



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

“Deterioro acelerado de semillas de linaza (*Linum usitatissimum L.*) durante un almacenamiento con alta humedad relativa y temperatura”.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERA EN ALIMENTOS

PRESENTA:

Yeshua Bet-el López Rosas

ASESOR: Dr. Enrique Martínez Manrique

CO-ASESOR: I.A Verónica Jiménez Vera

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN**

**DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**



ASUNTO: VOTO APROBATORIO

UNAM

ATN: DRA. MARÍA DEL CARMEN VÁLDERRAMA BRAVO

**Jefa del Departamento de Titulación
DE TITULACIÓN de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la: **Tesis y examen profesional.**

Deterioro acelerado de semillas de linaza (Linum usitatissimum L.) durante un almacenamiento con alta humedad relativa y temperatura.

Que presenta la pasante: **Yeshua Bet-el López Rosas**
Con número de cuenta: **418073287** para obtener el Título de: **Ingeniera en Alimentos.**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE

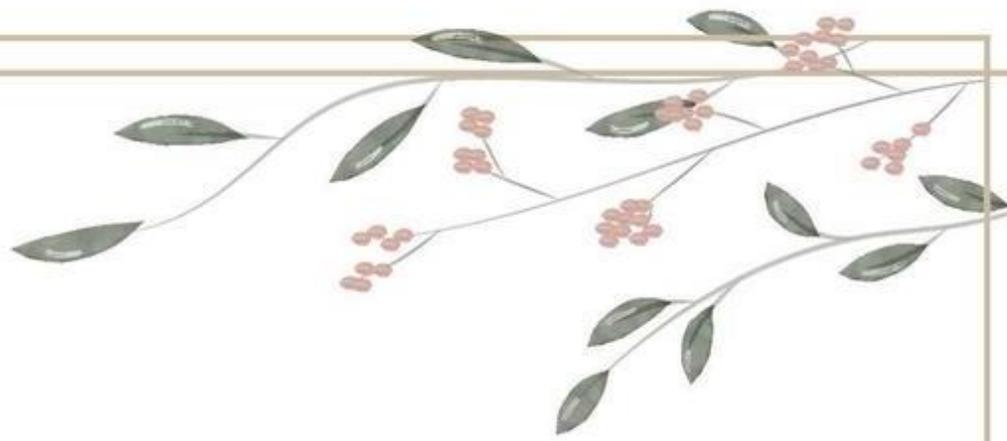
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 17 de abril de 2023.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	<u>I.A. Miriam Álvarez Velasco</u>	
VOCAL	<u>M. en C. Julieta González Sánchez</u>	
SECRETARIO	<u>Dr. Enrique Martínez Manríque</u>	
1er. SUPLENTE	<u>Dr. Ricardo Moisés González Reza</u>	
2do. SUPLENTE	<u>Dra. Samantha Alejandra Real Sandoval</u>	

NOTA: Los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.
En caso de que algún miembro del jurado no pueda asistir al examen profesional deberá dar aviso por anticipado al departamento.



Esta tesis se realizo con el apoyo del proyecto DGAPA-PAPIME 200522 "Mejoramamiento de la enseñanza teórico-practica mediante un aula y laboratorio virtuales en el Taller Multidisciplinario de Procesos Tecnológicos de Cereales de la carrera de ingeniería en alimentos de FESC-Cuautitlán".



Se agradece el apoyo del programa de cátedras de investigación "Cambios moleculares generados durante el almacenamiento de granos no convencionales en la elaboración de alimentos procesados" con clave CI 2253 de la FESC- Cuautitlán de la UNAM.



AGRADECIMIENTOS

A mi mamá **Beatriz Rosas Herrera**, con toda la alegría de mi corazón poder decirle que lo logramos señora, esto no sería posible sin ti gracias por siempre apoyarme, ser mi refugio, creer en mí y nunca soltarme en cada paso y camino que me trajo a este momento, sin duda en esta y en otras vidas elegiría ser tu hija, te amo ❤️ momi, Biachis, Betita.

A **Genaro Martínez Velazquez**, por ser un gran amigo y un soporte a lo largo de mi vida, por los consejos gracias por estar en las caídas, procesos y logros alcanzados me ha sido muy grato compartirlos contigo, no habría llegado hasta aquí sin tú presencia en mi vida.

A mis asesores de tesis **Dr. Enrique Martínez** y la **I.A Verónica Jiménez** que hicieron posible esto por compartir su conocimiento, su paciencia, interés y compromiso desde el inicio al final de este trabajo su apoyo y el ambiente de LAFIBIGRAS hicieron ameno el trayecto final de la carrera, me llevo buenos y divertidos recuerdos que estoy segura atesorare con cariño al labo 8 y a mis Lady's botella/vaquitas (**Liz, Mari, Ana, Arly, Sahi**) fue bueno compartir el laboratorio con ustedes chicas, éxito en todo lo que se propongan.

A mis amigos **Lizet Sánchez Sánchez** y **Erick Luna Flores**, sin duda los lazos más fuertes a lo largo de esta carrera me alegran demasiado, saber que conocí a personas maravillosas sin duda fueron de lo mejor que pude vivir en la Universidad, las desveladas, momentos de estrés, lagrimas, risas sobre todo las risas son los mejores. Si bien la FESC se llegó a convertir en una segunda casa sin duda fueron el mejor hogar para encontrar motivación, apoyo, fraternidad, cariño, consejo y fortaleza en temas ajenos a un salón de clase, los quiero.

A **Jorge Ivanuet Cercas Velasco** :3 porque hasta en eso la Universidad puso en mi camino a un ser extraordinario, gracias por siempre creer

en mí, apoyarme y ser comprensivo durante la carrera, de lo más especial y lindo que me puedo llevar de esta etapa, espero que la vida nos permita un eternamente siempre o un hasta que la tierra deje de existir.

A mis hermanos **David** y **Teresa** que aun en la distancia han sido una fuente de inspiración y ejemplo, los quiero no podría haber culminado sin ustedes.

A **Nina**  el amorcito de mi vida, mi mejor amiga y compañera de estudios incluso en las noches más largas de desvelo nunca dejaste que estuviera sola porque aun durmiendo en mi regazo te negabas a ir a tú camita sin mí, en los días difíciles y trayectos de regreso a casa más desastrosos el cómo me recibías siempre fue una dosis inmensa de alegría y motivación para continuar, un pedacito de todo esto es para ti te lo ganaste.

A la máxima casas de estudios **UNAM**, mi alma mater por darme los conocimientos, herramientas y aulas para poder decir con orgullo que fui formada en esta gran institución.

"Por mi raza hablara el espíritu".

INDICE GENERAL

RESUMEN	vi
INTRODUCCIÓN	vii
CAPITULO I. ANTECEDENTES	1
1.1 La linaza	1
1.1.1 Origen e historia.....	1
1.1.2 Botánica.....	1
1.1.3 Morfología de la semilla	3
1.1.4 Producción.	4
1.1.5 Composición química	7
1.1.6 Valor nutricional y beneficios a la salud de las semillas de linaza	9
1.2 Almacenamiento de granos y semillas.	13
1.2.1 Almacenamiento de granos y semillas en México.....	14
1.2.2 Deterioro de granos y semillas durante el almacenamiento.	16
1.3 ERO (Especies Reactivas de Oxígeno).....	17
1.3.1 Daños provocados por las ERO.	19
1.3.2 Red antioxidante.....	21
1.3.3 Sistema de defensa enzimático.	21
CAPITULO II. DESARROLLO EXPERIMENTAL	24
2.1 Objetivos.	24
2.1.1 Objetivo general.....	24
2.1.1.1 Objetivos particulares.....	24
2.2 Cuadro metodológico.....	25
2.3 Metodología.	26
2.3.1 Material biológico.....	26
2.3.2 Parámetros de deterioro.	26
2.3.2.1 Ensayos de germinación.....	26
2.3.2.2 Escape de electrolitos.	27
2.3.3 Análisis químico proximal.....	28
2.3.3.1 Determinación de humedad.....	28
2.3.3.2 Determinación de cenizas	29
2.3.3.3 Determinación de proteínas.....	30

2.3.3.4 Determinación de grasa .	32
2.3.3.5 Fibra cruda.	33
2.3.3.6 Determinación de carbohidratos.	35
2.3.4 Calidad nutrimental.	35
2.3.4.1 Triptófano (cuantificación).	35
2.3.4.2 Digestibilidad <i>in vitro</i> .	37
2.3.4.3 Almidón total	38
2.3.4.4 Almidón digerible.	40
2.3.4.5 Determinación de índice de peróxido en grasas y aceites.	40
2.3.5 Compuestos anti nutrimentales.	41
2.3.5.1 Ácido fítico.	41
2.3.5.2 Taninos.	42
2.3.5.3 Inhibidores de tripsina.	44
2.3.6 Calidad nutraceútica.	46
2.3.6.1 Capacidad antioxidante	46
2.3.6.2 Compuestos fenólicos.	47
2.3.6.3 Almidón resistente.	49
2.3.6.4 Fibra dietética.	51
2.3.7 Determinación de estrés oxidativo.	53
2.3.7.1 Determinación de carbonilos.	53
2.3.7.2 Determinación de malondialdehído (MDA).	55
2.3.8 Actividad enzimática.	56
2.3.8.1 Actividad de peroxidasa (POX).	57
2.3.8.2 Actividad de catalasa (CAT).	58
2.3.8.3 Actividad de superóxido dismutasa (SOD).	58
CAPITULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	60
3.1 Parámetros de deterioro.	60
3.2 Análisis Químico Proximal.	62
3.3 Calidad nutrimental.	62
3.4 Compuestos anti nutrimentales.	64
3.5 Calidad nutraceútica.	65
3.6 Determinación de estrés oxidativo.	67

3.7 Actividad enzimática.....	68
CONCLUSIONES.....	70
REFERENCIAS.....	71

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Uso cotidiano de planta de lino (Elisabel, 2015).....	1
Figura 2. a) Planta de lino (fibra); b) Planta de lino (aceite) (Deutscher Naturfaserveband, 2023; Hablemos de culturas, 2018).....	2
Figura 3. Variedad de color en semillas de linaza (Guerra, 2013).	3
Figura 4. Dimensiones características de la semilla de linaza (Modificado de Coşkuner et al., 2007).....	3
Figura 5. Morfología de la semilla de linaza: a) Corte longitudinal, b) cubierta de la semilla de lino (Modificado de Zuk <i>et al.</i> , 2015).....	4
Figura 6. Producción de linaza en el mundo 2015-2020 (FAOSTAT, 2022).....	4
Figura 7. Diez principales países productores de linaza (FAOSTAT, 2022).	5
Figura 8. Principales estados productores de linaza en México (SIAP, 2019).....	6
Figura 9. Estructura química del ácido graso omega 3 (Modificado de Losoya <i>et al.</i> , 2016).	9
Figura 10. Estructura química del ácido graso omega 6 (Modificado de Germana, 2015).	10
Figura 11. Desaturación y elongación de AL y ALA (Bockor <i>et al.</i> , 2021).	10
Figura 12. Mucilago de linaza (Mundoreishi, 2021).	11
Figura 13. Estructura del SDG (Selleckchem, 2013).	12
Figura 14. Estructura del enterodiol (Del Rio <i>et al.</i> , 2013).	13
Figura 15. Estructura de la entero lactona (Del Rio <i>et al.</i> , 2013).	13
Figura 16. Almacenamiento de granos y semillas en sacos (Embolpack, 2020).	14
Figura 17. Almacenamiento de granos y semillas a granel (Orbit Logistics, 2022).	15
Figura 18. Almacenamiento hermético de granos y semillas (Proain, 2020).	15
Figura 19. Ensilaje de granos y semillas (Lippel, 2023).	16
Figura 20. Química de las ERO, formadas por una reducción secuencial del oxígeno molecular (Desikan <i>et al.</i> , 2005).	18
Figura 21. Reacción de dismutación (Bohinski, 1991).	22
Figura 22. Descomposición del H_2O_2 y sustancias reducidas (Bohinski, 1991).	22
Figura 23. Muestras de semillas de linaza a distintos tiempo de deterioro.	26
Figura 24. Prueba de germinación: a) Cajas petri con el sustrato y las semilla; b) semillas germinadas.	27
Figura 25. Material utilizado para determinar la conductividad eléctrica en linaza.	28
Figura 26. Estufa (ARSA® modelo AR-290 AD)	29
Figura 27. Incineración de las muestras.	30
Figura 28. a) Etapa de digestión, b) destilador micro Kjeldahl.	31
Figura 29. Extracción de grasa por método Soxhlet.	33
Figura 30. Filtrado para determinar el contenido de fibra.	34
Figura 31. Lectura de pH	37
Figura 32. Hidrolisis enzimática para la obtención de almidón total.	39
Figura 33. Adición de solución férrica.	43
Figura 34. Extracción para determinar inhibidores de tripsina.	44
Figura 35. Evaporación en plancha de calentamiento.	47
Figura 36. Cambio de color amarillo a azul por reducción de polifenoles.	48
Figura 37. Reposo con etanol al 95%.	52

Figura 38. Toma de absorbancias a 366 nm.....	54
Figura 39. Lectura de absorbancia después de 30 minutos.....	55
Figura 40. Obtención del extracto enzimático para determinar POX, CAT y SOD.....	56
Figura 41. Capacidad germinativa de la semilla de linaza a distintos tiempos de deterioro.....	60
Figura 42. Pérdida de electrolitos en el agua de remojo de semillas de linaza de diferentes días de deterioro medida como conductividad eléctrica.....	61

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Producción anual en México 2016-2020 (FAOSTAT, 2022).....	6
Tabla 2. Composición química de la semilla de linaza (Modificado de Coşkuner <i>et al.</i> , 2007).....	7
Tabla 3. Composición de aminoácidos (%) de proteína aislada de linaza (Unidenigwe <i>et al.</i> , 2012).....	8
Tabla 4. Clasificación de antioxidantes (Modificado de Vaquero & Molero, 2015).....	21
Tabla 5. Análisis Químico Proximal (AQP) de linaza a distintos días de deterioro.....	62
Tabla 6. Calidad nutrimental en linaza a distintos días de deterioro.....	63
Tabla 7. Compuestos anti nutrimentales en linaza a distintos días de deterioro.....	65
Tabla 8. Calidad nutracéutica en linaza a distintos días de deterioro.....	66
Tabla 9. Determinación de carbonilos y malondialdehído (MDA) en semillas de linaza deterioradas a distintos tiempos.....	67
Tabla 10. Actividad enzimática en semillas de linaza deterioradas a distintos tiempos.....	69

RESUMEN

Para garantizar la disponibilidad de granos y semillas en la cantidad, así como con la oportunidad y calidad requeridas, es necesario recurrir a su almacenamiento y conservación. El almacenamiento se refiere a concentrar la producción en lugares estratégicamente seleccionados; en tanto que la conservación implica proporcionar a los productos almacenados las condiciones necesarias para que no sufran daños por la acción de plagas, enfermedades o del medio ambiente, evitando así mermas en su peso, reducciones en su calidad o en casos extremos la pérdida total.

El almacenamiento inadecuado de semillas de linaza provoca reacciones de deterioro, que pueden afectar las propiedades nutrimentales y funcionales; durante el desarrollo de este proyecto se sometieron semillas de linaza de la variedad linaza aceite a un deterioro controlado de 75% HR (Húmedad Relativa) y 40 °C por periodos de 0, 9,18,27,36,45 y 56 días.

Para evaluar el efecto del deterioro sobre la calidad de las semillas se llevaron a cabo pruebas de parámetros de deterioro y análisis bioquímico, posterior a esto el material biológico fue llevado a una molienda y tamizaje (Tyler #20) para tener muestras homogéneas y poder realizar un AQP (Análisis Químico Proximal) en muestras a distintos tiempos de deterioro. El efecto del deterioro influyo en el contenido de fibra cruda y CHOS (carbohidratos) lo cual se atribuye a un endurecimiento de la pared celular y un aumento en el contenido de fibra dietaría.

Se realizaron pruebas para determinar el efecto de almacenamiento inadecuado en su calidad nutrimental, componentes anti nutrimentales y componentes funcionales. Fue en el índice de peroxidación (componente nutrimental) y en la perdida significativa de capacidad antioxidante (compuesto funcional) que permitió evaluar que el efecto del deterioro actuó en el contenido de grasa principalmente ocasionando una lipoperoxidación.

De acuerdo a la determinación de estrés oxidativo las muestras de linaza a distintos tiempos de almacenamiento arrojaron concentraciones de MDA (malondialdehído) con diferencia significativa respecto a la concentración de la muestra control (0 días de deterioro) por lo cual si hubo una relación entre las condiciones de mal almacenaje con la generación de estrés oxidativo por medio de una oxidación de lípidos esto genero una actividad enzimática como sistema de defensa en las muestras a distintos tiempos siendo que catalasa fue la enzima que más presento actividad.

INTRODUCCIÓN

El valor económico, alimenticio, agrícola e industrial asociado a los granos y semillas, demanda cuidados especiales en el almacén para garantizar la conservación de su calidad; ésta debe mantenerse durante el tiempo que permanecerán en condiciones de almacenamiento y aun hasta el momento en que serán utilizados. Independientemente del tipo de almacén o de recipiente que se utilice, el producto almacenado debe mantenerse fresco, seco y protegido. Es importante no olvidar que el grano o la semilla son entes vivientes que respiran oxígeno del ambiente y producen como resultado bióxido de carbono, agua y energía que se traduce en calor; consecuentemente, en la medida en que se acelere el proceso de la respiración, lo hará también el deterioro del grano o la semilla (Hernández & Carballo, 2017).

Es sabido que unas malas condiciones de almacenaje propician el deterioro de granos y semillas ya sea por factores bióticos y abióticos y como resultado se presenten infestaciones de plagas que pueden ser mohos, micotoxinas, insectos e incluso ratas. En algunos casos es fácil detectar un deterioro por la apariencia física o por características sensoriales (Yang & Weng, 2017). Sin embargo son pocos los estudios que permitan conocer el efecto del deterioro de forma interna en los componentes químicos y bioquímicos en granos y semillas.

La degradación de la calidad ocurre en particular con productos excesivamente húmedos y calientes, y puede reconocerse por la decoloración interna y/o externa de la semilla y el olor a humedad (Coşkuner *et al.*, 2007). La linaza se ha reconocido desde tiempos prehistóricos, en Asia, norte de África, y Europa como una fuente de alimentos y su cultivo, destinado a la obtención de alimentos y fibra, es muy antiguo. Actualmente se le cultiva en alrededor de 50 países, la mayoría de los cuales están en el hemisferio norte (Figuerola *et al.*, 2008).

La linaza al ser una oleaginosa con contenidos de ácidos grasos esenciales y sus beneficios a la salud humana ha generado un mayor interés en los últimos años, sin embargo, como todas las semillas y granos, esta es almacenada después de su cosecha, para después ser distribuida, pero si este almacenamiento no es el adecuado la semilla puede sufrir diversos cambios físicos, químicos y biológicos.

Por tanto, el objetivo de este proyecto fue evaluar el efecto del deterioro por un almacenamiento inadecuado, a la linaza deteriorada se le analizaron sus propiedades nutrimentales y funcionales, así como su actividad enzimática de defensa contra el estrés oxidativo.

CAPITULO I. ANTECEDENTES

1.1 La linaza.

1.1.1 Origen e historia.

La linaza es la semilla de la planta del lino (*Linum usitatissimum* L.), que es miembro de la familia *Linaceae*. La planta no es un cultivo nuevo y es originaria de Asia Occidental y el Mediterráneo. Como fuente de fibra de lino, el lino se cultiva desde al menos 5000 a.C; hoy se cultiva principalmente por su aceite.

Los egipcios lo usaban para hacer telas en las que envolvían a sus momias, y la Biblia contiene muchas referencias a la planta que indican que el hilado y el tejido del lino eran industrias domésticas en la antigüedad (Figura 1). Además, las propiedades medicinales de las semillas eran conocidas por los griegos e Hipócrates la recomendaba para la inflamación de las mucosas (Coşkuner *et al.*, 2007).



Figura 1. Uso cotidiano de planta de lino (Elisabel, 2015).

1.1.2 Botánica.

✓ Planta de linaza.

El lino cultivado se clasifica en subgrupos de lino de aceite y lino de fibra, que muestran una diferencia significativa en la morfología y los rasgos agronómicos debido a la selección divergente histórica.

Entre estos diferentes rasgos, la altura de la planta es la más representativa, que suele ser de 80 a 120 cm en fibra de lino, mientras que en tipo aceite ronda los 70 cm. El lino de fibra (Figura 2a) tiene paja más larga, menos ramificada y más

delgada (la parte ramificada mide $\frac{1}{6}$ de la longitud total del tallo), en el lino de aceite (linaza) parte del tallo es aproximadamente $\frac{1}{3}$ de la longitud total de la planta con un sistema de raíces más pequeño (Figura 2b).

La mayor altura de la planta asegura el rendimiento del tallo de lino de fibra, mientras que el tallo más corto puede ayudar a que el lino de aceite obtenga más semillas. Por lo tanto, la altura de la planta tiene un efecto de regulación bidireccional sobre el rendimiento de lino de fibra y lino de aceite. Aunque la altura de la planta es significativamente diferente entre el lino de aceite y el lino de fibra, la base genética de la variación morfológica sigue siendo poco conocida (Guo *et al.*, 2021).

