



INSTITUTO TECNOLÓGICO DE MÉRIDA

TESIS

CARACTERIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE LA SEMILLA DE CALABAZA (*Cucurbita argyrosperma* Huber) Y DETERMINACIÓN DE SU CALIDAD NUTRICIONAL

PARA OPTAR AL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

Q. SANTOS LORENZO CHI UCÁN

DIRECTOR

DR. ENRIQUE SAURI DUCH

MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO

15 DE DICIEMBRE DE 2017



DEPENDENCIA: DIV. DE EST. DE POSG. E INV.
No. DE OFICIO: X-504/2017

ASUNTO: AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

MÉRIDA, YUCATÁN A 04 DE DICIEMBRE DE 2017

C. Chi Ucán Santos Lorenzo
Pasante de Maestría en Ciencias de los
Alimentos y Biotecnología
P r e s e n t e.

De acuerdo al fallo emitido por su asesor el Dr. Enrique Sauri Duch y la comisión revisora integrada por el Dr. Gabriel Lizama Uc, la Dra. Sara Elena Solís Pereira y el Dr. Víctor Manuel Toledo López, considerando que cubre los requisitos establecidos en el Reglamento de Titulación de los Institutos Tecnológicos le autorizamos la impresión de su trabajo profesional con la TESIS:

"Caracterización de las proteínas de la semilla de calabaza (*Cucurbita argyrosperma* Huber) y determinación de su calidad nutricional"

ATENTAMENTE
IN HOC SIGNO VINCES

M.C. DANIEL ARCANGEL LÓPEZ SAURI
JEFE DE LA DIVISION DE ESTUDIOS
DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

C.p. Archivo
DALS/ra



S. E. P.
INSTITUTO TECNOLÓGICO
DE MÉRIDA
DIVISION DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN



DEDICATORIA

A mi madre, quien es mi motor impulsor en todo momento, acompañándome en las buenas, las malas y las peores, en todas las alegrías y sinsabores presentes a lo largo de todos los días de mi existencia, y gracias a quien hoy soy quien soy y me encuentro en el lugar en el que estoy.

*“Algunas personas quieren que algo ocurra,
otras sueñan con que pasará,
otras hacen que suceda”*

Michael Jordan

*“La cosa más importante es ésta:
ser capaz en cualquier momento
de sacrificar lo que somos
por lo que podríamos llegar a ser”*

Charles Dubois

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Tecnológico de Mérida (ITM), División de Estudios de Posgrado e Investigación, por haberme aceptado como parte de su matrícula de estudiantes de posgrado y permitirme la realización de este proyecto en dicha institución.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca económica otorgada a lo largo de dos años, durante los cuales pude realizar y culminar exitosamente mis estudios de maestría.

Al Dr. Enrique Sauri Duch, por su comprensión, asesoramiento y los consejos brindados desde la concepción del presente proyecto, su desarrollo y la obtención de valiosos resultados y conclusiones que aportan información valiosa en el ámbito del conocimiento científico y tecnológico.

Al Laboratorio de Instrumentación Analítica, por las instalaciones y los equipos empleados durante la realización de este proyecto.

A mis revisores: Dr. Sara Elena Solís Pereira, Dr. Gabriel Lizama Uc y Dr. Víctor Manuel Toledo López, por el apoyo y revisiones de los resultados del proyecto, gracias a lo cual el proyecto se pudo adaptar y mejorar hasta convertirse en un trabajo de calidad.

A la Dra. Elizabeth de la Luz Ortiz Vázquez, por su apoyo como coordinadora del programa de maestría en todos los trámites administrativos y la agilización de los procesos durante el desarrollo de todo el proyecto.

Al Dr. David Abraham Betancur Ancona, y al Dr. Valentino Muktar Sandoval Peraza, por su apoyo en la parte de determinación de aminoácidos por HPLC y el préstamo de sus equipos y reactivos.

A mis compañeros del Laboratorio de Instrumentación Analítica: Abraham Cauich, Addy Zarza, Enrique Barbosa, Odri Sosa e Hiram Aguayo, por sus valiosos consejos y apoyo durante toda mi estancia, sin el cual habría sido difícil llevar a cabo muchas de las actividades relacionadas con mi proyecto. Gracias por compartirme su experiencia, y gracias por brindarme su invaluable amistad, los llevaré siempre en el corazón.

A mis compañeros de generación de la maestría, con quienes compartí momentos magníficos y también algunos estresantes y angustiosos. Gracias por ser una excelente compañía en este viaje, del cual me llevo encantadores recuerdos. Un agradecimiento especial a Monica Morales, gran compañera y amiga tanto en el ámbito académico como personal, y a quien conocí gracias a esta aventura.

Y, por último, pero no menos importante, a mi familia, especialmente a mi señora madre Enedina Ucán Montejo, y a mis amigos incondicionales y gente que llevo en el corazón: Asir Garrido, Emanuel Cox, Óscar Herrera y Pablo Canul, por estar conmigo incondicionalmente a lo largo de este proyecto, y que, si bien no contribuyeron en el ámbito académico, jugaron un papel aún más importante: mi soporte como persona, como individuo que necesita un oído para ser escuchado, unas palabras de aliento y un abrazo que lo reconforte. Los quiero, y espero que sigan formando parte de mi vida muchos años más.

RESUMEN

Se evaluaron las características fisicoquímicas y la calidad nutrimental de la proteína de la semilla de calabaza (*Cucurbita argyrosperma* Huber). Se determinó la composición proximal de la harina entera (HE) y desgrasada (HD) de semilla de calabaza, observándose un elevado contenido de proteína (36.15 ± 0.31 y $65.63 \pm 1.39\%$, respectivamente). Se obtuvo un aislado proteico (AP) mediante dilución con precipitación por punto isoelectrico, el cual tuvo una concentración de proteína elevada ($91.00 \pm 0.50\%$). Se determinó el perfil de solubilidad de las proteínas, la composición de las fracciones proteicas por el método de Osborne y los puntos isoelectricos de AP y las fracciones proteicas por turbidimetría, además del color. La solubilidad del aislado mostró una curva típica para las proteínas vegetales, con un valor mínimo en 4.5 y tendencia a aumentar a pH neutro y básico. La fracción mayoritaria de proteínas fueron las globulinas (74.79%), seguidas de las glutelinas (14.07%) y las albúminas (11.04%), además de un porcentaje muy pequeño de prolaminas. Los puntos isoelectricos del AP y las fracciones proteicas oscilaron en el rango de 4 – 5; la coloración fue bastante débil. Para evaluar la calidad proteica, se obtuvo la composición de aminoácidos de AP y la digestibilidad *in vitro* con pepsina (IVPD), además de diversos indicadores de calidad proteica (la tasa de aminoácidos esenciales (E/T), índice de aminoácidos esenciales (EAAI), puntuación química (CS), valor biológico (BV), tasa de eficiencia proteica (PER) y la puntuación de aminoácidos corregida con digestibilidad proteica (PDCAAS)). Se observó una elevada concentración de aminoácidos esenciales, satisfaciendo los requerimientos establecidos por la FAO/OMS (1985), siendo el aminoácido limitante la lisina, y con una buena digestibilidad. Los indicadores de calidad proteica fueron elevados, y en conjunto permitieron señalar a la semilla de calabaza como fuente de proteínas de elevada calidad. Los resultados obtenidos son importantes para el empleo potencial de las harinas y/o el aislado proteico como ingredientes en alimentos ricos en proteínas de alta calidad nutrimental.

ABSTRACT

The physicochemical characteristics and the nutritional quality of the pumpkin seed protein (*Cucurbita argyrosperma* Huber) were evaluated. The proximal composition of the whole (HE) and defatted (HD) flour of pumpkin seed was determined, observing a high protein content (36.15 ± 0.31 and $65.63 \pm 1.39\%$, respectively). A protein isolate (AP) was obtained by dilution with precipitation by isoelectric point, which had a high protein concentration ($91.00 \pm 0.50\%$). The solubility profile of the proteins, the composition of the protein fractions by the Osborne method and the isoelectric points of AP and the protein fractions by turbidimetry were determined, in addition to color. The solubility of the isolate showed a typical curve for vegetable proteins, with a minimum value in 4.5 and tendency to increase to neutral and basic pH. The majority fraction of proteins were globulins (74.79%), followed by glutelins (14.07%) and albumins (11.04%), in addition to a very small percentage of prolamins. The isoelectric points of AP and the protein fractions oscillated in the range of 4 - 5; the coloration was quite weak. To evaluate the protein quality, the amino acid composition of AP and in vitro digestibility with pepsin (IVPD) was obtained, as well as various protein quality indicators (the essential amino acid (E / T) rate, essential amino acid index (EAAI), chemical score (CS), biological value (BV), protein efficiency rate (PER) and protein digestibility corrected amino acid score (PDCAAS)). A high concentration of essential amino acids was observed, satisfying the requirements established by the FAO / WHO (1985), being lysine the limiting amino acid, and with a good digestibility was observed too. The protein quality indicators were high, and together they made it possible to point out the pumpkin seed as a source of high quality proteins. The results obtained are important for the potential use of the flours and/or the protein isolate as ingredients in foods rich in proteins of high nutritional quality.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
CAPÍTULO 1. MARCO TEÓRICO	1
1.1. INTRODUCCIÓN	1
1.1.1. Fuentes proteicas	1
1.1.2. Clasificación de las proteínas por su solubilidad	3
1.2. PROBLEMAS DERIVADOS DEL CONSUMO DE PROTEÍNAS	6
1.2.1. Alergias alimentarias originadas por proteínas	6
1.3. CARACTERIZACIÓN PROTEICA	8
1.4. CALIDAD NUTRIMENTAL DE LAS PROTEÍNAS	9
1.4.1. Aminoácidos esenciales y no esenciales	9
1.4.2. Calidad proteica	10
1.4.2.1. Puntuación química (CS) del perfil de aminoácidos	12
1.4.2.1. Tasa de aminoácidos esenciales (E/T)	13
1.4.2.3. Índice de aminoácidos esenciales (EAAI)	13
1.4.2.4. Tasa de eficiencia proteica (PER)	14
1.4.2.5. Valor biológico (BV)	14
1.4.2.6. Digestibilidad proteica	15
1.4.2.7. Digestibilidad proteica corregida con puntuación de aminoácidos (PDCAAS)	16
1.5. LA CALABAZA	16
1.5.1. Taxonomía	17
1.5.2. Descripción botánica	17
1.5.2.1. <i>Cucurbita argyrosperma</i>	18
1.5.3. Valor nutricional	19
1.6. JUSTIFICACIÓN	21
1.7. OBJETIVOS	22
1.8. HIPÓTESIS	23

CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS	24
2.1. ESTRATEGIA GENERAL DE TRABAJO	24
2.2. ANÁLISIS PROXIMAL	25
2.3. CARACTERIZACIÓN PROTEICA	27
2.3.1. Obtención del aislado proteico	27
2.3.2. Determinación de la solubilidad proteica	27
2.3.3. Fraccionamiento proteico	28
2.3.4. Determinación de los puntos isoelectricos	29
2.3.5. Determinación del color	29
2.3.6. Determinación del pH	30
2.3.7. Determinación de la densidad	30
2.3.8. Determinación de la actividad antioxidante del aislado proteico	31
2.3.8.1. Evaluación de la capacidad captadora de radicales libres por el método de DPPH•	31
2.3.8.2. Evaluación del poder reductor del extracto proteico por el método de reducción de Fe ⁺³	32
2.4. DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD PROTEICA	32
2.4.1. Determinación de la composición de aminoácidos	32
2.4.1.1. Hidrólisis proteica	33
2.4.1.2. Derivatización	33
2.4.1.3. Curva de calibración	33
2.4.1.4. Condiciones del análisis cromatográfico y gradiente de elución	34
2.4.2. Digestibilidad in vitro	35
2.4.3. Determinación de los parámetros nutricionales	36
CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIONES	37
3.1. COMPOSICIÓN PROXIMAL	37
3.2. CARACTERIZACIÓN PROTEICA	38
3.2.1. Solubilidad proteica	38
3.2.2. Fraccionamiento de Osborne	40
3.2.3. Puntos isoelectricos	41

3.2.4. Determinación de la concentración proteica por el método de Bradford	42
3.2.5. Color	44
3.2.6. pH y densidad	45
3.2.7. Actividad antioxidante	46
3.2.7.1. Capacidad de captación de radicales libres DPPH•	46
3.2.7.2. Poder reductor de Fe ⁺³	47
3.3. CALIDAD PROTEICA	49
3.3.1. Determinación del contenido de aminoácidos por RP-HPLC	49
3.3.1.1. Curva de calibración de los aminoácidos	49
3.3.1.2. Composición de los aminoácidos en la proteína de semilla de calabaza	52
3.3.1.2. Distribución por grupos de los aminoácidos presentes en la proteína de semilla de calabaza	54
3.3.2. Calidad de la proteína de la semilla de calabaza	55
CAPÍTULO 4. CONCLUSIONES	58
CAPÍTULO 5. BIBLIOGRAFÍA	60
ANEXOS	73
ANEXO I. Solubilidad de AP a diferentes valores de pH e influencia de la concentración	73
ANEXO II. Turbidimetría a 320 nm del aislado (AP) y las fracciones proteicas	74
ANEXO III. Determinación del contenido proteico por el método de Bradford	75
ANEXO IV. Curvas de calibración de los aminoácidos	76

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1.1. Alimentos de alto contenido proteico	2
Tabla 1.2. Composición proteica de algunos alimentos de origen vegetal	5
Tabla 1.3. Aminoácidos esenciales y no esenciales	10
Tabla 1.4. Concentraciones de aminoácidos esenciales en diferentes alimentos de origen vegetal	11
Tabla 1.4. Composición de la proteína de huevo	13
Tabla 1.5. Calidad proteica de algunos alimentos	15
Tabla 1.6. Clasificación taxonómica de <i>C. argyrosperma</i>	18
Tabla 2.1. Preparación de los estándares de aminoácidos para las curvas de calibración	34
Tabla 2.2. Gradiente de elución para la determinación de aminoácidos por RP-HPLC	35
Tabla 3.1. Composición proximal (% en base seca)* de la harina entera (HE) y desgrasada (HD) de la semilla pelada de calabaza (<i>C. argyrosperma</i> Huber) en comparación con las semillas de otras calabazas	37
Tabla 3.2. Contenidos y porcentajes relativos de las diferentes fracciones proteicas de Osborne en el aislado proteico de semilla de calabaza	41
Tabla 3.3. Contenidos de proteína de las harinas, aislado proteico y fracciones proteicas de semilla de calabaza	43
Tabla 3.4. Parámetros de color de las harinas, aislado y fracciones proteicas de la semilla de <i>C. argyrosperma</i> H.	44
Tabla 3.5. Valores de pH y densidad de la harina entera (HE) y desgrasada (HD) de la semilla de calabaza	45
Tabla 3.6. Porcentajes de inhibición del radical DPPH para el ácido ascórbico y el aislado proteico de la semilla de <i>C. argyrosperma</i> H. a diferentes concentraciones	46

