 2006). La actividad antioxidante de los fenoles se debe principalmente a sus propiedades redox que les permiten actuar como agentes reductores o donadores de átomos de hidrógeno. Por lo tanto los antioxidantes naturales funcionan como secuestradores de radicales e interruptores de la cadena oxidativa, también actúan quelando iones metálicos (Amarowics *et al.*, 2004).

Quercetina: Es el flavonol más abundante en la dieta humana (Figura 2. A), está presente en diferentes frutas y vegetales, así como en bebidas (0.3 mg/g peso fresco) y té (10-25 mg mg/L) (Hertog *et al.*, 1992). La quercetina es un flavonoide

amarillo-verdoso presente en la cebolla, brócoli, cerezas, uvas y principalmente en la manzana. En esta es encontrada en la cáscara (1mg/g en peso fresco), la fruta sin cáscara no contiene otros flavonoles. Los niveles de quercetina en las partes comestibles de los vegetales se encuentran generalmente cercanos a los 10 mg/ kg.

La quercetina presenta propiedades antioxidantes, atribuibles al número de hidroxilos que tienen la molécula y la estabilidad de las estructuras de resonancia que le permiten atrapar radicales libres (Rodarte, 2002). Además de antioxidante la quercetina puede actuar como antiinflamatorio, antiviral y anticancerígeno (Erlund, 2002).

Hesperidina: Es el flaván más consumido (Figura 2. B), y proviene de la naranja y el limón (125-250 mg/L de jugo) Es glicósido de flavonona que se compone de la aglicona hesperidina, y el disacárido rutinósido (ramnosa + glucosa). La hesperidina pura ($C_{18}H_{34}O_{15}$ y $PM=610.57$) se presenta en forma de agujas delgadas y largas, con color amarillo pálido y con punto de fusión de 258-262 °C y presenta una absorción máxima en el UV a 286nm.

Como se encuentra presente en frutos cítricos tales como la naranja dulce y el limón, es muy común encontrarla asociada con la vitamina C.

Se ha encontrado que presentan acción antioxidante por la estabilidad que le confiere la resonancia en sus anillos así como el número y posición de sus grupos OH^- . Además se le han encontrado propiedades para bloquear el acceso de los carcinógenos a las células, suprimiendo los cambios malignos en las células,

quelando metales induciendo a las enzimas a modificar su carcinogenicidad, estimulando la respuesta inmune o combinación de estas acciones (Herrera, 2006).

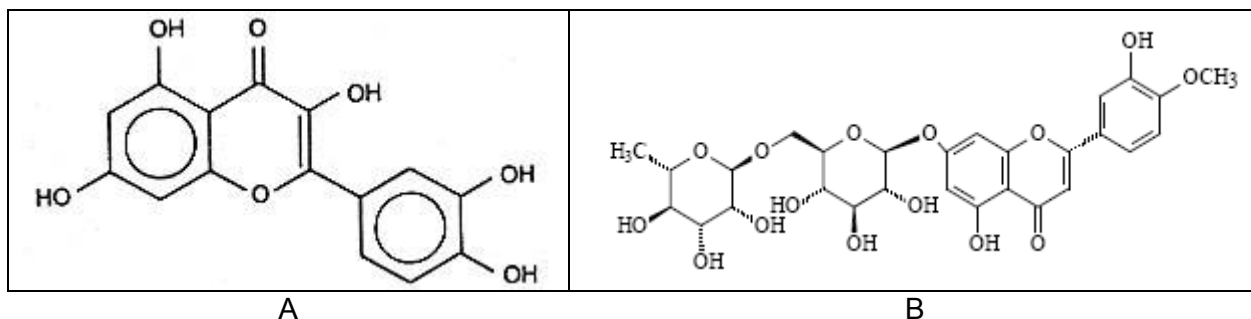
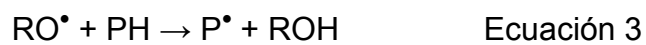


Figura 2 : a) Antioxidantes naturales comunes en la dieta diaria. A: Quercetina, B: Hesperidina (Herrera, 2006)

La incorporación de antioxidantes a empaques, cuando ambos provienen de una fuente natural, motivó el desarrollo de este proyecto y el interés por evaluar el efecto sinérgico y la funcionalidad del bioempaque activo.

1.5 Interacciones entre hidroperóxidos y proteínas

La reacción de las proteínas con hidroperóxidos y los compuestos que de ellos se derivan conducen a modificaciones de las mismas que se reflejan en los alimentos en forma de cambios de consistencia y solubilidad (unión entre proteínas), el color (reacciones de pardeamiento) y el valor nutritivo (pérdida de aminoácidos esenciales). En investigaciones con el ácido linoléico se ha observado que los radicales que se forman a partir de este ácido graso, atacan las proteínas (PH), preferentemente los aminoácidos triptófano, lisina, tirosina, arginina, histidina y cisteína por reacciones con el grupo OH fenólico o los grupos que contienen azufre o nitrógeno.



En la reacción subsiguiente (Ecuación 4) se unen los dos radicales de proteína.

Durante la peroxidación lipídica se forma en determinadas circunstancias, aldehído malónico. Como reactivo bifuncional puede ligar proteínas mediante reacciones tipo base de Schiff con los grupos $\epsilon\text{-NH}_2$ de los restos de lisina.

El aducto con la base de Schiff es un fluorocromo conjugado que, debido a sus propiedades espectrales (excitación $\lambda_M \sim 350\text{nm}$; emisión $\lambda_M \sim 450\text{nm}$) se utiliza para determinar la peroxidación lipídica y las reacciones resultantes con las proteínas.

También los compuestos monocarbonilo formados por la autooxidación de ácidos grasos insaturados se condensan fácilmente con los grupos NH_2 libres de las proteínas, formando bases de Schiff que, a través de una serie de condensaciones aldólicas, se transforman en polímeros de color pardo. Los productos formados, con frecuencia no contienen nitrógeno, pues el grupo amino se sigue hidrolizando.

De las investigaciones con sistemas modelo se deduce que una disminución del contenido de agua favorece la rotura de la molécula proteica y una degradación de las cadenas laterales proteicas con preferencias sobre las reacciones de unión vía radicales (Alfaro, 2008). Lo que se traduce en una considerable pérdida de aminoácidos esenciales como la metionina, triptófano, histidina, fenilalanina entre otros.

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar biopelículas activas a partir del concentrado proteínico de las semillas de limón y antioxidantes

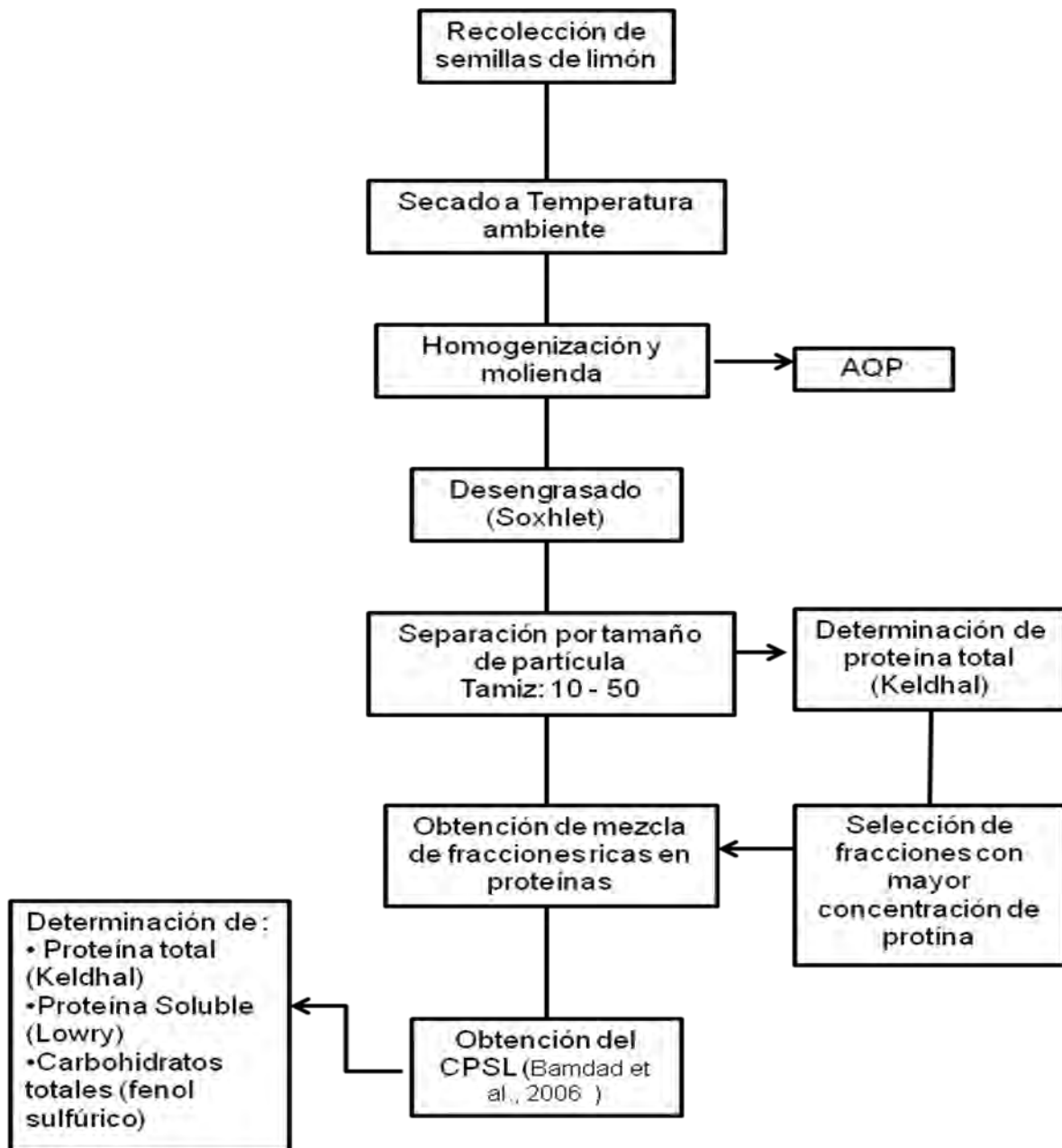
Objetivos particulares

- ✓ Obtener un concentrado proteínico de la semilla de limón con las características adecuadas para elaborar biopelículas.
- ✓ Extraer y determinar la concentración de antioxidantes que posee la corteza y pulpa del limón.
- ✓ Determinar la capacidad secuestrante que presentan los antioxidantes del limón.
- ✓ Incorporar los antioxidantes del limón a las biopelículas para formar un empaque activo.
- ✓ Conocer la capacidad de las biopelículas activas como barrera de protección de un alimento frente al deterioro químico oxidativo para evaluar su potencial uso como empaque y prolongar la vida de anaquel.
- ✓ Determinar de qué manera afecta la oxidación lipídica la concentración de proteína soluble y su digestibilidad.

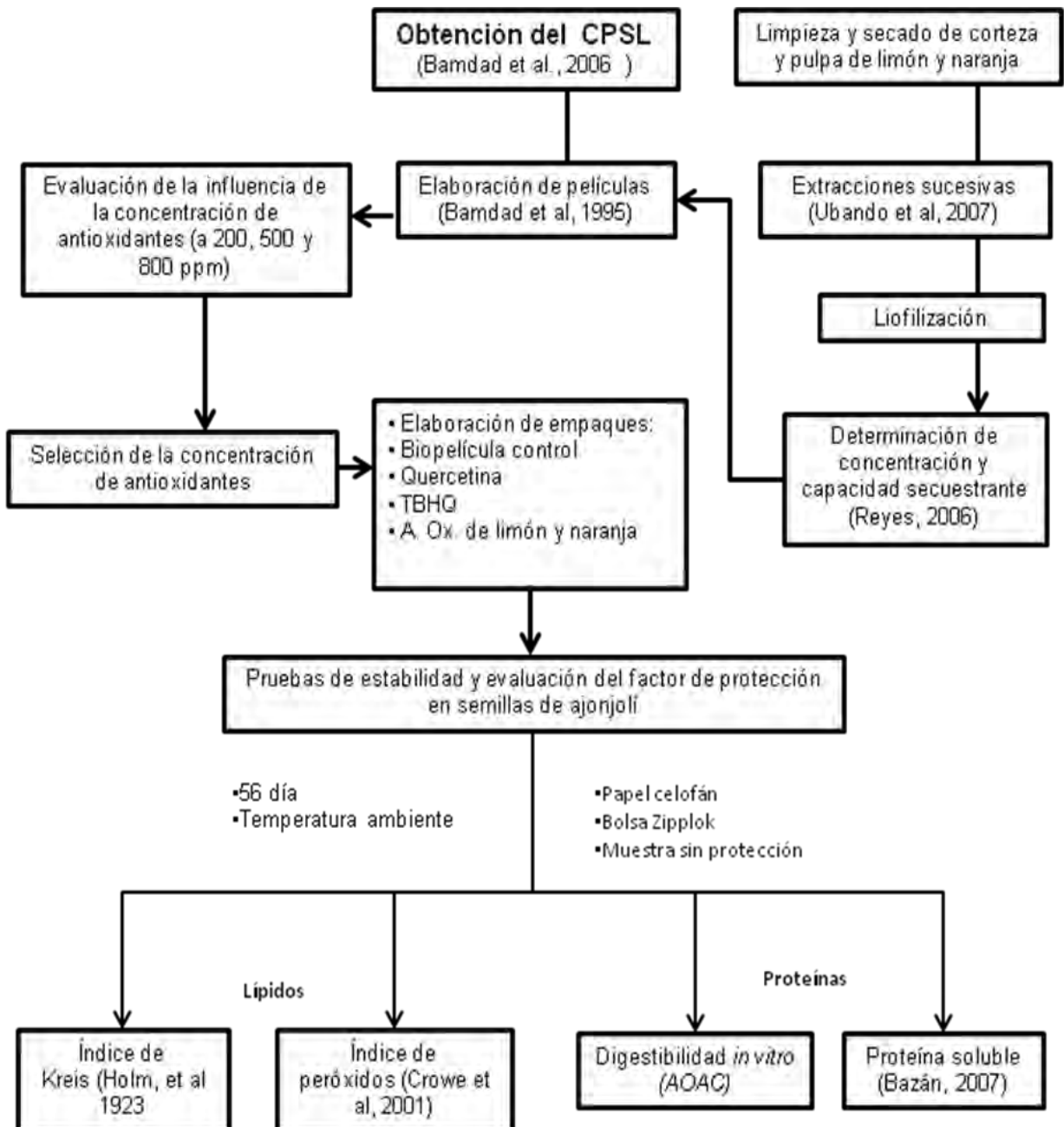
Capítulo 2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Diagrama general de trabajo