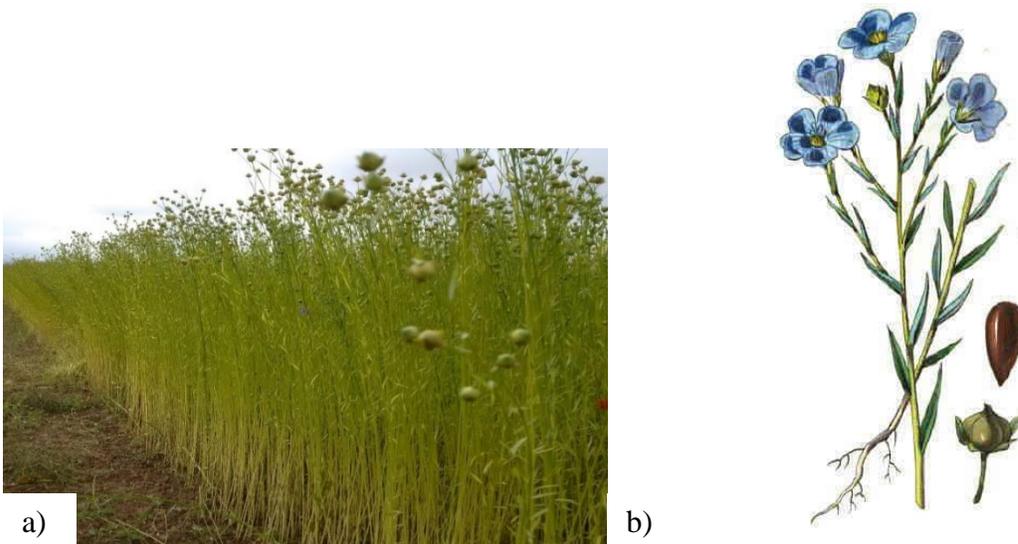


Figura 2. a) Planta de lino (fibra); b) Planta de lino (aceite) (Deutscher Naturfaserverband, 2023; Hablemos de culturas, 2018).

✓ Semilla de linaza.

Las cápsulas de fruta esféricas contienen dos semillas en cada uno de los cinco compartimentos, la semilla en sí es plana y ovalada con una punta puntiaguda de superficie lisa y brillante. Las semillas de lino varían en color desde un marrón rojizo medio hasta un amarillo claro (Figura 3). El color de la semilla está determinado por la cantidad de pigmento en la cubierta exterior de la semilla (Coşkuner *et al.*, 2007).



Figura 3. Variedad de color en semillas de linaza (Guerra, 2013).

Las dimensiones de la semilla varían aproximadamente de 3.0 a 6.4 mm de largo, de 1.8 a 3.4 mm de ancho y de 0.5 a 1.6 mm de espesor (Figura 4). Generalmente, las semillas de lino aceitoso tienen mayores dimensiones que las semillas de lino de fibra. Las semillas tienen una textura crujiente y masticable y un agradable sabor a nuez (Coşkuner *et al.*, 2007).

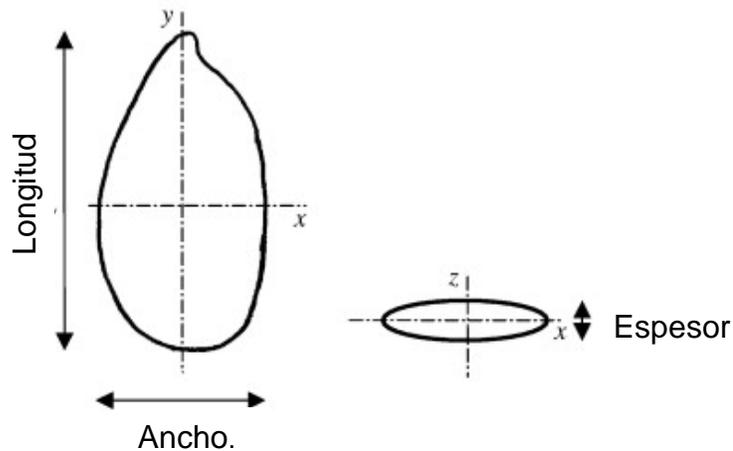


Figura 4. Dimensiones características de la semilla de linaza (Modificado de Coşkuner *et al.*, 2007).

1.1.3 Morfología de la semilla.

Se compone de una cubierta o testa, un embrión que consta de dos cotiledones grandes y aplanados, un hipocótilo corto y una radícula (Figura 5a). La cubierta de la semilla de lino se compone de cinco capas diferenciadas, siendo la más importante la capa epidérmica, conocida como capa de mucílago (Figura 5b), y la testa que se compone de células pigmentadas que determinan el color de la semilla (Zuk *et al.*, 2015).

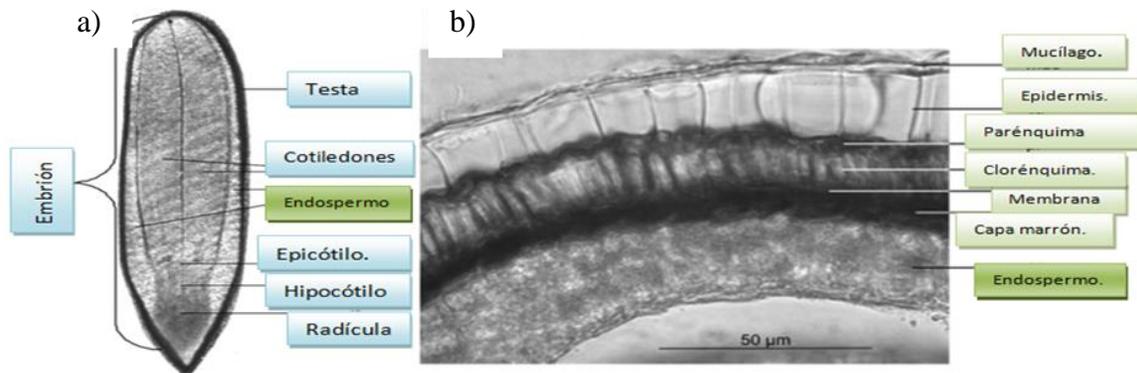


Figura 5. Morfología de la semilla de linaza: a) Corte longitudinal, b) cubierta de la semilla de lino (Modificado de Zuk *et al.*, 2015).

1.1.4 Producción.

La linaza se ha reconocido desde tiempos prehistóricos, en Asia, norte de África, y Europa como una fuente de alimentos y su cultivo, destinado a la obtención de alimentos y fibra (lino), es muy antiguo. Actualmente se le cultiva en alrededor de 50 países, la mayoría de los cuales están en el hemisferio norte (Figuerola *et al.*, 2008).

Las semillas de linaza se cultivan en diferentes partes del mundo (Figura 6), pero habrá que distinguir dos aspectos importantes:

- 1) Los linos de fibra proliferan en climas húmedos y suaves; tienen mayor altura y no se ramifican.
- 2) Los linos oleaginosos proliferan en climas templados y cálidos; son de menor altura y ramificadas .

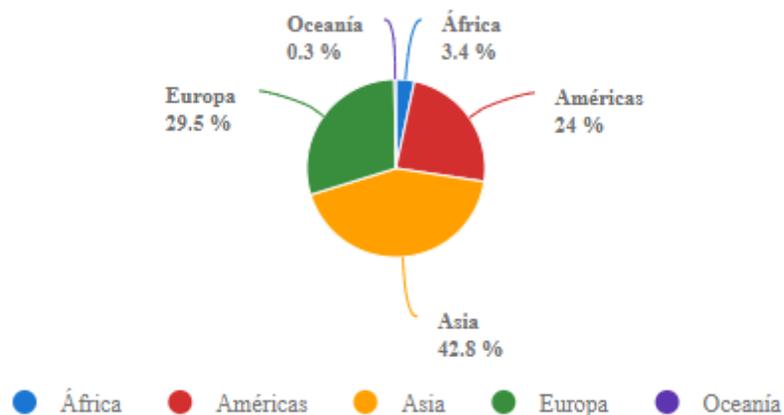


Figura 6. Producción de linaza en el mundo 2015-2020 (FAOSTAT, 2022).

Producción de Linaza: los 10 productores principales

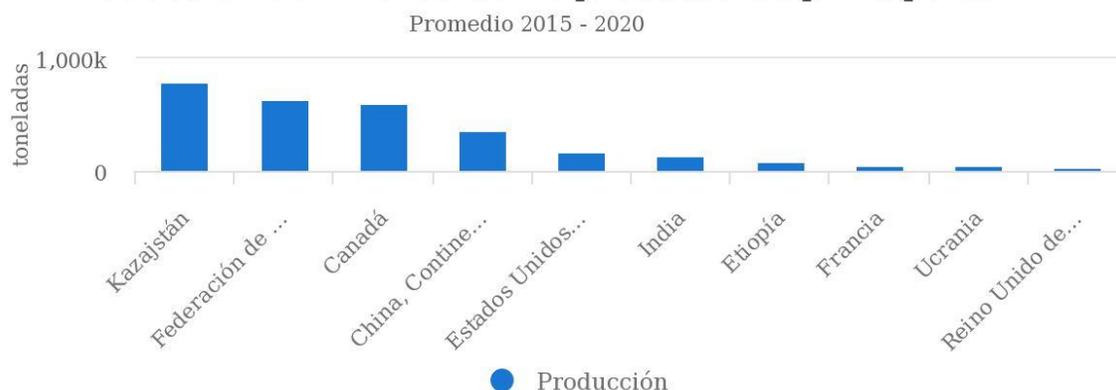


Figura 7. Diez principales países productores de linaza (FAOSTAT, 2022).

En 2020 Kazajstán fue el principal productor de linaza en el mundo con 1,058,247 toneladas (31.4%), seguido por Federación de Rusia con 787,923 toneladas (23.4%) y Canadá con 578,000 toneladas (17.2%), por lo que estas 3 naciones representaron el 72.0% de la producción mundial (Figura 7).

Además, Kazajstán (1,342,518 hectáreas), Federación de Rusia (973,411 hectáreas) y Canadá (371,000 hectáreas) fueron los países con mayor superficie cosechada, con el 37.9%, 27.5% y 10.5% del total mundial, respectivamente, teniendo en conjunto el 75.9% de la superficie mundial de este cultivo.

Mientras tanto, Bélgica, Grecia y Túnez fueron los países con el mayor rendimiento promedio, con 90.9, 3.3 y 3.3 toneladas por hectárea, respectivamente, por lo que superaron en 9,457.4%, 250.4% y 241.7% el rendimiento promedio mundial, que fue de 1 toneladas por hectárea (FAOSTAT, 2022).

La mayor o menor superficie que se siembra con linaza en México es influida por el precio a que se cotice la semilla en el mercado internacional y por los requerimientos de la industria (SIAP, 2019).

En nuestro país los estados productores son (Figura 8):

- ✓ Estado de México.
- ✓ Tamaulipas.
- ✓ Jalisco.
- ✓ Oaxaca.
- ✓ Chiapas.
- ✓ Veracruz.

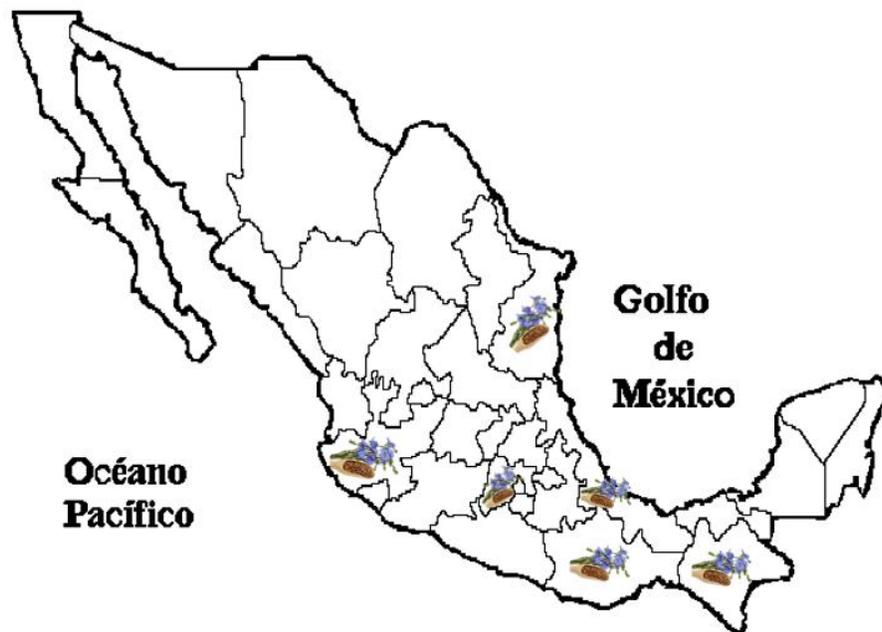


Figura 8. Principales estados productores de linaza en México (SIAP, 2019).

Siendo el Estado de México el que destaca en la producción de linaza ornamental (manejo), con casi 2 mil toneladas (SIAP, 2019).

No se encuentran registros de la producción durante la pandemia de covid-19, sin embargo la producción de 2016-2020 (Tabla 1) muestran que la linaza no es un cultivo muy popular en México, en este lapso la producción se vio en aumento y podría ser por el interés que se ha tenido por sus beneficios a la salud humana en los últimos años o el interés industrial en la obtención de aceite.

Tabla 1. Producción anual en México 2016-2020 (FAOSTAT, 2022).

Año	Producción anual de linaza (Ton).
2016	4
2017	4
2018	4
2019	8
2020	6

1.1.5 Composición química.

La linaza es rica en grasas, fibra dietética y proteínas, pero pobre en almidón (Tabla 2). Las semillas de lino también contienen cantidades sustanciales (5-8%) de material mucilaginoso de fibra soluble y tienen una alta capacidad de retención de agua y muestran propiedades funcionales similares a las de la goma arábiga (Coşkuner *et al.*, 2007).

Tabla 2. Composición química de la semilla de linaza (Modificado de Coşkuner *et al.*, 2007).

Componente	%
Humedad	6
Proteína	20
Grasa	30
Cenizas	3
Fibra	20
CHOS	21

Grasas: Nutricionalmente, los lípidos de linaza son el componente químico más atractivo de la linaza debido a su balance favorable de ácidos grasos poliinsaturados, monoinsaturados y saturados. Dentro de los ácidos grasos poliinsaturados, está el α -linolénico (alrededor del 55%) y ácido linoleico (alrededor del 14%), así como una proporción moderada de ácidos grasos monoinsaturados, siendo principalmente el ácido oleico (18%). Una pequeña cantidad de ácidos grasos saturados, principalmente ácido palmítico (alrededor del 5%) y ácido esteárico (alrededor del 3%). La fracción lipídica de la linaza también contiene una pequeña proporción de derivados del grupo de la vitamina E (por ejemplo, tocoferol y tocotrienol), esteroides y pigmentos carotenoides como la luteína (Morris & Vaisey-Genser, 2003).

Proteínas: Al igual que la proteína de soya, la proteína de linaza tiene un alto contenido de ácido aspártico, ácido glutámico, leucina y arginina (Tabla 3). Sin embargo, la proteína de linaza es pobre en aminoácidos que contienen azufre, que son metionina y cisteína. La relación porcentual del aminoácido esencial al total en la proteína de linaza está muy por encima de la relación porcentual del 36% para las proteínas, lo que brinda un gran potencial para la utilización de la linaza como una fuente de proteínas (Bekhit *et al.*, 2018).

Tabla 3. Composición de aminoácidos (%) de proteína aislada de linaza (Unidenigwe *et al.*, 2012).

Aminoácidos	%
Ácido aspártico	11.29
Treonina	3.67
Serina	4.34
Acido glutámico	19.83
Prolina	5.29
Glicina	5.47
Alanina	4.89
Cisteína	1.36
Valina	5.20
Metionina	2.02
Isoleucina	4.50
Leucina	5.80
Tirosina	2.52
Fenilalanina	5.47
Histidina	2.29
Lisina	3.04
Arginina	11.28

Carbohidratos: La mayor parte de los carbohidratos de linaza no son digeribles y consisten en fibra soluble y fibra insoluble. Aproximadamente un tercio de la fibra de linaza es soluble en agua y consiste principalmente de goma de mucílago, o conocido menos comúnmente como fibra viscosa y goma de linaza. El mucílago de linaza se encuentra en la capa más externa de la cáscara de la linaza y se lixivia fácilmente para formar una capa viscosa cuando la linaza se humedece. Los dos tercios restantes son insolubles en agua y consisten principalmente en polisacáridos no amiláceos como la celulosa y la lignina (Caballero *et al.*, 2003). Los efectos fisiológicos de la fibra se relacionan con sus propiedades fisicoquímicas y tecnológicas, como capacidad de retención de agua, capacidad de hinchamiento, viscosidad, formación de gel, capacidad de ligazón de sales biliares, las que son más útiles en la comprensión del efecto de la fibra dietética que la composición química por si sola. Estas propiedades dependen de su relación fibra insoluble / fibra soluble (Bekhit *et al.*, 2018).

1.1.6 Valor nutricional y beneficios a la salud de las semillas de linaza.

La semilla de linaza contiene diversos compuestos que pueden ofrecer beneficios para la salud tales como reducción del riesgo de desarrollo de enfermedades cardiovasculares, mitigación de los efectos de la diabetes, patologías renales, obesidad, cáncer de colon y recto, reducción del nivel de colesterol sérico y promoción de la evacuación intestinal. Por lo cual es importante destacar a la fibra dietética, los lignanos, el aceite y las proteínas.

- ✓ **α -linolénico:** Ácido graso poliinsaturado conocido como omega 3 (Figura 9) ubicado principalmente en los cotiledones de la semilla, que ha demostrado reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares; por esta razón, la linaza es una valiosa fuente de lípidos para mejorar la relación entre ácidos grasos n-6 y n-3 (Figuerola *et al.*, 2008). La linaza contiene una alta proporción de ácidos grasos poliinsaturados, como ALA (Ácido alfa-linolénico) alrededor del 55% y LA (Ácido linoleico) alrededor del 14% (Bekhit *et al.*,2018).

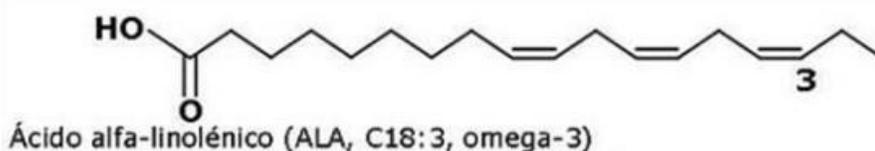
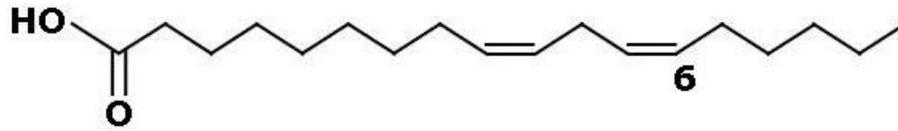


Figura 9. Estructura química del ácido graso omega 3 (Modificado de Losoya *et al.*, 2016).

Los ácidos grasos n-6 y n-3 también se conocen como ácidos grasos esenciales (AGE) porque los humanos, como todos los mamíferos, no pueden producirlos y deben obtenerlos en su dieta. Los ácidos grasos n-6 están representados por el ácido linoleico (Figura 10) y los ácidos grasos n-3 por el ácido α -linolénico. El ácido linoleico es abundante en la naturaleza y se encuentra en las semillas de la mayoría de las plantas, excepto en el coco, el cacao y la palma. El ácido alfa-linolénico, por otro lado, se encuentra en los cloroplastos de las verduras de hoja verde y en las semillas de lino, colza, chía, perilla y nueces (Simopoulos, 2005).



Ácido linoléico (LA, C18:2, omega-6)

Figura 10. Estructura química del ácido graso omega 6 (Modificado de Germana, 2015).

El LA y ALA se metabolizan a ácidos grasos de cadena más larga de 20 y 22 átomos de carbono. LA se metaboliza a (ácido araquidónico) (AA) y ALA a ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA), aumentando la longitud de la cadena y el grado de insaturación al agregar dobles enlaces adicionales al extremo carboxilo del molécula de ácido graso (Figura 12) (Simopoulus, 2005).

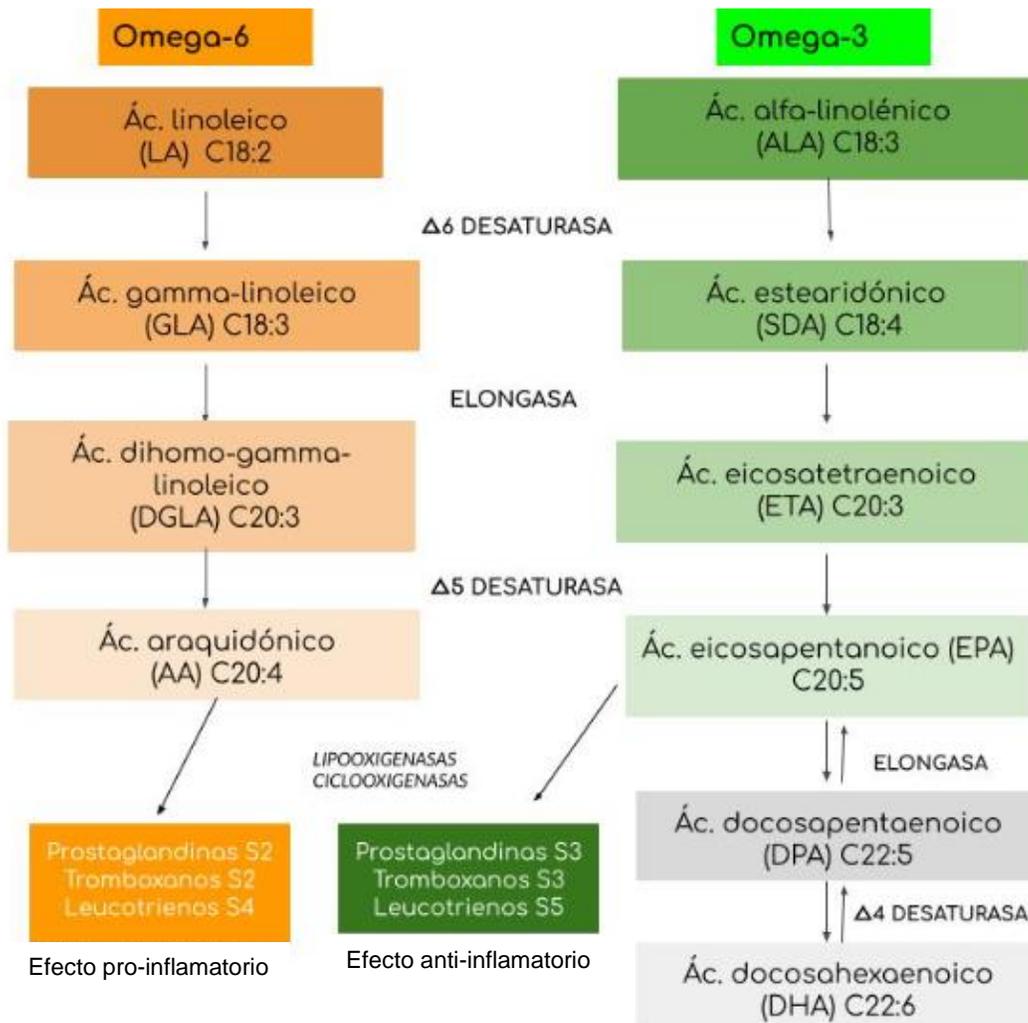


Figura 11. Desaturación y elongación de AL y ALA (Bockor *et al.*, 2021).