Tabla 3.7. Poder reductor de Fe ⁺³ del ácido ascórbico y del aislado proteico de la semilla de <i>C. argyrosperma</i> H. a diferentes concentraciones	48
Tabla 3.8. Tiempos de retención (t _R) y factores de respuesta (F.R.) de los aminoácidos de la mezcla estándar	52
Tabla 3.9. Contenido de aminoácidos por 100 g de proteína en el aislado proteico, en comparación con el contenido mínimo recomendado por la FAO/OMS	53
Tabla 3.10. Abundancias relativas de los aminoácidos por grupos en el aislado proteico	54
Tabla 3.11. Indicadores de calidad de la proteína de la semilla de calabaza	55

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1.1. Fruto y semillas de <i>C. argyrosperma</i> (Xnuuk xka' k'úum)	19
Figura 2.1. Estrategia general de trabajo	26
Figura 2.2. Parámetros de color	30
Figura 3.1. Perfil de solubilidad del aislado proteico	38
Figura 3.2. Influencia de la concentración del aislado proteico en dispersión (C_{disp}) en a) la concentración de proteína disuelta (C_{sol}) y b) la solubilidad proteica.	40
Figura 3.3. Absorbancias a 320 nm del aislado proteico y las diferentes fracciones proteicas a varios valores de pH	41
Figura 3.4. Curva de calibración de BSA empleada para la cuantificación proteica mediante el método de Bradford	42
Figura 3.5. Actividad captadora de radicales libres DPPH• del ácido ascórbico y del aislado proteico de la semilla de <i>C. argyrosperma</i> H.	46
Figura 3.6. Poder reductor de Fe^{+3} del ácido ascórbico y del aislado proteico de la semilla de <i>C. argyrosperma</i> H.	48
Figura 3.7. Patrón de elución de los derivados N-[2,2-bis(etoxicarbonil)vinil] de los aminoácidos presentes en la mezcla estándar (1500 pmol de cada aa).	49
Figura 3.8. Patrón de elución del triptófano en la mezcla estándar (768 pmol)	50
Figura 3.9. Cromatogramas correspondientes al análisis por RP-HPLC de los hidrolizados proteicos: a) hidrolizado ácido; b) hidrolizado básico (para la detección de triptófano)	51
Figura 3.10. Distribución de los grupos de aminoácidos	55

CAPÍTULO 1. MARCO TEÓRICO

1.1. INTRODUCCIÓN

Las proteínas son macromoléculas formadas por cadenas de aminoácidos, las cuales constituyen biomoléculas fundamentales en todos los organismos vivos, dado que se encuentran involucradas en la mayoría de las tareas que realizan las células. En los animales, son los componentes estructurales principales de músculo, del tejido conjuntivo, las plumas, las uñas y el pelo. Además, participan como reguladores metabólicos, transportadores de especies químicas en las rutas metabólicas, catalizadores de reacciones bioquímicas y como defensas en el sistema inmune (McKee & McKee, 2003).

Las proteínas son las biomoléculas más abundantes en las células, puesto que en general constituyen más del 50 por ciento de su peso seco, ya que se encuentran en todas las partes de la célula y son fundamentales en todos los aspectos de la estructura y función celular (Lehninger & Cox, 2006).

1.1.1. Fuentes proteicas

Para satisfacer sus requerimientos nutricionales, el cuerpo humano puede obtener proteínas a partir de diversas fuentes. La composición proteica varía entre los diferentes tipos de alimento, ya sean de origen animal o vegetal, y aún dentro de éstos, existen diferencias sustanciales en cuanto a las diferentes proteínas que las componen, las cuales les confieren características que permiten su utilización o no en determinadas aplicaciones y/o productos. En el caso de los alimentos de origen animal, son ricos en proteínas la carne (res, pescado, venado, mariscos, roedores, reptiles, gallináceas), diferentes tipos de leche (vaca, cabra, humana), los huevos (gallináceas, reptiles) y los derivados de leche (queso, yogur, cuajadas), mientras que en el caso de los alimentos de origen vegetal, destacan algunos cereales (trigo, arroz, maíz, cebada, centeno), las leguminosas (frijoles, guisantes, garbanzos, maní, soya), las nueces y ciertas mezclas proteicas comerciales (incaparina, nutrisoy, certomy) (García Blandón, 1983).

Los alimentos de origen animal constituyen la principal fuente de proteínas en el mundo occidental, y dadas sus excelentes características pueden ser ampliamente explotadas, además de que se les considera garantía de calidad nutricional (Gálvez-Mariscal *et al.*, 2006), aunque actualmente existe una búsqueda intensa de sustitutos para las proteínas de origen animal, en especial en los países tercermundistas, donde la satisfacción a los requerimientos nutricionales mínimos es limitada. Muchos vegetales cuentan con un alto contenido proteico, en particular ciertos cereales, como la cebada, y las leguminosas, como la soya, aunque las proteínas contenidas en este tipo de alimentos (principalmente en las semillas) por lo general contienen una baja concentración de aminoácidos con azufre (metionina y cisteína), situación que los consumidores deben tener en consideración (Ranjan *et al.*, 2012). En la Tabla 1.1 se presentan algunos ejemplos de alimentos con alto contenido proteico.

Tabla 1.1. Alimentos de alto contenido proteico

Origen animal		Origen vegetal	
Alimento	Proteínas (%)	Alimento	Proteínas (%)
Bacalao seco	81.8	Levadura de cerveza	51.9
Carne de res seca	64.8	Harina de soya	42.8
Venado seco	64.6	Semilla de ayote (jícaro)	30.5
Huevo entero gallina	47.0	Cacahuete	28.8
Pescado crudo	47.0	Incaparina	27.9
Queso duro	46.0	Lentejas	24.3
Leche de vaca en polvo descremada	35.9	Frijol rojo o negro	24.1
Armadillo (carne)	29.0	Gandul	19.2
Leche entera de vaca en polvo	26.1	Guisantes	22.5
Carne de iguana	24.4	Garbanzo	20.1
Conejo de crianza	20.4		

Fuente: García Blandón, 1983

Por lo general, las semillas son las partes vegetales que contienen mayor concentración de proteínas, las cuales forman parte del endospermo de la semilla (aleurona y cotiledones) y le sirven para nutrirse durante la germinación y el desarrollo (Gálvez-Mariscal *et al.*, 2006). Las proteínas de las semillas suelen clasificarse en tres grandes categorías: a) estructurales y metabólicas, implicadas en el crecimiento y desarrollo de la planta, b) protectoras, las cuales sirven para la defensa de las plantas contra el estrés biótico y abiótico y c) de reserva, que funcionan como un almacén de aminoácidos, y sirven como fuente de nitrógeno, carbono y azufre durante el desarrollo de la nueva plántula (Casey & Domoney, 1984; Shewry & Halford, 2002). De ellas, las más relevantes en cuestión de alimentación son las proteínas de reserva, puesto que constituyen la mayor parte del contenido proteico de las semillas, por lo cual están relacionadas con la calidad nutricional de las mismas, así como con las propiedades funcionales de sus derivados (Argos *et al.* 1985).

1.1.2. Clasificación de las proteínas por su solubilidad

Las proteínas presentes en los alimentos muestran una gran variedad en sus propiedades, debido en gran parte a la distinta proporción en que los 20 aminoácidos constituyentes intervienen en el complejo molecular, las variaciones en su secuencia en la cadena polipeptídica, y a las estructuras conformacionales resultado de las interacciones intramoleculares entre los residuos aminoacídicos, generando marcadas diferencias unas de otras (Bello Gutiérrez, 2000). Estas diferencias estructurales confieren a las proteínas ciertas propiedades fisicoquímicas que permiten clasificarlas de acuerdo a varios criterios, siendo el más frecuente la solubilidad (Macarulla & Goñi, 2002).

Los tipos más comunes de proteínas presentes en los productos alimenticios, clasificados en base a su solubilidad (Bello Gutiérrez, 2000), son:

- *Albúminas*. Solubles en agua y soluciones salinas diluidas, y precipitan con soluciones salinas concentradas. Están ampliamente distribuidas en tejidos animales y vegetales, e incluyen a numerosas proteínas alimenticias, como la lactoalbúmina o el factor antitripsico de las leguminosas.

- *Globulinas*. Solubles en soluciones salinas. Las de origen animal suelen coagular por el calor, por ejemplo, la miosina. Suelen integrar las reservas proteicas de muchos productos naturales, como la clara de huevo, leche, carnes y vegetales.
- *Glutelinas*: Solubles en soluciones alcalinas. Están presentes solo en los tejidos vegetales y son especialmente abundantes en los cereales, de modo especial en el trigo y el maíz, teniendo altos contenidos de cisteína y cistina. Las glutelinas más conocidas son las gluteninas aisladas del trigo (Huang & Khan, 1997).
- *Prolaminas*. Solamente se disuelven en etanol de 70-80%. Son todas de origen vegetal y abundan en los cereales: gliadina de trigo, hordeína de la cebada, zeína del maíz. Su nombre se originó por el alto contenido de prolina y nitrógeno amídico proveniente de la glutamina, presentes en altas cantidades y que juntos en algunos casos llegan a ser hasta el 50% del nitrógeno del grano (Segura-Nieto & Jiménez-Flores, 1999).
- *Escleroproteínas*. Se encuentran únicamente en tejido animales, y son totalmente insolubles. Suelen desempeñar funciones estructurales o protectoras. Son bastante resistentes a la acción de enzimas proteolíticas. Destaca el colágeno del tejido conectivo, caracterizado por un elevado porcentaje de hidroxiprolina, que por ebullición en agua se transforma en una estructura soluble denominada gelatina.

El tipo más abundante de estas proteínas dependerá de la especie vegetal en cuestión (Tabla 1.2): los cereales tienen un contenido proteico de alrededor del 12%, del cual el porcentaje más importante lo representan las glutelinas, mientras que, en el caso de las leguminosas, el contenido proteico oscila entre 18 y 25%, del cual las globulinas constituyen aproximadamente un 70% del total (Gálvez-Mariscal *et al.*, 2006).

Tabla 1.2. Composición proteica de algunos alimentos de origen vegetal

Alimento	Tipos de proteínas
Trigo	Sus harinas contienen de 10 a 12% de proteínas, del cual un 85% está constituido por glutelinas y prolaminas (llamadas gluteninas y gliadinas, respectivamente), que junto con lípidos y agua forman el gluten, caracterizado por su alta concentración de prolina y glutamina. Las gliadinas son poliméricas y se han clasificado por electroforesis en 4 subgrupos (α , β , γ y δ), con pesos moleculares de 15 000 a 80 000 Da. Las gluteninas suelen ser monoméricas, con pesos de 12 000 hasta 135 000 Da. En una menor proporción se encuentran albúminas y globulinas (15% del total, peso molecular promedio 12 000 Da) ¹ .
Maíz	Contiene entre 10.6 y 11% en peso de proteínas, las cuales son deficientes en lisina y triptófano, y tienen una elevada concentración de leucina e isoleucina ¹ . Sus proteínas se dividen en varias fracciones: las albúminas y las globulinas representan el 7 y el 5% por ciento del nitrógeno total, respectivamente; la fracción de prolamina constituye el 52%, del cual la prolamina I o zeína I soluble en isopropanol al 55% representa aproximadamente el 42%, y el restante 10% es prolamina 2 o zeína 2; las glutelinas representan el 25% ² .
Arroz	El perfil proteico varía bastante de acuerdo al tipo de arroz en cuestión, siendo en general las glutelinas las que se encuentran en una mayor proporción (del 60 al 75% aproximadamente), en un rango de pesos moleculares de 22 a 88 kDa, mientras que las otras fracciones se reparten equitativamente el porcentaje restante ³ .
Frijol	El porcentaje de proteína en el grano integral varía entre el 23 y el 27%, de las cuales más del 80% suele corresponder a globulinas, especialmente globulina I, la principal proteína en la semilla ⁴ , lo cual contrasta con la mayor abundancia de prolaminas y glutelinas en los cereales
Soya	Las principales proteínas de almacenamiento en la semilla son la β -conglucina (7S), deficiente en aminoácidos azufrados, y la glicina (11S), rica en los mismos. La glicina comprende del 25 al 30% de la proteína de la soya y está formada por un hexámero de peso molecular aproximado de 360,000 Da. ¹

Fuente: ¹ Gálvez-Mariscal *et al.*, 2006; ² Landry & Moureaux, 1970; ³ Chandi & Sogi 2007; ⁴ Osborne, 1985.

1.2. PROBLEMAS DERIVADOS DEL CONSUMO DE PROTEÍNAS

Actualmente se sabe que el consumo de productos animales conlleva varios inconvenientes, como, por ejemplo, el alto contenido de grasa que por lo general acompaña a la carne, el cual, combinado con el estilo de vida altamente sedentario, está estrechamente relacionado con la aparición de problemas cardiovasculares (Larsen, 2003). Además, también se les ha asociado con el desarrollo de alergias, como es el caso de las proteínas del huevo y de la leche, a la presencia de patógenos o agentes tóxicos como es el caso de *Salmonella* en el huevo (Mazurek *et al.*, 2005); los priones responsables de la encefalopatía espongiforme bovina o “mal de las vacas locas” (Roma & Prayson, 2005), o el gusano *Trichinella* en carnes, causante de la triquinelosis (Pozio, 2007); a la presencia residual de químicos y hormonas como el clenbuterol empleadas en los métodos de crecimiento artificial de los animales (Ramos *et al.*, 2004); y a la relación encontrada entre la ingesta de estos alimentos con el desarrollo de ciertos tipos de cáncer, especialmente el colorrectal (Chao, *et al.*, 2005).

1.2.1. Alergias alimentarias originadas por proteínas

Una alergia alimentaria es un tipo de reacción adversa de carácter individual hacia los alimentos que incluye una respuesta inmune en el organismo (Villaño *et al.*, 2006). Estas reacciones alérgicas llegan a representar un considerable problema de salud pública, pues se calcula que un 2% de la población adulta y un 8% de la infantil padecen algún tipo de alergia alimentaria y tienden a ir en aumento, particularmente entre la población infantil, coincidiendo con la inmadurez de la mucosa intestinal propia de esta etapa (Sampson, 1999; Bock, 1986).