2.1.1 Obtención del CPSL



2.1.2 Formación de biopelículas y pruebas de estabilidad



2.2 Obtención del concentrado proteínico de la semilla de limón (CPSL)

2.2.1 Extracción de grasa y separación por tamaño de partícula

- Se utilizaron semillas de limón las cuales fueron lavadas con agua corriente para remover la mayor cantidad de pulpa remanente del limón. Estas se colocaron sobre una tela absorbente para eliminar la mayor cantidad de agua posible que haya quedado en el lavado.
- Posteriormente se secaron las semillas a temperatura ambiente para eliminar la mayor cantidad de agua libre y facilitar la molienda.
- La molienda de las semillas se llevó a cabo en un molino (IKA WERKE, MF 10 Basic) a 5500 rpm y la harina se desengrasó por Soxhlet por 10 horas utilizando como disolvente hexano.
- Posteriormente se molió de nueva cuenta en un molino (IKA WERKE, MF 10 Basic) a 6500 rpm.
- Después, se separó por tamaño de partícula utilizando los siguientes tamices: malla 10 (2.00mm), malla 20 (850µm), malla 30 (600µm), malla 40 (425µm), malla 50 (300µm). Así se obtuvo una fracción de harina rica en proteína. Posterior al tamizado y en las fracciones separadas, se determinó proteína total por Kjeldahl (Método oficial a la AOAC 981.10). Las fracciones seleccionadas fueron aquellas con más del 20% de proteína total, se mezclaron para obtener una sola fracción y se le determinó proteína total por Kjeldahl además de proteína soluble por Lowry (Lowry *et al.*, 1951).

2.2.2 Determinación de proteína cruda (Kjeldahl y Kirl *et al*, 1996)

- Se pesó 0.1-0.5 g de muestra en un papel delgado libre de nitrógeno, se colocó en tubos de digestión y se agregó media pastilla de Kjeltabs y 5 mL de H₂SO₄ (R.A. Reasol).
- Se colocaron los tubos en el digestor a 420°C y se calentaron hasta la obtención de una coloración azul- verdosa (total digestión de la materia orgánica).
- Se llevó a cabo la destilación colocando el tubo enfriado a temperatura ambiente, al equipo de destilación. Se agregó 50 mL de NaOH (R.A. Reasol) al 40% y se recolectó un volumen de 100 mL en 50 mL de ácido bórico al 4%. Finalmente, se tituló con solución valorada de HCl (R.A. Reasol) al 0.1 N.

2.2.3 Determinación de proteína soluble (Lowry *et al*, 1951)

- Para determinar la concentración de proteína soluble se preparó una solución stock de la muestra que abarcó los intervalos de 5-100 µg de proteína/mL.
- Se tomó 1 mL de la solución problema y se mezcló con 1 mL de solución C (mezcla de 50 mL de la solución A y 1 mL de B). (A: Carbonato de sodio (R.A. Reasol) al 2% y Tartrato de sodio (R.A. Reasol) al 0.02% en NaOH 1 M; B: Sulfato de cobre al 0.5%).

- Se dejó reposar a temperatura ambiente por 10 minutos y posteriormente se adicionó 0.5 mL de reactivo D (Reactivo de Folin (R.A. Hycel)/agua 1:1), se mezcló y se dejó reposar por 30 minutos.
- Finalmente se leyó en un espectrofotómetro (Beckman DU-65) a 750nm.

2.2.4 Obtención del concentrado proteico de semilla de limón

Una vez que se tuvo la fracción adecuada y que se conoció la cantidad de proteína cruda y soluble, se elaboró el concentrado proteínico de la semilla de limón (CPSL)

Esta técnica está basada en lo informado por Bamdad *et al*, 2006 que incluye los siguientes pasos:

- Se remojó la harina obtenida de la malla 30 en solución de agua alcalina (pH 11) a razón de 1:10 (w/v). Se ajustó el pH con NaOH 0.1 N y se agitó por 0.5 horas.
- Se colocó en refrigeración a 4° C por una noche hasta que sedimentó la fracción no proteínica.
- Se centrifugó (Centrífuga Beckman M2) a 8000 rpm a 4°C por 25 minutos.
- Se decantó el sobrenadante, se ajustó a pH de 5.4 con HCl (R.A. Reasol) 0.1 N.
- Se agitó por 0.5 horas y colocar en refrigeración a 4°C por una noche.
- Transcurrido el tiempo se centrifugó (Centrífuga Beckman M2) a 8000 rpm y 4°C para colectar el precipitado.
- Finalmente el pellet fue secado en estufa de vacío a 37°C por 2 días.
- Se determinó proteína total (Kjeldhal) y proteína soluble (Lowry).

2.2.5 Determinación de carbohidratos totales. Fenol-sulfúrico (Dubois *et al*, 1956)

- Se preparó una suspensión de la muestra en agua y se colocó 1 mL en un tubo de ensaye. Para cada tubo se adicionó 0.6 mL de una solución acuosa de fenol (R.A. Reasol) al 5%.
- Se mezcló perfectamente y se adicionó cuidadosamente 3.6 mL de ácido sulfúrico concentrado (R.A. Reasol).
- Se homogeneizó y se dejó enfriar la mezcla a temperatura ambiente.
- Se determinó la intensidad del color naranja obtenido en un espectrofotómetro (Beckman DU-65) a 480nm, frente a un blanco preparado de la misma manera utilizando agua.
- Se calculó la cantidad de carbohidratos presentes en la muestra a partir de una curva patrón preparada con un carbohidrato en un intervalo de (10-100mg de glucosa/mL), tratada de la misma manera que el problema.

2.3 Extracción de polifenoles de la corteza y pulpa de limón y naranja (Ubando *et al*, 2005)

1. A las cáscaras se les retiraron las semillas así como se les extrajo la mayor cantidad de jugo posible, de tal forma que solo quedara la pulpa y la corteza.
2. La corteza y pulpa obtenida fue molida y lavada con Etanol a 96% en agitación por 1 hora para eliminar la mayor cantidad de carbohidratos y se secó en estufa a 60°C por 4 horas.

3. Posteriormente se decantó y se le hicieron extracciones sucesivas con 40 mL de metanol (R.A. Reasol)/agua (50:50 v/v) y 40 mL de acetona (R.A. Reasol)/agua (70:30, v/v) por 1 hora cada una.
4. Se centrifugó (Centrífuga Beckman M2) a 2500 rpm por 15 minutos.
5. Se combinaron los sobrenadantes obtenidos en ambas extracciones y se concentró en un rotavapor (BÜCHI R-205) a 50°C.

2.4 Determinación de polifenoles totales (Matthäus, 2002)

La concentración de polifenoles se calculó usando ácido gálico monohidratado (Mallincoat Chemicals) como estándar y los resultados se expresan como mg equivalentes de ácido gálico (EAG)/g muestra.

1. Se tomó una alícuota de 100 µl del extracto alcohólico de antioxidantes.
2. Se adicionó 2 mL de una solución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (R.A. Química Meyer) al 2%.
3. Después de 2 minutos se agregó 100 µl del reactivo de Follin-Ciocalteau (R.A. Hycel) diluido en agua (1:1 v/v).
4. Después de 30 minutos se leyó a 750 nm. en un espectro (Beckman DU-65).

2.5 Evaluación de la actividad antioxidante de los extractos polifenólicos

2.5.1 Capacidad secuestrante sobre el radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH°) (Reyes, 2006)

La reducción del radical DPPH° (Sigma Aldrich) se observó como un cambio de color de morado a amarillo, presentando un decremento en la absorbancia a 515nm en un espectrofotómetro (Beckman DU-65), cuando el radical fue reducido por un antioxidante mediante la donación de un hidrógeno o de un electrón para formar una molécula diamagnética estable.

Se adicionó 2 mL de una solución de DPPH° (Sigma Aldrich) 3.6×10^{-5} M a 50 μ L del extracto de polifenoles estandarizado a 200 ppm. Se registró el decremento de la absorbancia a 515nm continuamente a temperatura ambiente.

El porcentaje de la capacidad secuestrante sobre el radical DPPH° (Sigma Aldrich) se calculó de la siguiente forma:

$$\%CS_{DPPH^\circ} = \frac{Abs_{t=0} - Abs_{t=16min}}{Abs_{t=0}} \times 100$$

2.5.2 Capacidad secuestrante sobre el radical ácido 2,2'-azino-bis (3- etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS^{+o}) (Reyes *et al*, 1999)

Es un método de proyección de la actividad antioxidante aplicable tanto a antioxidantes lipofílicos como hidrofílicos, incluidos los flavonoides, carotenoides y antioxidantes de plasma. La preformación del radical monocatión del ácido 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6- sulfónico) (ABTS⁺⁺) es generado por la oxidación

de ABTS con persulfato de potasio y se reduce en presencia de hidrógeno de la donación de esos antioxidantes.

Para formar el radical ATBS⁺ se mezcló una solución de ABTS (Sigma Aldrich) 7mM con una solución 2.45 mM de persulfato de potasio y se dejó reposar por 16 horas en la oscuridad a temperatura ambiente para asegurar la completa oxidación del reactivo ABTS. Transcurrido el tiempo se diluyó con etanol hasta lograr una absorbancia de 0.70 a 734 nm. Se adicionó 1 mL de esta solución a 10 µL del extracto de polifenoles estandarizado a 200 ppm. Se registró el decremento de la absorbancia a 734nm en un espectrofotómetro (Beckman DU-65) continuamente a temperatura ambiente.

El porcentaje de la capacidad secuestrante sobre el radical ABTS se calculó de la siguiente forma:

$$\%CS_{DPPH^{\circ}} = \frac{Abs_{t=0} - Abs_{t=16min}}{Abs_{t=0}} \times 100$$

2.6 Formación de biopelículas activas (Bamdad *et al*, 2006)

La formación de las películas a partir del CPSL se basó en la siguiente técnica:

1. Se disolvió 5 gramos de CPSL en 100 mL de agua destilada.
2. Se adicionó sorbitol (R.A. Aldrich) en proporción 50% (w/w) de CPSL.
3. Se ajustó el pH de la solución a 11.0 ± 0.1 con NaOH 1 N.
4. Se calentó en un baño de agua a 70 ° C por 20 minutos.

5. Se sonicó por 15 minutos y se colocó sobre una sartén de teflón.
6. Se dejó secar por 3 días. Pasado el tiempo de despegó y se colocó en un desecador para mantener la humedad.

La incorporación de los polifenoles extraídos se realizó una vez obtenida la solución calentada y filtrada para la elaboración de biopelículas se utilizó extracto de polifenoles de limón muy concentrado, el cual fue agregado a la solución antes mencionada muy lentamente y con agitación constante. Una vez homogeneizada la solución final se sonicó, se colocó en el recipiente de teflón y se dejó secar.

2.6.1 Ensayo cualitativo de formación de películas

Este ensayo consistió en observar el desarrollo de las biopelículas empleando diferentes concentraciones de los polifenoles extraídos, estas concentraciones fueron 200 ppm, 500 ppm y 800 ppm para determinar las concentraciones con las que se trabajaría posteriormente.

En esta prueba se evaluó en primer lugar la observación de la formación de una película y posteriormente la facilidad para ser extraída del recipiente de teflón. De esta forma el desarrollo de las películas fue clasificado cualitativamente como óptimo o pobre.

2.7 Evaluación de la funcionalidad de las biopelículas activas

Una vez que se corroboró que los antioxidantes son capaces de integrarse a las películas elaboradas con CPSL, se llevó a cabo la evaluación de la funcionalidad de dichas biopelículas activas utilizándolas como empaque de una matriz alimentaria

susceptible al deterioro lipídico oxidativo. El alimento utilizado fue semilla de ajonjolí ya que es abundante su contenido lipídico y presenta una actividad acuosa baja que no permite el desarrollo de microorganismos.

Para la evaluación de la funcionalidad de las biopelículas activas como barreras protectoras de alimentos, se utilizaron 7 tipos de empaques diferentes así como una muestra que no fue cubierta. Los empaques utilizados fueron los siguientes:

- 4 biopelículas a las cuales se les agregó un antioxidante diferente; antioxidante extraído de pulpa y corteza de limón, antioxidante extraído de pulpa y corteza de naranja, TBHQ y Quercetina, todos a concentraciones de 200 ppm.
- 1 biopelícula control (sin antioxidantes).
- 2 empaques sintéticos comerciales. Bolsa con cierre a presión de tipo Ziplok y bolsa de celofán transparente.
- 1 muestra colocada en un recipiente sin cubierta o tapa.

A cada empaque se le introdujo la cantidad suficiente de muestra para las pruebas y se selló utilizando un pegamento comercial.