ALA, LA y sus derivados de cadena larga son componentes importantes en las membranas celulares, y a su vez son metabólicamente y funcionalmente distintos: con frecuencia presentan funciones fisiológicas importantes y opuestas. Tanto el AA como el EPA son los precursores de una serie de compuestos denominados eicosanoides, cuyo origen está dado por la oxidación de dichos ácidos grasos. Entre estos compuestos se encuentran prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanos, leucotrienos (Figura 11) y lipoxinas, los cuales están involucrados en diversas acciones fisiológicas. Los eicosanoides derivados de omega 6 y de omega 3 presentan funciones muy distintas. Los eicosanoides derivados de AA están asociados con una acción proinflamatoria y proagregatoria, y también actúan como vasoconstrictores. Son biológicamente activos en bajas cantidades pero pueden contribuir a la formación de ateromas, trombos o desórdenes inflamatorios y alérgicos, especialmente en individuos susceptibles, si se producen en cantidades mayores. Por otro lado, los compuestos derivados de EPA son menos activos y están asociados a un efecto antiinflamatorio, actuando como vasodilatadores y antiagregantes; es decir, pueden parcialmente oponerse o antagonizar la acción proinflamatoria de los eicosanoides derivados de AA, manteniéndose un equilibrio entre ellos (Bockor *et al.*, 2021).

- ✓ **Fibra dietética:** La linaza tiene, en las capas externas de la semilla, una gran cantidad de fibra dietética (28% de su peso), con una relación de 75% de fibra insoluble y 25 % de fibra soluble o mucílago (Figura 12). La alta viscosidad de esta fibra promueve la evacuación, reduce el riesgo de cáncer de colon y recto, ayuda a reducir el colesterol sérico y la obesidad y puede afectar la secreción de insulina y el mecanismo de mantención de la glucosa en el plasma (Figuerola *et al.*, 2008).



Figura 12. Mucilago de linaza (Mundoreishi, 2021).

- ✓ **Compuestos fenólicos:** Estos compuestos a menudo se asocian con diversos beneficios para la salud, principalmente debido a su actividad antioxidante. Los polifenoles como los ácidos fenólicos y los flavonoides exhiben propiedades terapéuticas tales como efectos antimicrobianos, antiinflamatorios, antitrombóticos, antialérgicos, antioxidantes y vasodilatadores (Bekhit *et al.*, 2018).
- ✓ **Lignanos:** La linaza es la fuente alimenticia más rica en los precursores de lignanos, diglucósido de secoisolariciresinol (SDG) (Figura 13) y materesinol, los cuales son fitoestrógenos que por acción del ácido gástrico y de la glucosidasa bacteriana (de aeróbicos facultativos del género *Clostridia*) del tracto digestivo, se transforman en enterodiol (Figura 14) y enterolactona (Figura 15), respectivamente, conocidos como lignanos de los mamíferos. Estos últimos poseen mayor capacidad antioxidante; la actividad antioxidante del lignano de la linaza (SDG) está relacionada con la supresión de las condiciones oxidantes de las especies reactivas de oxígeno. Debido a que estas sustancias han mostrado tener efectos anticáncer, se sugiere que el consumo de linaza reduciría el riesgo de desarrollar cáncer de pecho y de próstata así como su acción antioxidante reduciría el riesgo de las enfermedades coronarias (Figuerola *et al.*, 2008).

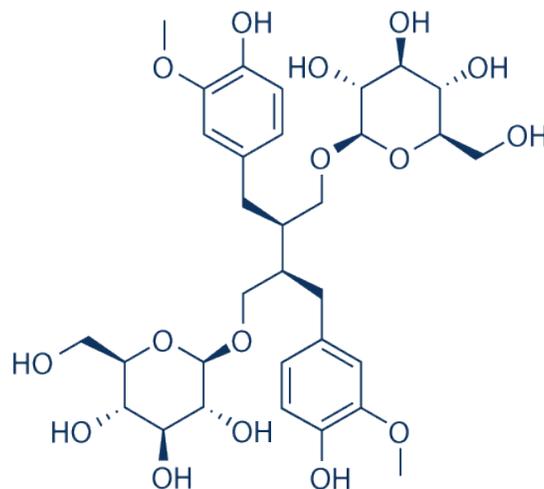


Figura 13. Estructura del SDG (Selleckchem, 2013).

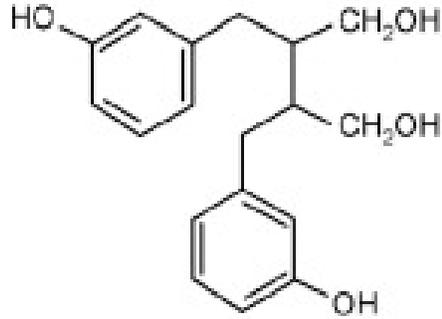


Figura 14. Estructura del enterodiol (Del Rio *et al.*, 2013).

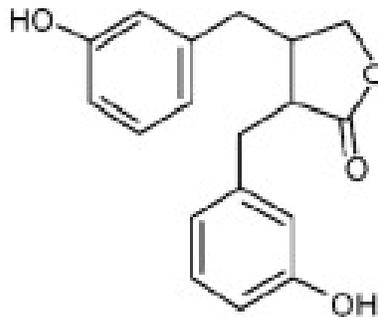


Figura 15. Estructura de la entero lactona (Del Rio *et al.*, 2013).

1.2 Almacenamiento de granos y semillas.

La función de un almacén es proporcionar a los granos y semillas toda la protección posible contra los factores adversos del medio ambiente, para garantizar su conservación adecuada a corto y largo plazo (Ramírez, 1981).

Aproximadamente el 20% de los granos se pierden anualmente durante el almacenamiento y, además de la pérdida física, los granos pierden calidad para su posterior procesamiento y pueden desarrollar micotoxinas dañinas que dañan la salud humana y animal. Las instalaciones de almacenamiento en todo el mundo se han calculado en menos del 65% de toda la producción, lo que indica una falta de infraestructura, especialmente en los países en desarrollo. Hasta el 70 % de los cultivos de reserva de alimentos del mundo todavía se almacenan al aire libre en sacos apilados en plataformas de tierra elevadas o se almacenan en sacos en galerías. Solo alrededor del 20% se almacena en silos modernos (Saldívar & García-Lara, 2016).

La clave para mantener los granos y semillas en condiciones óptimas es el control de su humedad. Cuando la humedad supera el nivel permitido, se activa el aumento de la tasa de respiración. Los cereales y semillas almacenados tienen latencia, es decir, respiración limitada, cuando se mantienen bajo su contenido crítico de humedad (considerado 14%). Además, por debajo de esta humedad crítica, las plagas tienen más problemas para reproducirse y sobrevivir (Saldívar & García-Lara, 2016).

1.2.1 Almacenamiento de granos y semillas en México.

La conservación apropiada de granos y semillas en un almacén depende de las condiciones ecológicas, del tipo de bodega o almacén disponible, así como el tipo de grano y el tiempo de almacenamiento.

El almacenamiento se hace porque los granos y semillas no se consumen o utilizan de manera inmediata después de la cosecha, estos demandan cuidados especiales por su valor económico, alimenticio, agrícola e industrial por lo que resulta necesario recurrir a su almacenamiento y conservación. Estos son almacenados para su posterior consumo o distribución.

Existen diferentes métodos de almacenamiento, pero en todos ellos es imprescindible el empleo de lugares secos, limpios y libres de plagas, esto permitirá la conservación de granos y semillas enteras, sanas y sin impurezas.

En México algunos de los métodos de almacenamiento de mayor uso son:

- Almacenamiento en sacos: que son hechos de yute, henequén, fibras locales y sintéticas (Figura 16). Su manejo es fácil y permite el almacenaje en la casa del agricultor, pero su rotura ocasiona pérdidas y facilita la infestación por plagas.



Figura 16. Almacenamiento de granos y semillas en sacos (Embolpack, 2020).

- Almacenamiento a granel: es una práctica común, este método es mecanizable y la manipulación de granos y semillas es rápida, la posibilidad de ataque por roedores aumenta y hay poca protección contra la reinfestación (Figura 17).



Figura 17. Almacenamiento de granos y semillas a granel (Orbit Logistics, 2022).

- Almacenamiento hermético: consiste en almacenar en recipientes que evitan la entrada de aire y humedad al producto (Figura 18), es de larga duración y evita el deterioro y las plagas.



Figura 18. Almacenamiento hermético de granos y semillas (Proain, 2020).

- Los almacenes para grandes volúmenes: cuentan con instalaciones mecánicas (Figura 19) que aseguran un adecuado manejo y una eficiente conservación de granos que dura desde uno hasta varios años (Agropecuarios, s.f).



Figura 19. Ensilaje de granos y semillas (Lippel, 2023).

1.2.2 Deterioro de granos y semillas durante el almacenamiento.

El deterioro de las semillas es uno de los factores que contribuyen al incremento de los costos de producción de los cultivos (Moreno, 1995).

El deterioro de la semilla es la pérdida de calidad, viabilidad y vigor de la semilla debido al efecto de factores ambientales adversos. Varias condiciones o factores pueden disminuir la calidad de las semillas pero las causas básicas son la temperatura, la humedad relativa, el contenido de humedad de la semilla, la invasión de microorganismos e insectos y el daño a los tejidos. La pérdida completa de calidad se refiere a la incapacidad de las semillas para reanudar el crecimiento activo después de la hidratación (Yang & Weng, 2017).

El deterioro puede analizarse por dos características inevitable e irreversible.

- Inevitable: una semilla nunca presentara la misma calidad de un día a otro, pero puede ser controlada mediante técnicas adecuadas de almacenamiento.
- Irreversible: cuando una semilla muere, es imposible revivirla, sea cual sea el tratamiento aplicado.

El deterioro intrínseco, es causado por la actividad metabólica resultante de la respiración, las semillas son organismos conformados por células vivas que respiran para producir la energía necesaria para sus procesos metabólicos y requieren la presencia de oxígeno. La presencia de oxígeno en almacén promueve procesos de respiración y con ello reacciones bioquímicas de deterioro que pueden provocar daño de semillas por la formación de especies reactivas de oxígeno, las cuales provocan daño celular (Ramírez, 1981).

El deterioro extrínseco, es causada principalmente por insectos, seguida por mohos. Los roedores y las aves también juegan un papel importante, especialmente en las instalaciones de almacenamiento al aire libre. Todos estos agentes bióticos provocan pérdidas directas e indirectas. El daño indirecto se debe a fragmentos de insectos, heces, pelos y heces de roedores y excrementos de pájaros que pueden contaminar un lote determinado de grano con bacterias patógenas. La presencia de estos contaminantes está muy penalizada por las agencias reguladoras (Yang & Weng, 2017).

Además de los síntomas visuales, se sabe que el deterioro es el resultado inicial de alteraciones deletéreas en la fisiología y bioquímica celular. Uno de los índices utilizados para evaluar el estado de deterioro es la reducción del poder germinativo de las semillas. También se han empleado índices de vigor más precisos, basados en alteraciones fisiológicas, variación de enzimas específicas, en el metabolismo respiratorio, en la síntesis de proteínas y carbohidratos, en lixiviación de sustancias y degradación de compuestos almacenados en las semillas. El proceso de deterioro de las semillas es complejo existen varias teorías que han sido propuestas para explicar las causas del deterioro, sin embargo, es probable que ninguno de los mecanismos de manera individual sea responsable por el deterioro de la semilla y más bien se den contribuciones parciales, de tal forma que el deterioro sea el resultado de la interacción de varios de estos mecanismos (Silva, 1993).

1.3 ERO (Especies Reactivas de Oxígeno).

Las semillas son organismos conformados por células vivas que respiran para producir la energía necesaria para sus procesos metabólicos y requieren la presencia de oxígeno. La presencia de oxígeno en almacén promueve procesos de respiración y con ello reacciones bioquímicas que forman especies reactivas de oxígeno (ERO) que provocan daño celular en las semillas (Ramírez, 1981).

El oxígeno presenta una naturaleza dual con potenciales efectos tóxicos y benéficos inherentes a su estructura y a la capacidad de presentar reacciones químicas. Estos efectos aparecen cuando el oxígeno sufre cambios en su estructura debido a reducciones parciales o transferencias de energías de excitación, dando origen a las especies reactivas de oxígeno.

Las ERO (especies reactivas de oxígeno) comprenden tanto radicales libres (anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo) (Figura 20) como moléculas

neutras y su generación inicia con la reducción parcial del oxígeno molecular a través de la transferencia de un electrón durante la ruta de la fosforilación oxidativa, generando el anión radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), que en un ambiente biológico, es transformado enzimáticamente a peróxido de hidrógeno (H_2O_2), a partir de la enzima superóxido dismutasa; posteriormente, considerando la presencia de metales como el Fe^{2+} y Cu^+ a través de la reacción de Fenton con la participación del peróxido de hidrógeno se podría formar el radical hidroxilo ($\bullet OH$) (Del R & Volke, 2012).

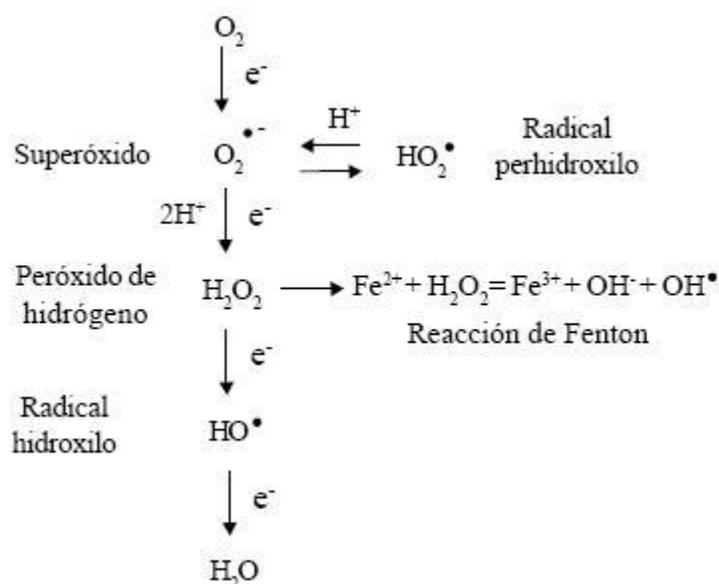


Figura 20. Química de las ERO, formadas por una reducción secuencial del oxígeno molecular (Desikan *et al.*, 2005).

Las ERO se forman dentro y fuera de las células, con funciones específicas dentro del metabolismo celular tales como la interpretación de señales celulares, expresión de genes, protección inmunológica, respiración celular, entre muchas otras funciones. Esta característica coloca a los ERO como moléculas fundamentales en el desarrollo normal de las células (Ortiz *et al.*, 2020).

El incremento descontrolado en la concentración de las ERO lleva al estado de estrés oxidativo. El incremento en la concentración de los ERO se puede originar por una sobre activación de las rutas de generación de ERO o por la inhibición de las rutas responsables de su consumo. La consecuencia directa es el daño a estructuras celulares debido a la peroxidación de lípidos, oxidación de proteínas y componentes del ADN, así como la interrupción de rutas metabólicas (Del R & Volke, 2012, Ortiz *et al.*, 2020).

1.3.1 Daños provocados por las ERO.

Estas ERO normalmente se producen durante el metabolismo y, en ausencia de mecanismos de defensa adecuados, las ERO pueden atacar el ADN, las proteínas y los lípidos (Desikan *et al.*, 2005).

Peroxidación Lipídica.

El desequilibrio prooxidante/antioxidante intracelular conduce al estrés oxidativo, lo que resulta en la peroxidación lipídica. La peroxidación de lípidos conduce a la generación de productos de peroxidación, que a su vez pueden intensificar las reacciones de radicales libres no específicas. El proceso de peroxidación lipídica consta de tres etapas, iniciación, propagación y terminación, en las que el estrés oxidativo sirve como fase de iniciación (Desai & Rai, 2014).

Las ERO que inician la peroxidación lipídica incluyen el propio oxígeno, el superóxido, el peróxido de hidrógeno, los iones de metales de transición y el radical hidroxilo. Aunque el superóxido es un radical libre, no es una especie particularmente dañina y no parece ser capaz de iniciar la peroxidación lipídica. Su mayor importancia es como fuente de peróxido de hidrógeno y como reductor de iones de metales de transición. El peróxido de hidrógeno no es un radical libre pero entra en la categoría de ERO. Es una fuente de radicales hidroxilo. En presencia de iones de metales de transición reactivos, el peróxido de hidrógeno puede descomponerse fácilmente para producir el radical hidroxilo, el radical libre de oxígeno más reactivo y dañino que atacará a la mayoría de las moléculas biológicas e iniciará la peroxidación lipídica a velocidades controladas por difusión. La peroxidación de los lípidos puede perturbar el ensamblaje de la membrana, provocando cambios en la fluidez y permeabilidad, alteraciones del transporte de iones e inhibición de los procesos metabólicos. El daño a las mitocondrias inducido por la peroxidación de lípidos puede resultar en una mayor generación de ERO. La alteración de la estructura de la membrana celular puede provocar además que los sistemas antioxidantes sean ineficaces. Además, la descomposición de los hidroperóxidos lipídicos produce gases de hidrocarburos (como etano y pentano), especies más radicales y aldehídos citotóxicos (Desai & Rai, 2014).

Oxidación de proteínas.

La oxidación de proteínas puede ser inducida directamente por especies reactivas de oxígeno (ERO), como el radical hidroxilo ($\text{HO}\cdot$), el radical hidroperoxilo ($\text{HOO}\cdot$),

el radical peroxilo ($\text{ROO}\cdot$), el radical alcoxilo ($\text{RO}\cdot$) y el radical superóxido anión ($\text{O}_2^{\bullet-}$). o indirectamente a través de reacciones con productos secundarios del estrés oxidativo, como el peróxido de hidrogeno (H_2O_2) y especies reactivas de nitrógeno (RNS) (Mora *et al.*, 2019).

La vía de oxidación de proteínas mediada por radicales libres puede iniciarse cuando una ERO extrae un átomo de hidrógeno de la molécula de proteína y genera un radical centrado en el carbono de la proteína ($\text{P}\cdot$) generan rápidamente radicales peroxilo ($\text{POO}\cdot$), que pueden formar derivados de hidroperóxido (POOH) con un donante de hidrógeno adecuado presente, o radicales alcoxilo ($\text{PO}\cdot$) y, en consecuencia, hidroxilo (POH) derivados (Heinonen *et al.*, 2021).

Otro mecanismo significativo de iniciación de reacciones de oxidación es la formación de radicales hidroxilo a través de sistemas catalizados por metales. Un ataque de un radical hidroxilo en el carbono α del esqueleto de la proteína puede conducir a la formación de un radical peroxilo y provocar la fragmentación del esqueleto (Hawkins & Davies, 1998).

Los aminoácidos que contienen azufre, como la metionina y la cisteína, son los aminoácidos más susceptibles a las ERO y a los lípidos oxidantes, mientras que los residuos de triptófano se oxidan rápidamente en presencia de iones metálicos. Otros residuos como tirosina , fenilalanina , prolina , histidina , lisina, treonina , arginina, leucina y valina necesitan condiciones más severas para oxidarse.

La formación de carbonilos de proteínas (aldehídos y cetonas) es la modificación más común resultante de la oxidación de proteínas. Las cadenas laterales de los residuos de prolina, lisina, arginina y treonina pueden oxidarse mediante reacciones catalizadas por iones metálicos en compuestos de carbonilo. La reacción entre los iones de metales de transición y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), a saber, la reacción de Fenton es una fuente de radicales hidroxilo altamente reactivos. Así, la presencia de hierro férrico (Fe^{3+}) puede iniciar la desaminación oxidativa de la molécula radical intermedia, convirtiendo la lisina en α -aminoadípico semialdehído (AAS), la arginina y la prolina en γ -semialdehído glutámico (GGS) y la treonina en α - ácido amino-3- cetobutírico . El Fe^{2+} resultante puede oxidar aún más otros aminoácidos a través de la reacción con H_2O_2 y formar radicales hidroxilo (Mora *et al.*, 2019).

1.3.2 Red antioxidante.

Para mantener el control oxidativo celular el organismo cuenta con un complejo sistema antioxidante basado en el engranaje funcional de compuestos enzimáticos y no enzimáticos (Tabla 4). Esta estructura se compone de elementos hidrofílicos (vitamina C, ácido ascórbico), lipofílicos (ubiquinol, vitamina E) y tioles (GSH, tiorredoxina, ácido lipoico) cuya interacción es esencial para mantener el equilibrio redox del complejo (Vaquero & Molero, 2015).

Tabla 4. Clasificación de antioxidantes (Modificado de Vaquero & Molero, 2015).

Antioxidantes enzimáticos.	Selenoproteínas.	Glutación peroxidasa (GPX). Tiorredoxina reductasa (TRX).
	Metaloproteínas.	Superóxido Dismutasa(SOD). Catalasa (CAT).
Antioxidantes no enzimáticos.	Compuestos sulfhidrilo.	Glutación (GSH).
	Vitaminas antioxidantes.	Ácido ascórbico (vitamina C). Tocoferol (vitamina E). Carotenoides (β -caroteno,licopeno,luteína).
	Polifenoles.	Flavonoides(quercetina,rutina,catequinas). Resveratrol. Hidroxitirosol.
	Lazaroides.	Melatonina. Selenio,ebseleño.

Los organismos celulares cuentan con un complejo sistema antioxidante compuesto por piezas lipo e hidrosolubles. Los antioxidantes de tipo liposoluble, cuyo arquetipo es la vitamina E, son necesarios para el control oxidativo en las membranas celulares, mientras que los antioxidantes hidrosolubles mantienen el estado redox de las fases acuosas, como el citosol o el espacio extracelular (Vaquero & Molero, 2015).