En la actualidad, tanto la FDA, la Agencia Europea y las empresas de productos manufacturados han propuesto ocho alimentos en particular como los mayores causantes de reacciones alérgicas: la leche, el huevo, el maní, los frutos secos (especialmente las nueces), la soya, el trigo, los pescados y los crustáceos (U.S. Food and Drug Administration, 2004), aunque se han documentado más de 160 diferentes alimentos que también pueden desencadenar reacciones alérgicas, aunque con una frecuencia menor (Hefle *et al.*, 1996).

En el caso de los alimentos con alérgenos de tipo proteico, la alergia a las proteínas de la leche de vaca (PLV) suele ser la más importante durante la lactancia y hasta el primer año de edad; en niños de mayor edad, cobran relevancia las proteínas del huevo y del pescado; y entre los jóvenes y adultos, hay una mayor variedad de alimentos que son fuentes de proteínas con reacciones adversas, tales como los frutos secos (almendra, nuez, maní, pistache, etc.), las legumbres (tomate, frijol, alubias, soya, entre otros), los mariscos (crustáceos como el camarón) y las frutas (melón, manzana, etc.) (Méndez de Inocencio, 2008), y en general, se puede considerar que cualquier alimento que contenga proteínas tiene la capacidad de elicitar una reacción alérgica en individuos susceptibles (Taylor & Hefle, 2001).

Actualmente existe muy poca información respecto a la relación entre las características de una proteína y su capacidad para desencadenar una reacción alérgica, pero se sabe que diversos tipos de prolaminas, entre las cuales se encuentran las proteínas de almacenaje en los cereales, proteínas ricas en azufre, ciertas lipoproteínas, algunas glicoproteínas de pared, y las albúminas 2S, pueden ser alérgicas para determinados individuos, así como la proteína alérgica del kiwi y enzimas como la papaína (Gálvez-Mariscal *et al.*, 2006).

El análisis de una gran variedad de alimentos alérgicos ha permitido identificar ciertas características bioquímicas compartidas por muchos alérgenos alimenticios, como que son proteínas relativamente estables y resistentes a la desnaturalización, lo cual es relevante dado que se ha asociado la permanencia de largas porciones significativas intactas de las proteínas con una mayor probabilidad a desencadenar una respuesta inmune (Astwood *et al.*, 1996). Varios autores proponen el empleo de ensayos de digestibilidad *in vitro* en la evaluación de la alergenidad, siendo la digestión por pepsina uno de los métodos más comúnmente empleados, en el cual se evalúa la resistencia de la proteína a la desnaturalización a valores de pH extremos (Astwood *et al.*, 1996; Nielson, 1988; Marquez & Lajolo, 1981).

1.3. CARACTERIZACIÓN PROTEICA

La caracterización proteica constituye una poderosa herramienta en ciencias de los alimentos, en términos de la optimización de los procesos y en el monitoreo, calidad, trazabilidad, seguridad y evaluación nutricional (Pedreschi *et al.*, 2010).

La caracterización de las proteínas de los alimentos no es un proceso sencillo, con grandes limitaciones: en primer lugar, la gran heterogeneidad entre las diferentes proteínas y péptidos en relación a sus propiedades fisicoquímicas, y, en segundo lugar, las abundancias relativas de los mismos. Un análisis proteico común suele incluir la extracción de la proteína, la separación y cuantificación, la identificación y el análisis de los datos e interpretación (Carpentier *et al.*, 2008).

Existe una amplia variedad de herramientas de extracción y fraccionamiento disponibles para péptidos y proteínas, basadas principalmente en sus propiedades fisicoquímicas y en sus características estructurales, tales como la solubilidad, la hidrofobicidad, el peso molecular, el punto isoeléctrico, la afinidad por otras moléculas, entre otras (Mathews *et al.* 2002). Es necesario remover los compuestos que interfieren en los análisis, principalmente lípidos, ácidos nucleicos, compuestos fenólicos, carbohidratos, enzimas oxidativas y proteolíticas, y pigmentos, mediante procesos optimizados que minimicen la proteólisis y las modificaciones a las proteínas, así como también sean compatibles con los análisis subsecuentes. Tomando en cuenta la inmensa variedad de proteínas y el elevado número de interferencias contaminantes, la solubilización simultánea de todas las proteínas representa un enorme reto (Martínez-Maqueda *et al.*, 2013).

En el caso de las proteínas provenientes de semillas vegetales se han reportado varios métodos de preparación de aislados proteicos para diferentes fuentes proteicas basados en la solubilidad de las mismas. Una de las técnicas más empleadas es la extracción alcalina seguida de precipitación isoeléctrica, la cual implica la solubilización de las proteínas en un medio alcalino (pH 8-10) mediante el ajuste del pH con NaOH diluido para solubilizar las proteínas contenida en una harina previamente desgrasada. El residuo insoluble contiene mayormente carbohidratos y otros componentes que son

separados de la proteína solubilizada por centrifugación, y posteriormente, la proteína es separada de otros compuestos solubles mediante la precipitación a su punto isoeléctrico (pI) con HCl diluido, de modo tal que al final del proceso las proteínas son separadas de otras sustancias no proteicas como los azúcares, la fibra, los lípidos y otros compuestos no deseables en el producto final (Fernández-Quintela *et al.*, 1993; Horax *et al.*, 2011).

Wu *et al.* (2009) evaluaron el efecto de las diferentes modalidades de extracción en las propiedades funcionales de aislados proteicos de cacahuate, empleando cuatro técnicas de precipitación diferentes: isoeléctricas, por alcohol, disolución alcalina seguida de precipitación isoeléctrica y precipitación isoeléctrica combinada con precipitación alcohólica. Sus resultados mostraron que el contenido proteico obtenido mediante disolución alcalina seguida de precipitación isoeléctrica fue mucho mayor que los alcanzados a través de las otras técnicas (96.65% vs. 72.35% del segundo mejor rendimiento), además de que tanto la solubilidad proteica, la capacidad espumante y la estabilidad de la proteína obtenida fueron mejores comparadas con la de los otros extractos proteicos.

Lqri *et al.* (2002) compararon los extractos proteicos de la semilla de lupina obtenidos tanto por extracción alcalina (aislado A) como por extracción con sulfito de sodio (aislado B), encontrando una composición similar de aminoácidos esenciales, pero el aislado A presentó un mayor rendimiento proteico (93.9 vs. 84.6%), aunque el aislado B tuvo una mayor digestibilidad *in vitro* (86.3 vs. 93.9%).

1.4. CALIDAD NUTRIMENTAL DE LAS PROTEÍNAS

1.4.1. Aminoácidos esenciales y no esenciales

Ciertos aminoácidos se sintetizan a través de vías que solo existen en plantas y microorganismos, por lo cual deben ser ingeridos dentro de la dieta. A estos aminoácidos se les conoce como esenciales, y son ocho: isoleucina, leucina, lisina, metionina, felilalanina, treonina, triptófano y valina. La arginina suele considerarse como esencial en la infancia dado que, a pesar de poder sintetizarse a través del ciclo de la urea, las cantidades requeridas por el niño durante la etapa de crecimiento superan las que son posibles de producir a través de dicha vía, por lo cual debe ser ingerida, al igual que la

histidina. Los aminoácidos restantes pueden ser sintetizados a través de las rutas metabólicas del organismo, así que no es indispensable ingerirlos en la dieta, y son conocidos como aminoácidos no esenciales (Voet *et al.* 2007) (Tabla 1.3).

Tabla 1.3. Aminoácidos esenciales y no esenciales

Aminoácidos			
Esenciales		No esenciales	
Arginina*	Metionina	Alanina	Glutamina
Histidina*	Fenilalanina	Asparagina	Glicina
Isoleucina	Treonina	Ácido aspártico	Prolina
Leucina	Triptófano	Ácido glutámico	Serina
Lisina	Valina	Cisteína	Tirosina

*En la infancia

1.4.2. Calidad proteica

La calidad de una proteína está dada principalmente por el tipo de aminoácidos que contiene y la cantidad de los mismos, así como por el grado en el que el organismo los aprovecha. Las proteínas completas o de alta calidad son aquellas que contienen todos los aminoácidos esenciales en suficiente cantidad para su aprovechamiento en el crecimiento de los tejidos y otras funciones celulares, ya que están compuestas por alrededor de un 33% de aminoácidos esenciales, en comparación con el 25% de las proteínas menos completas, como es el caso de las proteínas de origen animal, excepto la gelatina, que es deficiente en lisina y triptófano. En las proteínas incompletas o de baja calidad, uno o más de los aminoácidos esenciales están presentes en una concentración insuficiente para satisfacer las necesidades nutricionales del organismo (Kloss, 2000).

Los alimentos proteicos de mayor calidad son el huevo y la leche humana (Marín Rodríguez, 1988). Las proteínas vegetales suelen carecer de algún aminoácido indispensable para la dieta, principalmente lisina, metionina o treonina, y así, aunque cuantitativamente representen buenas fuentes proteicas, como en el caso de los cereales, su aporte de aminoácidos esenciales es deficiente (Bello-Gutiérrez, 2000), como por ejemplo el trigo, que contiene abundante metionina, pero es deficiente en lisina

(Voet *et al.*, 2007). Las legumbres, como la soya, las habas, los frijoles, el garbanzo y el chícharo contienen proteína en un grado casi tan alto como el de los alimentos de origen animal y de buena calidad, especialmente en el caso de la soya y sus productos, que contienen elevadas cantidades de lisina, aunque son deficientes en metionina (Velásquez, 2006; Voet *et al.*, 2007). Las nueces, semillas y granos contienen porcentajes menores de proteína que las legumbres, pero proveen algunos aminoácidos que faltan o están presentes en cantidades mínimas en las proteínas de las primeras, por ejemplo, la metionina, aunque el contenido de lisina suele ser muy pobre en las semillas. Las frutas y verduras contienen un porcentaje muy bajo de proteínas, las cuales son de baja calidad (Kloss, 2000). En la Tabla 1.4 se presentan las concentraciones típicas de aminoácidos esenciales presentes en algunas fuentes proteicas comunes.

Tabla 1.4. Concentraciones de aminoácidos esenciales en diferentes alimentos de origen vegetal

Alimento	Peso de aminoácido esencial (mg) en 100 g del alimento									
	Ile	Leu	Lys	Met	Phe	Thr	Trp	Val	Hys	Arg
Amaranto	695	1030	970	344	707	676	51	842	1449	451
Avena	526	1012	517	234	698	462	176	711	876	292
Arroz blanco	296	581	255	150	342	234	95	408	454	165
Cebada	4211	784	406	196	603	389	180	592	555	248
Centeno	414	728	401	172	522	395	87	561	541	261
Maíz	350	1190	254	182	464	342	67	461	398	258
Trigo (grano)	426	871	374	196	589	382	142	577	602	299
Trigo (germen)	899	1710	1608	482	1015	1047	261	1240	2026	711
Frijol	927	1685	1593	234	1154	878	223	1016	1257	627
Garbanzo	891	1505	1376	209	1151	756	174	913	1891	531
Lenteja	1045	1847	1739	194	1266	960	231	1211	2101	662
Soya	1889	3232	2653	525	2055	1603	532	1995	3006	1051
Avellana	1463	1455	690	188	833	623	263	1500	3506	424
Almendra	700	1267	454	518	975	492	172	1053	1976	450
Cacahuete	933	1766	98	317	1374	726	287	1154	---	---
Nuez	717	1376	285	247	753	494	185	809	2261	359

Fuente: Bourges *et al.*, 1996

La calidad del perfil de aminoácidos se obtiene al comparar el patrón de aminoácidos de la proteína a evaluar con el de una proteína denominada patrón, la cual debe presentar una eficiencia de retención de nitrógeno del 100% (Mora, 2002). Los criterios más comunes empleados para determinar la calidad de una proteína son variados; entre los más empleados se encuentran (Marín Rodríguez, 1988; FAO/OMS, 1991; Mora, 2002; Biel & Jacyno, 2013):

- la puntuación o evaluación química del perfil de aminoácidos (CS),
- la tasa de aminoácidos esenciales (E/T),
- el índice de aminoácidos esenciales (EAAI),
- la tasa de eficiencia proteica (PER)
- el valor biológico (BV),
- la digestibilidad,
- la digestibilidad proteica corregida con puntuación de aminoácidos (PDCAAS).

1.4.2.1. Puntuación química (CS) del perfil de aminoácidos

El huevo se usa como patrón para juzgar la calidad de la proteína de un alimento, dado que contiene todos los aminoácidos esenciales (Tabla 1.5), y se le asigna una calidad de 100, valor a partir del cual se evalúa la calidad del perfil proteico de otros alimentos (puntuación o evaluación química) (OMS/FAO/UNU, 1985; Martínez Maqueda *et al.*, 2013).

El aminoácido esencial que está en menor proporción con respecto al patrón se denomina aminoácido limitante, y es el que define la puntuación química (CS) (Ecuación 1) de la proteína (Friedman, 1996):

$$CS = \frac{\text{mg del aminoácido esencial limitante en 1 g de proteína evaluada}}{\text{mg del aminoácido esencial en 1 g de proteína patrón}} \quad (\text{Ec. 1})$$

Los aminoácidos que suelen ser limitantes con mayor frecuencia son la lisina, la treonina y el triptófano, mientras que la fenilalanina y los aminoácidos ramificados suelen encontrarse en casi todas las proteínas (León-Sanz, 2006).