En cuanto a la preparación de la muestra, al ajonjolí que sería utilizado se le midió el índice de peróxidos para verificar que se encontrara en buenas condiciones para su uso, la medida obtenida fue negativa, por lo que se aceptó para realizar su monitoreo. Posteriormente fue tostado en una sartén previamente calentada a fuego lento, para evitar que se quemara la semilla y a la vez evitar la producción de

compuestos que inicialmente interfirieran con la prueba. Una vez que se tenía el ajonjolí tostado este fue molido en un molino para granos de café hasta que el tamaño de partícula disminuyera convenientemente. Ambos tratamientos previos eran muy importantes pues al tostar el ajonjolí, se aumentó la temperatura y en general se aumentó la velocidad de oxidación, de igual manera al aumentar la superficie libre con la molienda, la velocidad de oxidación aumenta proporcionalmente con el área expuesta al aire.



Figura 3: Pequeños sacos hechos con biopelículas de CPSL

Los empaques con la muestra (figura 3) antes mencionados se colocaron en una charola expuesta a temperatura ambiente por 8 semanas, en las cuales se hicieron 6 monitoreos tanto de Índice de Peróxidos como de índice de Kreis para evaluar el deterioro lipídico. En este mismo periodo se evaluó, al principio y al final tanto proteína soluble como digestibilidad *in vitro*.

2.7.1 Extracción de lípidos por lotes

- Se pesaron 10 g de muestra en un matraz Erlenmeyer, se adicionaron 40 mL de disolvente y se agitó durante 10 min y se filtró por filtración rápida.
- Se recuperó el residuo y se adicionaron 40 mL del disolvente, se agitó y se filtró de igual manera.
- La extracción se repitió hasta que a extracción de grasa fue total.
- Para verificar que se extrajo toda la grasa, se dejó caer una gota del filtrado sobre papel filtro, al evaporarse el disolvente no debería dejar residuo de grasa.
- Se evaporó el disolvente en rotavapor (Büchi R-205) a 37°C.

2.7.2 Valoración de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ para la determinación de peróxidos

1. Se pesaron 0.20 – 0.23 g de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (R.A. Reasol) (previamente seco en la estufa a 100°C).
2. Se disolvió en 80 mL de agua hervida y fría 2 g de KI.
3. Se adicionó 20 mL de HCl (R.A. Reasol) 1 N e inmediatamente se dejó reposar en la oscuridad por 10 minutos.
4. Se tituló con $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ y la concentración se calculó de la siguiente forma:

$$N = \frac{\text{g } \text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 \cdot 1000}{\text{mL } \text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 49.032\text{g}}$$

2.7.3 Determinación del índice de peróxidos. Volumétrico micrométodo (Kirk et al, 1996)

Se pesó 0.5 ± 0.05 g de aceite en un matraz Erlenmeyer de 125 o 250 mL y se adicionó 2.5 mL de una solución de ácido acético/diclorometano (3:2), se disolvió perfectamente y se adicionó 0.05 mL de una solución saturada de yoduro de potasio y se dejó reposar en la oscuridad durante 60 seg., medidos con cronómetro.

Se añadió 7.5 mL de agua desionizada hervida y fría y se adicionó 0.1 mL de solución de almidón indicador (almidón soluble al 1% en agua). Se tituló lentamente con tiosulfato de sodio 0.001 N hasta la desaparición total del color azul.

El índice de peróxidos se obtiene calculando los miliequivalentes oxígeno activo por kilogramo de muestra.

$$\text{meq peróxidos} = \text{mL Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot \text{N Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 1000 / \text{g grasa}$$

2.7.4 Índice de Kreis (Kirk et al, 1996)

Se disolvió de 50 a 500 mg de grasa en 5 mL de diclorometano (R.A. Reasol). Se añadió 10 mL de una solución de ácido tricloroacético (R.A. Reasol) al 30% en ácido acético glacial y 1 mL de floroglucinol (Reasol) al 1% en ácido acético. Se agitó e incubó por 15 min, en un baño maría a 45°C. Se dejó enfriar y se agregó 4 mL de etanol. Se midió la absorbancia de la muestra a 540nm frente a un blanco de reactivos.

El Índice de Kreis se calculó como Abs a 540 nm/kg de grasa.

2.7.5 Factor de protección (Silva, 2009)

Para evaluar la efectividad de las películas activas se obtuvo el factor de protección (FP) de éstas a través del periodo de inducción del deterioro oxidativo de la muestra protegida. El FP se cálculo de la siguiente manera:

$$FP = IP_x / IP_0$$

Donde IP₀: periodo de inducción de la muestra sin antioxidante, en días.

IP_x: periodo de inducción de la muestra con antioxidante, en días.

2.7.6 Digestibilidad *in vitro*

Soluciones

= Solución enzimática A: Se disolvió 227,040 BAEE unidades de tripsina pancreática con 1,800 BAEE unidades de α-quimotripsina más 0.520 unidades ε-levan de β-naftilamina de peptidasa en 10 mL de agua.

= Solución enzimática B: Se disolvió 65 unidades caseína de proteasa bacteriana en 10 mL de agua.

Ambas soluciones se almacenaron en hielo.

= Proteína control: Se suspendieron 10 g de caseinato de sodio en 200 mL de agua y se ajustó el pH a 8 con NaOH y se mantuvo a este pH por 1 hora. Se deshidrató por congelación y se determinó Nitrógeno por Kjeldahl.

Procedimiento

- = Se usó una muestra control que contenía 10 mg de nitrógeno.
- = Se colocó la cantidad adecuada de muestra o control en un vial etiquetado y conteniendo una barra magnética de agitación. Adicionar 10 mL de agua y dejar remojar por 1 hora.
- = Utilizando un pH metro con agitación y en baño a 37°C se equilibró el control y la muestra a pH de 8 ± 0.03 por adición de HCl o NaOH diluido. Al mismo tiempo se equilibraron las soluciones de enzimas a pH 8 ± 0.03 en baño a 37°C. Una vez alcanzado el pH se colocaron las enzimas en baño de hielo y se mantuvo la muestra y el control a 37°C.
- = Para el vial del control equilibrado, se agregó 1 mL de solución enzimática A mientras se agitaba. Exactamente 10 minutos después se agregó 1 mL de solución enzimática B y se transfirió el vial al baño de agua a 55°C.
- = Exactamente 19 minutos después de haber adicionado la solución A al vial, se regresó el vial al baño de 37°C, y se leyó el pH exactamente al minuto 20.
- = Se corroboró que el control presentara un pH de 6.42 ± 0.05 para repetir exactamente todo lo anterior con la muestra.
- = Se calculó la digestibilidad mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Digestibilidad} = 234.84 - 22.56 * X$$

Donde: x: lectura de pH al minuto 20

2.7.7 Extracción de proteína soluble en ajonjolí (Bazán, 2007)

Para determinar de qué manera se vio afectada la proteína soluble del ajonjolí por acción de la oxidación lipídica primero se extrajo esta con la siguiente técnica.

- 1) Se disolvió harina desengrasada de ajonjolí en 60 mL de agua.
- 2) Se agitó por 15 minutos.
- 3) Se ajustó el pH a 10 – 12 y se agitó por 15 minutos.
- 4) Se centrifugó a 10,000 rpm a 4°C por 30 minutos.
- 5) Se separó el pellet y se colectó el sobrenadante.
- 6) Del sobrenadante se tomó 1 mL, se aforó a 100 mL y con esto se hizo Lowry.

Capítulo 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Obtención de las semillas de limón

Como ya se mencionó, las semillas del limón representan el 0.2% del peso del limón; por lo que fue una desventaja para la obtención de la materia prima.

Sin embargo, se hizo un esfuerzo exhaustivo para conseguir la mayor cantidad de semillas de limón. Los principales proveedores fueron los locales donde se venden cocteles de frutas, donde se podían conseguir en promedio 15 kg de limones exprimidos, de los cuales se obtenían de 15 – 20 g de semillas de limón.

Una vez separadas las semillas de la pulpa, estas fueron limpiadas con agua para eliminar los restos de la pulpa y facilitar su secado.

El secado se realizó a temperatura ambiente para evitar el oscurecimiento por acción de los carbohidratos aún presentes.

3.2 Molido y desengrasado

Una vez que se tuvo la semilla seca, estas se molieron en un molino de granos a 5500 rpm. En esta molienda se observó que la harina se apelmazó dentro del molino debido a la gran cantidad de lípidos que posee la semilla (20 – 25%), lo que dificultó la operación, sin embargo se obtuvo un rendimiento del 90%.

El rendimiento después de desengrasar fue del 65% por la alta cantidad de lípidos de la semilla.

La harina desengrasada se dejó secar a la intemperie cubierta con una servilleta absorbente por 24 horas, para posteriormente hacer la segunda molienda.

La segunda molienda fue hecha en el mismo molino a 6000 RPM para facilitar el concentrado de la proteína, debido a que ya estaba desengrasada la harina, esta no se apelmazó como en la primera molienda por lo que el rendimiento aumento a 98%.

3.3 Obtención de concentrado proteínico de semilla de limón (CPSL)

Para comenzar la elaboración de películas a partir de las semillas de limón, se tuvo que verificar que la materia prima contara con una cantidad significativa de proteína (17-21%). Estos resultados aparecen en la tabla 7.

Tabla 7: Análisis proximal de la semilla de limón

Componente	g / 100 g de semilla
Lípidos	28 ± 3.3
Proteína	22 ± 2.5
Carbohidratos	40 ± 1.9

Una vez obtenido el proximal de la semilla de limón, y como se observa en la tabla 7, el contenido de proteína es el esperado y se confirma con estudios hechos anteriormente (Alvarado, 2008). El resto de los macro componentes tienen similar concentración, por lo que la materia prima cuenta con la cantidad de proteína suficiente para la elaboración de las películas.

Para facilitar la obtención del concentrado proteínico, una vez que se molió la semilla y se desengrasó la semilla de limón se tamizó utilizando mallas de 10 a 50. A estas diferentes fracciones se les determinó la cantidad de proteína para trabajar únicamente con las fracciones que presentaran la mayor cantidad de proteína. A continuación se muestran estos resultados.

Tabla 8: Porcentaje de proteína en cada fracción de la harina obtenida

# de Malla	Abertura de malla	Proteína (%)
10	2.00 mm	17.23
20	850 μm	16.15
30	600 μm	23.66
40	425 μm	24.14
50	300 μm	26.25

Como se puede observar en la tabla 8, las fracciones no difieren mucho en cuanto al contenido proteínico. No obstante se decidió que las fracciones a utilizar para obtener el concentrado proteínico tuvieran más del 20% de proteína. Dichas fracciones corresponden a la mallas 30, 40 y 50.

3.4 Caracterización del concentrado proteínico

3.4.1 Proteína cruda total por el método de Kjeldhal, 1996

Una vez que se obtuvo el concentrado proteico (Bamdad *et al.*, 2006), se procedió a caracterizarlo para verificar que la cantidad de proteína fuera la adecuada para la formación de la película.

Para esta determinación se utilizó el factor de conversión estándar que es de 6.25, ya que en la literatura no se reporta el contenido de nitrógeno total presente en la proteína de la semilla de limón.

Tabla 9: Contenido proteico del concentrado de semilla de limón

	Proteína (%)
Promedio	84.82
% CV	1.595

Como se observa en la tabla 9, el contenido de proteína total es alto. Comparado con el contenido de proteína en la harina de la semilla de limón se obtuvo un concentrado de proteína 3.4 veces mayor, por lo que el proceso se llevó a cabo eficientemente.

3.4.2 Proteína soluble por el método de Lowry

Como parte del proceso para la elaboración de la película, la proteína de la semilla de limón debió estar en solución, para que se pudiera incorporar el plastificante y así formar la red y por tanto obtener la película. Es por esto que fue muy importante la

determinación de proteína soluble, pues era necesario saber qué tanto del concentrado proteico se aprovecharía en la elaboración de la película. Estos resultados se observan en la tabla 10, donde se muestra que el contenido de proteína soluble en la semilla de limón es de 83.79%, el valor es muy alto considerando el contenido de proteína total. De esta manera se puede establecer que el 98.78 % de concentrado proteínico es aprovechable para la formación de la película.

Tabla 10: Contenido de proteína soluble en el concentrado proteico de semilla de limón

	Abs	Proteína (%)
Promedio	0.1880	83.79
% CV	1.3322	1.55

3.4.3 Carbohidratos totales por el método fenol-sulfúrico

Un componente importante, si se toma en cuenta que pueden causar interferencia en la formación de la película, son los carbohidratos. Estos causan interferencia debido a que también pueden formar redes, es por esto que en la obtención del concentrado proteínico se pretende eliminar la mayor cantidad de carbohidrato para que la red formada este compuesta, si no totalmente, si mayoritariamente por las proteínas propias de la semilla de limón y así poder evaluar únicamente las capacidades de estas para formar películas.

Tabla 11: Contenido de carbohidratos del concentrado de semilla de limón

	Carbohidratos (%)
Promedio	6.78
CV	1.12

En la tabla 11, se observa que la concentración de carbohidratos que permanecen después de la precipitación isoeléctrica indicada en la técnica (Bamdad *et al.*, 2006), es muy baja. Con esto se consigue disminuir el riesgo de un posible ataque de microorganismos, lo que prolongaría la vida útil de la biopelícula.

3.5 Extracción y cuantificación de antioxidantes presentes en la pulpa y corteza de limón y naranja

Para la extracción de los antioxidantes presentes tanto en la corteza y pulpa de naranja y limón se siguió el procedimiento descrito por Ubando *et al.*, (2005).

En este procedimiento se lavó con etanol al 96 %, con la finalidad de eliminar la mayor cantidad posible de carbohidratos que pudieran interferir en las posteriores determinaciones.