1.3.3 Sistema de defensa enzimático.

La primera línea de defensa enzimática de las células contra los resultados de degradación del estrés oxidativo comprende dos enzimas: superóxido dismutasa

(SOD) y catalasa (CAT). SOD cataliza (Figura 21) la dismutación de $O_2^{\bullet-}$ a oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno de acuerdo con la siguiente ecuación.

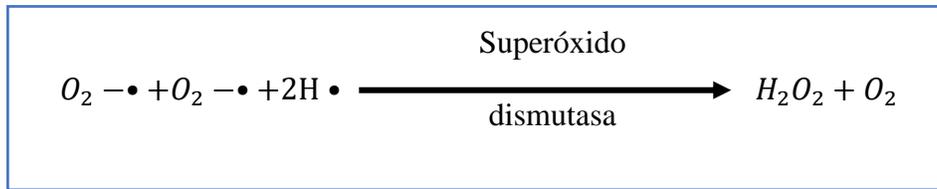


Figura 21. Reacción de dismutación (Bohinski, 1991).

El peróxido de hidrógeno, que es un producto de esta reacción, luego se descompone (Figura 22) (en oxígeno molecular y agua) mediante una catalasa, que es una enzima tetramérica que está presente en la mayoría de las células eucariotas, localizándose a nivel de los peroxisomas.

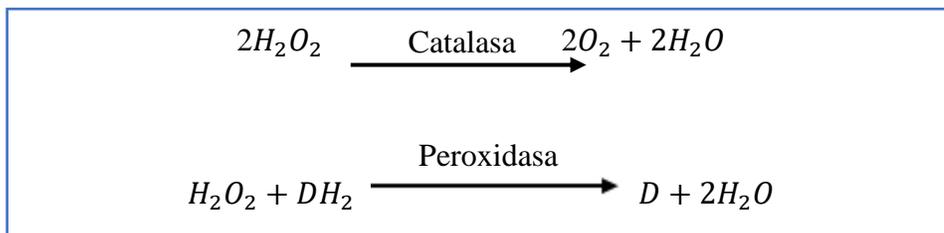


Figura 22. Descomposición del H_2O_2 y sustancias reducidas (Bohinski, 1991).

Las peroxidasa más importantes incluyen ascorbato peroxidasa (ciclo de ascorbato-glutatión) y glutatión peroxidasa (ciclo de glutatión peroxidasa). La SOD existe en forma de varios tipos de enzimas que difieren en el cofactor metálico en el sitio catalítico y se encuentran en casi todas las partes de la célula: Cu/Zn SOD en el citoplasma y los cloroplastos, Fe SOD en los cloroplastos y Mn SOD en las mitocondrias (Kraj & Warczyk, 2021).

Con base en lo antes expuesto, se sabe que la linaza es una oleaginosa que durante mucho tiempo ha tenido un interés y uso industrial más que alimenticio; pero en la actualidad ha generado un mayor interés en la alimentación humana por su contenido de ácidos grasos esenciales, además de su proteína, fibra y fitoquímicos que pueden beneficiar a la salud. Sin embargo, como todas las semillas y granos de cereales esta es almacenada después de su cosecha para después ser distribuida, queda claro que el almacenamiento es importante ya que si no es adecuado la semilla, de acuerdo a Silva. (2003), puede sufrir un deterioro que, además de los síntomas visuales en la semilla, se sabe que es el resultado inicial de alteraciones en la fisiología y bioquímica celular de la semilla y que las condiciones pueden propiciar la generación de estrés oxidativo (ERO`s).

Actualmente no se encuentran reportados estudios del efecto de un almacenamiento inadecuado en semillas de linaza. Por tanto, el objetivo de este proyecto fue evaluar el efecto del deterioro por un almacenamiento inadecuado sobre su composición química, componentes funcionales, nutrimentales y la generación de estrés oxidativo; donde las semillas se deterioraron durante periodos de almacenamiento inadecuado, que de acuerdo con Elias (1982) son condiciones de temperaturas de 40 °C y humedad relativas mayor a 65%, así como la presencia de oxígeno .

CAPITULO II. DESARROLLO EXPERIMENTAL

2.1 Objetivos.

2.1.1 Objetivo general.

Evaluar el deterioro acelerado en semillas de linaza (*Linum usitatissimum L.*) provocado por condiciones de humedad relativa y temperatura inadecuada determinando su composición química, calidad nutrimental, factores funcionales y generación de estrés oxidativo para conocer el efecto del deterioro en esta semilla.

2.1.1.1 Objetivos particulares.

Objetivo particular 1.

Obtener semillas de linaza deterioradas a distintos tiempos, almacenándolas a 75% HR y 40 °C, para evaluar su envejecimiento mediante pruebas de germinación, escape de electrolitos y un posterior análisis químico proximal (humedad, cenizas, proteínas, grasa, fibra cruda y carbohidratos).

Objetivo particular 2.

Evaluar el deterioro en semillas de linaza midiendo su digestibilidad *in vitro*, contenido de triptófano, almidón total, almidón digerible, taninos, ácido fítico, inhibidores de tripsina e índice de peróxidos para conocer el efecto en su calidad nutrimental.

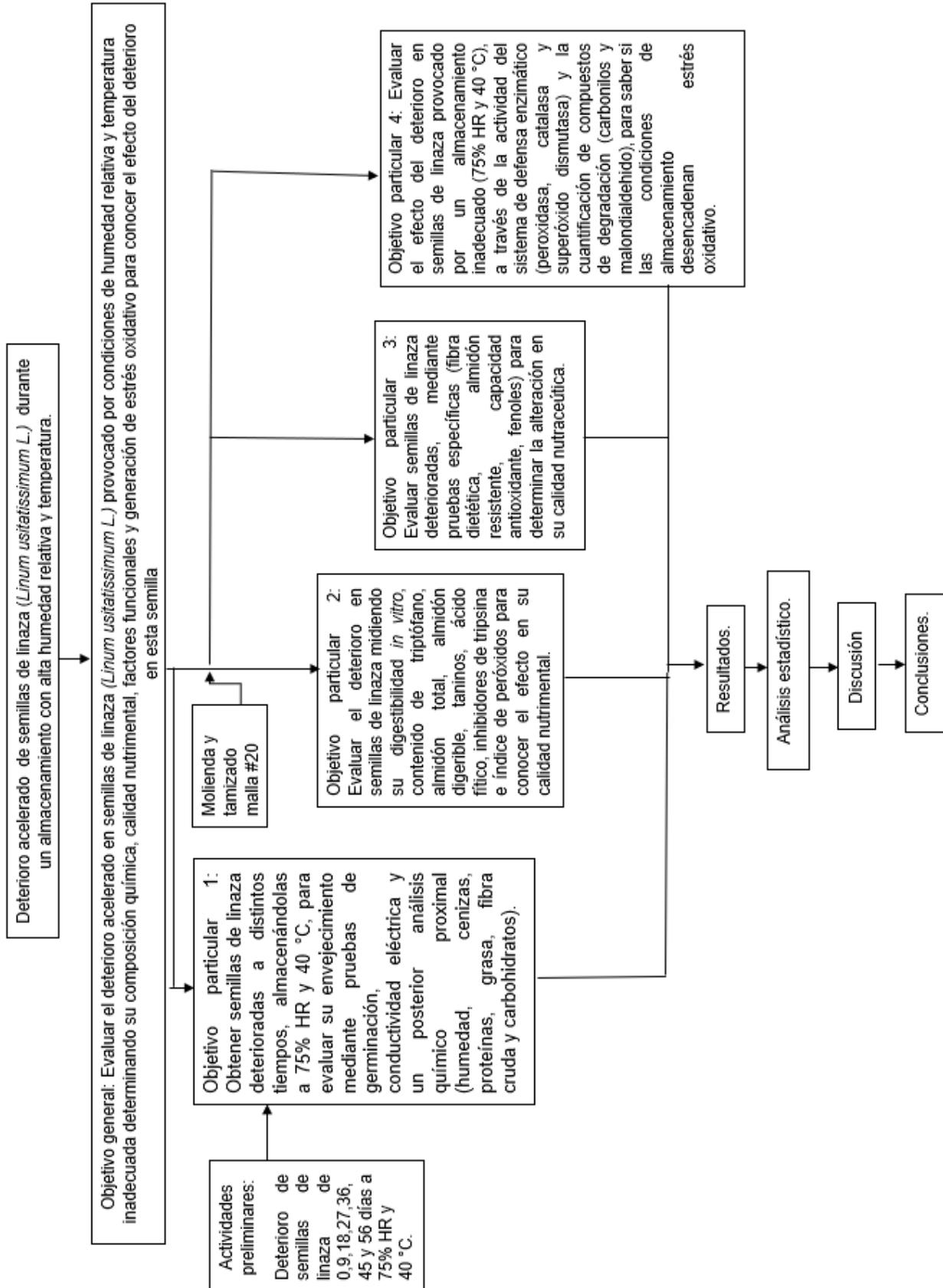
Objetivo particular 3.

Evaluar semillas de linaza deterioradas, mediante pruebas específicas (fibra dietética, almidón resistente, capacidad antioxidante, fenoles) para determinar la alteración en su calidad nutraceútica.

Objetivo particular 4.

Evaluar el efecto del deterioro en semillas de linaza provocado por un almacenamiento inadecuado (75% HR y 40 °C), a través de la actividad del sistema de defensa enzimático (peroxidasa, catalasa y superóxido dismutasa) y la cuantificación de compuestos de degradación (carbonilos y malondialdehído), para saber si las condiciones de almacenamiento desencadenan estrés oxidativo.

2.2 Cuadro metodológico.



2.3 Metodología.

2.3.1 Material biológico.

Se trabajó con la especie de linaza (*Linum usitatissimum L.*) variedad lino de aceite, cosecha 2019. Estas semillas de linaza se sometieron a un deterioro acelerado. Para deteriorar las semillas, se colocaron en recipientes herméticos, que en la parte inferior contenían una solución saturada de NaCl (78.4 g de sal de grano en 200 mL de agua desionizada) esto para generar 75% HR y en la parte superior, se colocaron las semillas sobre una malla de plástico para evitar el contacto con la solución. Posteriormente se mantuvieron a una temperatura de 40 °C durante diferentes periodos de tiempo (9, 18, 27, 36, 45 y 56 días), además de un control de cero días de almacenamiento. Se tomaron muestras de 200 g por cada periodo de los cuales 100 g se destinaron a una molienda y 100 g de semillas entera; se colocaron en recipientes con tapa y se mantuvieron a 8 °C hasta su análisis (Figura 23).



Figura 23. Muestras de semillas de linaza a distintos tiempo de deterioro.

2.3.2 Parámetros de deterioro.

2.3.2.1 Ensayos de germinación.

Es importante realizar ensayos de germinación para poder determinar el efecto del almacenamiento inadecuado sobre la calidad de las semillas. Ya que es uno de los parámetros que se ve más afectado durante el almacenamiento.

Esta determinación se realizó de acuerdo a lo propuesto por Moreno.(1984).Donde se colocaron 50 semillas de linaza desinfectadas con una solución clorada al 1%

sobre un sustrato (papel filtro) previamente humedecido con agua desionizada y se colocaron en cajas Petri (Figura 24a) las cuales se mantuvieron a 25 °C durante 72 horas. Al término de este tiempo, se contaron las semillas germinadas (Figura 24b) y los resultados se expresaron como porcentaje de germinación.



Figura 24. Prueba de germinación: a) Cajas petri con el sustrato y las semilla; b) semillas germinadas.

2.3.2.2 Escape de electrolitos.

La prueba de conductividad eléctrica permite estimar la integridad de la membrana celular. La pérdida de la integridad de las membranas y la subsiguiente pérdida de solutos citoplasmáticos con propiedades electrolíticas son indicativas del rápido deterioro de las semillas (Tajbakhsh, 2000).

La determinación se realizó con lo propuesto por Stewart & Bewley. (1980). Midiendo la conductividad del agua de remojo de las semillas mediante un conductímetro (HI 3291 ATC Conductivity Probe Connect 1) (Figura 25), para esto Se colocaron 1.8 g de semillas de linaza en 20 mL de agua desionizada, posteriormente se incubaron por 24 horas a una temperatura de 25 °C.



Figura 25. Material utilizado para determinar la conductividad eléctrica en linaza.

2.3.3 Análisis químico proximal.

Se realizó un análisis químico proximal a las semillas, tanto control (0 días de deterioro) como las deterioradas (9, 18, 27, 36, 45 y 56 días de deterioro) mediante pruebas de humedad, cenizas, proteínas, grasa y fibra cruda de acuerdo a los métodos de la A.O.A.C. (2005) y carbohidratos por diferencia.

2.3.3.1 Determinación de humedad.

Técnica: Secado por estufa (920.53)

Fundamento: La determinación de secado en estufa se basa en la pérdida de peso de la muestra por evaporación del agua. Para esto se requiere que la muestra sea térmicamente estable y que no contenga una cantidad significativa de compuestos volátiles. El resultado se expresó como porcentaje de humedad (Nielsen, 2009).

Procedimiento: Se colocaron muestras de 3 g en cajas de aluminio (previamente llevadas a peso constante) se dejaron secar en estufa de circulación forzada de aire (ARSA® modelo AR-290 AD) (Figura 26) a una temperatura de 130 °C durante una hora, posteriormente se colocaron en un desecador por 10 minutos y se registró el peso de cada caja de aluminio en una balanza analítica, el proceso se repitió hasta llegar a un peso constante. El cálculo para la determinación de humedad se realizó con la ecuación 1, el resultado se expresó en porcentaje de humedad.



Figura 26. Estufa (ARSA® modelo AR-290 AD) .

Cálculo:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{(W_2 - W_3)}{W_1} (100)$$

Ecuación 1.

Dónde: .

W1=Peso de la muestra (g)

W2= Peso de la muestra húmeda (g)

W3=Peso de la muestra seca (g)

2.3.3.2 Determinación de cenizas.

Técnica: Método de Klemm “Cenizas totales” (923.03)

Fundamento: Descomposición de la materia orgánica por incineración. En este método toda la materia orgánica se oxida en ausencia de flama a una temperatura que fluctúa entre 550 ± 600 °C; el material inorgánico que no se volatiliza a esta temperatura se conoce como ceniza. El residuo de incineración se calcula por diferencia de peso (Hart, 1991).

Procedimiento: Se colocaron 3 g de muestra en un crisol de cerámica (previamente llevado a peso constante) el cual se colocó a fuego directo (Figura 27) para calcinar la muestra, el crisol se retiró cuando la muestra dejó de

desprender humo y el color de la ceniza fuera negro, posteriormente se introdujo a una mufla (SYRBO®, modelo thermolyne 1400) a 550 ± 600 °C durante 1 hora para después dejar el crisol fuera de la mufla por 10 minutos antes de introducirlo a un desecador por 10 minutos para poder pesar el crisol hasta alcanzar un peso constante y realizar el cálculo para esto se repitió el procedimiento a partir de volver a introducir el crisol en la mufla. Para la determinación de cenizas se utilizó la ecuación 2 , el resultado se expresó como porcentaje de ceniza.



Figura 27. Incineración de las muestras.

Cálculos:

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{(W_3 - W_2)}{W_1} (100)$$

Ecuación 2.

Dónde:

W1= Peso de la muestra (g)

W2= Peso del crisol sin muestra (g)

W3= Peso del crisol con las cenizas (g)

2.3.3.3 Determinación de proteínas.

Técnica: Método de Micro- Kjeldahl (954.01)

Fundamento: Se basa en la determinación del nitrógeno total, partiendo de la destrucción de la materia orgánica con H₂SO₄ (ácido sulfúrico) concentrado en presencia de un catalizador con calor para reducir el nitrógeno orgánico hasta

NH_3 (amoníaco), el cual queda en forma de NH_4SO_4 (sulfato de amonio) para su posterior destilación y titulación (Nielsen, 2009).

Procedimiento: Mediante el método Micro Kjeldahl y utilizando el factor de conversión 6.25. La digestión se llevó a cabo de la siguiente manera : En un matraz micro-kjeldahl se colocó 0.1 g de muestra con 1.5 g de K_2SO_4 , (sulfato de potasio), 0.2 g de CuSO_4 (sulfato de cobre) y 2 mL de H_2SO_4 concentrado, el matraz se colocó en una parrilla eléctrica durante 1.5 horas (Figura 28a) hasta obtener una solución de color azul-verdosa, se dejó enfriar y se preparó una matraz Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de (ácido bórico) al 4% y una gota de fenolftaleína al 0.1%. Se monto el equipo para la destilación (Figura 28b) en el cual se agregó la solución azul-verdosa y se adicióno 10 mL de NaOH (hidróxido de sodio) al 40% una vez recuperado el destilado en el matraz Erlenmeyer hasta alcanzar un volumen de 100 mL se detuvo la destilación y se tituló con HCl (ácido clorhídrico) 0.1 N donde los mililitros gastados fueron los utilizados en la ecuación, se realizó el cálculo y el resultado se expresó como porcentaje de proteína. La determinación de proteína se utilizó la ecuación 3 y 4, el resultado se expresó como porcentaje de proteínas.



Figura 28. a) Etapa de digestión, b) destilador micro Kjeldahl.

Cálculos:

$$\% N = \frac{(V_2 - V_1) (N)(0.014)}{W} (100)$$

Ecuación 3.

$$\% \text{ Proteinas} = (* F)(\% N)$$

Ecuación 4.

Dónde:

%N= Porcentaje de nitrógeno total

W= Peso de la muestra (g)

V1= Volumen (mL) de la solución de HCl requerido para la prueba en blanco

V2 =Volumen (mL) de la solución de HCl requerido para la muestra problema

N= Normalidad del HCl

*F= 6.25 para linaza.

2.3.3.4 Determinación de grasa.

Técnica: Método de Soxhlet (920.39)

Fundamento: Se extraen las grasas, de un modo semicontinua, con un disolvente orgánico. Se calienta y volatiliza el disolvente: a continuación, este se condensa por encima de la muestra. El disolvente gotea sobre la muestra y la empapa para extraer las grasas. El contenido de grasas se mide por el peso de la grasa extraída (Nielsen, 2009).

Procedimiento: Se colocó 3 g de muestra en pañuelos desechables de forma envolvente (obtenida de la determinación de humedad), la muestra envuelta se colocó en cartuchos de celulosa y se montó el equipo de destilación (Figura 29) que consta de un refrigerante, un colector y un matraz bola a peso constante, se puso a reflujo durante 3.5 horas (ya que la muestra contenía un porcentaje alto de grasa). Una vez pasado el tiempo se retiró el hexano y se retiró el cartucho de celulosa, se esperó a que terminara de evaporarse el hexano y quedara la grasa libre se retiró el matraz, se colocó en una estufa a 70 °C por media hora, se dejó enfriar en un desecador y se pesó. El cálculo se realizó sustituyendo en la ecuación 5, el resultado se expresó en porcentaje de grasa.



Figura 29. Extracción de grasa por método Soxhlet.

Cálculo:

$$\%Grasa = \frac{(W_3 - W_2)}{W_1} (100)$$

Ecuación 5.

Dónde:

W1= Peso de la muestra antes de la desecación (g)

W2= Peso del matraz sin muestra (g)

W3= Peso del matraz con grasa (g)

2.3.3.5 Fibra cruda.

Técnica: Wendee (989.03)

Fundamento: Es la digestión ácida y alcalina de la muestra obteniéndose un residuo de fibra cruda y sales que con calcinación posterior se obtiene la fibra cruda. Su determinación se basa en la simulación de la digestión en el organismo por tratamientos ácidos y alcalinos, separando los constituyentes solubles de los insolubles. La naturaleza química de la fibra cruda, aun cuando no está bien establecida, se considera constituida por celulosa, hemicelulosa y lignina.

Procedimiento: Se agregaron 2 g de muestra seca y libre de grasa en un vaso de precipitados de 600 mL, se adicionaron 200 mL de H₂SO₄ al 1.25%, el vaso se colocó en una parrilla, bajo un extractor de gases. Se dejó hervir durante 30 minutos pasado este tiempo se adicionaron 200 mL de NaOH al 2.5% y continuó

calentándose por 30 minutos al termino se filtró la solución usando papel filtro (puesto a peso constante), el cual se colocó en un embudo Buchner (Figura 30). Una vez que se filtró la solución, se realizaron lavados sucesivos con agua caliente, hasta eliminar el álcali (utilizando papel pH para confirmarlo) posteriormente el papel filtro se dejó secar a 110 °C hasta peso constante para pasarlo a un crisol de cerámica que se encontraba a peso constante y se incineró en un mechero, después se introdujo en la mufla a 550 °C por una hora, se dejó enfriar por 20 minutos, se pesó y así sucesivamente hasta peso constante. El resultado de la pérdida de peso fue el resultado de la fibra cruda. El cálculo se realizó sustituyendo en la ecuación 6, el resultado se expresó como porcentaje de fibra cruda.



Figura 30. Filtrado para determinar el contenido de fibra.

Cálculos:

$$\% \text{ Fibra cruda} = \frac{(W_2 - W_1) - (W_4 - W_3)}{W_5} (100)$$

Ecuación 6.

Dónde:

W1= Peso del papel filtro (g)

W2= Peso del papel filtro con residuos secos (fibra) (g)

W3= Peso del crisol vacío (g)

W4= Peso del crisol después de la incineración (cenizas) (g)

W5= Peso de la muestra (g)

2.3.3.6 Determinación de carbohidratos.

El contenido de carbohidratos se realizó por diferencia siguiendo la ecuación 7.

Cálculos:

$$\%CHOS = 100\% - (\%Proteínas + \%Humedad + \%Grasa + \%Cenizas)$$

Ecuación 7.

Dónde:

% CHOS: Porcentaje de carbohidratos.

2.3.4 Calidad nutricional.

2.3.4.1 Triptófano (cuantificación).

Fundamento: Por hidrólisis enzimática, se libera el triptófano del enlace peptídico. Este aminoácido se cuantifica en proteínas puras o péptidas, mediante técnicas colorimétricas en el cual se desarrollará color con *p*-dimetilaminobenzaldehído (DMAB) y nitrito de sodio como contraste. La lectura se realiza mediante espectrofotometría a $\lambda = 590\text{nm}$ (Rama *et al.*, 1974).