Tabla 1.5. Composición de la proteína de huevo

Aminoácido	g/100 g de proteína	Aminoácido	g/100 g de proteína
Isoleucina	6.6	Asparagina	-----
Leucina	8.8	Ac. Aspártico	9.0
Lisina	6.4	Ac. Glutámico	16.0
Fenilalanina	5.8	Glutamina	-----
Tirosina	4.2	Glicina	3.6
Metionina	3.1	Histidina	2.4
Cisteína-Cistina	2.4	Ornitina	-----
Treonina	5.1	Prolina	8.1
Triptófano	1.6	Serina	8.5
Valina	7.3		
Alanina	7.4	% aa esenciales	46
Arginina	6.1	E/T	3.2 g/16 g N

Fuente: Mora, 2002

1.4.2.1. Tasa de aminoácidos esenciales (E/T)

Corresponde a la proporción de los aminoácidos esenciales en relación con el total de aminoácidos (Shenkin & Wretlind, 1978), y suele expresarse mediante un porcentaje (Ecuación 2):

$$E / T = \frac{\text{gramos de aminoácidos esenciales}}{\text{gramos totales de aminoácidos}} \times 100 \quad (\text{Ec. 2})$$

1.4.2.3. Índice de aminoácidos esenciales (EAAI)

La razón en masa de un aminoácido esencial (EAA) es el cociente entre la cantidad de dicho aminoácido en la proteína muestra con respecto a la cantidad de dicho aminoácido en la proteína de referencia (Ecuación 3) (Oser, 1951).

$$EAA = \frac{\text{masa de aa esencial en la muestra}}{\text{masa de aa esencial en la referencia}} \quad (\text{Ec. 3})$$

Dado que todos los aminoácidos esenciales juegan un papel relevante en la calidad de la proteína dietaria y no únicamente el aminoácido limitante, se desarrolló un indicador conocido como índice de aminoácidos esenciales (EAAI), el cual consiste en la media geométrica de las razones de los aminoácidos esenciales en una proteína muestra con respecto al patrón de referencia (Ecuación 4) (Oser, 1951),

$$EAAI = \sqrt[9]{EAA_1 \cdot EAA_2 \cdot \dots \cdot EAA_8 \cdot EAA_9} \quad (\text{Ec. 4})$$

1.4.2.4. Tasa de eficiencia proteica (PER)

Consiste en la ganancia de peso de un sujeto prueba dividido entre su ingesta de una proteína alimenticia durante el período de prueba, mediante la comparación entre el peso ganado por animales en crecimiento alimentados con una proteína de prueba con respecto al peso ganado por otros animales en crecimiento alimentados con una proteína de referencia de alta calidad (Ilsen, 2004). Dado que no está basado en la ingesta/excreción de residuos proteicos de los alimentos, su exactitud es menor a la de indicadores como el valor biológico, pero la técnica para obtenerlo es sencilla y fácil de usar (Mudambi, 2001). Puede ser estimado a partir de las siguientes tres ecuaciones (Ecs. 5 – 7) (Alsmeyer *et al.*, 1974):

$$PER_1 = -0.648 + 0.456\text{Leu} - 0.047\text{Pro} \quad (\text{Ec. 5})$$

$$PER_2 = -0.468 + 0.454\text{Leu} - 0.105\text{Tyr} \quad (\text{Ec. 6})$$

$$PER_3 = -1.816 + 0.435\text{Met} + 0.78\text{Leu} + 0.211\text{Hys} - 0.944\text{Tyr} \quad (\text{Ec. 7})$$

1.4.2.5. Valor biológico (BV)

El valor biológico es el porcentaje de proteína que el cuerpo retiene para utilizarlo en la síntesis de tejidos nuevos. Solamente el huevo y la leche materna contienen todos los aminoácidos necesarios para construir tejidos y para la síntesis proteica en la cantidad adecuada, por lo que tienen un valor biológico cercano a 100 (Marín Rodríguez, 1988). Éste puede ser determinado *in vivo* a través de la determinación de la tasa nitrógeno retenido/nitrógeno absorbido mediante un análisis de la materia fecal de los sujetos de estudio (Mora, 2002), o bien estimado a partir de la Ecuación 8 (Morup & Olesen, 1976):

$$BV = 10^{2.15} \times \text{Lys}^{0.41} \times (\text{Phe} + \text{Tyr})^{0.60} \times (\text{Met} + \text{Cys})^{0.77} \times \text{Thr}^{0.24} \times \text{Trp}^{0.21} \quad (\text{Ec. 8})$$

donde cada símbolo de aminoácido representa:

- % aminoácido / % aminoácido del patrón FAO (1985), si el % aminoácido \leq % aminoácido del patrón FAO o
- % aminoácido del patrón FAO (1985) / % aminoácido, si el % aminoácido \geq % aminoácido del patrón FAO.

1.4.2.6. Digestibilidad proteica

La digestibilidad corresponde al porcentaje de la proteína ingerida que normalmente es absorbida en el tracto gastrointestinal. *In vitro*, la digestibilidad se reporta como el porcentaje de nitrógeno soluble en base al residuo de una digestión con pepsina (PDR), tal como se expresa en la Ecuación 9 (Mertz *et al.*, 1984).

$$\% \text{Digestibilidad} = \frac{(N_{\text{muestra}} - N_{\text{residuo}})}{N_{\text{muestra}}} \times 100 \quad (\text{Ec. 9})$$

En la Tabla 1.6 se muestra un comparativo de indicadores de la calidad de las proteínas presentes en varios alimentos comunes.

Tabla 1.6. Calidad proteica de algunos alimentos

Alimento	CS	BV	NPV
Huevo entero	100	98	94
Leche	95	77	77
Harina de soya	74	70	65
Trigo	53	49	48
Maíz	49	36	31
Arroz	67	67	63

Fuente: Fox & Cameron, 1982

1.4.2.7. Digestibilidad proteica corregida con puntuación de aminoácidos (PDCAAS)

La puntuación de aminoácidos (AAS) corresponde a las cantidades de los aminoácidos individuales en un alimento, o su razón en relación con la necesidad de ese aminoácido en la dieta, sin importar la medida en la cual la proteína es digerible o no (Ecuación 11) (Mokrane *et al.*, 2010).

$$\text{AAS} = \frac{\text{Contenido de aa en la proteína muestra}}{\text{Contenido de aa en el patrón FAO/WHO/UNU}} \quad (\text{Ec. 11})$$

A partir de ello, la FAO y la OMS han adoptado otra escala de calidad proteica llamada digestibilidad proteica corregida con puntuación de aminoácidos (PDCAAS), la cual corresponde a la concentración del aminoácido limitante en la proteína, la cual se expresa como el porcentaje de la concentración del aminoácido limitante en el patrón de referencia de aminoácidos (Ecuación 12) (FAO/WHO /UNU, 1989):

$$\text{PDCAAS} = \frac{\text{Contenido de aminoácido (mg/g de proteína)} \times \text{Digestibilidad}}{\text{Contenido de aminoácido en el patrón FAO/WHO/UNU}} \quad (\text{Ec. 12})$$

Si bien este parámetro no es perfecto, se considera que es mejor y más exacto en relación a las necesidades reales en la alimentación humana y a la puntuación de los alimentos (Mokrane *et al.*, 2010).

1.5. LA CALABAZA

El término “calabaza” se emplea para referirse a un grupo de plantas con frutos carnosos que se comen (*Cucurbita moschata*, *C. pepo*, *C. máxima* y otras), así como también frutos que se han empleado como recipientes (*Lagenaria siceraria* y *Crescentia cujete*), las cuales (a excepción de *C. cujete*) pertenecen a la familia de las cucurbitáceas. Son originarias del continente americano, y al igual que el maíz y el frijol, han sido cultivadas por milenios, dado que son frutos abundantes en carbohidratos y vitaminas, y sus semillas con ricas en aceites y proteínas, e inclusive las flores son consumidas o cocidas, además de que son fáciles de propagar y crecen rápidamente sobre desechos orgánicos, por lo cual se cosechan en casi toda la república (Muschler *et al.*, 2008).

Usualmente, las semillas de calabaza son un subproducto derivado del procesamiento de la pulpa a gran escala o también a nivel artesanal. Se estima que las semillas constituyen alrededor del 2.9% en peso del fruto fresco, mientras que en base seca representan hasta un 32% (Sedano-Castro et al., 2005). Marcone *et al.* (1998) reportan que las principales proteínas presentes en las semillas de calabaza consisten en globulinas de almacenaje solubles en soluciones salinas, así como también albúminas, glutelinas y prolaminas.

1.5.1. Taxonomía

La familia Cucurbitaceae incluye alrededor de 90 géneros y 750 especies, de los cuáles el género *Cucurbita* cuenta con 27 especies (Whitaker, 1968; Hernández, 1978), de las cuales quince se encuentran en Latinoamérica (Lira R. , 1995). Las especies de este género forman el grupo conocido como calabazas, de las cuales cinco ya han sido domesticadas: *C. pepo* L. (calabaza de india), *C. ficifolia* Bouché (chilacayote), *C. moschata* (calabaza de castilla); *C. maxima* (calabaza kabosha) y *C. argyrosperma* Huber, las cuales (con excepción de *C. maxima*) se encuentran ampliamente distribuidas en México (Lira R. , 1995; Hernández, 1978). De estas especies se obtienen diferentes productos, ya sea como alimento (verdura), para la elaboración de dulces o fruta cristalizada, para la obtención de aceites a partir de las semillas o pepitas, y también en la medicina herbolaria como tratamiento contra la solitaria (Cruces-Carbajal, 2006). En el estado de Yucatán se cultivan tres de las quince especies, *C. argyrosperma*, *C. moschata* y *C. pepo* (Lira R. , 1995), cuyo eje de domesticación ha sido la semilla debido a su durabilidad postcosecha y a su alto valor alimenticio (Nee, 1990; Merrick, 1995).

1.5.2. Descripción botánica

Las calabazas crecen de plantas anuales, herbáceas, trepadoras o rastreras, con zarcillos ramificados (filamentos espiralados que se enrollan en los objetos sólidos o se adhieren al suelo y las paredes), con hojas anchas, simples, alternas, pilosas o pubescentes y lobuladas, y flores amarillas solitarias en las axilas de las hojas, unisexuales, gamopétalas, pentámeras, con cinco pétalos y cinco sépalos. El fruto es una baya idehiscente, carnosa, con la pulpa esponjosa en la cual se encuentran muchas

semillas blancas o amarillentas, de cáscara más o menos gruesa, lisa o plegada, dura o quebradiza, de una variedad de colores (verde amarillenta, anaranjada, rojiza, azulosa o jaspeada, con o sin costillas prominentes (Cruces-Carbajal, 2006).

1.5.2.1. *Cucurbita argyrosperma*

Perteneciente al género *Cucurbita*, es una de las tres especies cultivada en la península de Yucatán, cuya domesticación, de acuerdo a la evidencia arqueológica, ocurrió en el sureste mexicano hace más de 7000 años. El tamaño relativamente grande de su semilla (Figura 1.1) indica que este fruto fue empleado principalmente para la obtención de las mismas, y, a diferencia del resto de las especies de *Cucurbita*, los datos sobre la distribución del cultivo de *C. argyrosperma* afuera de América son muy escasos y no hay certeza de que esta especie hubiese sido cultivada alguna vez en el Viejo Mundo ni tampoco fuera de su área de domesticación (Lira & Montes, 1994). La clasificación taxonómica de la especie se presenta en la Tabla 1.7.

Tabla 1.7. Clasificación taxonómica de *C. argyrosperma*

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Dilleniidae
Orden	Cucurbitales
Familia	Cucurbitaceae
Género	<i>Cucurbita</i>
Especie	<i>Argyrosperma</i>
Nombre común	<i>Xnuuk Xka' xkuúm</i>



Figura 1.1. Fruto y semillas de *C. argyrosperma* (Xnuuk xka' k'uum)

A lo largo de su área de distribución, tanto las flores, los brotes jóvenes y los frutos jóvenes y maduros son consumidos como vegetales. Las semillas, su producto más importante, son consumidas enteras, tostadas o rostizadas y son el ingrediente principal de salsas empleadas en la preparación de varios platillos (como los *papadzules* y el *pipián*), y tienen un alto valor nutricional dada su elevado contenido de aceite y proteína. En la península de Yucatán, la pulpa del fruto se emplea en la medicina tradicional para tratar quemaduras, heridas y erupciones de la piel, mientras que las semillas son empleadas como anestésico, para estimular la producción de leche en las mujeres lactantes, y como antihelmíntico (Lira & Montes, 1994).

1.5.3. Valor nutricional

Las calabazas son consideradas un alimento relevante en relación a su aporte nutrimental, pues contienen beta-caroteno, vitamina E, cuatro vitaminas D y minerales, compuestos esenciales para fortalecer la defensa del organismo contra patógenos y los efectos dañinos de la radiación UV (Muschler *et al.*, 2008).

Achu *et al.* (2005) estudiaron el valor nutricional de semillas de cucurbitáceas (*Cucumeropsis mannii*, *Cucurbita maxima*, *Cucurbita moschata*, *Lagenaria siceraria* y *Cucumis sativus*) de diferentes regiones de Camerún, encontrando que tanto las semillas como sus tortas desgrasadas son ricos en proteínas (28 a 40.49 y 61 a 73.59% en peso respectivamente), con valores de humedad, fibra cruda y cenizas similares a los de las semillas de soya, cacahuate, ajonjolí y girasol, además de que el valor nutricional

de las semillas no depende de la región climática sino de la especie en cuestión.

Idouraine *et al.* (1996) estudiaron los nutrientes contenidos en ocho líneas de semillas de *Cucurbita pepo* encontraron que los valores de proteína constituyeron desde el $37.1 \pm 0.45\%$ a $44.4 \pm 0.45\%$, siendo significativamente diferentes entre los diferentes tipos de semillas, con un patrón de aminoácidos similar entre las diferentes líneas celulares, con altos niveles de arginina y ácidos aspártico y glutámico, pero bajos de cisteína y metionina.

Sharma *et al.* (1986) determinaron la calidad nutricional de proteínas de cuatro especies de cucurbitáceas cultivadas mediante evaluación química por balance de nitrógeno, encontrando valores biológicos para las proteínas de melón, de sandía y de calabaza de 59, 64, y 67 respectivamente, y un valor de 70 para la calabaza amarga (*Momordica charantia*). Respecto a la composición de aminoácidos, encontraron que la lisina fue el aminoácido esencial limitante en todas las proteínas estudiadas, mostrando además que los cocientes leucina:isoleucina y leucina:lisina se mantuvieron relativamente constantes entre las diferentes especies.

Mansour *et al.* (1993) evaluaron el valor nutritivo de productos de semilla de calabaza *Cucurbita pepo* Kakai 35 y encontraron que contenían un valor elevado de proteína cruda, en el rango de $720-960 \text{ g kg}^{-1}$, con una digestibilidad proteica *in vitro* y un valor biológico en los rangos de 88-97% y 73-86%, respectivamente, con un elevado contenido de Ca, K, P, Mg, Fe y Zn, así como vitaminas del grupo B.

Estos contenidos proteicos hacen de las semillas de calabaza una materia prima prometedora en la elaboración de productos de elevada calidad proteica para su uso como suplementos nutricionales o agentes funcionales en la formulación de alimentos, además de que varias investigaciones reportan propiedades fisicoquímicas y funcionales de las harinas ricas en proteínas que les otorgan un gran potencial para diferentes aplicaciones tecnológicas en la elaboración de productos alimenticios ((El-Adawy & Taha, 2001).

1.6. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, existe una alta demanda de productos alimenticios para satisfacer las necesidades nutricionales de las personas alrededor de todo el orbe. El aumento exacerbado de la población mundial pone a prueba constantemente la capacidad de la industria de los alimentos para satisfacerla la demanda.