Las extracciones sucesivas con metanol/agua y acetona/agua favorecen la extracción de los compuestos polifenólicos por su solubilidad, lo que es muy importante ya que la biopelícula se desarrolla en un medio acuoso por lo que los antioxidantes extraídos debían ser solubles en disolventes polares para mejorar su incorporación a la biopelícula. Posterior a la centrifugación de los sobrenadantes,

estos fueron concentrados con un rotavapor, hasta que se recuperó todo el disolvente, por lo que no se liofilizó como indica el procedimiento.

Finalmente se resuspendió en etanol y se determinó la concentración de los extractos así como la capacidad secuestrante.

Para determinar la concentración de los polifenoles totales presentes en los extractos obtenidos, se siguió el procedimiento descrito por Matthäus (2002).

Tabla 12: Concentración de polifenoles totales para limón y naranja.

	Limón	Naranja
Concentración promedio (mg EAG/g)	11.39	10.56
D. Estándar	0.005	0.0175
C. Variación (%)	0.048	0.165

En la tabla 12 se observa que el contenido de polifenoles totales en el limón es ligeramente mayor que en la naranja. Los valores obtenidos para el limón son similares a los obtenidos por Ubando *et al.*, (2005) quienes trabajaron con la fibra dietética del limón. Es probable que los principales componentes polifenólicos en la pulpa del limón y naranja sean la hesperidina, ácido ferúlico, ácido elágico, caempferol, quercetina y ácido caféico (Larrauri *et al.*, 1996).

Se observa que la cantidad de polifenoles totales obtenidos es considerable, lo cual fue indispensable para posteriormente adicionarla a las películas, sin tener que ocupar un volumen muy grande, además, como fueron extraídos con disolventes polares se garantiza que se pudieran incorporar a las biopelículas.

3.6 Evaluación de la actividad antioxidante de los extractos polifenólicos

Para determinar que los extractos polifenólicos obtenidos conservaron su actividad antioxidante, para su posterior adición a las películas y verificar el posible beneficio para el retardo de la oxidación lipídica, se realizaron ensayos midiendo la capacidad secuestrante sobre dos radicales. Las especies utilizadas fueron 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH°) y 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS⁺). Estas especies, en solución tienen un color característico, sin embargo al ser capturadas por los extractos polifenólicos, se presenta un cambio en la coloración que se puede monitorear espectrofotométricamente (Rogisnky, 2005). Esto permite hacer un seguimiento rápido y sencillo. Para fines prácticos, la absorbancia obtenida fue representada como % DDPH° para visualizar el decremento.

Además se utilizó Trolox, que con facilidad dona sus hidrógenos como control y complementar la evaluación de los extractos polifenólicos obtenidos.

3.6.1 Capacidad secuestrante sobre el radical DPPH°

Esta prueba se basa en la capacidad del radical DPPH° en reaccionar con donadores de protones como lo son los polifenoles.

En la figura 4 se muestra el comportamiento de que presentaron los extractos polifenólicos obtenidos a partir del limón como de la naranja, así como el Trolox utilizado como control.

En esta gráfica se observa que el control rápidamente reduce el % DPPH°, y llega hasta su mínimo (5.63%) en aproximadamente 1 minuto, es decir que en este tiempo

el Trolox capturó aproximadamente el 95% del DPPH°. Para los extractos polifenólicos, el limón capturó en promedio el 70% del DPPH° en un tiempo de 4 minutos, datos similares a los estudios de Ubando *et al.*, (2005). Mientras que los antioxidantes de la corteza de naranja capturaron el 63.8% del DPPH° en aproximadamente 6 minutos. Comparando con el Trolox que, aunque no obtuvo el 100%, y con lo reportado por Silva (2009) donde la Chía capturo el 83.2% de DPPH°, tanto el limón como la naranja se encontraron por debajo, sin embargo se considera aceptable su actividad antioxidante.

3.6.2 Capacidad secuestrante sobre el radical ABTS⁺

Otra de las pruebas realizadas a los extractos polifenólicos fue con el radical ABTS⁺, de igual manera se estandarizaron los extractos para seguir la metodología descrita. En la figura 5 se observa la capacidad secuestrante que presentaron los polifenoles frente al radical ABTS⁺. Al igual que en el ensayo realizados con el DPPH°, el Trolox fue el que capturo el mayor porcentaje del radical alcanzando menos del 1% de ABTS⁺ remanente, mientras que los polifenoles provenientes del limón presentaron un mejor desempeño que los provenientes de la naranja, habiendo capturado 77.45% y 71.52% respectivamente. La literatura especifica que los componentes polifenólicos que se encuentran presentes en la naranja, son muy similares a los que presenta el limón como lo son los flavonoides nobiletina, tegeritina, narirutina (Martinez, 2006), pero los más importantes en cuanto a su actividad antioxidante son la hesperidina y la quercetina (Inurreta, 2006). Lo cual

podría explicar porque presentan comportamientos de capacidad secuestrante muy parecidos.

Con ambos ensayos se confirma que los extractos polifenólicos obtenidos de la cáscara de limón y de la naranja, cumplen con una característica fundamental en la inhibición de la oxidación lipídica en una matriz alimentaria; y esta es que actúan como donadores de hidrógeno o como aceptores de radicales libres.

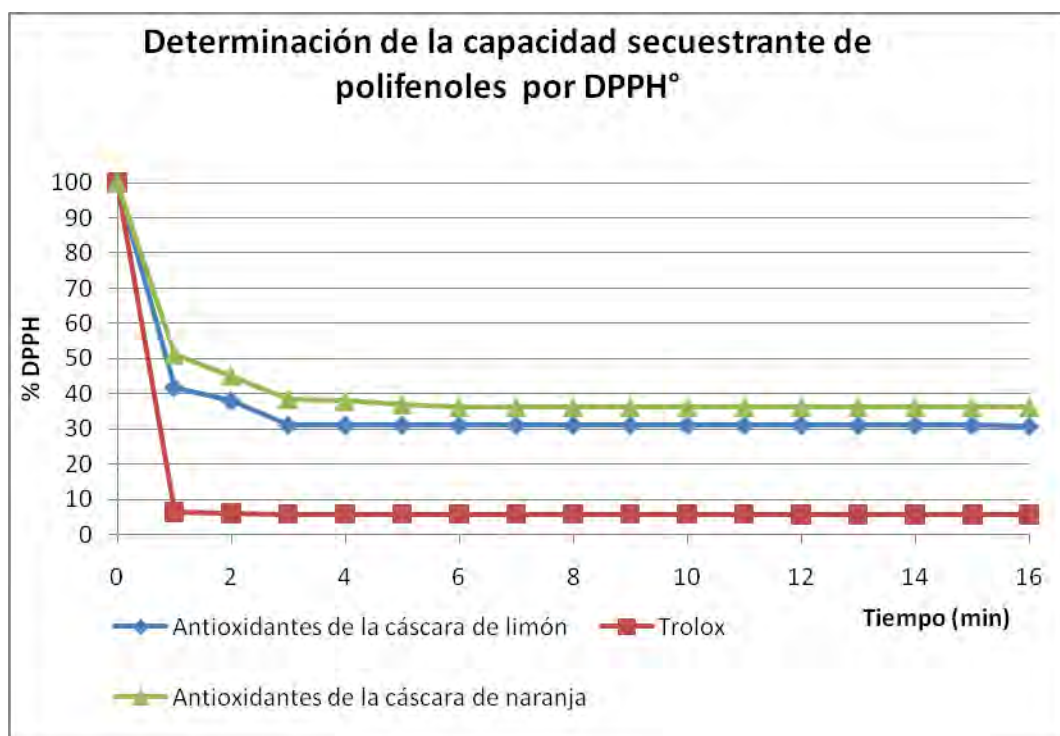


Figura 4: Comportamiento de la capacidad secuestrante de los extractos a 200 ppm con DPPH°

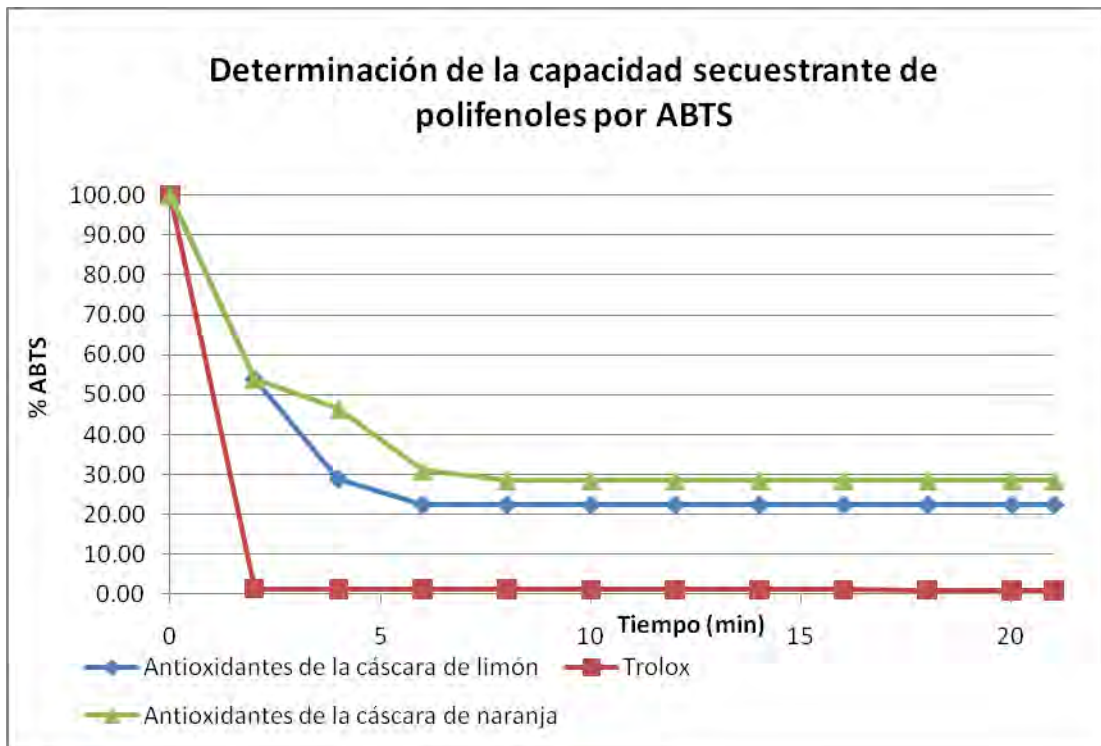


Figura 5: Comportamiento de la capacidad secuestrante de los extractos a 200 ppm con ABTS+°

3.7 Formación de biopelículas

En general, las películas obtenidas a partir de CPSL son de apariencia translúcida y de color ámbar, ligeramente brillosas y de textura lisa. La coloración es muy importante, ya que al momento de proteger al alimento, esta será la primera vista que tenga el consumidor al cual la apariencia le debe agradar para que se decida por el producto.

Un defecto que se pudo apreciar en la película, es la formación de líneas en la película. Esto puede deberse a la presencia de fibra que pudiera haber permanecido en el CPSL (Alvarado, 2008).

Las películas elaboradas a partir del CPSL presentaron, como ya se ha comprobado en trabajos previos (Alvarado, 2008) características físicas adecuadas para ser probadas como barrera de una matriz alimentaria. Es decir, que se formaron satisfactoriamente; no se deformaron ni se mostraron frágiles y se despegaron fácilmente del molde. Con esto se garantizaba que el CPSL no solo tenía la cantidad de proteína requerida, sino que también era la suficiente y en las condiciones adecuadas para la formación de películas.

De igual manera se corroboró que la técnica para la elaboración de las películas se siguió correctamente. En este punto, la formación de películas puede dividirse en dos partes (Yong y Rhee, 2004), el primero es aquel donde la proteína es sometida a una desnaturalización en medio alcalino, con el fin de exponer los grupos funcionales presentes en el péptido, así como facilitar la solubilidad de éste en el medio acuoso. El segundo corresponde a una deshidratación de la superficie, que es donde las proteínas con el plastificante, se desdobl原因 para formar una red, esto se debe a las interacciones que se dan entre proteínas, como pueden ser puentes de hidrógeno, enlaces disulfuro, e interacciones hidrofóbicas.

En el caso de las películas elaboradas con CPSL (Alvarado, 2008), las cinco fracciones proteínicas van a interactuar de la misma forma para poder formar la red, teniendo en cuenta que esta proteína cuenta con tres fracciones con un peso mayor a 30 kDa que son la parte minoritaria y dos fracciones de menor tamaño que forman la parte mayoritaria. Es posible establecer que durante la formación de la red para la formación de la película, el papel de las proteínas de menor peso molecular

es unirse mediante interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno y disulfuro a las proteínas de mayor peso molecular y así aumentar el tamaño de la red. Aunado a esto se debe considerar que el Sorbitol interfiere con las interacciones del polímero, estableciendo interacciones como puentes de hidrógeno e hidrofóbicas, dando como consecuencia un aumento en la flexibilidad y la estabilidad de las películas.

3.8 Incorporación de los antioxidantes a las biopelículas

Una vez que se tenían los concentrados de los extractos polifenólicos del limón y la naranja y que se corroboró la conservación de la actividad antioxidante requerida para conformar las biopelículas activas, se procedió a incorporar los polifenoles.

En este paso se observó la formación de precipitados y ligeros cambios en la coloración de la solución, posiblemente debido a un cambio ligero cambio en el pH causado por la solución alcohólica en la que se encontraban disueltos los polifenoles. Posteriormente se sonicó por 30 minutos para eliminar la mayor cantidad de aire disuelto y así prevenir la formación de burbujas en la película y garantizar la homogeneidad en la superficie de la barrera protectora. Se colocó en un sartén de teflón y se dejó secar por 3 días.