Procedimiento: La cuantificación de triptófano se desarrolló de acuerdo a lo propuesto por Rama *et al.* (1974) con algunas modificaciones para lo cual se pesó 1 g de muestra (seca y libre de grasa) y se le adicionaron 10 mL de solución de pepsina al 0.3% y se colocó en una parrilla de agitación por 3 horas a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo se adicionaron 10 mL de NaOH 0.1N y 10 mL de pancreatina al 0.4% y se dejó en parrilla de agitación por 24 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se aforo la solución a 50 mL con agua destilada y después se filtró. Se tomaron 2 mL de extracto y se le adicionaron 7.5 mL de HCl concentrado, 7.5 mL de DMBA al 0.5% y 0.5 mL de NaNO_2 al 0.2%; los cuales se dejaron reposar en la oscuridad por 15 minutos posteriormente se leyó la absorbancia con un espectrofotómetro (Jenway® modelo Genova) a 590 nm.

Cálculo:

Para poder realizar el cálculo se realizó una curva patrón de 0 a 100 mg de triptófano de la cual se obtuvo la ecuación de la recta (ecuación 8) y con ella la ordenada al origen (b) y pendiente (m) para determinar el contenido de triptófano de las muestras.

$$y = mx \pm b$$

Ecuación 8.

$$x = \frac{y - b}{m}$$

Ecuación 9.**Dónde :**

x=contenido de triptófano (mg Try)

y= absorbancia de la muestra a 590 nm

b= -0.034

m= 10.8 mg^{-1}

Sustituyendo en la ecuación 9.

$$x = \frac{y - (-0.034)}{10.8 \text{ mg}^{-1}} = \text{mg Try}$$

Ecuación 10.

Con el valor de x se realiza el cálculo para obtener el contenido de triptófano en gramos por 100 g de muestra, ecuación 11.

$$\left(\frac{x \text{ mg Try}}{1 \text{ mL}}\right) \left(\frac{25 \text{ mL}}{0.5 \text{ g}}\right) (100) = \frac{x \text{ mg Try}}{100 \text{ g muestra}}$$

Ecuación 11.

Convertir miligramos de Try a gramos de Try. Es importante conocer el dato del % de proteína para obtener los gramos de triptófano en 100 gramos de proteína (g Try/100g proteína), ecuación 12.

$$\left(\frac{x \text{ g Try}}{100 \text{ g muestra}}\right) \left(\frac{100 \text{ g muestra}}{x \text{ g proteína}}\right) (100) = \frac{x \text{ g Try}}{100 \text{ g de proteína}}$$

Ecuación 12.

2.3.4.2 Digestibilidad *in vitro*.

Fundamento: Sistema multienzimático compuesto por una solución A (tripsina, quimotripsina, peptidasa) y solución B (proteasa bacteriana). El coeficiente de correlación entre el pH a los 20 minutos y la digestibilidad aparente *in vitro* es de 0.90, con un margen de error estimado de 2.23 (Hsu *et al.*,1977).

Procedimiento: Para la experimentación de acuerdo a lo propuesto por Hsu *et al.*(1977). Se calculó la cantidad de nitrógeno total equivalente a 10 mg de nitrógeno y se le adicionaron 10 mL de agua destilada. Una vez preparada la disolución se ajustó el pH a 8 (Figura 31) con HCl 0.01N e NaOH 0.001N, posteriormente se colocó en parilla de agitación por 1 hora a 37 °C. Paralelamente se preparó la solución A y B, al término de la hora se agregó 1 mL de solución A, mientras se seguía agitando y permaneció por 10 minutos más, al termino se agregó 1 mL de la solución B y se transfirió a un baño de agua a 55 °C por 9 minutos, pasado el tiempo se transfirió durante 1 minuto al baño de agua a 37 °C, al finalizar se midió el pH y se realizó el cálculo con la ecuación 13 donde el resultado se expresó como porcentaje de digestibilidad.



Figura 31. Lectura de pH .

Cálculos:

$$\% Dig = 234.84 - 22.56 (pH)$$

Ecuación 13.

Dónde:

%Dig= Porcentaje de digestibilidad

pH= pH de la suspensión de proteína al término de la prueba.

2.3.4.3 Almidón total.

Fundamento: Consiste en cuantificar la glucosa liberada como resultado de la hidrólisis enzimática (figura 34) de amiloglucosidasa que hidroliza los enlaces glucosídicos α -(1,4) y α -(1,6) de las cadenas de amilosa y amilopectina, según el método propuesto por Goñi *et al.* (1996).

Procedimiento: La experimentación se realizó de acuerdo a Goñi *et al.* (1996). Con algunas modificaciones, para lo cual se pesó una muestra (seca y libre de grasa) de 0.05 g y se dispersó con 6 mL KOH (hidróxido de potasio) 2 mol a temperatura ambiente en parilla de agitación (Figura 32), se adicionaron 3 mL de buffer de acetato de sodio 0.4 mol pH= 4.75, posteriormente se adiciono 80 μ L de enzima amiloglucosidasa y se llevó a un baño a 60 °C durante 45 minutos. Transcurrido el tiempo, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se centrifugo por 10 minutos a 5000 rpm. Se midió la cantidad del sobrenadante (volumen), se tomó 1 mL de reactivo de glucosa oxidasa/peroxidasa (SPIREACT® glucosa-LQ) y se mezcló con 10 μ L del sobrenadante y un blanco con únicamente glucosa oxidasa/peroxidasa se dejó reposar por 20 minutos y se llevó a cabo la lectura de la absorbancia en un espectrofotómetro (Jenway® modelo Genova) a 505 nm.

Cálculos:

De una curva patrón de glucosa se obtuvo la ecuación de la recta (ecuación 8) y con ella la ordenada al origen (b) y pendiente (m) para determinar el contenido de almidón total.

Sustituyendo en la ecuación 9 tenemos:

$$x = \frac{y - (0.058)}{0.0422 \text{ mg}^{-1}}$$

Ecuación 14.

Donde:

x= contenido de glucosa (mg) en 10 μ L

y=absorbancia corregida (absorbancia de la muestra a 505 nm menos la absorbancia del blanco)

b= -0.058

m= 0.0422 mg^{-1}

Con el valor de x se realizó el cálculo con las siguientes ecuaciones para conocer el porcentaje de almidón total.

$$x_1 = \frac{(1000 \mu L)(x)}{(10 \mu L)}$$

Ecuación 15.

$$x_2 = \frac{(x_1)(mL \text{ de sobrenadante})}{(1 mL)} \left(\frac{1g}{1000 mg} \right)$$

Ecuación 16.

$$x_3 = \frac{(x_2)(100 g)}{(g \text{ de muestra})}$$

Ecuación 17.

Dónde:

x_1 = contenido de almidón total (mg) en 1 mL

x_2 = contenido de almidón total (g) en el volumen del sobrenadante.

x_3 = contenido de almidón total (g) en 100 g de muestra

Se calculó el porcentaje de almidón total:

$$\% \text{ Almidón total} = \frac{(x_3)}{(10E3)}$$

Ecuación 18.



Figura 32. Hidrolisis enzimática para la obtención de almidón total.

2.3.4.4 Almidón digerible.

Procedimiento: El contenido de almidón digerible se determinó por diferencia del almidón total menos el almidón resistente.

Cálculos:

La metodología para la determinación de almidón resistente se encuentra en las pruebas de calidad nutraceútica.

$$\%Almidón\ Digerible = (\%Almidón\ total - \%Almidón\ resistente)$$

Ecuación 19.

2.3.4.5 Determinación de índice de peróxido en grasas y aceites.

Técnica: Método de titulación (965.33)

Fundamento: Liberación del yodo de la muestra por acción del ácido acético glacial-cloroformo y su posterior valoración con tiosulfato de sodio (A.O.A.C,1995).

Procedimiento: Se pesaron 0.5 g de grasa de semillas de linaza en un matraz Erlenmeyer de 125 mL y se adicionaron 2.5 mL de una solución de ácido acético-cloroformo (3:2), se agregaron 0.05 mL de una solución saturada de yoduro de potasio y agito en oscuridad durante 1 minuto, se agregó 3 mL de agua desionizada, 0.1 mL de solución de almidón al 1% . Cuando se presentó una coloración azul intenso se procedió a titular con tiosulfato de sodio 0.01 N hasta la desaparición total del color azul.

Cálculos:

El valor de Peróxido es reportado en miliequivalentes de peróxido por kg de aceite o grasa y se calcula como sigue:

$$IP = \frac{(S)(N)(1000)}{g\ muestra}$$

Ecuación 20.

Donde:

IP= Índice de peroxidación

S= mL de tiosulfato gastados en la muestra menos los gastados en el blanco.

N= normalidad o molaridad del tiosulfato.

2.3.5 Compuestos anti nutrimentales.

2.3.5.1 Ácido fítico.

Fundamento: El extracto de una muestra se calienta con una solución de ácido férrico para liberar el contenido de hierro. La disminución del hierro (determinada colorimétricamente con 2,2-bipiridina) en el sobrenadante es la medida del contenido de ácido fítico (Haug & Lantzsch, 1983).

Procedimiento: La determinación de ácido fítico se llevó a cabo de acuerdo a lo señalado por Haug & Lantzsch.(1983) con algunas modificaciones para lo cual se pesó un muestra (seca y libre de grasa) de 0.1 g a la cual se le adicono 20 mL de HCl 0.2N y se dejó en parilla de agitación a temperatura ambiente durante 20 minutos posteriormente se centrifugo durante 15 minutos a 3000 rpm, se colocaron 0.5 mL en un tubo de ensayo y se le agrego 1 mL de sulfato férrico de amoniaco al 0.2%, se tapó el tubo y se colocó en baño de agua a 95 ± 2 °C durante 30 minutos, terminado el tiempo se retiró y se dejó enfriar a temperatura ambiente, a continuación se adicono 2 mL de 2,2-bipiridina y se agito en un vortex (Scientific Industries® modelo Genie-2) a los 30 segundos que se adicono 2,2-bipiridina se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro (Jenway® modelo Genova) a 519 nm.

Cálculos:

Se realizó una curva patrón y se graficaron los μg de P (fósforo) del ácido fítico/mL vs Absorbancia corregida, se obtuvo la ecuación de la recta (ecuación 8) y con ella la ordenada al origen (b) y pendiente (m).

Sustituyendo en la ecuación 9 tenemos:

$$x = \frac{y - (-0.03)}{0.028 \mu\text{g}^{-1}\text{mL}^{-1}}$$

Ecuación 21.

Donde:

x= contenido de fosforo del ácido fítico ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

y=absorbancia de la muestra a 519 nm

b= -0.03

m= $0.028 \mu\text{g}^{-1}\text{mL}^{-1}$

Para determinar el porcentaje de ácido fítico se utilizaron las siguientes ecuaciones:

$$P = \frac{x * E}{T} \left(\frac{1 \times 10^{-6} g}{1 \mu g} \right)$$

Ecuación 22.

$$\% \text{ Ácido fítico} = \left(\frac{P}{\frac{g \text{ muestra}}{mL HCl}} \right) (100)$$

Ecuación 23.

Donde:

x= contenido de fosforo del ácido fítico (µg/mL)

E= 660.08g (1mol de ácido fítico)

T= 185.82g (6 moles de fosforo)

P=µg de fosforo del ácido fítico/mL

2.3.5.2 Taninos.

Fundamento: Se basa en la extracción de los taninos hidrolizables y condensados (fenoles totales) mediante dimetilformamida (DMF) al 75% y la posterior reducción del ion férrico debido a los iones polifenoles con la subsiguiente formación de un complejo colorido en condiciones alcalinas, cuantificado espectrofotométricamente a 525 nm (ISO,1988).

Procedimiento: La determinación se realizó de acuerdo a la ISO.(1988). Se tomó 1 g de muestra (seca y libre de grasa) a la cual se le adiciono 20 mL de DMF y se colocó en parilla de agitación a temperatura ambiente durante 1 hora, posteriormente se dejó en reposo por 15 minutos al termino de este tiempo se centrifugó a 5000 rpm por 20 minutos. Se etiquetaron 2 tubos de ensayo, uno para la determinación y otro como blanco, a cada tubo se le agrego 1 mL del sobrenadante que previamente se centrifugo; se agregó también 1 mL de citrato férrico amoniacal al 20% (Figura 33), 5 mL de agua destilada y 1 mL de amoniaco, se agito en un vortex (Scientific Industries® modelo Genie-2), y una vez que se formó un complejo colorido se leyó la absorbancia con un espectrofotómetro (Jenway® modelo Genova) a 525 nm.



Figura 33. Adición de solución férrica.

Cálculos:

Se realizó una curva patrón y se graficó concentración de solución estándar de ácido tánico vs absorbancia, se obtuvo la ecuación de la recta (ecuación 8) y con ella la ordenada al origen (b) y pendiente (m).

Sustituyendo en la ecuación 9 tenemos:

$$x = \frac{y - (0.099)}{0.064 \text{ mg}^{-1}}$$

Ecuación 24.

Donde:

x= contenido de taninos (mg)

y=absorbancia de la muestra a 525 nm

b= 0.099

m= 0.064 mg^{-1}

Para determinar el porcentaje de taninos utilizar la siguiente ecuación:

$$\%taninos = \frac{(x) \left(\frac{1g}{1x10^3mg} \right)}{g \text{ muestra}} (100)$$

Ecuación 25.

2.3.5.3 Inhibidores de tripsina.

Fundamento: La técnica se basa en poner en contacto el extracto acuoso o diluido de una muestra con una solución estándar de tripsina, posteriormente se determina la actividad proteolítica remanente utilizando un sustrato sintético (benzoil-arginina-p-nitroanilide) (BAPNA), el cual producirá coloración, que es inversamente proporcional al contenido de inhibidores de tripsina y que se lee en el espectrofotómetro a una 410 nm (Kakade *et al.*,1974).

Procedimiento: La experimentación se realizó de acuerdo a lo propuesto por Kakade *et al.* (1974) con algunas modificaciones de manera que se pesó 1 g de muestra y se le adiciono 45 mL de NaOH 0.01N, se ajustó el pH a 9.6 ± 0.2 y se aforo a 50 mL con NaOH 0.01N, se colocó en parrilla de agitación a temperatura ambiente por 2 horas (Figura 34), transcurrido el tiempo se dejó reposar por 30 minutos ,se obtuvo el sobrenadante y se centrifugo a 5000 rpm por 5 minutos. A continuación se colocó una alícuota del extracto de 0,0.6, 1, 1.4 y 1.8 mL en tubos de ensaye y se ajustó el volumen de cada uno a 2 mL con agua destilada; se adiciono 2 mL de solución estándar de tripsina y se agito en vortex (Scientific Industries® modelo Genie-2), se mantuvo el contacto con el inhibidor de tripsina en un baño de agua de 37 °C. Posteriormente se adiciono BAPNA (benzoil-arginil-p-nitroanilida) al primer tubo y al pasar 30 segundos ,se adiciono BAPNA al segundo tubo, de esta manera hasta terminar con los cinco tubos. Se mantuvo la reacción por 10 minutos exactamente en el baño de agua, transcurrido el tiempo se añadió 1 mL de ácido acético al 30% para detener la reacción enzimática, por último se midió la absorbancia con un espectrofotómetro (Jenway® modelo Genova) a 410 nm.



Figura 34. Extracción para determinar inhibidores de tripsina.

Cálculos:

$$UT = (-)(100)$$

Ecuación 26.

$$UTI = UT_{Blanco} - UT_{cada\ uno\ de\ los\ tubos\ de\ ensayo}$$

Ecuación 27.

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{(UTI)(100)}{UT_{Blanco}}$$

Ecuación 28.

$$\frac{UTI}{mL} = \frac{UTI}{mL\ de\ extracto\ que\ se\ colocaron\ en\ cada\ tubo\ de\ ensayo}$$

Ecuación 29.

Dónde:

(-)= absorbancia de cada tubo de ensayo a 410 nm

UT= Unidades de Tripsina

UTI= Unidades de Tripsina Inhibida

Se graficó mL de extracto vs UTI para obtener la ecuación de la recta (ecuación 8) y con ella la ordenada al origen (b) y la pendiente (m).

Para determinar inhibidores de tripsina (UTI/mg) se utiliza la siguiente ecuación:

$$(m) \left(\frac{\text{volumen de aforo de la muestra}}{mg\ de\ muestra} \right) = \frac{UTI}{mg\ de\ muestra}$$

Ecuación 30.

Donde:

m= contenido de UTI/mL (la pendiente)

volumen de aforo de la muestra: Se refiere al aforo de 50mL con NaOH 0.01N que se realizó al inicio de la experimentación.

mg de muestra: Se refiere a la muestra en miligramos que se tomó para realizar la determinación (1 g).

Sustituyendo en la ecuación 30 tenemos:

$$(m) \left(\frac{50 \text{ mL}}{1000 \text{ mg}} \right) = \frac{UTI}{\text{mg de muestra}}$$

Ecuación 31.

2.3.6 Calidad nutraceútica.

2.3.6.1 Capacidad antioxidante.

Fundamento: El ensayo se fundamenta en la medición de la capacidad de un antioxidante para estabilizar el radical DPPH (2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo), esta medición puede hacerse espectrofotométricamente siguiendo el decaimiento de la absorbancia a 518 nm. La reacción de estabilización se considera que transcurre principalmente mediante un mecanismo Transferencia de Electrones (TE), con un aporte marginal de Transferencia de Átomos de Hidrógeno (TAH) (Londoño, 2012).

Procedimiento: La determinación se realizó de acuerdo a lo propuesto por Londoño (2012). Con algunas modificaciones de manera que se tomó muestra (seca y libre de grasa) de 0.1 g la cual se diluyó con 1 mL de Metanol-HCl al 1%, se llevó a un baño de agua de 95 ° C por 10 minutos , se retiró y se dejó enfriar a temperatura ambiente a continuación se centrifugo a 9000 rpm durante 10 minutos, se obtuvo el sobrenadante y se colocó en tubos eppendorf en bloque de calentamiento (Figura 35) a 65 °C hasta su total evaporación, como resultado de la evaporación se obtuvo una pastilla la cual se disolvió con 1mL de agua desionizada, se agito en vortex (Scientific Industries® modelo Genie-2) y se centrifugo nuevamente a 9000 rpm durante 10 minutos de esta manera se obtuvo el extracto del cual se tomaron 500 µL a los cuales se les agregó 500 µL de solución DPPH 120 µmol y se dejó reposar en oscuridad absoluta durante 30 minutos, posteriormente se leyó la absorbancia con un espectrofotómetro (Jenway® modelo Genova) a 518 nm, el cual fue previamente calibrado con agua; se leyó una muestra de Metanol + DPPH (500 µL de cada uno) la cual se dejó

reposar 30 minutos en oscuridad absoluta y este valor de absorbancia se tomó como control negativo que se utilizó para desarrollar el cálculo.



Figura 35. Evaporación en plancha de calentamiento.

Cálculos:

$$\%CA = \frac{(Abs. control negativo - Abs. muestra)}{Abs control negativo} (100)$$

Ecuación 32 .

Dónde:

%CA= Porcentaje de capacidad antioxidante

Abs. control negativo = Valor de absorbancia (Metanol + DPPH)

Abs. muestra = Valor de absorbancia de la muestra a analizar

2.3.6.2 Compuestos fenólicos.

Fundamento: Se basa en que los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu, a pH básico, dando lugar a una coloración azul susceptible de ser determinada espectrofotométricamente a 765 nm. Este reactivo contiene una mezcla de wolfrato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico y reacciona con los compuestos fenólicos presentes en la muestra. El ácido fosfomolibdotúngstico (formado por las dos sales en el medio ácido), de color amarillo, al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso (Figura 36), cuya intensidad es la que medimos para evaluar el

contenido en polifenoles(figura 38) (Prasad & Weigle, 1976, Ranganna, 1977, Valadez *et al.*, 1990).

Procedimiento: Para obtener el extracto el procedimiento se llevó a cabo de acuerdo a lo propuesto por Londoño. (2012) para lo cual se tomó una muestra (seca y libre de grasa) de 0.1 g la cual se diluyó con 1 mL de Metanol-HCl al 1%, se llevó a un baño de agua de 95 ° C por 10 minutos, se retiró y se dejó enfriar a temperatura ambiente a continuación se centrifugo a 9000 rpm durante 10 minutos, se obtuvo el sobrenadante y se colocó en tubos Eppendorf en bloque de calentamiento a 65 °C hasta su total evaporación, como resultado de la evaporación se obtuvo una pastilla la cual se disolvió con 1 mL de agua desionizada, se agito en vortex (Scientific Industries® modelo Genie-2) y se centrifugo nuevamente a 9000 rpm durante 10 minutos de esta manera se obtuvo el extracto.

Para la determinación de acuerdo a Prasad & Weigle. (1976), Ranganna. (1977), Valadez *et al.*, (1990). Con algunas modificaciones, se tomaron 400 µL del extracto y se le adicionaron 3570 µL de agua destilada, 250 µL de Folin-Ciocalteu se agito en un vortex (Scientific Industries® Modelo Genie-2) y se dejó en reposo durante 5 minutos, posteriormente se agregó 500 µL de Na₂CO₃ (carbonato de sodio), se agito en vortex (Scientific Industries® modelo Genie-2) y se dejó en reposo por 15 minutos, posteriormente se leyó la absorbancia con un espectrofotómetro (Jenway® modelo Genova) a 760 nm.



Figura 36. Cambio de color amarillo a azul por reducción de polifenoles.

Cálculos:

Se realizó una curva patrón de ácido gálico de la cual se obtuvo la ecuación de la recta (ecuación 8) y de ella la ordenada al origen (b) y la pendiente (m), sustituyendo en la ecuación 9 tenemos:

$$x = \frac{y - (0.065)}{3.492 \text{ mg}^{-1}}$$

Ecuación 33.

Donde:

x= contenido de fenoles (mg) en 400 μL

y=absorbancia de la muestra a 760 nm

b= 0.065

m= 3.492 mg^{-1}

Se calculó x_1 = contenido de fenoles en 1g de muestra:

$$x_1 = x \left(\frac{1000 \mu\text{L}}{400 \mu\text{L}} \right) \left(\frac{1 \text{ g}}{0.1 \text{ g}} \right) = \text{mg}$$

Ecuación 34.

$$\text{Fenoles} = \frac{(x_1)(E)}{PM} (10) = \frac{\text{mg EAG}}{\text{g muestra}}$$

Ecuación 35.