Las proteínas son biomoléculas muy importantes para una elevada cantidad de funciones estructurales, de síntesis, catalíticas, reguladoras o de transporte, el consumo de proteínas de calidad en la cantidad adecuada es indispensable para mantener el adecuado funcionamiento del organismo. Desafortunadamente, el acceso de una gran parte de la población a estos nutrimentos se ve obstaculizado por la escasez o el alto precio de los alimentos que las proveen, además de que muchas de las fuentes tradicionales de proteínas de calidad pueden ser alérgenos, por lo que es prioritario identificar nuevas fuentes proteicas de alta calidad y bajo costo.

La obtención de proteínas de alta calidad de fuentes subexplotadas es una de las alternativas para satisfacer los requerimientos proteicos y contribuir a la disminución del problema de desnutrición en los países en desarrollo. La calabaza (*Cucurbita* sp.) es una planta ampliamente distribuida en gran parte del país. Sus semillas tienen un alto contenido de aceite, y actualmente han cobrado especial atención debido a que son una buena fuente de proteínas, aunque se encuentra desaprovechada como fuente nutrimental, debido al desconocimiento de sus características y propiedades.

El incremento en la producción de aceite de semilla de calabaza a nivel global genera una gran cantidad de torta desgrasada de semilla de calabaza como subproducto, el cual llega a tener porcentajes de proteínas de alrededor del 60%, pudiendo emplearse para la elaboración de concentrados o aislados proteicos que sirvan como ingredientes en diferentes productos alimenticios o bien como suplementos, dándole un valor agregado a las semillas, ya que actualmente suele emplearse solo como un subproducto de bajo valor, para la alimentación del ganado, o en nuestra región, solamente como botana o como ingrediente de un número muy reducido de platillos.

1.7. OBJETIVOS

Objetivo General:

Caracterizar los componentes proteicos de la semilla de calabaza (*Cucurbita argyrosperma* Huber) y determinar su calidad nutrimental.

Objetivos específicos:

- Determinar la composición proximal de la harina entera y desgrasada.
- Determinar las propiedades fisicoquímicas del aislado proteico de la semilla de calabaza (solubilidad, composición de las fracciones proteicas, color, pH, densidad, actividad antioxidante).
- Determinar la composición de aminoácidos de las proteínas de la semilla de calabaza.
- Obtener los principales parámetros de calidad proteica.
- Determinar la calidad nutrimental de las proteínas de semilla de calabaza.

1.8. HIPÓTESIS

La semilla de calabaza es un alimento de origen vegetal con un alto contenido de proteínas, con características fisicoquímicas adecuadas para su empleo en la industria alimenticia, además de que poseen un contenido adecuado de aminoácidos esenciales e indicadores de calidad proteica tales que las hacen altamente recomendables para el consumo humano y la satisfacción de sus requerimientos proteicos, debido a su elevada calidad nutrimental.

CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. ESTRATEGIA GENERAL DE TRABAJO

El presente estudio se dividió en tres grandes fases:

- 1. Análisis proximal:** A partir de la semilla pelada de calabaza *C. argyrosperma* Huber se obtuvo una harina entera mediante molienda, a partir de la cual se obtuvo una harina desgrasada mediante una extracción de tipo Soxhlet con hexano. Posteriormente, se determinó la composición proximal de acuerdo a los procedimientos establecidos por la AOAC (2005).
- 2. Caracterización proteica:** A partir de la harina desgrasada se obtuvo un aislado proteico mediante dilución alcalina con precipitación por punto isoelectrico. A partir de dicho aislado, se procedió a obtener el perfil de solubilidad en agua, la composición de las fracciones por diferencias en solubilidad de acuerdo al método de Osborne, la determinación de color, pH y densidad, así como la determinación de la actividad antioxidante del aislado mediante el método de captación de radicales libres DPPH• y el poder reductor de Fe^{+3} .
- 3. Determinación de la calidad proteica:** Se obtuvo el perfil de aminoácidos del aislado proteico y su concentración mediante cromatografía de líquidos de alta eficiencia en fase reversa (RP-HPLC). A partir de ello, se determinaron los siguientes indicadores de calidad proteica:
 - la puntuación o evaluación química del perfil de aminoácidos (CS),
 - la tasa de aminoácidos esenciales (E/T),
 - el índice de aminoácidos esenciales (EAAI),
 - el valor biológico (BV),
 - la digestibilidad *in vitro* (IVPD) y
 - la digestibilidad proteica corregida con puntuación de aminoácidos (PDCAAS).

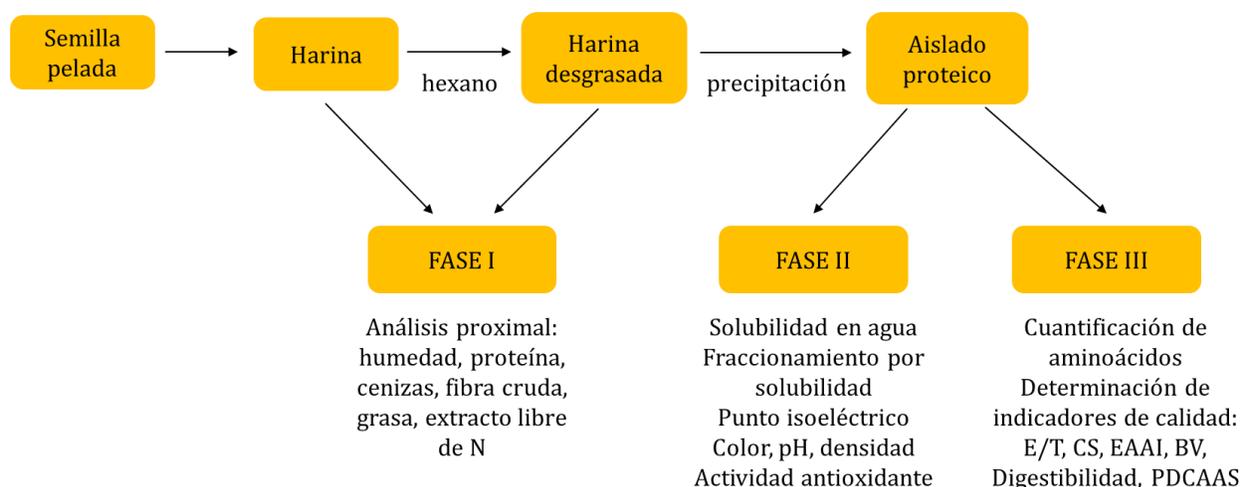


Figura 2.1. Estrategia general de trabajo

2.2. ANÁLISIS PROXIMAL

La materia a emplear en este estudio consistió semilla de calabaza (*C. argyrosperma* Huber), adquirida en un mercado local. Las semillas fueron molidas en un procesador de alimentos y tamizadas para obtener una harina. Posteriormente se procedió a determinar su composición proximal en base a las metodologías propuestas por la AOAC (2005), y para determinar el contenido proteico se empleó el método de Bradford (1976). Todos los análisis se realizaron por triplicado.

- La determinación de humedad se realizó mediante el método de secado en estufa. Se pesarán 2 gramos de muestra en un crisol a peso constante conocido, y se introdujeron a un horno a 105 °C por 2 horas. Transcurrido este tiempo, se sacaron del horno y se colocaron en un desecador por 30 min para alcanzar temperatura ambiente, y se procedió a pesarlos. La humedad se determinó calculando la diferencia entre el material original y el material secado, y se expresó como un porcentaje.
- La determinación de cenizas se realizó mediante una calcinación en mufla. Se pesaron 2 gramos de muestra en crisoles a peso constante conocido, y se introdujeron a un horno a 550 °C por 5 horas. Transcurrido este tiempo, se sacaron del horno y se colocaron en un desecador por 30 min para alcanzar temperatura ambiente, y se procedió a pesarlos. El contenido de cenizas se determinó por

diferencia entre el crisol con muestra y el crisol sin ella, y se expresó como un porcentaje.

- Para la determinación de grasas se empleó un equipo Soxhlet y hexano como disolvente. En un cartucho de extracción de celulosa, se pesaron 5 g muestra deshidratada y se tapó con una capa ligera de algodón, y se colocaron en el extractor Soxhlet. Seguidamente, se colocó un recipiente con hexano y se procedió a la extracción durante 2 horas. Se sacaron los cartuchos de extracción de celulosa y se colocaron en un desecador por 30 min; transcurrido este tiempo, se pesaron. El contenido de grasas se determinó por diferencia entre el peso inicial y el peso final, y se expresó como un porcentaje.
- La fibra cruda se determinó mediante la medición de la pérdida de masa que corresponde a la incineración del residuo seco de la digestión de una muestra con ácido sulfúrico 1.25% (m/v) e hidróxido de sodio 1.25% (m/v). Se pesaron 2 g de muestra desgrasada y se colocaron en un matraz con 200 mL de H₂SO₄ al 1.25 % en ebullición con agitación esporádica por 30 min. Trascurrido este tiempo, la muestra se filtró a vacío en un embudo Büchner precalentado y se lavó con agua hirviendo. Se repitió el mismo procedimiento con el residuo, empleando en esta ocasión NaOH 1.25% m/v. El nuevo residuo se colocó en un crisol de filtración, se lavó con agua hirviendo y posteriormente con HCl al 1% y de nuevo con agua caliente, seguido de tres lavados con éter de petróleo. El residuo se depositó en un crisol a peso constante conocido y se colocó en un horno a 105 °C durante 12 horas, dejándolos enfriar posteriormente en desecador por 30 min para proceder a pesarlos. Una vez hecho esto se colocaron en la mufla a 550 °C por 3 h, y posteriormente se dejaron enfriar en un desecador por 30 min, después de lo cual se pesaron. El contenido de fibra se determinó empleando la siguiente expresión matemática:

$$\% \text{Fibra cruda} = \frac{(\text{Peso residuo seco} - \text{Peso cenizas})}{\text{Peso muestra}} \times 100 \quad (\text{Ec. 7})$$

- Para determinar el porcentaje de proteína cruda en las muestras, se utilizó el método de Bradford (Bradford, 1976). Se preparó una disolución madre de albúmina sérica bovina (BSA) con una concentración de 1 mg/mL, a partir de la cual se prepararon

disoluciones en el intervalo 20 – 100 µg de proteína, con las que se realizó una curva de calibrado, agregando a cada disolución 2 mL de reactivo de Bradford grado analítico de Sigma-Aldrich y midiendo las absorbancias a 595 nm. Posteriormente, se tomaron 10 µL del sobrenadante de una suspensión de la harina desgrasada y se completó con agua hasta una concentración medible de proteína.

- El extracto libre de N (carbohidratos principalmente) se obtuvo como la resultante de restar a 100 los porcentajes calculados para cada uno de los nutrientes calculados anteriormente.

2.3. CARACTERIZACIÓN PROTEICA

2.3.1. Obtención del aislado proteico

Se realizó mediante una dilución alcalina seguida de precipitación por punto isoeléctrico mediante el método de Shevkani *et al.* (2015) con ligeras modificaciones. Se suspendieron 20 g de la harina desgrasada en 250 mL de agua desionizada, y se ajustó el valor del pH a 10 con NaOH 0.1 M. Las dispersiones se agitaron por una hora a 40 °C y se centrifugaron a 8000 g por 20 min. Se recuperó el sobrenadante, y se realizó una segunda extracción a la harina siguiendo el mismo procedimiento. Los sobrenadantes se combinaron, y se ajustó al valor de pH correspondiente a su punto isoeléctrico, determinado tal como describe Ju (2001), empleando HCl 0.1 M para precipitar las proteínas; se realizó una segunda centrifugación, y se colectó el precipitado, correspondiente al aislado proteico, el cual fue lavado dos veces con agua destilada, seguido de centrifugación y secado con horno a 40 °C por 6 h, para posterior almacenamiento a 4 °C hasta posterior empleo. La extracción se realizó por triplicado.

2.3.2. Determinación de la solubilidad proteica

El perfil de solubilidad proteica a varios valores de pH se determinó de acuerdo a la metodología propuesta por Bera *et al.* (1989) con ligeras modificaciones. Se disolvieron 100 mg de aislado proteico en 10 mL de agua desionizada, preparando muestras a valores de pH en el rango 2-11, con variaciones de una unidad de pH, ajustando con NaOH 0.1 M o HCl 0.1 M, según fue el caso. Las muestras se agitaron por 30 minutos a temperatura ambiente, y se centrifugaron a 7 500 g por 15 min. Se determinó la cantidad

de proteína presente en la solución antes de la centrifugación y en los sobrenadantes después de la centrifugación a 10000 g por 15 minutos mediante el método de Bradford (1976). La solubilidad proteica (PS) se determinó mediante la ecuación:

$$PS(\%) = \frac{\text{mg de proteína en el sobrenadante}}{\text{Cantidad total de proteína en 100 mg de muestra}} \quad (\text{Ec.8})$$

Se determinó también la influencia de la concentración de la dispersión proteica en el grado de solubilidad del aislado proteico, para tres valores de pH, de acuerdo a la metodología de Bucko *et al.* (2015) con ligeras modificaciones. Se prepararon dispersiones proteicas a diferentes concentraciones, empleando cantidades adecuadas de aislado proteico para preparar dispersiones proteicas en un rango de concentración de proteína (C_{disp}) de 2-10 g/100 mL, manteniendo en agitación constante por una hora a una temperatura de 40 °C, para facilitar la disolución de las proteínas. La concentración proteica del sobrenadante se determinó de acuerdo al método de Bradford (1976), y el porcentaje de solubilidad se calculó empleado la Ecuación 8.

2.3.3. Fraccionamiento proteico

Las fracciones proteicas fueron extraídas a partir de la harina desgrasada empleando el método de Osborne tal como lo describen Ju *et al.* (2001). Las proteínas solubles en agua (albúminas) fueron extraídas mediante agitación de una suspensión preparada con 10 g de proteína en 100 mL de agua destilada por dos horas a temperatura ambiente, la cual posteriormente se centrifugó a 10 000 g por 20 minutos para obtener el sobrenadante con la fracción de albúminas. El residuo sólido se resuspendió en 100 mL de NaCl 1M para extraer las proteínas solubles en medios salinos (globulinas) mediante agitación de la suspensión por dos horas a temperatura ambiente, la cual posteriormente se centrifugó a 10 000 g por 20 minutos para obtener el sobrenadante con la fracción de globulinas. El residuo sólido recuperado se resuspendió en 100 mL de agua destilada, a la cual se le ajustó el valor del pH a 11 empleando NaOH 0.1 M, y se procedió a agitarlo por dos horas a fin de extraer las proteínas solubles en medios alcalinos (glutelinas). La suspensión se centrifugó a 8000 g por 20 minutos para obtener el sobrenadante con la fracción de glutelinas. Las proteínas solubles en alcohol (prolaminas) fueron extraídas de manera

análoga empleando etanol al 70% por dos horas, seguida de centrifugación. Todos los residuos fueron lavados con una pequeña porción del solvente de extracción para retirar las fracciones residuales de proteína, y se juntaron con los sobrenadantes previamente obtenidos. Las albúminas, globulinas y glutelinas se precipitaron mediante ajuste al valor de pH correspondiente a su punto isoeléctrico, mientras que las prolaminas fueron precipitadas por adición de acetona tal como describe Tecson (1971). Después de la precipitación proteica, las muestras se centrifugaron, eliminándose los sobrenadantes y procediendo a secar los pellets en incubadora a 50 °C por 5 h, para posterior almacenamiento a 4 °C hasta posterior empleo.