Se partió de una concentración de 200 ppm para adicionar a las películas, pero también se utilizaron concentraciones de 500 ppm y 800 ppm ya que en la literatura no se encuentra especificado el límite para los antioxidantes naturales. De igual manera se observó la incorporación a las biopelículas de uno de los antioxidante

comúnmente utilizados en la industria de los alimentos como lo es el TBHQ, el cual al ser fuertemente polar es especialmente activo en grasa y aceites por que se acumula en la fase grasa/aire (Fennema, 2005). También se observó la incorporación de un antioxidante natural, la Quercetina, aislado de la manzana y como ya se mencionó es uno de los componentes polifenólicos obtenidos de la cáscara del limón. De igual manera se probaron concentraciones de 200 ppm, 500 ppm y 800 ppm.

Tabla 13: Ensayo cualitativo de la incorporación de polifenoles de diferentes fuentes.

ANTIOXIDANTE	200 ppm	500 ppm	800 ppm
De la cáscara de limón	Optima	Optima	Optima
De la cáscara de naranja	Optima	Optima	Optima
TBHQ	Optima	Optima	Optima
Quercetina	Optima	Pobre	Pobre

En la tabla 13 se observa que a la concentración de 200 ppm, las películas se formaron de manera óptima. Esto fue de gran importancia ya que esta es la concentración permitida para un antioxidante sintético y la que se utilizaría para comparar con los antioxidantes naturales obtenidos. También se puede observar que para cualquier concentración de todos los antioxidantes, excepto la Quercetina, la película se desarrolló de manera óptima. Esto puede deberse a que la Quercetina no es soluble en agua ni en el disolvente en el cual fueron resuspendidos los extractos polifenólicos que fue el etanol, por lo que esa diferencia en polaridad al disolvente además de la estructura del antioxidante pudieron haber causado que las películas se mostraran más quebradizas ya que no se incorporaron a la matriz continua de la

proteína. De igual manera que al agregar los antioxidantes naturales obtenidos, cuando se adicionaron los antioxidantes sintéticos se presentó un cambio en la coloración de las películas. Como se muestra en la figura 6, las películas cambiaron de una coloración ámbar que tiene la película control o sin antioxidantes (ver figura 3) posiblemente por la misma razón que presentaron la formación de precipitados, es decir, por un ligero cambio en el pH por la solución alcohólica en que se encontraban los polifenoles.



Figura 6: Ejemplo de biopelícula activa: TBHQ 800 ppm.

3.9 Evaluación de la funcionalidad de las biopelículas activas como barreras protectoras de alimentos

3.9.1 Evaluación del deterioro lipídico

Como ya se mencionó en las 8 semanas de ensayo se tomaron 6 lecturas, esto con el fin de observar mejor las primeras etapas de la oxidación: Inducción y propagación. Para fines prácticos no se muestran los valores de los triplicados

obtenidos en cada lectura de índice de peróxidos, pero cabe mencionar que los coeficientes de variación no rebasaron el 12%, lo cual los hace confiables.

A continuación se muestran las constantes obtenidas para cada tipo de empaque.

Tabla 14: Velocidad de formación de peróxidos de las muestras protegidas con diferentes empaques. Todos los antioxidantes a 200ppm

Constantes de oxidación Lipídica								
	Sintético			Biopelículas con antioxidantes				
Tipo de empaque	S/Cubierta	Ziplok	Celofán	Control	TBHQ	Quercetina	Anti. Ox. Limón	Anti. Ox. Naranja
Velocidad media meq peróxido/ Kg *día	5.140	3.106	1.831	0.959	0.433	0.574	0.589	0.662

De la tabla 14 se observa que como se esperaba, las velocidades medias de formación de peróxido fueran diferentes para cada tipo de empaque, tanto entre los sintéticos como en los elaborados a partir del CPSL.

De igual manera y como se esperaba, la muestra que no tenía ningún tipo de empaque fue la que presentó la mayor velocidad, alcanzando 5.140 meq peróxido/Kg*día. Esto es razonable pues fue la que estuvo expuesta al ambiente, es decir, a la luz, humedad y oxígeno atmosférico que como ya se revisó son factores para acelerar la oxidación de los lípidos.

La siguiente con menor velocidad fue el empaque tipo Ziplok, el cual estaba provisto de un cierre a presión, lo que en primera instancia aislaría parcialmente la muestra de la humedad y oxígeno. Sin embargo, de los empaque sintéticos probados, fue

éste empaque el que mayor velocidad de formación de peróxidos presentó con 3.106 meq de peróxido/Kg*día.

A continuación, el celofán fue el empaque sintético con menor velocidad de formación de peróxidos, alcanzando 1.831 meq peróxido/Kg*día. Este empaque fue termosellado y presentó mejores resultados que el empaque con el sello a presión, por lo que la diferencia en el retardo podría deberse más a la permeabilidad al agua y al oxígeno de los materiales.

En cuanto a los empaques hechos con CPSL, en general arrojaron mejores resultados que los empaques sintéticos. Dentro de estos la biopelícula que no tenía ningún antioxidante y que fungió como control, fue la que presentó la mayor velocidad de formación de peróxidos con 0.959 meq peróxido/Kg*día, prácticamente la mitad de la velocidad que registró el celofán. Alvarado (2008), en sus estudios encontró esta diferencia entre los empaques sintéticos y los elaborados con CPSL, explicándolo a que estos últimos, por las características que presenta la red formada por las proteínas y el plastificante, le confieren a las películas cualidades superiores de permeabilidad al vapor de agua y oxígeno.

De las biopelículas con antioxidante, la que presentó una menor velocidad de formación de peróxidos fue a la que se le adicionó el TBHQ con 0.433 meq peróxido/kg*día aproximadamente la mitad de la velocidad que presentara la película control. Esto se debe a que este antioxidante es especialmente activo y porque se acumula en la interface grasa/aire, lo cual sumado al efecto protector de la biopelícula explica el retardo en la evolución de la oxidación.

El siguiente en presentar una menor velocidad de formación de peróxidos, fue la Quercetina. La cual alcanzó una velocidad de 0.574 meq peróxido/kg*día.

De los antioxidantes extraídos del limón y la naranja, se obtuvieron velocidades de formación de peróxidos de 0.589 meq peróxido/kg*día y 0.662 meq peróxido/kg*día respectivamente. De esta manera, aparentemente el mejor de los antioxidantes extraídos fue el del limón, sin embargo la diferencia no es significativa (para $\alpha=0.05$).

Con estas constantes obtenidas se puede determinar que la muestra que sufrió mayor deterioro, además de la que no tenía ningún tipo de protección, fue la del empaque tipo Ziplok, como se observa en la figura 7.

Figura 7: Índice de peróxidos presentada por el ajonjolí protegido con diferentes empaques (sintéticos y biopelículas). Todos los antioxidantes a 200ppm

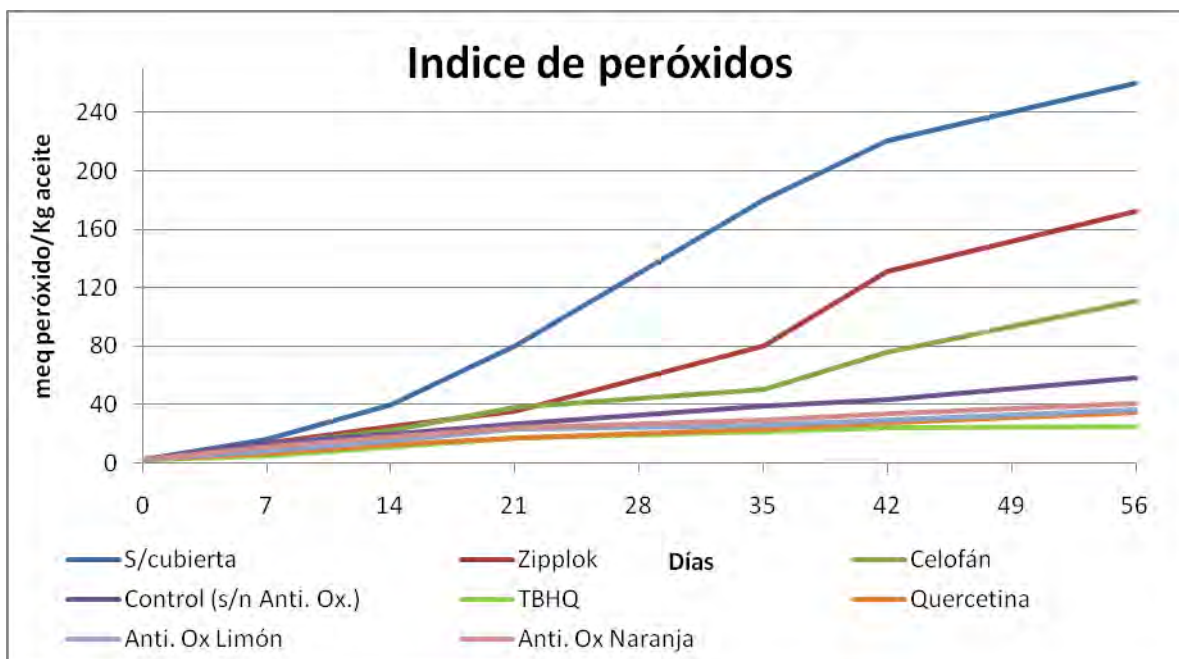
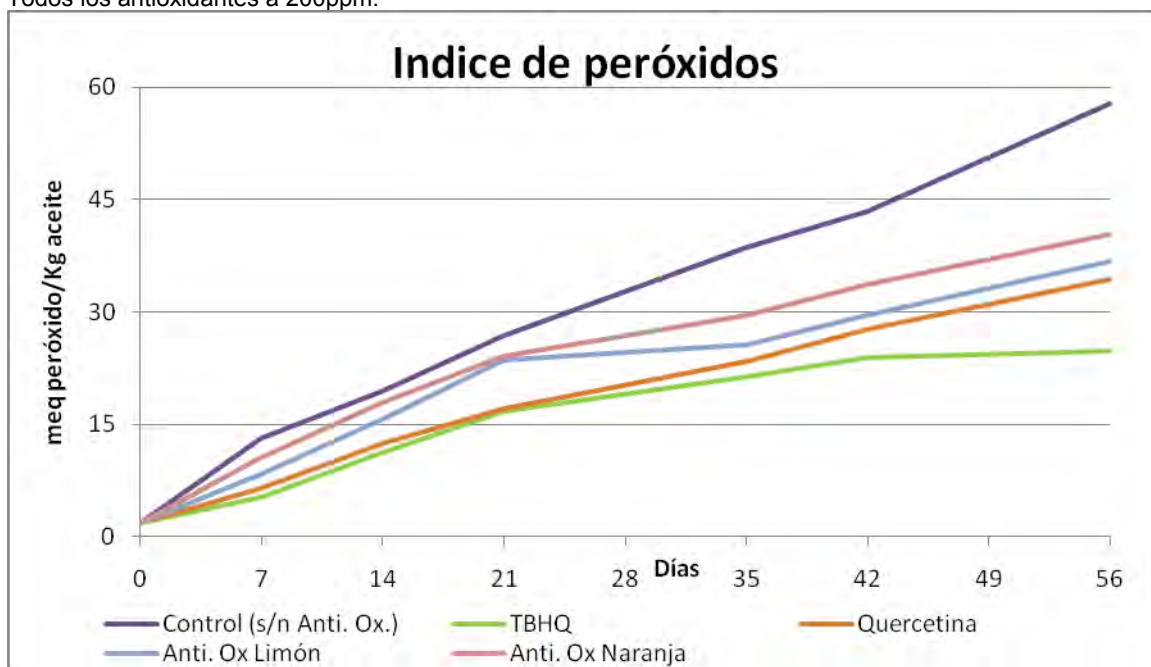


Figura 8: Índice de peróxidos presentada por el ajonjolí protegido con biopelículas con diferentes antioxidantes. Todos los antioxidantes a 200ppm.



En la figura 8, el ajonjolí que no tenía ningún tipo de protección y que como ya se mencionó, presentó una rápida formación de peróxido, fue la muestra más deteriorada por la oxidación de los lípidos. Para esta muestra, destaca que el periodo de inducción fue de aproximadamente 7 días, apenas una octava parte de lo que duró el ensayo. Después de este punto la peroxidación del alimento se acelera autocatalíticamente porque se forman radicales por escisión monomolecular de los hidroperóxidos. Mucho antes del final del ensayo, la concentración de hidroperóxidos ya era tan alta que el alimento era prácticamente incomible. En el caso del empaque tipo Ziplok, el periodo de inducción se prolongó un poco más, hasta los 21 días y de igual manera al final del ensayo el deterioro fue menor que sin empaque. Para el caso del empaque de celofán, este prolongó su periodo de inducción hasta los 35 días, más de la mitad del tiempo ensayos. Esto resulta coherente, pues de los empaques

sintéticos utilizados fue el que presentó una menor velocidad de formación de peróxidos.

Como ya se mencionó, los empaques elaborados a partir de CPSL, presentaron menores velocidades de formación de peróxidos que los elaborados con polímeros sintéticos. De la misma manera los empaques de CPSL prolongaron su periodo de inducción de tal forma que al final del ensayo estos continuaban en dicho periodo (figura 8). Sin embargo, el control fue el que al final obtuvo una mayor cantidad de peróxidos, y el TBHQ el que presentó una menor lectura de Índice de peróxidos. En tanto que las biopelícula a las que se les incorporó la Quercetina y los antioxidantes obtenidos del limón y naranja tuvieron valores finales muy semejantes. Para verificar si existe diferencia significativas, los datos obtenidos fueron tratados estadísticamente mediante una Prueba de Tukey (Montgomery, 2005). Los resultados de esta prueba se resumen en el siguiente esquema (figura 9).