Dónde:

x_1 : contenido de fenoles (mg) en 1 g de muestra

E: 6 EAG (equivalentes de ácido gálico)

PM: Peso molecular del ácido gálico (170.2 g)

2.3.6.3 Almidón resistente.

Fundamento: Consiste en realizar una digestión enzimática en donde se hidrolizan las cadenas de almidón y almidón unido a proteínas. Posteriormente se realiza un lavado con agua, etanol y acetona para eliminar la fibra soluble quedando solamente los residuos de fibra insoluble. Se realiza nuevamente otra digestión para liberar los monómeros de glucosa, que son cuantificados por un método enzimático-espectrofotométrico (Goñi *et al.*, 1996).

Procedimiento: La determinación se llevó a cabo de acuerdo a lo propuesto por Goñi *et al.* (1996) con algunas modificaciones para esto se tomó 100 mg de muestra (seca y libre de grasa) a la cual se le agrego 10 mL de buffer de KCl-HCl

pH=1.5 y 200 μL de pepsina, se incubó en baño de agua a 40 °C durante 1 hora con agitación constante, se retiró y se dejó enfriar a temperatura ambiente, se adicionaron 9 mL de buffer Tris maleato pH= 6.9 y 1 mL de α -amilasa, se incubó durante 16 horas a 37 °C en agitación constante. Pasado el tiempo se centrifugó a 5000 rpm durante 15 minutos, se descartó el sobrenadante; el residuo se lavó dos veces con 10 mL de agua desionizada y se descartó nuevamente el sobrenadante. Al residuo se le agregaron 6 mL de KOH (hidróxido de potasio) 2 mol, la mezcla se mantuvo agitación constante durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se adicionaron 3 mL de buffer de acetato de sodio, se ajustó el pH a 4.75 (con ácido acético glacial), se agregaron 80 μL de enzima amiloglucosidasa y se colocó en baño de agua a 60 °C con agitación constante por 45 minutos, para que el almidón solubilizado se hidrolice. Pasado el tiempo, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se centrifugó a 5000 rpm durante 10 minutos, se midió el volumen del sobrenadante el dato del volumen se utilizó para realizar el cálculo, se tomaron 10 μL del sobrenadante y se trató con reactivo de glucosa, finalmente se leyó la absorbancia a 505 nm en espectrofotómetro (Jenway® modelo Genova).

Cálculos:

De una curva patrón de glucosa se obtuvo la ecuación de la recta (ecuación 8) y con ella la ordenada al origen (b) y pendiente (m) para determinar el contenido de almidón total.

Sustituyendo en la ecuación 9 tenemos:

$$x = \frac{y - (0.058)}{0.0422 \text{ mg}^{-1}}$$

Ecuación 36.

Donde:

x= contenido de glucosa (mg) en 10 μL

y=absorbancia corregida (absorbancia de la muestra a 505 nm menos la absorbancia del blanco)

b= -0.058

m= 0.0422 mg^{-1}

El porcentaje de almidón resistente se obtuvo mediante la siguiente secuencia de cálculos:

Se realizó el cálculo para determinar la concentración en 1000 μL (x_1) y posteriormente conocer la concentración de glucosa en el sobrenadante (x_2).

$$x_1 = \frac{(x)(1000 \mu L)}{10 \mu L}$$

Ecuación 37.

$$x_2 = \frac{(x_1)(\text{volumen del sobrenadante en mL})}{1 \text{ mL}}$$

Ecuación 38.

Se determinó la concentración en 100g (x_3) y posteriormente se expresó en porcentaje.

$$x_3 = \frac{(x_2)(100 \text{ g})}{0.1 \text{ g}} \left(\frac{1 \times 10^6 \mu g}{1 \text{ g}} \right)$$

Ecuación 39.

$$\% \text{ Almidón resistente} = \frac{x_3}{10^6 \mu g}$$

Ecuación 40.

2.3.6.4 Fibra dietética.

Fundamento: Se mide el contenido de fibra dietética de los alimentos usando una combinación de métodos enzimáticos-químicos y gravimétricos (Cunnif *et al.*, 1994).

Procedimiento: La experimentación se realizó de acuerdo a lo propuesto por Cunnif *et al.* (1994). Con algunas modificaciones; se efectuó la determinación de un blanco bajo las mismas condiciones descritas en el procedimiento para el análisis de las muestras.

Se tomó 1 g de muestra (seca y libre de grasa) por duplicado, la cual se colocó en un matraz Erlenmeyer de 500 mL, se adicionaron 50 mL de buffer de fosfato 0.08 mol y se ajustó el pH a 6 ± 0.02 , posteriormente se adiciono 1 mL de solución de α -amilasa, se cubrió el matraz con papel aluminio y se colocó en baño de agua dejándolo en ebullición durante 15 minutos con agitación constante, terminado el tiempo se retiró y dejó enfriar a temperatura ambiente.

Se ajustó el pH a 7.5 ± 0.02 con NaOH 0.275 mol. Se adicionó 5 mg de proteasa, se cubrió el matraz con papel aluminio y se incubó a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos con agitación continua. Se dejó enfriar y se agregaron 10 mL de HCl 0.325 mol, se ajustó el pH a 4.0-4.6 y se adicionó 0.1 mL de amiloglucosidasa, se cubrió nuevamente con papel aluminio y se llevó una segunda incubación a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos con agitación continua, se retiró y se dejó enfriar a temperatura ambiente.

Posteriormente se adicionaron 280 mL de etanol al 95% (precalentado a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$) y se dejó reposar durante 1 hora (Figura 37), terminando el tiempo se filtró con vacío y se lavó el residuo con tres porciones de 20 mL de etanol al 78%, dos porciones de 10 mL de etanol al 95% y dos porciones de 10 mL de acetona.

El contenido del papel filtro se secó hasta peso constante en una estufa de circulación forzada de aire (ARSA® modelo AR-290 AD) a $100 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, se tomó el residuo de un papel filtro para analiza proteínas mientras que al otro papel filtro con residuo se le analizaron cenizas, se discriminó el contenido de proteínas, cenizas y el blanco para el desarrollo del cálculo.

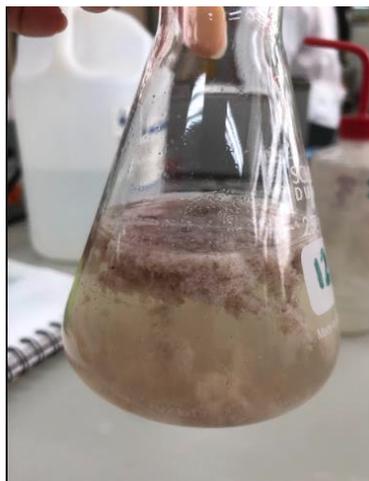


Figura 37. Reposo con etanol al 95%.

Cálculos:

$$\%Fibra\ dietética = \frac{R - (P + C + B)}{PM} (100)$$

Ecuación 41.

Dónde:

R: Peso del residuo de la muestra (mg)

P: Peso de la muestra que se usó para determinar proteínas (mg)

C: Peso de la muestra que se usó para determinar cenizas (mg)

B: Peso de la muestra que se usó en el blanco (mg)

PM: Peso de la muestra (mg)

2.3.7 Determinación de estrés oxidativo.

2.3.7.1 Determinación de carbonilos.

Extracción de proteína soluble.

Procedimiento: Se realizó de acuerdo a lo propuesto por Sun & Carl. (1995). Con algunas modificaciones para lo cual se homogeneizó 0.3 g de muestra (seca y libre de grasa) con 600 μ L de buffer de fosfatos 5 mmol pH=7.5 que contenía una mezcla de inhibidor de proteasas, se adicionaron 800 μ L de buffer de fosfatos 5mmol pH=7.5. Los ácidos nucleicos se precipitaron con 156 μ L de sulfato de estreptomicina al 2% en HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-iletanosulfónico) 50 mmol pH=7.2 ,se centrifugo la muestra a 9000 rpm durante 15 minutos, al sobrenadante se le agregaron 156 μ L de sulfato de estreptomicina y se volvió a centrifugar, el segundo sobrenadante se utilizó para la determinación de carbonilos.

Contenido de carbonilos en proteína.

Procedimiento: La determinación se desarrolló de acuerdo a lo propuesto por Levine et al. (1990). Con algunas modificaciones, para esto previamente se determinó el contenido de proteína por el método de Lowry (1951). El extracto de proteína se colocó en microtubos y se adiciono 2,4- dinitrofenilhidrazina 10 mmol en HCl 2 mol, se dejó reaccionar durante 1 hora a temperatura ambiente. El control fue tratad con HCl 2 mol, al término de la reacción, las proteínas fueron precipitadas con 500 μ L de ácido tricloroacético al 10% y se centrifugo a 4500 rpm durante 4 minutos. Los pellets se lavaron tres veces con 800 μ L de etanol-acetato de etilo (1:1) para remover impurezas y después se centrifugo a 4500 rpm durante 4 minutos. El sobrenadante fue desechado después de cada lavado.

La proteína fue disuelta con 1.5 mL de guanidina 6mol en amortiguador de fosfatos 20 mmol pH=2.5 durante 15 minutos a 37 °C. Se centrifugó la solución y al sobrenadante se le midió la absorbancia a 366 nm (Figura 38) en espectrofotómetro (Jenway® modelo Genova).

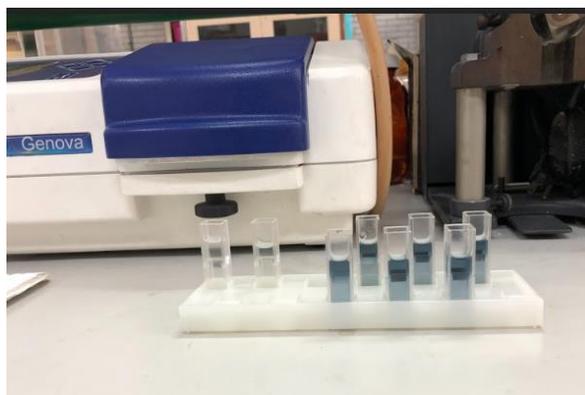


Figura 38. Toma de absorbancias a 366 nm.

Cálculo:

El contenido de carbonilos se determinó con la absorbancia, utilizando un coeficiente de absorción molar de $22000 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ en la ecuación.

$$A = abc$$

Ecuación 42 .

$$c = \frac{A}{a * b}$$

Ecuación 43 .

Dónde:

A= absorción corregida de la muestra a 366 nm (al valor de la absorción de la muestra a 366 nm se le resta el valor de la absorción control a 366 nm)

a= $22000 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ es el coeficiente de absorción

b= longitud del paso óptico (1 cm)

c= mol carbonilos/ mg de proteína

El contenido de carbonilos se expresa como $\mu\text{mol carbonilos/mg de proteína}$, por lo cual teniendo el valor de c, se realiza el siguiente cálculo (Se utilizan los datos de proteína por el método de Lowry):

$$\frac{\mu\text{mol carbonilos}}{\text{mg proteína}} = c \left(\frac{1\text{mg proteína}}{x} \right) \left(\frac{1E6\mu\text{mol}}{1\text{mol}} \right)$$

Ecuación 44 .

2.3.7.2 Determinación de malondialdehido (MDA).

Procedimiento: La determinación se realizó de acuerdo a lo propuesto por Heath & Packer. (1968) con algunas modificaciones para esto se colocaron 0.5 g de muestra (seca y libre de grasa) en microtubos, se adicionaron 5 mL de una solución de ácido tiobarbitúrico al 0.5% en ácido tricloroacético al 20%; se centrifugó la muestra a 4500 rpm durante 15 minutos, se tomó una alícuota del sobrenadante de la misma cantidad que el ácido tiobarbitúrico en ácido tricloroacético, se calentó en baño de agua en ebullición durante 25 minutos terminado el tiempo se dejó enfriar a temperatura ambiente, se centrifugó a 4500 rpm durante 1 minuto para clarificar la solución, posteriormente se leyó la absorbancia en espectrofotómetro (Jenway® modelo Genova) a 532 nm, se dejó reaccionar la solución con ácido tiobarbitúrico durante 30 minutos (Figura 39) y se volvió a leer la absorbancia pero a 600 nm.



Figura 39. Lectura de absorbancia después de 30 minutos.

Cálculos:

La cuantificación se llevó a cabo mediante la ecuación 43.

Dónde:

A= La diferencia de absorbancia a 532 nm menos la absorbancia a 600 nm

a= coeficiente de absorción molar de MDA es $155 \text{ mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

b= longitud del paso óptico es de 1 cm

c= Contenido de MDA (mmol)

El contenido de MDA se expresa en $\mu\text{mol MDA/g}$ de muestra (en el desarrollo de esta determinación se usaron 0.5 g) por lo que al realizar el cálculo el contenido de

MDA se expresó como mmol MDA /0.5 g muestra, por lo tanto teniendo el dato de c que se obtuvo al sustituir en la ecuación 43, se realizó el siguiente cálculo :

$$\frac{\mu\text{mol MDA}}{\text{g muestra}} = \frac{\text{mmol MDA}}{0.5 \text{ g}} \left(\frac{1000 \mu\text{mol}}{1 \text{ mmol}} \right) (2)$$

Ecuación 45.

2.3.8 Actividad enzimática.

El comportamiento del sistema supresor de ERO'S se cuantificó mediante la actividad de las enzimas: POX (peroxidasa), CAT(catalasa) y SOD (superóxido dismutasa), con el objetivo de conocer de qué manera influye el almacenamiento inadecuado y el estrés oxidativo sobre estos mecanismos de defensa.

Obtención de extracto enzimático.

Se homogeneizó 0.3 g de muestra (seca y libre de grasa) con 3 mL de amortiguador de fosfatos 5 mmol pH= 7.5, se centrifugó a 9000 rpm durante 15 minutos y el sobrenadante se utilizó para la determinación de las enzimas: POX, CAT y SOD (Figura 40).



Figura 40. Obtención del extracto enzimático para determinar POX, CAT y SOD.

2.3.8.1 Actividad de peroxidasa (POX).

Procedimiento: La experimentación se realizó de acuerdo a lo propuesto por Chance & Mehly (1955). Con algunas modificaciones, por lo que se preparó una mezcla de reacción que consistió en adicionar 500 μL de buffer de fosfatos 50 mmol pH=6.7, 200 μL de guaiacol 50 mmol, 200 μL peróxido de hidrógeno 10 mmol y 100 μL de extracto enzimático. Se preparó un blanco con 100 μL agua destilada en lugar de extracto. Se registraron los cambios de absorbancia en un espectrofotómetro (Jenway® modelo Genova) a 470 nm durante 5 minutos en intervalos de 5 segundos.

Cálculos:

El espectrofotómetro registra la cinética de reacción de POX, en la cinética se registra tiempo y absorbancia, en los cuales se cambia el valor de absorbancia por la concentración de H_2O_2 consumido en la generación del tetraguaiacol con la siguiente ecuación:

$$[] \text{ de } H_2O_2 = \frac{(Absorbancia)(4)}{26.6 \text{ mmol}^{-1}\text{cm}^{-1}(1 \text{ cm})} = \text{mmol de } H_2O_2$$

Ecuación 46.

Donde:

26.6 $\text{mmol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ = coeficiente de absorción molar.

4 = mmoles que se ocupan de H_2O_2 para generar el tetraguaiacol que es el compuesto colorido de la reacción

1 cm = es el diámetro de haz de luz

Se graficó tiempo vs concentración de H_2O_2 , para obtener la ecuación de la recta y el valor de la pendiente (m) que se considera como la actividad de la enzima en (mmol de H_2O_2 minuto) ,el resultado final se expresó como mmol H_2O_2 / minuto*g muestra para lo cual se realizó el siguiente cálculo.

$$\frac{\text{mmol } H_2O_2}{\text{minuto} * \text{g muestra}} = m \left(\frac{3000 \mu\text{L}}{100 \mu\text{L}} \right) \left(\frac{1 \text{ g}}{0.3 \text{ g}} \right)$$

Ecuación 47.

2.3.8.2 Actividad de catalasa (CAT).

Procedimiento: La determinación se realizó de acuerdo a lo propuesto por Aebi. (1984). Con algunas modificaciones, para esto se preparó una mezcla de reacción que consistió en adicionar 700 μL de amortiguador de fosfatos 50 mmol pH=7, 200 μL de peróxido de hidrógeno 50 mmol y 100 μL de extracto enzimático. Se preparó un blanco con agua destilada en lugar de extracto. Se registraron los cambios de absorbancia en un espectrofotómetro (Jenway® modelo Genova) a 240 nm durante 3 minutos en intervalos de 10 segundos.

Cálculos:

Con los datos de tiempo y absorbancia, se cambió el valor de absorbancia por la concentración de H_2O_2 consumido, ecuación 48.

$$[\text{H}_2\text{O}_2] = \frac{\text{absorbancia}}{(40 \text{ mmol}^{-1}\text{cm}^{-1})(1 \text{ cm})} = \text{mmol de } \text{H}_2\text{O}_2 \text{ consumido}$$

Ecuación 48.

Donde:

40 $\text{mmol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ es el coeficiente de absorción molar.

1 cm es el diámetro de haz de luz

Se graficó tiempo vs concentración de H_2O_2 para obtener la ecuación de la recta y la pendiente la cual se considera como la actividad de la enzima CAT en mmol de H_2O_2 /minuto. El resultado final se expresó como $\mu\text{mol } \text{H}_2\text{O}_2$ / minuto * g muestra para lo cual se realizó el siguiente cálculo.

$$\frac{\mu\text{mol } \text{H}_2\text{O}_2}{\text{minuto} * \text{g muestra}} = m \left(\frac{3000 \mu\text{L}}{100 \mu\text{L}} \right) \left(\frac{1 \text{ g}}{0.3 \text{ g}} \right) \left(\frac{1000 \mu\text{mol}}{1 \text{ mmol}} \right)$$

Ecuación 49.

2.3.8.3 Actividad de superóxido dismutasa (SOD).

Procedimiento: De acuerdo a lo propuesto por Misra Fridovich. (1972). La experimentación se realizó preparando una mezcla de la reacción que consistió en adicionar 650 μL de amortiguador de carbonatos 50 mmol pH= 10.2, 200 μL de EDTA 0.5 mmol, 100 μL extracto enzimático y 50 μL de epinefrina (10 mg/mL), se

preparó un blanco con agua destilada en lugar de extracto. Se registraron los cambios de absorbancia en un espectrofotómetro (Jenway® modelo Genova) a 480 nm durante 3 minutos en intervalos de 10 segundos.

Cálculos:

$$[]_{\text{adenocromo}} = \frac{\text{absorbancia}}{(4 \text{ mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1})(1 \text{ cm})} = \text{mmol de adenocromo}$$

Ecuación 50.

Donde:

4 mmol⁻¹ cm⁻¹ = es el coeficiente de absorción molar

1 cm = es el diámetro de haz de luz

Se graficó tiempo vs concentración de adenocromo para obtener la ecuación de la recta y la pendiente la cual se considera como la actividad de la enzima SOD en mmol de adenocromo / minuto. El resultado final se expresó como μmol adenocromo / minuto*g muestra para lo cual se realizó el siguiente cálculo.

$$\frac{\mu\text{mol adenocromo}}{\text{minuto} * \text{g muestra}} = m \left(\frac{1 \text{ g}}{0.3 \text{ g}} \right) \left(\frac{1000 \mu\text{mol}}{1 \text{ mmol}} \right)$$

Ecuación 51.

2.4 Métodos estadísticos.

Las pruebas se realizaron por triplicado; calculando su media, desviación estándar y coeficiente de variación. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) utilizando el paquete estadístico Origin 6, mediante comparación de medias con la prueba t - student con nivel de significancia de α=0.05.

CAPITULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Parámetros de deterioro.

Las semillas de linaza disminuyeron su capacidad germinativa conforme pasaba el tiempo de almacenamiento inadecuado hasta casi perderla por completo a los 56 días de deterioro, existiendo diferencia estadísticamente significativa ($P \leq 0.05$) a partir del día 27 con el control (Figura 41). De acuerdo con Santos *et al.*, (2005) la reducción de la capacidad de germinación a causa del deterioro se da por el daño en las membranas celulares que provocan la pérdida de la capacidad de retención de solutos, y es considerado como el primer paso hacia el deterioro de la calidad fisiológica de la semilla.

Se sabe que la germinación de la semilla es el paso inicial en el ciclo de vida de las plantas, que comienza cuando la semilla absorbe agua y se completa con la protrusión de la radícula de la cubierta de la semilla (Makhaye *et al.*, 2021). Estrictamente, deterioro se refiere al proceso de envejecimiento y muerte de las semillas y, por lo tanto, la calidad de la semilla es afectado por este proceso. Y el primer parámetro afectado por el deterioro es la germinación (Carvalho & Nakagawa, 1998; Teofilo *et al.*, 2004; Delouche, 2002).

Además, las semillas más pequeñas, como la linaza, que tienen una mayor relación área superficial/volumen son más propensas a la absorción de agua y al deterioro, que las semillas más grandes y este fenómeno es más significativo en la prueba de envejecimiento acelerado (Yang & Wen, 2017).

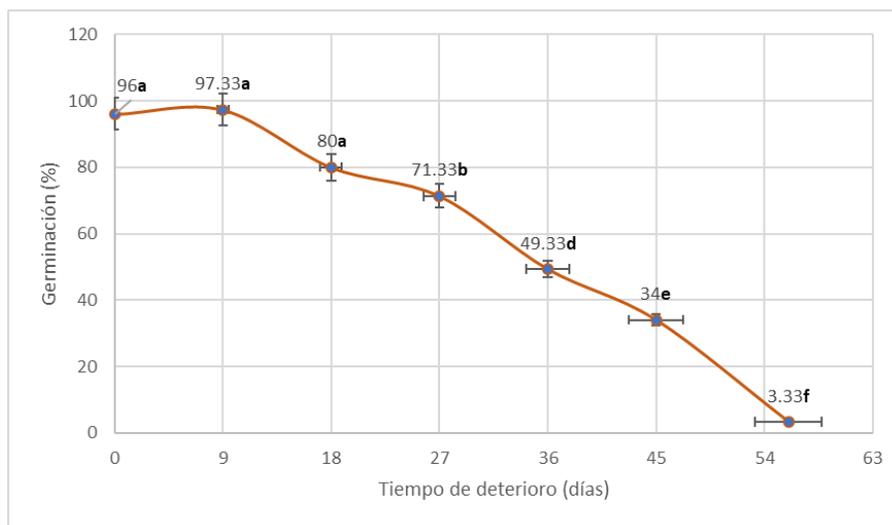


Figura 41. Capacidad germinativa de la semilla de linaza a distintos tiempos de deterioro.