2.3.4. Determinación de los puntos isoeléctricos

Los puntos isoeléctricos (pI) del aislado y de las fracciones proteicas se determinaron mediante turbidimetría de acuerdo a la metodología descrita por Horax *et al.* (2010). Se tomaron 10 µL de cada uno de los sobrenadantes obtenidos y se diluyeron hasta alcanzar una concentración de turbidez medible, y se procedió a medir la absorbancia con un espectrofotómetro a 320 nm en un rango de pH de 2-11, con variaciones de una unidad de pH y con incrementos más pequeños cerca del valor del pI, ajustando con NaOH 0.1 M o HCl 0.1 M, según fue el caso. El valor del pI correspondió al pH que originó la mayor turbidez en cada caso.

2.3.5. Determinación del color

Los parámetros de color para las harinas y el aislado proteico fueron medidos con un colorímetro tri-estímulo (X-rite SP60 Series), mediante el cual se determinó la claridad (L), la cromaticidad rojo/verde (a^*) y la cromaticidad amarillo/azul (b^*), calculando a partir de ellos la cromaticidad (C^*) y el ángulo de tono (h^*) (Figura 2.2), en base a las siguientes ecuaciones (Rodríguez-Miranda *et al.*, 2012):

$$C^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \quad (\text{Ec. 13})$$

$$h^* = \arctg\left(\frac{b^*}{a^*}\right) \quad (\text{Ec. 14})$$

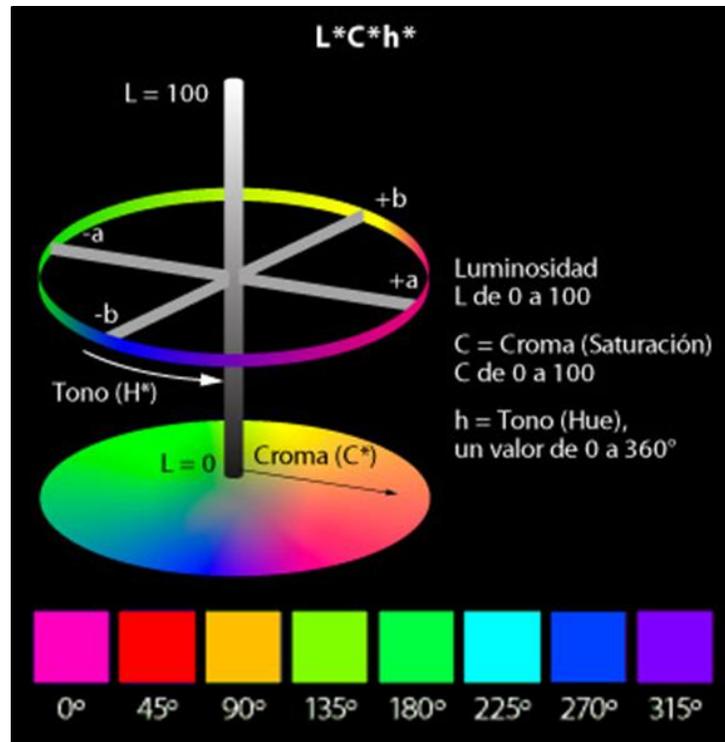


Figura 2.2. Parámetros de color (Fuente: www.gusgsm.com)

2.3.6. Determinación del pH

Se dispersaron 5 gramos de cada muestra (harina, harina desgrasada y aislado proteico) en 50 mL de agua destilada, y se mantuvo en agitación por media hora a temperatura ambiente. El valor de pH respectivo se determinó empleando un potenciómetro (Rodríguez-Miranda *et al.*, 2012).

2.3.7. Determinación de la densidad

La densidad de las harinas y del aislado proteico se determinó empleando el método descrito por Monteiro y Prakash (1994) con ligeras modificaciones. Se colocó muestra en un tubo centrífugo de plástico previamente pesado (P1) hasta alcanzar la marca de 5 mL, y se procedió a compactarla para eliminar espacios dentro del tubo. El volumen fue tomado como el volumen final de la muestra del tubo (V). El tubo fue pesado otra vez (P2), y a partir de la diferencia de peso, la densidad de las muestras fue calculada y expresada en g/mL.

2.3.8. Determinación de la actividad antioxidante del aislado proteico

La actividad antioxidante del aislado proteico de semilla de calabaza fue evaluada mediante la evaluación de dos propiedades: la capacidad de captación de radicales libres DPPH• y el poder reductor de iones Fe⁺³.

2.3.8.1. Evaluación de la capacidad captadora de radicales libres por el método de DPPH•

Se evaluó la actividad captadora de radicales libres del aislado proteico empleando la metodología de Brand-Williams *et al.* (1995), con algunas modificaciones. Se preparó una disolución Stock del radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) mezclando 2.5 mg del radical con 100 mL de etanol al 96%, a la cual se le ajustó la absorbancia hasta un valor de 0.7 ± 0.02 empleando el mismo disolvente, a una longitud de onda de 515 nm.

Se preparó una muestra tomando una alícuota de 100 µL de sobrenadante proteico, a la cual se le añadieron 3.9 mL de disolución de DPPH. La muestra se agitó y se dejó reposar por 30 min en ausencia de luz, después de los cuales se procedió a medir la absorbancia de la misma a 515 nm con un espectrofotómetro UV-Vis Agilent Technologies Cary 60, empleando etanol como blanco. Se calculó el porcentaje de inhibición (% Inhib.) como:

$$\% \text{ Inhib} = \frac{\text{absorbancia control} - \text{absorbancia muestra}}{\text{absorbancia control}} \times 100 \quad (\text{Ec. 14})$$

y el resultado fue expresado como IC₅₀, correspondiente a la reducción del 50% de la actividad radicalaria, empleando una curva de calibración con concentraciones de aislado proteico en el rango de 100 a 1000 mg/mL. Se realizó también una curva de calibración empleando ácido ascórbico como antioxidante de referencia, empleando el mismo rango de concentraciones que para el aislado proteico.

2.3.8.2. Evaluación del poder reductor del extracto proteico por el método de reducción de Fe^{+3}

Se evaluó el poder reductor del aislado proteico sobre el ion férrico (Fe^{+3}) empleando la metodología de Oyaizu (1986). Se mezclaron 2.4 mL de extracto con 2.5 mL de amortiguador de fosfatos (0.2M, pH 6.6) y con 2.5 mL de ferricianuro de potasio (1% m/v H_2O), y se procedió a incubar la muestra a 50 °C por 20 min. Posteriormente, se adicionaron 2.5 mL de ácido tricloroacético (10% m/v H_2O) a la mezcla de reacción, y se centrifugó a 8000 g durante 15 mL. Se tomaron 5 mL del sobrenadante de la mezcla y se mezclaron con 4 mL de agua destilada y 1 mL de cloruro férrico (1% m/v H_2O), dejando reposar por 30 min a temperatura ambiente en oscuridad. Transcurrido este tiempo, se midió la absorbancia de las mismas a 700 nm en un espectrofotómetro UV-Vis Agilent Technologies Cary 60. El incremento en el valor de este parámetro corresponde a un aumento en el poder reductor del extracto. El resultado fue expresado como mg equivalentes a ácido ascórbico, usando una curva de calibración con concentraciones entre 0.1 y 1 mg/mL.

2.4. DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD PROTEICA

2.4.1. Determinación de la composición de aminoácidos

La determinación de la composición de aminoácidos se realizó mediante cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa (RP-HPLC), de acuerdo a la metodología de Alaiz *et al.* (1992) con ligeras modificaciones, empleando un cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia marca Agilent, modelo 1100 series, con las siguientes especificaciones:

- a) Inyector manual
- b) Bomba binaria marca Agilent, modelo G1311A.
- c) Desgasificador marca Agilent, modelo G1379A.
- d) Detector de longitud de onda variable (VWD) marca Agilent, modelo G1315A.
- e) Columna cromatográfica C18 en fase reversa, tamaño de partícula 4 μ m, 300 x 3.9 mm marca Nova Pack, modelo WAT011695.
- f) Programa computacional Data Apex Clarity Chromatography Station para Windows.

2.4.1.1. Hidrólisis proteica

Se pesaron 10 mg del aislado proteico en un vial de 2 mL, y se le añadieron 10 μ L de ácido L-aminobutírico como patrón interno y 1.5 mL de HCl 6N. Los viales se cerraron con sello de teflón bajo atmósfera de nitrógeno y se procedió a realizar la hidrólisis durante 20 horas a 110 °C. Tras la hidrólisis, las muestras se llevaron a sequedad en una estufa al vacío durante 4 h, y se procedió a realizar la derivatización precolumna.

Para el caso del triptófano, se realizó una hidrólisis básica de acuerdo a Yust *et al.* (2004). 10 mg de muestra fueron disueltos en 3 mL de hidróxido de sodio 4 N, se colocaron en tubos de hidrólisis bajo atmósfera de nitrógeno, y se incubaron en un horno a 100 °C por 4 h. Los hidrolizados fueron enfriados en hielo y neutralizados a pH 7 utilizando HNO₃ 12 N. Posteriormente fueron diluidos hasta 25 mL con buffer de borato de sodio 1 M (pH 9). Se tomaron alícuotas de estas soluciones y se filtraron a través de filtros Millex 0.45 μ m (Milliporre) previo a la inyección.

2.4.1.2. Derivatización

Previo al análisis del hidrolizado proteico ácido, se llevó a cabo una derivatización precolumna (Alaiz, 1992). A los viales con la muestra hidrolizada y seca se les añadieron 0.8 μ L de etoximetilenmalonato de dietilo (EMMDE) como agente derivatizante. Seguidamente, se agregó amortiguador de borato de sodio 1M (pH 9) hasta alcanzar un volumen final de 1 mL, y se dejó que la reacción se llevara a cabo durante 50 min a 50 °C. Transcurrido el tiempo de reacción los viales se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se tomaron 15 μ L de muestra, los cuales se filtraron a través de filtros Millex 0.45 μ m (Milliporre), y fueron inyectados en el cromatógrafo de líquidos.

2.4.1.3. Curva de calibración

Para la elaboración de la curva de calibración se empleó una mezcla estándar de aminoácidos a una concentración de 2.5 μ mol/mL para cada uno (1.25 μ mol/mL en el caso de la L-cistina), a partir de la cual se prepararon soluciones estándar en un rango de concentraciones de 37.5 a 3000 pmol aa/15 μ L de acuerdo a lo que se muestra en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1. Preparación de los estándares de aminoácidos para las curvas de calibración

Cantidad de aminoácido (pmol)	Estándar de aminoácidos (μL)	Patrón interno (μL)	EMMDE (μL)	Amortiguador (μL)
37.5	1	10	0.8	988
187.5	5	10	0.8	984
375	10	10	0.8	979
750	20	10	0.8	969
1500	40	10	0.8	949
3000	80	10	0.8	910

Los aminoácidos utilizados para hacer las rectas de calibrado de aminoácidos fueron sometidos a las mismas condiciones que las muestras, para evitar los errores producidos por la pérdida de algunos aminoácidos durante la hidrólisis ácida. El volumen total de todas las soluciones fue de 1 mL y el cálculo de las concentraciones se efectuó para 15 μL correspondientes al volumen de inyección.

2.4.1.4. Condiciones del análisis cromatográfico y gradiente de elución

Para el análisis cromatográfico del perfil de aminoácidos (a excepción del triptófano) se empleó un gradiente de elución, empleando dos fases móviles A y B:

- Fase A: Acetato de sodio 25 mM con 0.02% de azida de sodio pH 6.
- Fase B: Acetonitrilo grado HPLC.

Las fases móviles fueron filtradas a través de un filtro de membrana Millipore con un tamaño de poro de 0.45 μm antes de ser utilizadas.

El gradiente empleado en la determinación por RP-HPLC se presenta en la Tabla 2.2. Los cambios de gradiente se realizaron de manera lineal y el análisis cromatográfico se llevó a cabo a una temperatura de columna de 34 °C, a una velocidad de flujo de 0.9 mL/min, con un ciclo de tiempo de inyección a inyección de 40 min. La longitud de onda del detector fue de 280 nm. La columna empleada fue de Hypersil ODS (5 μm) 150 x 4.6 mm.

Tabla 2.2. Gradiente de elución para la determinación de aminoácidos por RP-HPLC

Tiempo (min)	Gradiente lineal (%A:%B)
0-3	Elución (91:9)
3-5	(91:9) a (86:14)
5-15	Elución (86:14)
15-24	(86:14) a (81:19)
24-30	(81:19) a (69:31)
30-35	Elución (69:31)
35-40	(69:31) a (91:9)

Para el caso del triptófano, se inyectaron muestras de 15 µL dentro de la columna, y en lugar del gradiente de elución, se empleó un sistema de elución isocrática consistente en acetato de sodio 25 mM, 0.02% de azida de sodio (pH 6)/acetonitrilo (91:9) a una velocidad de flujo de 0.9 mL/min, manteniendo las demás condiciones sin variación (Yust *et al.*, 2004).

2.4.2. Digestibilidad *in vitro*

La digestibilidad proteica *in vitro* fue determinada empleando pepsina de estómago bovino (944 unidades por mg) proporcionada por Sigma-Aldrich, de acuerdo al procedimiento descrito por Mertz *et al.* (1984), con ligeras modificaciones. Se suspendieron 500 mg de aislado proteico de semilla de calabaza en 25 mL de buffer de monofosfato de potasio 0.2 M (NaH₂PO₄, pH 2.0), conteniendo 2.0 mg/mL de solución de pepsina en un baño de agua a 37 °C en agitación, durante 120 min. La suspensión fue filtrada, y el porcentaje de proteína soluble fue deducido del porcentaje de proteínas en el aislado inicial y en el residuo, mediante el método de Bradford (1976). La digestibilidad *in vitro* fue reportada como el porcentaje de proteína soluble.

$$\% \text{ Digestibilidad} = \frac{(\text{Proteína muestra} - \text{Proteína residuo})}{\text{Proteína muestra}} \times 100 \quad (\text{Ec. 15})$$

2.4.3. Determinación de los parámetros nutricionales

A partir de la composición de aminoácidos del aislado proteico y el valor de la digestibilidad proteica se determinaron los siguientes parámetros nutricionales:

- la puntuación o evaluación química del perfil de aminoácidos (CS),
- la tasa de aminoácidos esenciales (E/T),
- el índice de aminoácidos esenciales (EAAI),
- el valor biológico (BV),
- la digestibilidad proteica corregida con puntuación de aminoácidos (PDCAAS).

en base a las Ecuaciones 1, 2, 4, 5 – 8 y 12.