Uno de los objetivos de hacer más de tres lecturas, al contrario de como se había hecho en otros estudios que involucran el monitoreo de la oxidación lipídica de una matriz alimentaria, era identificar de mejor manera cuándo se dan las primeras etapas de este importante proceso. Otro aspecto importante de esto fue observar más a detalle cómo se va separando el comportamiento que presenta cada empaque, como se puede observar en la figura 9. En dicha figura se representa en color verde la intersección de las parejas de empaques, durante las 6 lecturas hechas para este monitoreo cuya diferencia fue significativa.

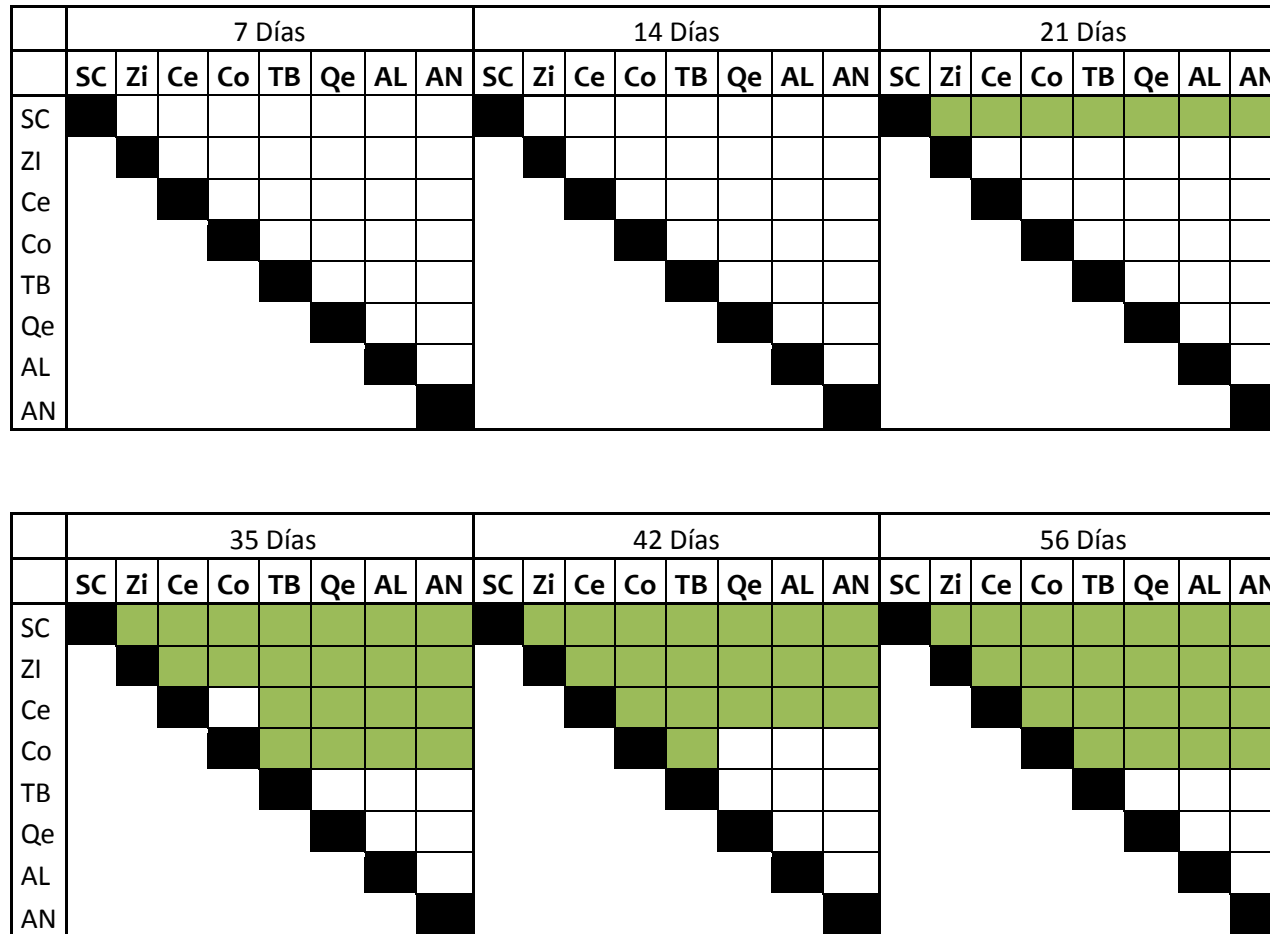


Figura 9: Resumen de la prueba estadística de Tukey ($\alpha = 0.05$): Comparación por pares de los diferentes empaques en cada intervalo de medición. Intersección en color verde ■ indica que SI existe diferencia significativa. SC: Sin cubierta, Zi: Zipplok, Ce: Celofán, Co: Control, TB: TBHQ, Qe: Quercetina, AL: Antioxidantes extraídos de la pulpa de limón, AN: antioxidantes de la pulpa de naranja.

Se observa que en los primeros 7 días no existe diferencia significativa entre los empaques, incluso tampoco con la muestra que no está cubierta debido a que las reacciones de oxidación transcurren a la misma velocidad. Es hasta los 14 días, y como se observó en la figura 7, la diferencia de la muestra sin protección con los demás empaques comienza a ser significativa estadísticamente y continúa la tendencia el resto del monitoreo. A este tiempo, dicha muestra empieza con la etapa de propagación mientras que las demás permanecen en la etapa de inducción.

Para los 21 días la tendencia persiste y es hasta los 35 días cuando la muestra sin protección y los empaques sintéticos presentan diferencia significativa entre ellos así como con el resto de los empaques. Para los 42 días la película control (figura 9) presenta diferencia significativa con las demás películas con antioxidante. Al finalizar el monitoreo se confirma que los empaques sintéticos y la muestra sin protección fueron las muestras que mayor deterioro presentaron, mientras que las muestras con antioxidante no presentaron entre ellas diferencia significativa.

En cuanto al índice de Kreis se observa una tendencia similar a la presentada en la formación de peróxidos. En donde de igual manera la muestra que no tiene protección alguna es la que se ve afectada más rápidamente. Le siguen los empaques sintéticos (figura 10), que como en lo obtenido para el índice de peróxido, el menos deteriorado fue el celofán, aunque en ambos casos se alcanzaron altos valores de índice de Kreis.

En cuanto a los empaques hechos a partir de CPSL (figura 11), se conservó la misma tendencia que en la prueba de peróxidos, siendo el mejor empaque el que fue adicionado con TBHQ, seguido de la película con Quercetina, la película con

antioxidantes del limón y finalmente las películas con antioxidantes de naranja y el control. Dicha tendencia se refleja en las velocidades de formación de compuestos carbonílicos y que se muestran como constantes en la tabla 15.

Tabla 15: Velocidad de formación de compuestos carbonílicos de las muestras protegidas con diferentes empaques. Todos los antioxidantes a 200ppm

Constantes de oxidación lipídica								
Tipo de empaque	Sintéticos			Biopelículas con antioxidantes				
	S/Cubierta	Zipplok	Celofán	Control	TBHQ	Quercetina	Ant. Ox. Limón	Ant. Ox. Naranja
Velocidad media (Abs 550 nm / g grasa *día)	1.083	0.144	0.092	0.067	0.039	0.056	0.053	0.06

El comportamiento en la producción de compuestos carbonílicos se observó como se muestra en la figura 10. De la que resalta la gran similitud con la presentada para el índice de peróxidos (figura 7) y con la que se confirman los estados de propagación de las diferentes muestras. En el caso de la muestra que no tiene protección, en la cual se da rápidamente la formación de compuestos carbonílicos, esta se da aproximadamente a los 7 días. Como el aceite de ajonjolí es rico en los ácidos grasos oleico y linoléico, y una vez iniciada la etapa de propagación podemos encontrar compuestos como pentano, pentanal, hexanal, heptanal, nonanal, decanal, que son productos de la descomposición de los peróxidos (Badui, 2004). Resulta muy evidente que los empaques elaborados a partir del CPSL presentaron mejores características de protección para el ajonjolí que los empaques sintéticos. Esto se

debe, primero, a que las biopelículas elaboradas de CPSL tienen una menor permeabilidad al oxígeno ($17.6 \text{ cm}^3 \text{ cm}^3 \mu\text{m}^2 \text{ d KPa}$) que empaques sintéticos como el Zipploc ($57.8 \text{ cm}^3 \mu\text{m}^2 \text{ d KPa}$). No obstante que en cuanto a la permeabilidad al vapor de agua fue mayor para las biopelículas de CPSL que para dicho empaque sintético ($2.12 \text{ ng/Pa*s*m*10}^3$ y $0.18 \text{ ng/Pa*s*m*10}^3$, respectivamente) (Alvarado, 2008).

Figura 10: Índice de Kreis presentado por el ajonjolí protegido con diferentes empaques (sintéticos y biopelículas). Todos los antioxidantes a 200ppm.

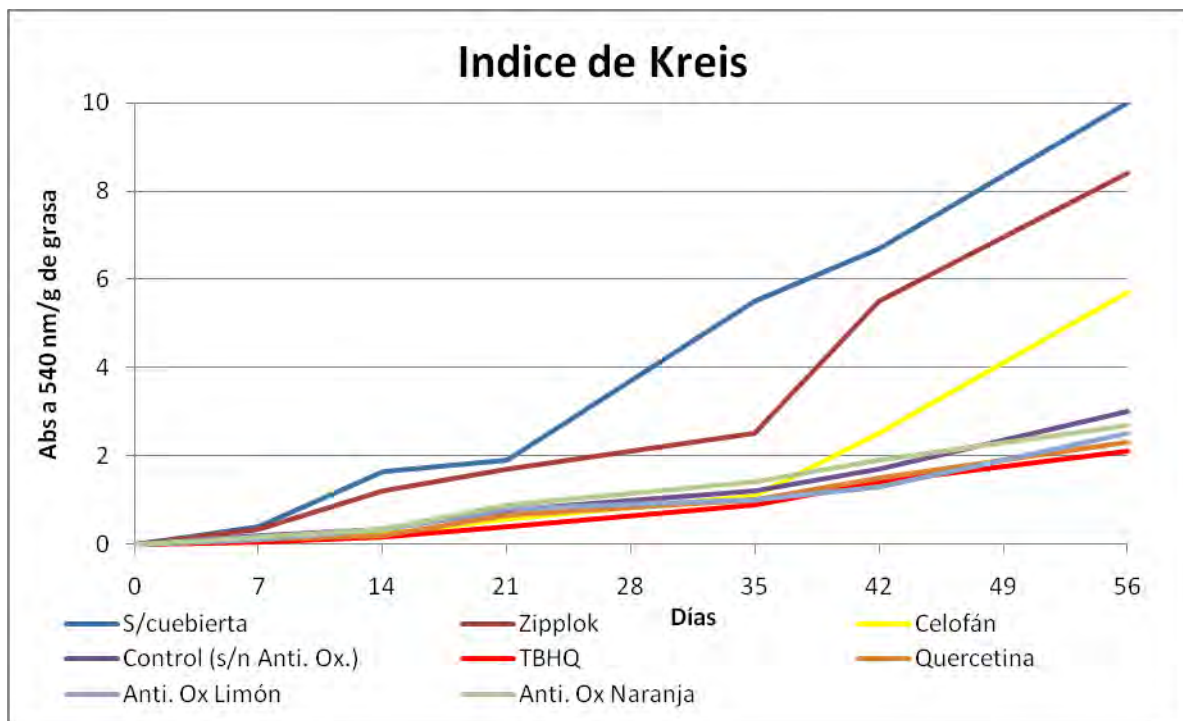
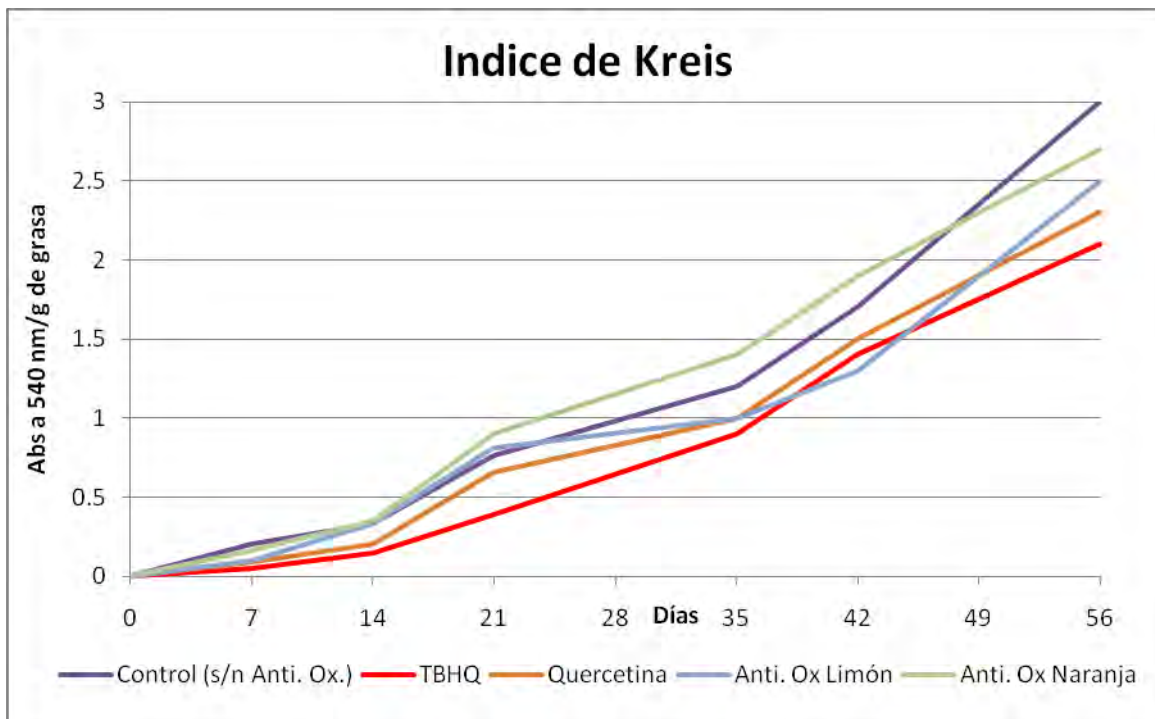


Figura 11: Índice de Kreis presentado por el ajonjolí protegido con diferentes empaques (sintéticos y biopelículas). Todos los antioxidantes a 200ppm



En segundo lugar, los antioxidantes adicionados estabilizan los radicales libres formados en etapas tempranas, prolongando el periodo de inducción y retardando la oxidación lipídica.