Los resultados obtenidos de conductividad en el agua de remojo de semillas de linaza mostraron un aumento en relación directa con el tiempo de almacenamiento, presentando diferencia estadísticamente significativa ($P \leq 0.05$) con el control a partir del día 27, alcanzando el valor más alto al día 56 (Figura 42), lo cual significa que el lixiviado aumentó de manera progresiva y de acuerdo a Araméndiz *et al.*, (2017) los iones lixiviados son inversamente proporcionales a la integridad de las membranas celulares; la baja conductividad se refiere a semillas de mejor calidad, por el contrario, una alta conductividad significa mayor producción de lixiviado de semillas y pérdida en su calidad. También se ha reportado que, el aumento de la humedad relativa y de la temperatura, asociados con el tiempo de almacenamiento de la semilla, conducen al deterioro ocasionado por la pérdida de la integridad de las membranas (Delouche & Baskin, 1973; Delouche *et al.*, 1973). Esto se explica como sigue; las membranas celulares mantienen solutos como azúcares, aminoácidos y electrolitos compartimentados dentro de las células. La integridad de las membranas celulares se pierde con el envejecimiento, lo que resulta en la fuga de componentes celulares hacia los espacios intracelulares y luego en el ambiente de germinación. Se promueve la fuga de moléculas de iones inorgánicos, azúcares, ácidos inorgánicos, proteínas y aminoácidos durante la imbibición de semillas. Las semillas de baja calidad tienen una estructura de membrana deficiente que permite la difusión hacia el exterior de iones durante la imbibición que se detectan al monitorear los electrolitos presentes en el agua de remojo. El principio de la conductividad eléctrica es que el proceso de deterioro es la lixiviación de las células de las semillas empapadas en agua debido a la pérdida de integridad de los sistemas celulares (Yang & Wen, 2017).

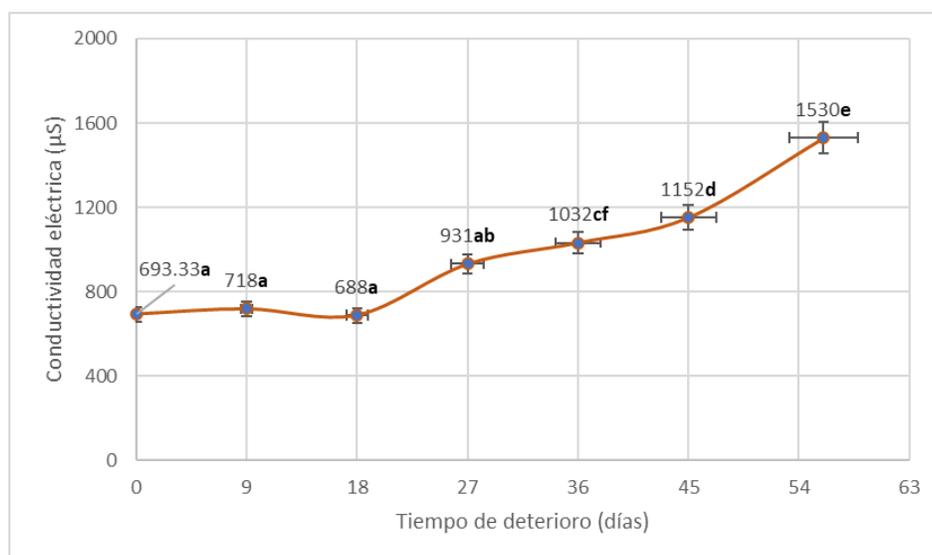


Figura 42. Pérdida de electrolitos en el agua de remojo de semillas de linaza de diferentes días de deterioro medida como conductividad eléctrica.

3.2 Análisis Químico Proximal.

El contenido de humedad, proteínas, grasas y cenizas no presentaron diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$) con mayor tiempo de deterioro, sin embargo, el contenido de fibra y carbohidratos sí presentaron estas diferencias, pues conforme aumentaba el tiempo de deterioro la fibra también aumentó (Tabla 5) mientras que el contenido de carbohidratos disminuyó. Una posible explicación es que los carbohidratos se están polimerizando y formando fibra insoluble como la celulosa o hemicelulosas ya que de acuerdo a Megías (s.f.) la celulosa se sintetiza en la membrana celular gracias a la acción de la celulosa sintasa. Estas moléculas nuevas de celulosa también se van asociando con las microfibrillas que ya había antes formándose pilas de estas microfibrillas de celulosa de manera que la resistencia de la pared celular aumenta, esta resistencia podría explicar por qué los demás contenidos químicos (humedad, proteínas, cenizas y grasas) de la linaza permanecen casi constante durante el deterioro ya que al aumentar la fibra insoluble (microfibrillas de celulosa, fibrillas y fibras de celulosa) es la pared celular la que podría endurecerse más evitando que el deterioro afecte el contenido de estos.

Tabla 5. Análisis Químico Proximal (AQP) de linaza a distintos días de deterioro.

Muestra	Humedad(%)	Proteínas(%)	Grasa(%)	Cenizas(%)	Fibra(%)	CHOS(%)
Control	7.20±0.05 ^a	17.12±0.06 ^a	45.21±1.92 ^a	2.90±0.03 ^a	5.37±0.20 ^a	22.2 ^a
9 días	7.03±0.13 ^a	18.83±0.55 ^a	43.15±0.44 ^a	2.79±0.20 ^a	18.46±1.56 ^b	9.74 ^b
18 días	6.56±0.17 ^a	18.54±0.52 ^a	41.31±0.29 ^a	2.97±0.01 ^a	18.16±0.20 ^b	12.46 ^c
27 días	6.76±0.19 ^a	13.26±0.53 ^a	57.14±3.88 ^a	2.96±0.18 ^a	18.53±0.24 ^b	1.35 ^d
36 días	5.75±0.12 ^b	16.99±0.45 ^a	41.50±0.30 ^a	3.16±0.02 ^a	29.7±0.77 ^c	2.9 ^e
45 días	6.10±0.02 ^{ab}	19.64±1.07 ^a	43.14±1.67 ^a	2.94±0.05 ^a	21.62±0.20 ^d	6.56 ^f
56 días	6.07±0.21 ^{ab}	15.79±0.55 ^a	47.98±0.77 ^a	2.92±0.04 ^a	20.27±0.35 ^{bd}	6.97 ^f

NOTA: Letras diferentes en la misma columna indican diferencia estadísticamente significativa ($P \leq 0.05$).

3.3 Calidad nutricional.

La Tabla 6 muestra que, conforme avanzó el tiempo de deterioro la digestibilidad *in vitro* no presentó diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$) solo hasta el día 56, esto puede estar relacionado con el aumento en el contenido de fibra cruda (Tabla 5), ya que se ha reportado que durante el deterioro de semillas

puede existir interacción de los polisacáridos de la fibra con proteínas (Aloba *et al.*,2022) y estas interacciones disminuirían la digestibilidad. Aunque reportes de la FAO (1970) mencionan que los cereales, leguminosas y oleaginosas tienen valores de digestibilidad de proteínas que van de 75% al 85% por lo que la digestibilidad obtenida en este estudio podría considerarse como la esperada.

En cuanto a la determinación de triptófano en la Tabla 6 se puede observar que hubo una disminución con el tiempo de deterioro y fueron diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$), sin embargo, el contenido de este aminoácido está por arriba de los valores recomendados por la FAO que es de 1.1 gTry/100g de proteína (OMS/FAO/ONU) lo que sugiere que la linaza es una buena fuente de triptófano. La pérdida de triptófano, aunque no es considerable, podría deberse a la acción de estrés oxidativo que se generó por las condiciones del deterioro acelerado, como se presentará más adelante en este trabajo o por la posible interacción con polisacáridos como ya se mencionó anteriormente.

La semilla de linaza no se caracteriza por tener un alto contenido de almidón, se caracteriza principalmente por su contenido en lípidos y fibra dietética, los resultados muestran que el contenido de almidón total presentó pocos cambios durante el tiempo de deterioro (Tabla 6), esto se puede atribuir a la poca degradación de los compuestos que interactúan con los gránulos de almidón de acuerdo a Bernal & Martínez .(2007).

Tabla 6. Calidad nutrimental en linaza a distintos días de deterioro.

Muestra	Digestibilidad <i>in vitro</i> (%)	Triptófano (gTry/100g proteína)	Almidón total(%)	Almidón digerible(%)	Índice peroxidación (meq/kg)
Control	82.55 ± 1.29 ^a	4.25 ± 0.06 ^a	10.6 ± 0.40 ^a	6.6 ^a	1.97 ± 0.01 ^a
9 días	91.95 ± 2.60 ^a	3 ± 7.07 ^{e-3} ^b	7.65 ± 0.51 ^b	4.84 ^b	3.95 ± 0.03 ^b
18 días	88.19 ± 3.18 ^a	3.64 ± 0.20 ^c	5.59 ± 0.60 ^c	1.8 ^c	5.96 ± 0.035 ^c
27 días	83.68 ± 0 ^a	4.88 ± 0.021 ^d	5.94 ± 0.07 ^c	4.48 ^b	5.91 ± 0.01 ^c
36 días	83.68 ± 0 ^a	3.34 ± 0.02 ^{bc}	5.57 ± 0.45 ^c	5.04 ^b	5.96 ± 0.04 ^c
45 días	90.45 ± 3.18 ^a	3.40 ± 0.19 ^{bc}	5.34 ± 0.14 ^c	2.29 ^d	11.85 ± 0.11 ^d
56 días	78.04 ± 1.59 ^b	3.95 ± 0.24 ^d	7.34 ± 0.65 ^b	3.21 ^e	13.94 ± 0.04 ^e

NOTA: Letras diferentes en la misma columna indican diferencia estadísticamente significativa ($P \leq 0.05$).

Sin embargo, la disminución significativa del almidón digerible pudiera deberse al aumento que se presentó en almidón resistente (Tabla 8), recordando que el almidón total es la cuantificación tanto del digerible que es el almidón que aprovecha el cuerpo humano como energía; y el resistente que es una fracción de

almidón capaz de resistir la digestión y permanece intacto en el tracto gastrointestinal. La razón por la cual pudiera haber disminuido el almidón digerible es porque el almidón resistente es almidón atrapado físicamente dentro de células vegetales en la presencia de paredes celulares, los gránulos que están rodeados por una matriz indigerible, es almidón inaccesible (Chung *et al.*, 2011, Villarroel *et al.*, 2018). Por lo que dicha matriz pudo aumentar con el deterioro al desarrollar un endurecimiento en la pared celular.

En la Tabla 6 podemos observar que existe diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$) en el índice de peroxidación del control con los diferentes periodos de almacenamiento, siendo el día 45 y 56 donde se presentaron índices mayores. De acuerdo al CODEX ALIMENTARIUS, que marca un índice máximo de 10 meq/kg para un aceite de buena calidad, en los días 45 y 56 sobrepasaron este índice por lo que su consumo no sería adecuado ya que presentan oxidación; el aumento del índice de peroxidación se puede atribuir a una lipoperoxidación lipídica como consecuencia del almacenamiento inadecuado y el deterioro de las semillas de linaza. Ya que la oxidación es un proceso irreversible muy común en los aceites y grasas, los cuales en presencia del oxígeno, los radicales libres forman los compuestos primarios de la oxidación, llamados peróxidos e hidroperóxidos y el análisis del índice de peróxidos es capaz de cuantificar los compuestos de oxidación (*Kemin Industries México. f.*).

3.4 Compuestos anti nutrimentales.

El contenido de taninos fue en aumento en relación directa con los días de deterioro (Tabla 7), existiendo diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$) con la muestra control. Esto es importante, ya que los taninos son capaces de unirse a enzimas, proteínas, polisacáridos, ácidos nucleicos y formar complejos con el hierro del alimento, dificultando la digestión de los nutrientes (Yan & Wen, 2007), sin embargo, la cantidad que un ser humano consuma de taninos es lo que va propiciar que sea un factor anti nutrimental ya que se ha reportado que, bajo dosis adecuadas de 1.5 a 2.5 gramos al día, los taninos presentan propiedades benéficas sin llegar a ser anti nutrimentales (Sharma *et al.*, 2019). De esta manera la cantidad de taninos durante los tiempos de almacenamiento en su deterioro no se podría considerar que tengan un efecto nutrimentalmente adverso.

Tabla 7. Compuestos anti nutrimentales en linaza a distintos días de deterioro.

Muestra	Taninos(%)	Ácido fítico(%)	Inhibidores de tripsina (UTI/mg)
Control	0.29±0.01 ^a	1.75±0.01 ^a	0.41±0.028 ^a
9 días	0.24±0.007 ^b	1.13±0.03 ^b	*ND
18 días	0.3±0.14 ^{ac}	1.27±0.03 ^b	*ND
27 días	0.33±0.035 ^{ac}	1.53±0.04 ^c	*ND
36 días	0.35±0.02 ^c	1.25±0.03 ^b	*ND
45 días	0.33±0.007 ^{ac}	1.52±0.16 ^c	*ND
56 días	0.67±0.014 ^d	1.43±0.04 ^{bc}	*ND

*ND=No Detectado.

NOTA: Letras diferentes en la misma columna indican diferencia estadísticamente significativa ($P \leq 0.05$).

El ácido fítico tuvo una disminución en su contenido y mostró diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$) con respecto al control (Tabla 7), lo cual muestra que sí se vio afectada la semilla de linaza durante su almacenamiento inadecuado. Una explicación de porque el ácido fítico tuviera concentraciones diferentes podría ser por el daño en la membrana celular como menciona Yang & Wen.(2007), se promueve el grado de fuga de moléculas de iones inorgánicos propiciando una mayor cantidad de complejos con los minerales. Sin embargo, el rango de los cereales, leguminosas y oleaginosas es de 2 a 5% (Derache,1990) y como se muestra en la Tabla 7, las concentraciones de ácido fítico durante el deterioro no representan un carácter anti nutrimental.

Los inhibidores de tripsina no fueron detectados en muestras de linaza deteriorada, sin embargo, es sabido por Figuerola *et al.*, (2008) que en la linaza, existen pequeñas cantidades de inhibidores de tripsina, en el control se detectaron 0.41 *UTI/mg* que comparado con el $LMP \leq 10$ *UTI/mg* de acuerdo a la metodología propuesta Kakade *et al.*,(1974) está muy por debajo del valor que le conferiría un carácter anti nutrimental.

3.5 Calidad nutraceútica.

Los factores funcionales no mostraron tener un comportamiento constante durante los periodos de deterioro, sin embargo si hubo diferencia estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$) en los resultados obtenidos (Tabla 8).

Para la determinación de fibra dietética solo se tomaron muestras del inicio (control), tiempo intermedio (27 días) y final (56 días). Durante el tiempo de deterioro se presentó un aumento en el contenido de fibra dietética y de acuerdo a

la relación que esta tiene entre la soluble e insoluble, fue la fracción insoluble que presentó un incremento mayor (Tabla 8). La linaza se destaca entre otros granos por ser una excelente fuente de fibra dietética. La relación entre fibra soluble e insoluble fluctúa entre 30:70. En la fracción soluble, se encuentra un hidrocoloide conocido como mucílago (Figuerola *et al.*, 2008).

Tabla 8. Calidad nutraceútica en linaza a distintos días de deterioro.

Muestra	Fibra dietética (%)	Almidón resistente(%)	Capacidad antioxidante(%)	Fenoles (mg EAG/g muestra)
Control	61.96 ^a	4.01±0.18 ^a	53.74 ± 1.48 ^a	1.48 ± 0.06 ^a
9 días		2.81±0.04 ^b	44.8±2.10 ^b	0.72±0.05 ^b
18 días		3.79±0.14 ^c	29.36±2.70 ^c	0.92±7.07 ^{e-3c}
27 días	69.46 ^a	1.46±0.063 ^d	17.92±1.36 ^d	0.72±0 ^b
36 días		0.53±0.02 ^e	29.10±2.93 ^e	0.67±0.05 ^{bd}
45 días		3.05±0.09 ^b	17.34±0.72 ^f	0.64±0.03 ^{bd}
56 días	66.43 ^a	4.13±7.03 ^{e-3c}	5.83±0 ^g	0.58±0.02 ^d

NOTA: Letras diferentes en la misma columna indican diferencia estadísticamente significativa ($P \leq 0.05$).

El almidón resistente tuvo diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$) aunque no tuvo un comportamiento constante durante el deterioro, Chung *et al.*, (2011) menciona que el almidón resistente presente en semillas es almidón atrapado físicamente y que la presencia de paredes celulares contribuye al contenido de este almidón y que una molienda o masticación extensa puede reducir el contenido de este, por lo tanto el deterioro pudo crear un efecto ocasionando mayor rigidez de la pared celular sin embargo el llevar a cabo una molienda en las semillas de linaza para obtener muestras homogéneas también tuvo un efecto sobre el almidón resistente al fragmentar la pared celular y la matriz indigerible.

La capacidad antioxidante se vio reducida un 89.15% al concluir con los periodos de almacenamiento. La disminución de la capacidad antioxidante se puede relacionar con la generación de estrés oxidativo, ya que los antioxidantes son necesarios para el control oxidativo (Vaquero & Molero, 2015). Tomando en cuenta que las condiciones de almacenamiento propiciaron el desarrollo de ERO's, es probable que se usaran al máximo los antioxidantes para contrarrestar los daños que pudieran ocasionar. Esto se corresponde con los resultados de la concentración de fenoles totales obtenidos, pues los fenoles disminuyeron en relación directa con el tiempo de deterioro, mostrando diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$) durante el deterioro acelerado (Tabla 8),

llegando a la mitad del control a los 56 días de deterioro. Considerando que lo más destacable de los compuestos fenólicos son sus propiedades antioxidantes, por un lado, son muy susceptibles a ser oxidados y por otro, impiden que los metales catalicen las reacciones de oxidación (Creus, 2004), las condiciones de almacenamiento propiciaron la generación de ERO's , con ello la oxidación de los fenoles y la pérdida de capacidad antioxidante.

3.6 Determinación de estrés oxidativo.

El contenido de carbonilos no tuvo un comportamiento constante durante el tiempo de almacenamiento, pero presentó diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$); los días 18, 27, 36 y 56 fueron los periodos donde la linaza fue más susceptible al daño en sus proteínas (Tabla 9), ya que como es sabido la formación de carbonilos de proteínas es la modificación más común resultante de la oxidación de proteínas (Mora *et al.*, 2019) dicha concentración fue superior al control.

Tabla 9. Determinación de carbonilos y malondialdehido (MDA) en semillas de linaza deterioradas a distintos tiempos.

Muestra	Carbonilos (μMol carbonilos/mg proteína)	MDA (μMol MDA/g semilla)
Control	4.15 ^a	7.6 ^a
9 días	2.20 ^b	9.2 ^b
18 días	5.56 ^c	6.68 ^c
27 días	4.11 ^a	6.16 ^{ce}
36 días	5.89 ^c	3.84 ^d
45 días	2.39 ^b	3.94 ^d
56 días	4.51 ^a	5.56 ^e

NOTA: Letras diferentes en la misma columna indican diferencia estadísticamente significativa ($P \leq 0.05$).

El contenido de MDA mostró diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$); del control con los diferentes tiempos de deterioro (Tabla 9) siendo el día 9 donde se presentó una mayor concentración y posible daño en el contenido de lípidos de linaza. De acuerdo con Vandemoortele & De Meulenaer .(2019) el MDA es un aldehído característico resultante de la peroxidación lipídica de ácidos ω -3 y

ω -6 ácidos grasos, la linaza tiene un contenido rico en ω -3 , por lo tanto, al parecer sus lípidos fueron susceptibles a sufrir un daño por el almacenamiento inadecuado al presentarse una peroxidación.

El MDA es muy reactivo y es capaz de descomponerse, debido a su carácter electrofílico. Esto da como resultado su oligomerización y la formación de una variedad de aductos con componentes alimentarios (por ejemplo, proteínas, polifenoles, ácido ascórbico , nitrito, etc.). Por lo tanto, se podría subestimar la cantidad real de MDA formada en un alimento en particular como resultado de la peroxidación lipídica, lo cual podría justificar valores bajos a partir del día 9. Sin embargo, la conductividad eléctrica, pérdida de su capacidad antioxidante, índice de peroxidación y la actividad enzimática son indicadores de que en las semillas de linaza se generó estrés oxidativo.

3.7 Actividad enzimática.

Las enzimas que tuvieron mayor actividad en linaza fueron catalasas y superóxido dismutasa con diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$); mientras que la peroxidasa presentó menor actividad. En comparación al control CAT y SOD indica que el mecanismo de defensa ante un estrés oxidativo fue desarrollado; en los días de 45 y 56 días de deterioro se mostraron los tiempos con mayor actividad (Tabla 10) lo cual se puede relacionar con el índice de peroxidación correspondientes a esos días (Tabla 9), al estar por arriba del límite permitido por el CODEX (10meq/kg aceite) justificaría por qué el aumento de actividad de CAT y SOD y la pérdida significativa de la capacidad antioxidante se puede atribuir a un aumento del radical anión superóxido y de radicales libres producto de una lipoperoxidación, ya que de acuerdo a Desai & Rai. (2014) la lipoperoxidación la pueden iniciar el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno, lo cual también influyó en la muerte celular de la semilla afectando su capacidad germinativa.

Las concentraciones de SOD en la Tabla 10 indican que hubo una mayor concentración de peróxido de hidrógeno, razón por la cual la actividad de CAT se desencadenó en mayor proporción que la POX ya que de acuerdo a lo que cita Libretext. (2022), la reacción enzimática de CAT es la desproporción del peróxido de hidrógeno y la función de la enzima parece ser la prevención de cualquier acumulación de ese oxidante, mientras que en la POX no es específica para el peróxido de hidrogeno pues la reacción catalizada es el peróxido de hidrogeno y una variedad sustancias reducidas que pueden ser orgánicas e inorgánicas.