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.1. COMPOSICIÓN PROXIMAL

Los datos correspondientes a la determinación de la composición proximal de la harina entera y desgrasada de semilla de calabaza (*C. argyrosperma* Huber) se presentan en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Composición proximal (% en base seca)* de la harina entera (HE) y desgrasada (HD) de la semilla pelada de calabaza (*C. argyrosperma* Huber) en comparación con las semillas de otras calabazas

Componente	HE	HD	<i>C. pepo</i> L. ¹	<i>C. máxima</i> ²	<i>C. moschata</i> ³
Proteína	36.15 ± 0.31 ^a	65.63 ± 1.39 ^b	36.47 ± 0.48	36.02	28.21
Grasa	46.76 ± 0.27 ^a	3.21 ± 0.03 ^b	51.01 ± 0.28	38.25	43.22
Fibra cruda	3.36 ± 0.06 ^a	2.5 ± 0.13 ^b	4.43 ± 0.63	3.03	10.27
Cenizas	5.67 ± 0.02 ^a	9.15 ± 0.09 ^b	3.21 ± 0.14	3.96	5.03
Extracto libre de N	8.06 ± 0.43 ^a	19.5 ± 1.36 ^b	4.88 ± 0.53	18.74	13.26

*La humedad fue de 5.46 ± 0.02 y 3.52 ± 0.16 % para HE y HD, respectivamente. Promedios ± desviación estándar de tres determinaciones. Los diferentes superíndices en la misma fila indican diferencia significativa ($p < 0.05$). ¹ Eldawy & Taha, 2001; ² Habib *et al.*, 2015; ³ Kim *et al.*, 2012.

La harina entera de semilla de calabaza tuvo un alto contenido proteico (36.15 ± 0.31 en base seca) y de lípidos (46.76 ± 0.27% en base seca). Este contenido es similar al reportado para la semilla de *C. pepo* L. por Eldawy & Taha (2001) así como al de *C. máxima* (Habib *et al.*, 2015), pero con un contenido proteico mayor al de *C. moschata* (Kim *et al.*, 2012). Los demás componentes fueron minoritarios y presentaron porcentajes similares entre las semillas de las diferentes especies, excepto en el caso del extracto libre de nitrógeno para la semilla de *C. pepo*. Respecto a las ligeras diferencias entre los valores obtenidos, éstas pueden ser atribuidas a la diversidad genética (Idouraine *et al.*, 1996).

El contenido de proteínas (%), cenizas (%) y carbohidratos incrementaron en la harina desgrasada (%), mientras que el contenido de lípidos y fibra cruda decrecieron (%). El incremento en el contenido proteico ha sido reportado previamente en harinas

desgrasadas de soya (Lapedes, 1977), esto debido a que la extracción de la grasa resulta en un incremento relativo en la proporción con respecto a los otros componentes. El descenso en la cruda fibra pudo haberse originado debido a que una porción de la fibra soluble fue extraída por el solvente empleado durante el proceso de desgrasado. El alto contenido proteico de la harina de semilla de calabaza es comparable con el de otras semillas y sugiere que ésta tiene un gran potencial para su aplicación en la elaboración de productos de alto contenido proteico.

3.2. CARACTERIZACIÓN PROTEICA

A partir de 20.01 ± 0.01 gramos de harina desgrasada (HD) se obtuvieron 10.81 ± 0.18 g de aislado proteico en polvo, al cual se le realizaron los análisis cuyos resultados se presentan a continuación.

3.2.1. Solubilidad proteica

El perfil de solubilidad proteica para el aislado proteico se muestra en Figura 3.1, y fue determinado en base a la cantidad de proteína disuelta en una dispersión de 1 g de aislado en un volumen de 100 mL con agua destilada a valores de pH en el rango 2-11.

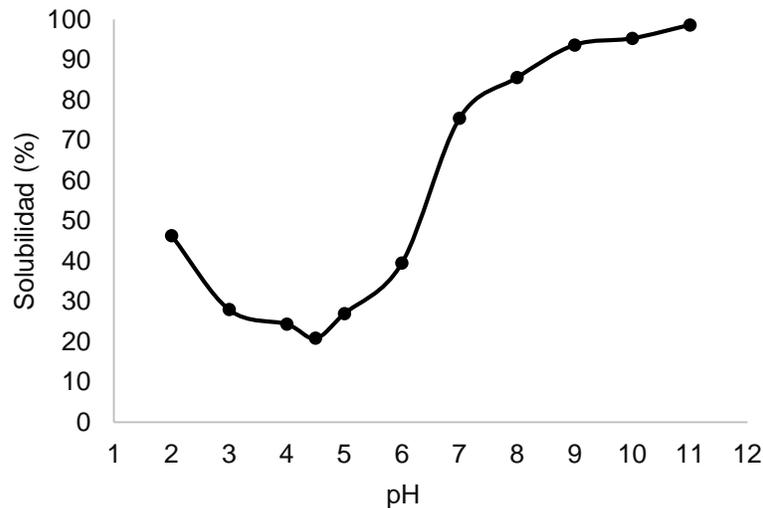


Figura 3.1. Perfil de solubilidad del aislado proteico

Se observó un mínimo de solubilidad a un valor de 4.5, mientras que a valores más altos o más bajos la solubilidad proteica aumentó; la máxima solubilidad observada fue de 98.62 ± 0.97 % a un valor de pH 11. La curva de solubilidad observada es comparable a la solubilidad reportada para aislados proteicos de otras semillas, tales como el girasol (González-Pérez *et al.*, 2005) y el ajonjolí (Achouri *et al.*, 2012), y se ajusta a la tendencia general de las proteínas de los alimentos de origen vegetal, las cuáles son mayormente acídicas, con valores mínimos de solubilidad a pH 4-5 y máximos a pH alcalino (Yuliana *et al.*, 2004). Se sabe que la solubilidad de las proteínas depende de la carga prevalente de los aminoácidos que las constituyen a un determinado valor de pH, de tal modo que a un valor de pH igual al punto isoelectrico (pI) se observa la mínima solubilidad, debido a que el balance entre cargas positivas y negativas reduce la repulsión electrostática entre los grupos cargados de las proteínas, conduciendo de esta forma a la formación de agregados entre las mismas, disminuyendo de este modo la solubilidad proteica; conforme el pH de la solución decrece respecto del punto isoelectrico, predominan las formas catiónicas, y al aumentar éste, predominan las formas aniónicas, de modo tal que la repulsión electrostática se incrementa en ambos casos, aumentando de este modo la solubilidad proteica en solución (Deng *et al.*, 2011; Lawal, 2004).

Se evaluó también la influencia de la concentración de la dispersión (C_{disp}) en la cantidad de proteína disuelta (C_{sol}) para tres diferentes valores de pH (3, 5 y 8) (Figura 3.2a), observándose un incremento en dicha cantidad con respecto al aumento en la concentración de la dispersión proteica, sin importar el valor del pH de la misma. La mayor cantidad de proteína disuelta fue de 6.34 ± 0.04 g/100 mL, obtenida a una concentración de 10 g/100 mL y un valor de pH de 8.

Por otro lado, la solubilidad proteica disminuyó con respecto al aumento de C_{disp} , (Figura 3.2b) a pesar del incremento absoluto en la concentración de proteína disuelta observado en la Figura a. Esta disminución fue más notoria a pH 8 y a pH 3, en los cuales el valor de la solubilidad proteica pasó de 87.00 ± 1.00 a 63.40 ± 0.40 y de 34.00 ± 0.50 a 25.90 ± 0.20 , a partir de lo cual se infiere que conforme aumenta la cantidad de proteína añadida a un determinado volumen de disolvente, las interacciones entre las cadenas

polipeptídicas se incrementan, disminuyendo la solubilidad de las mismas en el medio acuoso.

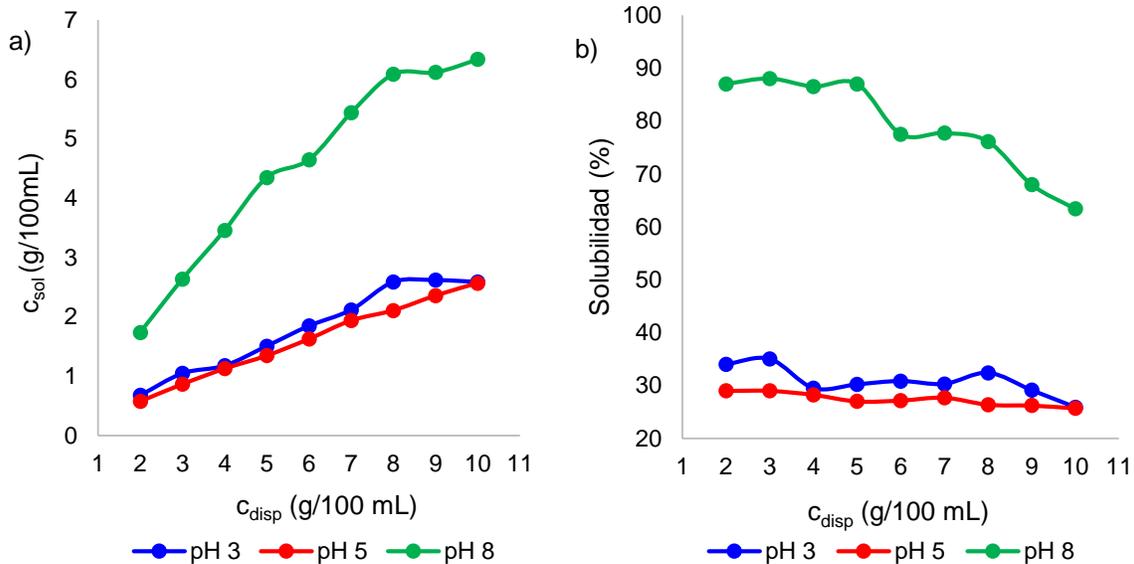


Figura 3.2. Influencia de la concentración del aislado proteico en dispersión (c_{disp}) en a) la concentración de proteína disuelta (c_{sol}) y b) la solubilidad proteica.

3.2.2. Fraccionamiento de Osborne

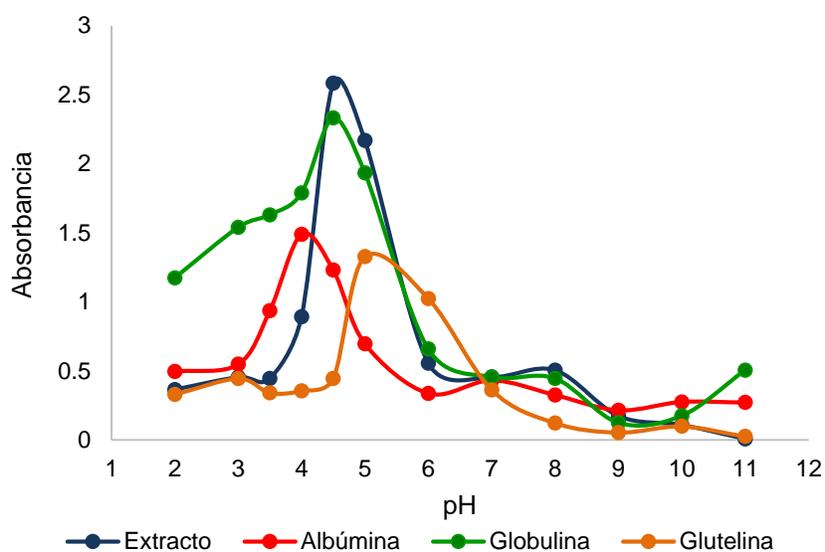
Se observó la presencia de diferentes fracciones proteicas con diferencias en su solubilidad conformando el aislado proteico de semilla de calabaza (AP), de acuerdo al método de fraccionamiento de Osborne (1924). La fracción mayoritaria fue la de las proteínas solubles en solución salina de NaCl al 5 % (globulinas), con un 74.79 %, seguidas de las solubles en medio altamente alcalino (glutelinas) con un 14.07 % y las solubles en agua (albúminas) con un 11.04 %, además de un porcentaje muy pequeño de proteínas solubles en etanol (prolaminas). Estas observaciones concuerdan con los datos reportados en la literatura, dado que en las semillas que no son cereales las proteínas predominantes son las globulinas (Marcone, 1998), tendencia que se mantiene en las cucurbitáceas, como *C. máxima* y *C. pepo*, en las cuales las globulinas son la fracción predominante (Rezig, 2013). Por su parte, las prolaminas no suelen en cantidades importantes en las semillas de la mayoría de las plantas (incluyendo a las cucurbitáceas), sino solamente en los cereales, especialmente en los endospermos de semillas de amiláceas en crecimiento (Horax, 2010).

Tabla 3.2. Contenidos y porcentajes relativos de las diferentes fracciones proteicas de Osborne en el aislado proteico de semilla de calabaza

Componente	Masa (g)	% de HD	% Relativo
Albúminas	1.1228	5.61	11.04
Globulinas	7.6106	38.01	74.79
Glutelinas	1.4323	7.15	14.07
Prolaminas	0.0102	0.05	0.10
TOTAL	10.18	50.82	100.00

3.2.3. Puntos isoeléctricos

Para optimizar los valores de pH a emplear en la precipitación proteica se obtuvieron los perfiles de turbidez a 320 nm tanto del aislado proteico como de las diferentes fracciones proteicas solubles (Figura 3.3). Se obtuvieron valores de máxima turbidez a valores de pH de 4.5, 4, 4.5 y 5 para el aislado proteico, las albúminas, las globulinas y las glutelinas, respectivamente. Estos valores de pH correspondieron al valor del pH isoeléctrico promedio para las diferentes clases de proteínas contenidas en el aislado o fracción analizada.