Para los datos obtenidos en el monitoreo del índice de Kreis tampoco se muestran los triplicados obtenidos, sin embargo cabe señalar que el coeficiente de variación no rebasó el 9%, por lo que se consideran confiables. De igual manera que para el índice de peróxidos, se realizó la prueba estadística de Tukey (Montgomery, 2005) obteniéndose resultados similares a los obtenidos para índice de peróxidos, resultado finalmente que existe diferencia significativa entre los empaques sintéticos y las biopelículas, así como que no existe diferencia significativa entre estas últimas.

Otra manera de comprobar el efecto de protección que brindan las biopelículas activas de la semilla de limón con respecto a las demás cubiertas de polímeros sintéticos, es calculando un factor de protección (FP), el cual está basado en el comportamiento que presenta la formación de peróxidos, indicando el retardo del inicio del periodo de propagación que produce un antioxidante, en el deterioro oxidativo de una matriz alimentaria. Para calcular el FP (Silva, 2009) fue necesario conocer el término del periodo de inducción en la oxidación del ajonjolí tostado para cada una de las muestras. El FP relaciona el periodo de inducción de la muestra con antioxidante con el periodo de inducción de la muestra sin antioxidante. Este último dato fue obtenido de la muestra que no tenía protección alguna así como ningún tipo de antioxidante adicionado. A continuación se muestran los datos obtenidos.

Tabla 16: Factor de protección calculado para cada tipo de empaque.

Empaque	Fin del Periodo de inducción (días)	Factor de protección (FP)
S/ protección	7	1.0
Ziplok	21	3.0
Celofán	35	5.0
Biopelícula control	---	> 8.0
Biopelícula con TBHQ	---	> 8.0
Biopelícula con Quercetina	---	> 8.0
Biopelícula con Anti. Ox de limón	---	> 8.0
Biopelícula con Anti. Ox de naranja	---	> 8.0

En la tabla anterior se observa que los empaques sintéticos ofrecen un FP de 3 y 5 respectivamente para Ziplock y celofán, esto indica el número de veces que el antioxidante prolonga el periodo de inducción. En el caso de estas muestras, que no tenían ningún antioxidante, el FP se refiere primordialmente a la acción del empaque ya que no se tiene ningún tipo de efecto combinado entre el empaque y el antioxidante adicionado.

De igual manera que para los empaques sintéticos, la biopelícula control, a la que tampoco se le adicionó ningún antioxidante, el FP corresponde al efecto que tuvo únicamente la biopelícula para prolongar el periodo de inducción en dicha muestra. El hecho de que esta biopelícula haya presentado el mismo FP que las demás biopelículas con antioxidante, no indica que no exista diferencia entre adicionar o no un antioxidante a las biopelículas. Esto es debido a que al final del monitoreo tanto la biopelícula control como el resto que les fue adicionado un antioxidante aún se encontraban en el periodo de inducción, por lo que no fue posible conocer el momento del inicio del periodo de inducción. No obstante, se puede afirmar que el FP para las biopelículas con o sin antioxidante es mayor a 8. Sin embargo, si se hubiera prolongado más el monitoreo se hubiera podido registrar la diferencia del fin de periodo de inducción para cada biopelícula, donde muy posiblemente, y porque ya se demostró que al final del monitoreo se encontró diferencia significativa entre la biopelícula control y las que tenían antioxidantes; la que presentaría el menor retraso del periodo de propagación sería la biopelícula control y la que presentaría el mayor retardo de dicho periodo sería la biopelícula con TBHQ, pues fue la que presentó una

menor velocidad de formación de peróxidos, seguida por la que tenía Quercetina, la de antioxidantes de limón y finalmente la que tenía antioxidantes de naranja.

Como ya se aclaró, el FP para los empaques que no tienen antioxidantes se refiere únicamente a la protección que brinda como tal el empaque, mientras que para las biopelículas activas el FP es una medida de la protección que por efecto combinado ofrecen el antioxidante adicionado como la biopelícula como tal.

3.9.2 EVALUACIÓN DE LA PROTEÍNA SOLUBLE

Además de la formación de los compuestos carbonílicos y demás productos de la oxidación de los lípidos, y de los cambios organolépticos producidos por estos, se ven afectadas otras macromoléculas en la composición de los alimentos; en este caso las proteínas.

La reacción de las proteínas con hidroperóxidos y los compuestos que de ellos se derivan, conducen a modificaciones de las mismas que se reflejan en forma de cambios que no siempre son a favor del alimento. Los cambios son en la consistencia y solubilidad (unión entre proteínas), el color (reacciones de pardeamiento) y el valor nutritivo (pérdida de aminoácidos esenciales). Los radicales formados a partir de los hidroperóxidos atacan a las proteínas, preferentemente a los aminoácidos Trp, Lys, Tyr, Arg, His, cisteína y cistina, por reacciones con el grupo OH fenólico, o los grupos que contienen azufre o nitrógeno. En estas reacciones, tanto los radicales formados a partir de los hidroperóxidos como compuestos

monocarbonílicos se unen fácilmente con los grupos NH₂ libres de la proteínas para formar bases de Schiff (Alfaro, 2008).

La semilla de ajonjolí, contiene un 20 -25 % de proteína, de la cual el 25 % corresponde a proteína soluble. Para determinar de qué manera se vio afectado el contenido proteínico del ajonjolí protegido con los diferentes empaques se midió el contenido de proteína soluble al inicio y al final del monitoreo. Estos resultados se muestran en la tabla 17.

Tabla 17: Concentración de proteína soluble en los diferentes empaques a los 56 días. Entre paréntesis se encuentra el coeficiente de variación de cada determinación. **Al tiempo cero.

Controles	g proteína soluble / 100 g de muestra
Ajonjolí sin tostar**	6.03 (8.3%)
Ajonjolí tostado**	5.79 (7.7%)
Ajonjolí sin protección	1.93 (6.0%)
Tipo de empaque	
Película control	3.26 (6.5%)
Película con TBHQ	5.03 (7.2%)
Película con anti ox. de Limón	4.33 (8%)
Película con ati ox. se Naranja	4. 07 (5.4%)

De la tabla 17 el ajonjolí sin tostar corresponde a la muestra antes de que se le aplicara el tratamiento térmico, es decir los 6.03 g de proteína soluble/ 100 g de muestra corresponden a la concentración que inicialmente presentó el ajonjolí antes del monitoreo y que serviría como el control principal para determinar de qué manera se vio afectada la concentración de proteína soluble por acción de la degradación lipídica. El segundo control correspondió al ajonjolí una vez que fue tostado, en el

cual se observó una ligera disminución en el contenido de proteína soluble, con respecto a lo que contiene el ajonjolí sin tostar. Sin embargo, debido al corto tiempo que había transcurrido después del tratamiento térmico, la degradación de la proteína fue mínima de tal manera que la diferencia no es significativa. El siguiente control fue el ajonjolí que no tenía ningún tipo de protección medido a los 56 días, en este se observó que el contenido de proteína soluble disminuyó en un 67.8% con respecto al contenido del ajonjolí tostado inicial, debido a que ya habían transcurrido 8 semanas, tiempo en el cual los radicales formados de la oxidación lipídica inducen la formación de radicales de proteína para darse entrecruzamiento de ambos radicales y desencadenar una polimerización de lípidos – proteínas y una consecuente pérdida de aminoácidos. Además con la formación de estos polímeros se da un aumento en las interacciones hidrofóbicas y como consecuencia la ya planteada disminución de proteína soluble, principalmente la albúmina 2S (ó β -globulina) que corresponde al 25% de la proteína total (Bazán, 2007). Uno de los ácidos grasos más abundantes del contenido lipídico del ajonjolí es el ácido linoléico, este puede reaccionar a temperatura ambiente con Tripsina; después de 40 min aminoácidos como la Metionina (abundante en el ajonjolí) se pierde en un 83 %, Histidina en un 12% (Berlitz, 2004). En este punto la calidad nutritiva del alimento se ve deteriorada por la rápida acción de oxidación lipídica.

Como ya se mencionó la biopelícula hecha a partir de CPSL, presentaron una menor velocidad de formación de peróxidos y productos secundarios que los empaques sintéticos por lo que de igual manera presentaron un menor deterioro lipídico durante el ensayo. Por esto último se esperaba que la degradación de las proteínas

siguiera la misma tendencia. La biopelícula control fue en la que se observó la mayor disminución de proteína, un 43.7 % con respecto a la concentración inicial. La que menor degradación de proteína presentó fue la biopelícula a la que le fue adicionado el TBHQ, resulta coherente pues durante el monitoreo fue en el que se produjeron la menor cantidad de hidroperóxidos que pudieran desencadenar la formación de polímeros lípido-proteína. Por su parte los antioxidantes del limón y naranja presentaron concentraciones de proteína final similares. Con 4.33 g de proteína soluble/100 g de muestra y 4.07 g de proteína soluble/100 g de muestra, respectivamente, reflejan una mejor protección que la biopelícula control, e incluso muy cercana a la aportada por la biopelícula con TBHQ, pues las diferencias no son significativas ($\alpha = 0.05$).

3.9.3 Evaluación de la digestibilidad de la proteína de ajonjolí

La digestibilidad de una proteína es un ensayo en el cual mediante enzimas se intenta simular el proceso de la digestión. Básicamente la digestibilidad de una proteína, se refiere a que tanto de ésta el organismo es capaz de asimilar en las subunidades más simples.

En esto radica la importancia de esta prueba, ya que no obstante que en algunos casos el deterioro lipídico fue tal que el alimento era incomible, en otros casos el deterioro no fue significativo y era imperativo determinar que tan funcional era la proteína que no se vio afectada.

La proteína del ajonjolí tiene de digestibilidad el 79.6%, no es tan alta como la de la caseína de la leche (98.7%) pero es considerablemente alta.

Tabla 18: Digestibilidad de las diferentes muestras y pH \pm desviación estándar, medido a los 56 días.

** Al tiempo cero. No se realizo con Quercetina por los resultados similares con TBHQ.

Muestra	pH	% Digestibilidad
Control de caseína	6.33 \pm 0.23	98.72
Ajonjolí sin tostar**	6.98 \pm 0.19	77.2
Ajonjolí tostado**	7.08 \pm 0.24	74.89
Ajonjolí sin protección	8.99 \pm 0.11	31.84
Película control	7.65 \pm 0.12	62.10
Película con TBHQ	7.17 \pm 0.04	72.91
Película con anti ox. de Limón	7.41 \pm 0.10	67.45
Película con ati ox. se Naranja	7.51 \pm 0.14	65.21

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 18. Donde el control utilizado es la caseína por ser un claro ejemplo de una alta digestibilidad y porque así lo indica la técnica, que señala también un valor específico en el cual se debe encontrar el control para verificar que las condiciones y reactivos son los adecuados. En este caso el resultado del control (6.33 \pm 0.23) es satisfactorio.

Como ya se mencionó entre más grande es la digestibilidad mayormente la proteína es aprovechable y viceversa, por lo que las muestras en que menor se vio afectada la digestibilidad fueron la biopelícula a la que se la adicionó el TBHQ que presentó una digestibilidad final de 72.91% muy similar al ajonjolí tostado que tuvo una digestibilidad de 74.89%, es decir la digestibilidad inicial de la muestra. Además de diferencia significativa con respecto a la película control que presento una

digestibilidad de 62.10% y una gran diferencia con lo obtenido para la muestra que no tenía ningún tipo de protección de la cual se obtuvo un 31.84% de digestibilidad.

Anteriormente se mencionó por qué disminuye la concentración de proteína en los alimentos; la formación de radicales durante la oxidación de los lípidos induce a formación de radicales en las proteínas, volviéndolas reactivas, y es entonces donde se da la disminución de la proteína, por la formación de polímeros de proteína-lípido, con la formación de nuevas estructuras y la consecuente pérdida de aminoácidos, causando así la disminución de digestibilidad.

En dicha prueba se controlaron estrictamente la temperatura y el pH ya que de estos factores depende la actividad de las enzimas utilizadas. Además dichas enzimas entre sus características esta la especificidad.

En las biopelículas que presentaron la mayor velocidad de formación de peróxidos y productos carbonílicos, las proteínas reaccionaron con éstos compuestos para formar los ya mencionados polímeros proteína – lípido, teniendo como consecuencia, entre otras, la pérdida sustancial de aminoácidos, por lo que los centros activos de las enzimas utilizadas en la prueba de la digestibilidad, emulando la digestión humana, no son capaces de reconocer la secuencia de aminoácidos necesaria y por tanto son incapaces de escindirlos para su asimilación. Al contrario de lo que ocurre con las biopelículas con antioxidantes, donde la velocidad de formación de los peróxidos y compuestos carbonílicos y la consecuente disminución de la formación de polímeros entre proteínas y lípidos, por lo que los péptidos conservan su

estructura y secuencia y las enzimas de la digestión pueden hacer su trabajo, reflejado en la disminución del pH por los grupos carboxilos liberados.