Tabla 10. Actividad enzimática en semillas de linaza deterioradas a distintos tiempos.

Muestra	POX (mM H ₂ O/min g muestra)	CAT (μM H ₂ O/min g muestra)	SOD (μM adenocromo/min g muestra)
Control	*ND	13.5 ± 0.19 ^a	2.44 ± 0.38 ^a
9 días	*ND	3.75 ± 0.70 ^b	4.66 ± 2.30 ^b
18 días	*ND	4.33 ± 1.52 ^c	5.77 ± 1.38 ^c
27 días	0.5±0.086 ^a	5 ± 1 ^c	4.22 ± 1.01 ^b
36 días	0.98±0.07 ^b	8 ± 3.46 ^d	5.33 ± 2.89 ^{bc}
45 días	0.91±0.10 ^b	20 ± 10 ^e	14.66 ± 3.05 ^d
56 días	1.80 ± 0.10 ^c	40 ± 10 ^f	8.33 ± 0.46 ^e

*ND= No Detectado.

NOTA: Letras diferentes en la misma columna indican diferencia estadísticamente significativa (P ≤ 0.05).

CONCLUSIONES.

Hubo una pérdida gradual en la calidad de las semillas de linaza tipo aceite a causa de almacenarlas a 75% HR y 40 °C lo cual se vio reflejado en la pérdida de su capacidad germinativa y el aumento de la conductividad eléctrica sugiere daño en membranas celulares; esto permitió obtener muestras deterioradas para su análisis.

Durante el deterioro los compuestos químicos de la semilla de linaza en su mayoría se mostraron inalterados a excepción de un aumento significativo de fibra cruda y disminución de carbohidratos.

El deterioro sí tuvo un efecto en la calidad nutricional de la linaza principalmente en la grasa indicado por un aumento del índice de peroxidación mayor al límite que marca el CODEX ALIMENTARIUS; también la digestibilidad *in vitro* y el contenido de triptófano disminuyeron, sin embargo, los valores se encuentran dentro de los establecido por la FAO para oleaginosas.

El deterioro aumento ligeramente el contenido de taninos y ácido fítico pero de acuerdo a los Límites Máximos Permisibles para seres humanos no son concentraciones que pudieran tener un efecto anti nutricional o tóxico.

El deterioro provocó una disminución de la capacidad antioxidante y el contenido de compuestos fenólicos disminuyendo sus propiedades nutraceuticas.

El deterioro en semillas de linaza si generó estrés oxidativo, indicado primero por el aumento en su actividad enzimática de defensa, la Catalasa fue la que presentó mayor actividad seguida de la Superóxido Dismutasa lo cual sugirió mayor presencia de superóxido y peróxido de hidrógeno, y segundo la actividad de los antioxidantes presentes en la linaza por lo cual disminuyeron el contenido de fenoles y la capacidad antioxidante de la semilla

REFERENCIAS.

- A.O.A.C (1995). Official Methods of Analysis.16th ed. vol. II, Ch. 41, AOAC Official Method 965.33 Peroxide value of oils and fats, 9. Gaithersburg, MD: Association of Official Analytical Chemists.
- A.O.A.C.(2005). Official Methods of Analysis.18th ed. Association of Official Analytical Chemists-International Gaithersburg, Maryland, USA(Methods empleados:925.09, 920.39, 954.01, 923.03 y 989.03).
- Aebi, Hugo (1984). *Catalase in vitro*. Methods in Enzymology. 105,121-126.
- Agropecuarios, M. D. D. C. L. S. D. A. A. Y. (s. f.). Almacenamiento y conservación de granos y semillas. gob.mx. <https://www.gob.mx/aserca/articulos/almacenamiento-y-conservacion-de-granos-y-semillas?idiom=es>
- Aloba, T. A, Corea, E. E, Mendoza, M., Dickhoefer, U., & Castro-Montoya, J. (2022). Effects of ensiling length and storage temperature on the nutritive value and fiber-bound protein of three tropical legumes ensiled alone or combine with sorghum. *Animal Feed Science and Technology*, 283, 115-172.
- Análisis de oxidación de alimentos | Kemin Industries México. (s. f.). <https://www.kemin.com/na/es-mx/blog/food-technologies/food-oxidation-analysis>
- Araméndiz, H., Cardona, C., y Alzate, K. (2017). Prueba de conductividad eléctrica en la evaluación de la calidad fisiológica de semillas en berenjena (*Solanum melongena L.*). *Scientia Agropecuaria*, 8(3), 225–231.
- Bekhit, A. E. D. A., Shavandi, A., Jodjaja, T., Birch, J., Teh, S., Mohamed Ahmed, I. A., Al-Juhaimi, F. Y., Saeedi, P. & Bekhit, A. A. (2018). Flaxseed: Composition, detoxification, utilization, and opportunities. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 13, 129-152.
- Bockor, S., Díaz, M., Gordillo, T., Palambo, M., Palomino, M., Ruzal, S y Allievi, M. (2021). Omega 3: El eslabón perdido de una dieta saludable. *Química viva*, núm. 1. Recuperado el 16 de febrero de 2023, de : <http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/v20n1/E0199.html>
- Bohinski, Robert C. (1998). “*Bioquímica*”. Quinta edición. Pearson educación. México. p. 421 – 422.
- Caballero, B., Trugo, L., & Finglas, P. (2003). *Encyclopedia of Food Science and Nutrition* (2.^a ed.). Academic Pr.pp 2525-2531.

- Camacho, Villanueva Adriana (1999). "Producción y detoxificación enzimática de especies reactivas de oxígeno en semillas de maíz con distinta sensibilidad al envejecimiento". Tesis maestría. Facultad de Química. UNAM. México. pp. 55.
- Carvalho, N.M. y J. Nakagawa.(1998). *Sementes: ciência, tecnologia e produção*. 3 ed. Fundação Cargill. Campinas (Brasil). 424.
- Chance, B. and Maehly, A.C. (1955). "Assay of catalase and peroxidase". *Methods in enzymology*. 11:764-775.
- Chung, H. J., Donner, E., & Liu, Q. (2011). Resistant Starches in Foods. *Comprehensive Biotechnology*, 527-534.
- CIMMYT, 2020. <https://idp.cimmyt.org/sin-oxigeno-no-hay-plagas/>
- Coşkuner, Y. & Karababa, E. (2007). Some physical properties of flaxseed (*Linum usitatissimum L.*). *Journal of Food Engineering*, 78(3), 1067-1073.
- Creus, G. E. (2004, 1 junio). Compuestos fenólicos. Un análisis de sus beneficios para la salud | Offarm. <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-compuestos-fenolicos-un-analisis-sus-13063508>
- Cunnane, S. C., Ganguli, S., Menard, C. R., Liede, A. C., Hamadeh, M. J., Chen, Z., Wolever, T. M., & Jenkins, D. J. (1993). High α -linolenic acid flaxseed (*Linum usitatissimum*): some nutritional properties in humans. *British Journal of Nutrition*, 69(2), 443-453.
- Cunnif, P. M., Fossey, S. A., Auerbach, M. A., Song, J. W. (1994). Mechanical properties of major ampulate gland silk fibers extracted from *Nephila clavipes* spiders. In ACS symposium series.
- De Dios Elizalde, A., Portilla, Y. P., & Chaparro, D. C. (2009). Factores antinutricionales en semillas. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 7(1), 45-54.
- Del R Peralta-Pérez, M. & Volke-Sepúlveda, T. (2012). La defensa antioxidante en las plantas: Una herramienta clave para la fitorremediación. *Revista Mexicana De Ingeniería Química*, 11(1), 75-88.
- Del Rio, D., Rodríguez-Mateos, A., Spencer, J. P., Tognolini, M., Borges, G., & Crozier, A. (2013). Dietary (Poly)phenolics in Human Health: Structures, Bioavailability, and Evidence of Protective Effects Against Chronic Diseases. *Antioxidants & Redox Signaling*, 18(14), 1818-1892.
- Delouche, J.C. (2002). Germinación, deterioro y vigor de semillas. *Seeds News* 6(6). En: http://www.seednews.inf.br/espanhol/seed66/artigocapa66a_esp.shtml; consulta: diciembre 2022.

- Delouche, J.C. y C.C. Baskin. 1973. Accelerated aging techniques for predicting the relative storability of seed lots. *Seed Sci. Technol.* 1(2), 427-452.
- Derache R. (1990). *Toxicología y seguridad de los alimentos*. Barcelona: Editorial Omega, S.A.
- Desai, S., Farris, F., & Ray, S. (2014). Lipid Peroxidation. *Encyclopedia of Toxicology*, 89-93.
- Desikan, R., Hancock, J., and Neill, S. (2005). Reactive oxygen species as signaling molecules. pp. 169–191. In: N. Smirnoff (ed). *Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants*. Blackwell Publishing Ltd. Oxford, UK. 302 p.
- Deutscher Naturfaserverband.(2023). Fecha de consulta:15-febrero-2023.Disponible en: <https://www.naturfaserverband.com/faserpflanzen/bastfaserpflanzen/flachs/>
- Dev, D. K., & Quensel, E. (1989). Functional Properties of Linseed Protein Products Containing Different Levels of Mucilage in Selected Food Systems. *Journal of Food Science*, 54(1), 183-186.
- Di Sarpio, O., Bueno, M., Busilacchi, H., Quiroga, M., y Serverin, C. (2012).Caracterización Morfoanatomica de Hoja de Tallo, Fruto y Semilla de *Salvia Hispanica L. (Laminaceae)* .*Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*,11(3),249-268.
- Elías, Luis G. (1982). “Conocimientos actuales sobre el proceso de endurecimiento del frijol”. Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP), Guatemala, Guatemala, C. A. Vol. XXXII, No. 2, 233-257.
- Elisabel (2015).Lino. Fecha de consulta: 14-diciembre-2022. Disponible en: <http://bordadoraush.blogspot.com/2015/04/lino.html>
- Embolpack (2020). Fecha de consulta:07-febrero-2023. Disponible en: <https://www.embolpack.com/almacenamiento-en-sacos/>
- FAO (1970). Amino-acid content of foods and biological data on proteins.*Estudio FAO Alimentación y Nutrición* .No. 24. Roma.
- Figuerola, F., Muñoz, O. & Estévez, A. M. (2008). La linaza como fuente de compuestos bioactivos para la elaboración de alimentos. *Agro Sur*, 36(2), 49-58.
- Geneva. Williams, A., Pullen, G. (2007). Functional ingredients. Cauvain, S., Young, L. (eds), *Technology of Breadmaking* (2nd), Springer Business & Multimedia, LLC, NY.
- Germana (2015). Omega 3,Omega 6 y Omega 9. Fecha de consulta: 14-diciembre-2022. Disponible en: <https://www.farmaciagermana.com/blog/omega-3-omega-6-y-omega-9>

- Goñi I., Garcia,D.L.,Mañas, E., Saura C.F. (1996). Análisis de almidón resistente: un método para alimentos y productos alimenticios. *Quim.Alimenticia*, 56, 445-449.
- Guerra Liliana (2013). Fecha de consulta : 15-febrero-2023. Disponible en: <https://www.abeautyandhealthylife.com/2013/01/semillas-de-lino-limpia-tu-cuerpo-desde.html>
- Guo, D., Jiang, H., Ye, J., Zhang, A., Wang, Y., Gao, Y., Yan, Q., Chen, J., Duan, L., Liu, H., Li, X., Li, G., Xue, M. & Xie, L. (2021). Transcriptome combined with population level validation reveals genomic loci controlling plant height in flax (*Linum usitatissimum* L.). *Industrial Crops and Products*, 172.
- Hablemos de culturas (2018). Fecha de consulta: 14-diciembre-2022. Disponible en: <https://hablemosdeculturas.com/semillas-de-lino/>
- Haug, W., Lantzsch, H. J. (1983). Sensitive method for the rapid determination of phytate in cereals and products.J. *Sci. Food Agric.* 34, 14232-14261.
- Hawkins, C. L. & Davies, M. J. (1998). EPR studies on the selectivity of hydroxyl radical attack on amino acids and peptides. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions.* 2, 12, 2617-2622.
- Heath, L. and Packer L. (1968). "Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation". *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 125:189-198.
- Heinonen, M., Gürbüz, G. & Ertbjerg, P. (2021). Oxidation of proteins. Chemical Changes During Processing and Storage of Foods, 85-123.
- Hernández, G.A, Carballo, C.A. (2017).Almacenamiento y conservación de granos y semillas. SAGARPA. México, Edo. Méx pp 2-7 .
- Hsu, H.W., D. L. Vavak, L. D. Satterleeand G. A. Miller (1977). A multienzyme technique for estimating protein digestibility. *Journal food Science.* 42(5), 1269-1273.
- ISO (1988). Determinación de taninos en sorgo. International Organization Standarization. ISO/O15 9648.pp. 175-215.
- Kakade ML, Rackis JJ, McGhee JE, Puski G (1974). Determination of trypsin inhibitor activity of soy product: A collaborative analysis of an improved procedure. *Cereal Chem*, 51, 376-381.
- Khan, M. I., Sa, M. U. N., & Sarwar, M. (2003). Review Techniques Measuring Digestibility for the Nutritional Evaluation of Feeds. *International Journal of Agriculture and Biology*, 5(1), 91-94.

- Klein, J. (2003). Postharvest physiology| Seed Storage. *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*, 862-865.
- Kraj, W., Pietrzykowski, M. & Warczyk, A. (2021). The antioxidant defense system and bioremediation. *Handbook of Bioremediation*, 205-220.
- Levine, RL., Garland D, Oliver C.N, Amici S, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S, Stadtman E. R. (1990). "Determination of carbonyl content in oxidatively modified protein". *Methods in enzymology*. 186, 464-478.
- Libretexts. (2022, 2 noviembre).Catalasa y Peroxidasa. LibreTexts Español. [https://espanol.libretexts.org/Quimica/Qu%C3%ADmica_Inorg%C3%A1nica/Libro:Qu%C3%ADmica_bioinorg%C3%A1nica_\(Bertini_et_al.\)/05:Reacciones_de_diox%C3%ADgeno/5.01:Catalasa_y_Peroxidasa](https://espanol.libretexts.org/Quimica/Qu%C3%ADmica_Inorg%C3%A1nica/Libro:Qu%C3%ADmica_bioinorg%C3%A1nica_(Bertini_et_al.)/05:Reacciones_de_diox%C3%ADgeno/5.01:Catalasa_y_Peroxidasa)
- Lippel (2023). Fecha de consulta: 08-febrero-2023. Disponible en: <https://www.lippel.com.br/movimiento-y-dosaje-de-biomasa/elevadores-de-cangilones-para-materiales-a-granel/?lng=es>
- Londoño, J. (2012). Antioxidantes: Importancia biológica y métodos para medir su actividad. Corporación Universitaria Lasallista. Capítulo 9. Parte III. Antioquia-Colombia.
- Losoya, C., Chacón, G. y Rodríguez, A. (2016). Ácidos grasos sus beneficios en una buena nutrición. CienciAcierta. Recuperado el 16 de febrero de 2023, de: <http://www.cienciacierta.uadec.mx/2016/09/21/acidograsos-sus-beneficios-en-una-buena-nutricion/>
- Lowry, O.K. and Becker, R. (1987). Extraction and refining of oil from amaranth seed. *Journal of American Oil Chemistry Society*. 64, 233.
- Makhaye, G., Mofokeng, M. M., Tesfay, S., Aremu, A. O., Van Staden, J., & Amoo, S. O. (2021). Influence of plant biostimulant application on seed germination. *Biostimulants for Crops from Seed Germination to Plant Development*, 109-135.
- Manríquez, H. (s.f.). La digestibilidad como criterio de evaluación de alimentos su aplicación en peces y en la conservación del medio ambiente. Recuperado: 2023. Disponible en: <https://www.fao.org/3/ab482s/AB482S08.htm#ch8>
- Megías M, Molist P, Pombal MA. Atlas de histología vegetal y animal. <http://mmegias.webs.uvigo.es/inicio.html>. Consultado: 28-febrero-2023.
- Misra, H. P. and Fridovich I. (1972). "Importance of glutathione peroxidase, catalase and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress". *Free Rad. Biol. Med.* 17, 235-248.
- Mora, L., Gallego, M., Aristoy, M. C. & Toldrá, F. (2019). Protein Oxidation. *Encyclopedia of Food Chemistry*, 41-47.

- Moreno, M. Ernesto (1995). "Almacenamiento y Conservación de Granos en el Medio Rural". Notitec-PUAL. Aguascalientes, México. Volumen 5-3, 20-25.
- Moreno, M. Ernesto (1984). "Análisis físico y biológico de semillas agrícolas". Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F.
- Morris, D. H., & Vaisey-Genser, M. (2003b). Flaxseed. *En Elsevier eBooks* (pp. 2525-2531).
- Mundo reishi (2021). Fecha de consulta: 14-diciembre-2022. Disponible en: <https://www.mundoreishi.com/plantas-estrenimiento/>
- Nielsen, S. (2009). Análisis de los alimentos. Acribia, España.
- Orbit Logistics (2022). Fecha de consulta: 07-febrero-2023. Disponible en: <https://blog.portalvmi.com.br/es/como-funciona-la-logistica-de-carga-a-granel/>
- Ortiz Escarza, J. M. & Medina López, M. E. (2020). Estrés oxidativo ¿un asesino silencioso? *Educación Química*, 31(1), 2.
- Prasad, K. & Weigle L.J. (1976). Association of seed coat factors with resistance to *Rhizoctonia solani* in *Phaseolus vulgaris*. *Phytopathology*, 66, 342-345.
- Proain tecnología agrícola (2020). Fecha de consulta: 08-febrero-2023. Disponible en : <https://proain.com/blogs/notas-tecnicas/como-funciona-el-ensilaje-hermetico-de-granos-y-semillas>
- Rama, M., Tara, R., Krishnan, C. (1974). Colorimetric estimation of tryptophan content of pulses. *Journal Food Science and Technology*. 11,213-216.
- Ramírez, Genel M. (1981). "Almacenamiento y conservación de granos y semillas". Compañía editorial continental S. A. Octava impresión. México. p. 36-66.
- Ranganna, S. (1977). *Manual of Analysis of Fruit and Vegetables Products*. Mc-Graw Hill. New Delhi. 634 p.
- Saldivar, S. S., & García-Lara, S. (2016). Cereals: Storage. *Encyclopedia of Food and Health*, 712-717.
- Santos, C.M., N.L. Menezes y F.A. Villela. 2005. Physiologic and biochemical alterations in artificially aged bean seeds. *Rev. Brasil. Sementes*. 27(1), 104-114.
- Selleckchem (2013). Fecha de consulta: 14-diciembre-2022. Disponible en: <https://www.selleckchem.com/products/secoisolariciresinol-diglucoside.html>

- Sharma, K., Kumar, V., Kaur, J., Tanwar, B., Goyal, A., Sharma, R., Gat, Y. y Kumar, A. (2019). Health effects, sources, utilization and safety of tannins: A critical review. *Toxin Reviews*, 1-13.
- Silva Castro Carlos Arturo (1993). Aspectos relacionados con el deterioro de las semillas. Artículos Técnicos. Sección Nacional de Hortalizas. *Revista ICA*. Vol. 28. Santafé de Bogotá. Colombia.
- Simopoulos, A. (2005). FATTY ACIDS | Omega-3 Polyunsaturated. Encyclopedia of Human Nutrition, 205-219.
- Stewart, R.C.R. and Bewley J.D. (1980). "Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes". *Plant Physiology*. 65, 245-248.
- Sun, J. M. and Chiu C.C.(1995). "Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes of naturally aged soybean send". *Plant Science*. 110, 45-52.
- Sun, Wendell Q. and Carl Leopold (1995). "The Maillard reaction and oxidative stress during aging of soybean seeds". *Physiologia Plantarum*. 94, 94-105.
- Tajbakhsh, M. (2000). Relationships between electrical conductivity of imbibed seeds leachate and subsequent seedling growth (viability and vigour) in omid wheat. Journal of Agriculture, *Science and Technology*, 2, 67-71.
- Teofilo, E. M., Oliveira, S., Esmeraldo, A.M., Madeiros, S. y Barbosa, F.D. (2004). Qualidade fisiológica de sementes de aroreira (*Myracrodruon urundeuva* Allemao) em função do tipo de embalagem, ambiente e tipo de armazenamento. *Rev. Ciência Agronômica*. 35(2), 371-376.
- Udenigwe, C. C., Adebisi, A. P., Doyen, A., Li, H., Bazinet, L., & Aluko, R. E. (2012). Low molecular weight flaxseed protein-derived arginine-containing peptides reduced blood pressure of spontaneously hypertensive rats faster than amino acid form of arginine and native flaxseed protein. *Food Chemistry*, 132(1), 468-475.
- Valadez Moctezuma, E., Ortega Delgado, M.L., Carallo Carballo, A., & Fucikovsky Zak, L. (1990). Flavonoides de la testa de frijol como inhibidores de dos bacterias fitopatógenas. *Agrociencia*, 2, 75-91.
- Vandemoortele, A., & De Meulenaer, B. (2019). Reactivity of Lipid Oxidation Products in Foods – Is Malondialdehyde a Reliable Marker? *Encyclopedia of Food Chemistry*, 468-477.
- Vaquero-Raya, E. & Molero-Richard, X. (2005). Especies reactivas de oxígeno en las enfermedades inflamatorias del páncreas: ¿una posible diana terapéutica? *Gastroenterología y Hepatología*, 28(8), 473-484.

Villarroel, P., Gómez, C., Vera, C., y Torres, J. (2018). Almidón resistente: Características tecnológicas e intereses fisiológicos. *Rev. Chil. Nutr*, 45(3), 271-278.

WHO/FAO/UNU (2007). Protein and amino acid requirements in human nutrition: Report of a Joint WHO/FAO/UNU Expert Consultation. WHO Technical Report Series 935.

Yang, L., & Wen, B. (2017). Seed Quality. *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*, 553-563.

Yos Sánchez Elias David (2020). Evaluación Nutricional y Funcional de Germinados de Amarantho (*Amaranthus hypochondriacus L.*). Tesis Ingeniero en Alimentos. Fes Cuautitlán. UNAM.

Zuk, M., Richter, D., Matuła, J., Szopa, J. (2015). Linseed, the multipurpose plant. *Industrial Crops and Products*, 75 (Part B), 165-177.