Finalmente las biopelículas con antioxidantes de naranja y limón presentaron valores de digestibilidad de 67.45% y 65.21% respectivamente, superando los resultados obtenidos para la biopelícula control y siendo superadas por la biopelícula con TBHQ.

CONCLUSIONES

- ❑ La semilla de limón tiene una concentración considerable de proteína (24%), con la cual se logró obtener un concentrado proteínico adecuado para la elaboración de biopelículas de CPSL, del cual el 83.79% correspondía a proteína soluble viable para ser utilizada.
- ❑ Cítricos como el limón y naranja contienen compuestos polifenólicos con propiedades antioxidantes, como: la hesperidina, el caempferol, el ácido ferúlico y ácido cafeico. Aprovechando la corteza y pulpa de estos cítricos, cuyo desperdicio representa el 55% de la producción anual, se logro extraer y cuantificar los antioxidantes para utilizarlos como aditivos en la elaboración de biopelículas activas.
- ❑ Se logró la incorporación de los antioxidantes a las biopelículas de CPSL hasta en 800ppm, sin embargo la concentración seleccionada fue de 200ppm por ser el límite de un antioxidante sintético para su uso en alimentos. De esta manera se obtuvo una biopelícula resistente y lo suficientemente flexible para su uso como barrera protectora.
- ❑ Con la prueba de estabilidad, utilizando semilla de ajonjolí tostado por su alto contenido lipídico y su baja actividad acuosa, se corroboró que las biopelículas activas elaboradas con CPSL prolongan el periodo de vida útil de la semilla, retardando el periodo de inducción en la oxidación lipídica y ofreciendo un

factor de protección (FP) de 8 para las biopelículas activas superior al empaque tipo Ziplok (FP=3) y el empaque de celofán (FP=5).

- ❑ Con la biopelícula control (sin antioxidantes) se corroboró que el aumento en el periodo de vida útil de la semilla cuando ésta fue protegida con una biopelícula activa se debe a un efecto combinado entre la acción del antioxidante adicionado y la protección que brinda como tal la biopelícula.

- ❑ Al retardarse la oxidación lipídica de la semilla de ajonjolí tostado, se corroboró que el deterioro de las proteínas de la semilla también disminuyó. Esto se vio reflejado en la digestibilidad y en la concentración de proteína soluble, pues la biopelícula con TBHQ perdió el 13.12% de la proteína soluble que se tenía inicialmente (5.79 g proteína soluble/100 g muestra) mientras que las biopelículas con antioxidantes de limón y naranja perdieron 25.21% y 29.7% respectivamente, en cada caso fueron superiores a la pérdida de proteína soluble de la muestra sin protección que fue de 66.66%. En cuanto a la digestibilidad, inicialmente la semilla de ajonjolí presentaba el 74.89%. A los 56 días la biopelícula control disminuyó 62.10%, la que tenía TBHQ apenas a 72.91 y las que tenían antioxidantes de limón y naranja a 67.45% y 65.21% respectivamente. De igual manera que con la proteína soluble la muestra sin protección fue la más deteriorada con una digestibilidad de 31.84%.

- ❑ A pesar que la concentración de proteína en la semilla de limón es considerablemente alta, la obtención de dicha semilla es una limitante que

destacó en este proyecto. Ya que no se comercializa como es el caso de la chía, que se puede encontrar con facilidad y a un bajo costo. En el caso de la semilla de limón, no existen proveedores que faciliten la materia prima, por lo que la única manera de conseguirla fue recolectando lo que se desecha en comercios de alimentos, separarla de la pulpa y limpiarla manualmente. Por lo que para llevar a una escala industrial se tendrían que plantear una logística de acopio y acondicionamiento de las toneladas de desperdicio que genera el país.

BIBLIOGRAFÍA

- ✓ Alfaro Sosa, Jocabed (2008). Efecto de la conservación y el tiempo de almacenamiento sobre los aminoácidos y vitaminas liposolubles del queso suave de leche de cabra, cruda y pasteurizada. Tesis Licenciatura, Facultad de Química, UNAM. México D.F. pp. 15-30.
- ✓ Alvarado, Suarez Luis A. (2008). Estudio para evaluar biopelículas proteínicas como barreras protectoras de alimentos. Tesis Licenciatura, Facultad de Química, UNAM. México D.F, pp. 7-70.
- ✓ Amarowics R., Pegg R. B., Rahimi-Moghaddam P., Barl B., Weil J. A. (2004) Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chemistry*, 84, pp. 551-562.
- ✓ Ahvenanien R. (2003). *Novel Food Paking Techniques* Editorial Cambridge England Woodehead. pp. 203 – 249.
- ✓ AOAC (1995). Method oficial 981.10. Crude Protein. Block digestion in method. *Official Methods of analysis of AOAC international*, 16 th editions. Cunnif, P.
- ✓ Arvanitoyannis, I., Psomiadou, E., Nakayama, A., Aiba, S., and Yamamoto, N. (1997) “Edible films made from gelatin, soluble starch and polyols, part 3”. *Food Chemistry*, 60(4), pp. 593–604.
- ✓ Badui, S. D. (2004). *Química de alimentos*, Alhabama, USA,, Pp 69-87, pp. 154 – 173.
- ✓ Bamdad, F., Goli A. H., Kadivar M. (2006). Preparation and characterization of proteinous film from lentil (*Lens culinaris*). *Edible film from lentil (Lens culinaris)*, *Food Research International*. 39: pp. 106–111.

- ✓ Bartholomew Elbert, & Walton S. (1990) The lemon fruit, its composition, physiology and products” University of California Press. Berkeley, California, USA. pp. 22-23, 116-118.

- ✓ Bazán Gómez, Ángeles B. (2007). Detección de la albúmina 2S en aislados proteicos de ajonjolí. Tesis Licenciatura, Facultad de Química, UNAM. México D.F. pp. 10 – 44.

- ✓ Berlitz, H., W. Grosch, P. S. (2004). Food chemistry, fourth edition, Berlin, Germany, 2004. pp. 209 – 213.

- ✓ Burda, S., Oeszek, W. and Lee, C. Y. (1990). Phenolic compounds and their changes in apples during maturation and cold storage. J. Agric. Food Chemistry. 38: pp. 945-948.

- ✓ Braverman, J. B., (1997). Introducción a la bioquímica de los alimentos, Editorial Manual Moderno”, USA., pp. 162 – 166.

- ✓ Choi, W. S & Han, J. H. (2001) Physical and mechanical properties of pea-protein-based edible films. Journal of Food Science, 66 (2), pp. 319 – 322.

- ✓ Dubois, M. Gilles, K.A., Hamilton, J. K. Rebers, P.A. y Smith, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry, 28:3, pp. 350-356.

- ✓ Erlund I. (2002). Chemical Analysis and pharmacokinetics of the flavonoides quercetin, hesperidin and naringenin in humans. Thesis doctoral, Academic Dissertation. pp. 19-28.

- ✓ Fennema, O. R. (2005). Food Chemistry. 4ª edición, Acribia SA, Madrid, España. pp. 197-245.

- ✓ Gennadios, A., & Weller, C. L. (1990). Eddible films and Coating from Wheat and Corn Proteins. *Food Technology*, 44 (10), pp. 63 – 69.
- ✓ Guilbert, S., Cuq, B., & Gontard, N. (1997). Recent innovations inedible and/or biodegradable packaging materials. *Food Additives and Contaminants*, 14(6), pp. 741-751.
- ✓ Herrera Hernández, Martha E. (2006). Semilla de limón mexicano (*Citrus aurantifolia*): Obtención de concentrado de fibra dietética con poder antioxidante. Tesis de Licenciatura., Facultad de Química, UNAM., México D.F. pp. 5-56.
- ✓ Hertog, M.G.L., Hollman, P.C.H., and Putte, van de B. (1996) Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in Netherlands. *J. Agric food chem.* 40: pp. 2379-2383.
- ✓ Hong, S. and Krochta, J.M. (2005). Oxigen barrier performance of whey-protein-coated plastic films as affected by temperature, relative humidity, base film, and protein type. *Food Research International*, 77, pp. 739-745.
- ✓ Hui Y. H., Guerrero I., and Rosmini M. (2006) *Ciencia y Tecnología de Carnes*. Limusa. México. pp. 212-214, 566-567.
- ✓ Inurreta Salinas, Y. (2007). Calidad de los alimentos funcionales, caso flavonoides como antioxidantes. Tesis de maestría, Facultad de Química, UNAM, México, D.F. pp. 3-69.
- ✓ Juscafresa, Baudillo, (1992). *Árboles frutales, cultivo y explotación comercial*” 7ª Edición, Editorial Aedos, Barcelona, España. pp. 187-191.

- ✓ Jongjareonrak A., Benjakul S., Visessanguan W., Tanaka M. (2008). Antioxidative activity and properties of fish skin gelatin films incorporated with BHT and α -tocopherol. *Food Hydrocolloids*, 22, pp. 449-458.

- ✓ Kirk R.S., Sawyer, R y Egan H. (1996). *Composición y Análisis de Alimentos de Pearson*, Segunda edición., Editorial CECSA., México. pp. 28 – 29.

- ✓ Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951) Protein measurement with Folin phenol reagent. *The Journal of Biochemical Chemistry*. 193, pp 265 – 275.

- ✓ Larrauri, J.A., Sanchez-Moreno, C., Rupérez P., and Saura-Calixto, F. (1999) Free Radical Scavenging capacity in the aging of selected red Spanish wines. *J. Agric. Food Chem.* 47(4) pp. 1603-1606.

- ✓ Martínez Ochoa, M.A. (2006) *Manzana Golden (Malus sp.): Estudio para evaluar el uso alternativo de residuos como fuente de compuestos bioactivos*. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM, México, D.F. pp. 35-50.

- ✓ McHugh, T. H., Avena-Bustillos, R., and Krochta, J. M. (1993) “Hydrophilic edible films: modified procedure for water vapor permeability and explanation of thickness effects”. *Journal of Food Science*, 58(4), pp. 899–903.

- ✓ Martínez Febrer, José (1999). *Cultivo del naranjo, Limoneros y otros agrios*. 2ª edición. Editorial Sintesis, S. A. Las Fontes de Tarraza, Barcelona, España pp. 274-275.

- ✓ Matthaüs, B. (2002). Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 50(12), pp. 3444-3452.

- ✓ Montgomery, Douglas C. (2005). *Diseño y análisis de experimentos* Editorial Limusa Wiley, 2ª edición, México. pp. 96-97,182-183.
- ✓ Nerín C., Tovar L., Salafranca J. (2008) Behaviour of a new antioxidant active film versus oxidable model compounds. *Journal of Food Engineering*, 84, pp. 313-320.
- ✓ Ou, S., Kwok, K. C., & Kang, Y. (2004). Changes in vitro digestibility and available lysin of soy protein isolate after formation of film. *Journal of Food Engineering*, 64, 301–305
- ✓ Peschel W., Sánchez-Rabaneda F., Diekmann W., Plescher A., Gartzía I., Jiménez D., Lamuela-Ravento´s R. (2002). An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. *Food Chemistry*, pp. 137-150.
- ✓ Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M. y Rice-Evans C. (2009) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay”., *Free Radical Biology & Medicine*, Vol. 26, Nos. 9/10, pp. 1231–1237.
- ✓ Reyes Caudillo E. (2006). *La Chía (Salvia hispánica): fuente de fibra dietética total con propiedades funcionales y antioxidantes*, Tesis de Licenciatura., Facultad de Química, UNAM., México D.F., pp. 21-24.
- ✓ Rodarte Castrejon, A.D. (2002). *Flavonoides y su importancia en la alimentación*. Tesis Licenciatura, UNAM, México, D.F., pp. 47-50.
- ✓ Roginsky V. Liss E. (2005). Review of methods to determine chain-breaking antioxidants activity in food. *Food Chemistry*. 92 pp. 235-254.

- ✓ Seung Yong Choa, Chul Rhee, (2004). Mechanical properties and water vapor permeability of edible films made from fractionated soy proteins with ultrafiltration” Food Research International. pp. 833- 839.
- ✓ SIAP, (Sistema Integral de Información Agroalimentaria y Pesquera). Análisis agropecuario del limón, junio 2009. Consulta octubre de 2009. www.siea.sagarpa.gob.mx/infomer/analisis/anlimon.html
- ✓ Silva Navarro, Berenice, (2009). Desarrollo de biopelículas con actividad antioxidante y evaluación del factor de protección en alimentos” Tesis Licenciatura, UNAM, Facultad de Química, México, D.F. pp. 3 -77.
- ✓ Sorrentino Andrea, Giuliana Gorrasi and Vittoria Vittoria (2007). Potential perspectives of bio-nanocomposites for food packaging applications Food Science & technology 2007.
- ✓ Sothornvit, R., pitak, N. (2007). Oxygen permeability and mechanical properties of banana films. Food Research International, 40, pp. 365-370.
- ✓ Taga S., Miller E. and Pratt D.E. (1984). Chia seed as a source of natural lipid antioxidants. JAOCS, vol. 6, No. 5. pp. 123 -135.
- ✓ Tharanathan, R. N. (2003). Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. Trends in Food Science & Technology, 14(3), pp. 71- 78.
- ✓ Ubando Rivera J., A. Navarro Ocaña, M.A. Valdivia López, (2005). Mexican Lime peel: Comparative study on contents of dietary fiber and associated antioxidant activity. Food Chemistry 89 (2005) pp. 57 – 61.