**Figura 3.3.** Absorbancias a 320 nm del aislado proteico y las diferentes fracciones proteicas a varios valores de pH

Los valores obtenidos se corresponden con los valores normalmente obtenidos para las proteínas vegetales que no provienen de cereales, en los cuales los puntos isoeléctricos varían normalmente en un rango de valores aproximado de 3 – 5 (Marcone, 1998; Rezig, 2013). Además, esta observación está acorde al perfil de solubilidad observado para el aislado proteico, ya que Damodaran (1997) menciona que el punto isoeléctrico de las proteínas corresponde al punto mínimo de solubilidad de las proteínas, y dado que la mayoría de las proteínas de los alimentos, entre ellos los vegetales, son de naturaleza acídica, exhiben una solubilidad mínima a valores de pH de 4 – 5, correspondiente a su punto isoeléctrico.

3.2.4. Determinación de la concentración proteica por el método de Bradford

Se determinó el contenido proteico de las harinas entera (HE), desgrasada (HD) y el extracto proteico, así como también el de las fracciones proteicas obtenidas a través del fraccionamiento por el método de Osborne. La curva estándar de albúmina sérica bovina (BSA) obtenida y empleada para interpolar las concentraciones proteicas de las muestras se presenta en la Figura 3.4.

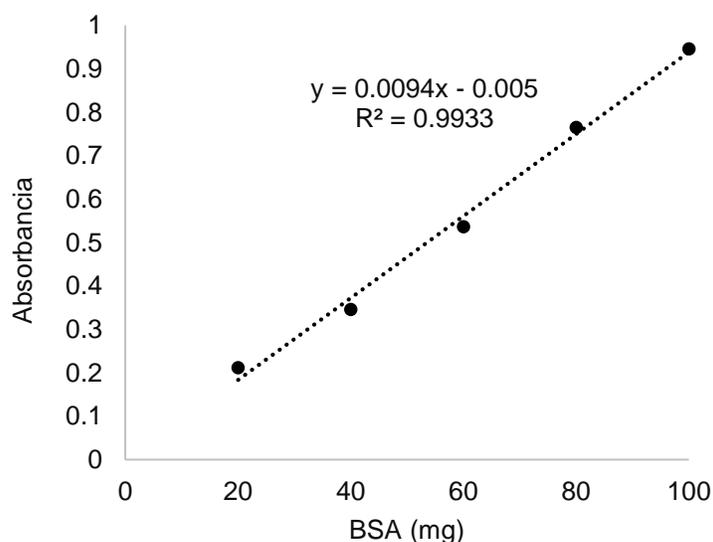


Figura 3.4. Curva de calibración de BSA empleada para la cuantificación proteica mediante el método de Bradford

El porcentaje de proteína observado en la harina entera de semilla (Tabla 3.3) fue similar a las leguminosas con un contenido elevado de proteína en su composición, las cuales generalmente oscilan entre el 20 y el 35 %. El contenido proteico fue similar al de la soya (36.5%) y el altramuz (36.41%), y mayor al del garbanzo (22.88%), haba (24.56%), frijol (25.37%) y la lenteja (26.71%) (Gil, 2010), así como también mucho mayor a los de los cereales, tales como la quinoa (18%) y el amaranto (16%), los dos cereales con mayor contenido proteico (Pitchford, 2007). En el caso de la harina desgrasada, el contenido proteico fue aún mayor (60.32%), lo cual es relevante dado que esta se genera como un residuo en la obtención del aceite de calabaza, generando de esta manera un valor agregado.

Respecto al aislado proteico se observa que su contenido proteico es bastante elevado, con un porcentaje de $91.00 \pm 0.50\%$. Este porcentaje permite considerarlo realmente un aislado proteico como tal y no simplemente un concentrado, ya que se de acuerdo a Doxastakis (2000), un contenido proteico mayor al 90% o mayor indica que el producto es un aislado proteico, mientras que, si dicho contenido es de un 70% o algo mayor, nos estaremos refiriendo a un concentrado proteico. Los porcentajes de proteína de las fracciones de Osborne del aislado fueron también elevados, en el rango cercano al 80 – 90%.

Tabla 3.3. Contenidos de proteína de las harinas, aislado proteico y fracciones proteicas de semilla de calabaza

Producto	Proteína (%)
Harina entera (HE)	34.17 ± 0.29
Harina desgrasada (HD)	63.32 ± 1.32
Aislado proteico	91.00 ± 0.50
Albúminas	78.02 ± 0.09
Prolaminas	87.20 ± 0.54
Glutelinas	91.76 ± 0.52

Promedios \pm desviación estándar de tres determinaciones.

3.2.5. Color

La harina entera (HE) y la harina desgrasada (HD) difirieron significativamente ($p < 0.05$) en todos los parámetros de color (L^* , a^* , b^* , C^* y h°) (Tabla 3.4). Las muestras con tendencia hacia el rojo tuvieron valores negativos de a^* ; mientras que las que tendieron hacia el verde tuvieron valores positivos; los que tendieron hacia el azul tuvieron valores negativos de b^* , y los que tendieron al amarillo tuvieron valores positivos de b^* .

Tabla 3.4. Parámetros de color de las harinas, aislado y fracciones proteicas de la semilla de *C. argyrosperma* H.

	L^*	a^*	b^*	C^*	h°
Harina entera (HE)	77.94 ± 0.03^a	-2.48 ± 0.01^a	25.86 ± 0.01^a	25.98 ± 0.01^a	95.68 ± 0.00^a
Harina desgrasada (HD)	95.62 ± 0.04^b	-0.19 ± 0.00^b	9.37 ± 0.03^b	9.37 ± 0.03^b	91.10 ± 0.00^b
Aislado proteico	76.86 ± 0.01^c	2.10 ± 0.00^c	26.90 ± 0.01^c	26.98 ± 0.01^c	85.53 ± 0.01^c
Albúminas	74.60 ± 0.03^d	0.99 ± 0.00^d	21.00 ± 0.01^d	21.02 ± 0.01^d	87.30 ± 0.00^d
Globulinas	95.61 ± 0.03^e	0.11 ± 0.00^e	11.50 ± 0.01^e	11.5 ± 0.02^e	89.43 ± 0.02^e
Glutelinas	72.18 ± 0.55^f	1.91 ± 0.00^f	25.91 ± 0.43^f	25.98 ± 0.43^a	85.79 ± 0.08^f

Promedios \pm desviación estándar de tres determinaciones. Los diferentes superíndices en la misma columna indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

Las muestras analizadas difirieron significativamente en todos los parámetros de color analizados. Los valores de L^* observados fueron cercanos a uno (valor asociado a una tonalidad blanca), probablemente porque la mayoría de los pigmentos presentes en las semillas (carotenoides y polifenoles, por ejemplo) fueron removidos durante el proceso de desgrasado, lo cual explica el cambio observado en el valor de este parámetro entre la harina entera y la desgrasada, la cual mostró una alta luminosidad. Los valores de a^* de las muestras fueron mayormente positivos y pequeños, mostrando una pequeña tendencia al verde, excepto para las harinas, que mostraron valores negativos y pequeños de b , evidenciando una tendencia mínima al rojo. En el caso de b^* , las

magnitudes de los valores fueron mayores y todos positivos, evidenciando una tendencia al amarillo considerable para todas las muestras analizadas.

Los valores de la cromaticidad (C^*) muestran una baja saturación del color, especialmente en la harina desgrasada y en las globulinas (fracción proteica más abundante), las cuáles mostraron la mayor luminosidad (blancura). El ángulo de tono (h°) varía muy poco entre las diferentes muestras de proteína, con una magnitud del ángulo pequeña, lo cual indica que la tonalidad de los mismos es de baja intensidad y bastante similar entre las diferentes muestras.

3.2.6. pH y densidad

Respecto a la determinación del pH de las harinas, se obtuvo un valor de pH de 6.38 para la harina entera y de 6.25 para la harina desgrasada, observándose diferencia significativa entre ambos valores ($p > 0.05$), aunque ambos se mantuvieron dentro de un estrecho rango de acidez, con valores ligeramente menores a 7 (Tabla 3.5).

La diferencia entre ambos valores fue probablemente debido a la presencia de ácidos grasos libres en el aceite de la semilla de calabaza (Rodríguez-Miranda *et al.*, 2012), que se dispersan cierta cantidad de iones H^+ en la dispersión. El proceso de desgrasado con hexano eliminó la mayor parte de estos aceites, por lo cual el valor del pH de la harina desgrasada sufrió cierto incremento.

Tabla 3.5. Valores de pH y densidad de la harina entera (HE) y desgrasada (HD) de la semilla de calabaza

Parámetro	HE	HD
pH	6.26 ± 0.01 ^a	6.39 ± 0.01 ^b
Densidad	0.72 ± 0.03 g/mL ^a	0.79 ± 0.01 g/mL ^b

Promedios ± desviación estándar de tres determinaciones. Los diferentes superíndices en la misma línea indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

3.2.7. Actividad antioxidante

3.2.7.1. Capacidad de captación de radicales libres DPPH[•]

La actividad de captación de radicales libres de las proteínas presentes en el aislado proteico de *C. argyrosperma* H. se presenta en la Tabla 3.6 y la Figura 3.5.

Tabla 3.6. Porcentajes de inhibición del radical DPPH para el ácido ascórbico y el aislado proteico de la semilla de *C. argyrosperma* H. a diferentes concentraciones

Concentración (mg/mL)	% Inhibición Ác. Ascórbico	% Inhibición Proteína
0.1	10.02 ± 0.39	1.67 ± 0.97
0.2	23.07 ± 1.65	7.34 ± 0.49
0.5	51.23 ± 0.54	18.84 ± 0.61
0.8	74.08 ± 1.82	28.57 ± 3.61
1	94.22 ± 0.19	36.02 ± 1.06

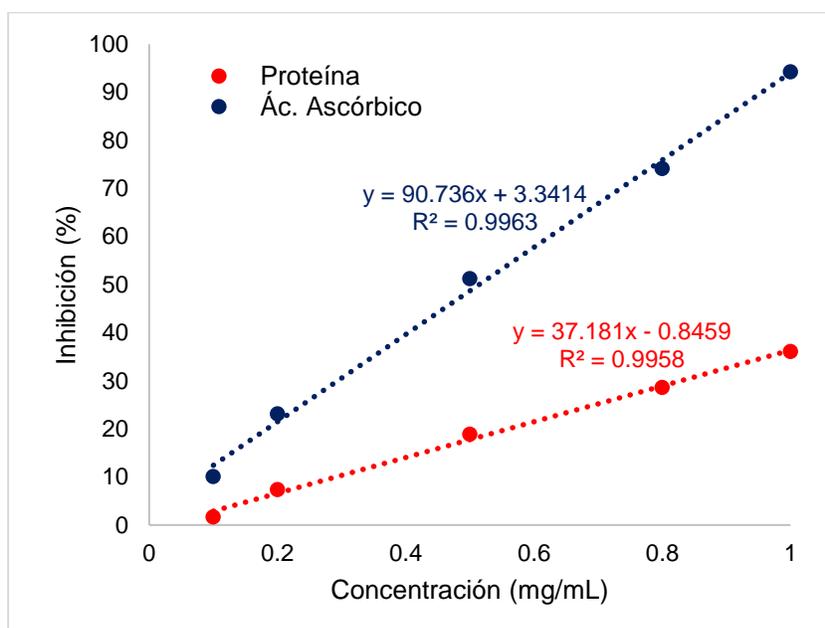


Figura 3.5. Actividad captadora de radicales libres DPPH[•] del ácido ascórbico y del aislado proteico de la semilla de *C. argyrosperma* H.

Se observó que la actividad antirradicalaria incrementó de manera directamente proporcional a la concentración del aislado proteico. La actividad antioxidante del aislado proteico puede deberse a la presencia en su estructura de determinados aminoácidos que tienen grupos funcionales que permiten capturar de un modo estable los radicales libres que se asocian con dichos aminoácidos (Siow, 2014). Se tienen reportes de que se pueden desarrollar procesos de oxidación en ciertos residuos de aminoácidos dentro de las proteínas, tales como los aminoácidos sulfurados o las cadenas terminales de tipo aromático, además de que existen proteínas de tipo enzimático (como la catalasa y la peróxido dismutasa) que inactivan las especies reactivas de oxígeno (Elías *et al.*, 2008).

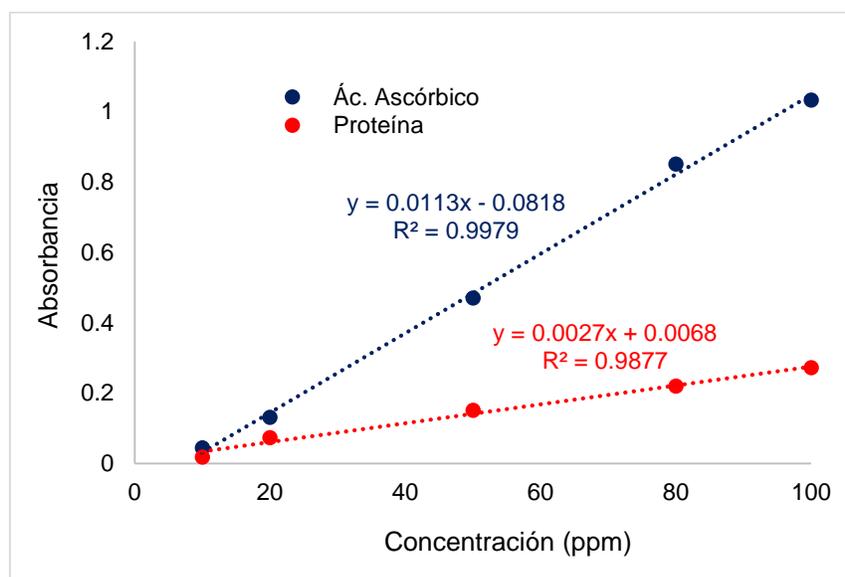
Se calculó la concentración efectiva para una actividad antirradicalaria del 50% (IC₅₀) mediante regresión lineal, obteniéndose un valor de 1.32 mg/mL. Como control positivo se empleó ácido ascórbico, el cual mostró una mejor actividad captadora de radicales DPPH• en comparación con la del aislado proteico, con un valor de IC₅₀ de 0.51 mg/mL. Esta actividad relativamente puede explicarse con el hecho de que se conoce que los hidrolizados proteicos suelen tener una mayor actividad antioxidante, y no así las proteínas estructuralmente enteras, dado que presentan una mayor cantidad de residuos de aminoácidos expuestos que pueden asociarse con los radicales libres causantes de los procesos de oxidación, y de esta manera estabilizarlos de manera más efectiva (Elías *et al.*, 2008).

3.2.7.2. Poder reductor de Fe⁺³

La Tabla 3.7 muestra el poder reductor del aislado proteico a diferentes concentraciones, así como para el ácido ascórbico, antioxidante de referencia. Una comparación del poder reductor correspondiente se presenta en la Figura 3.6.

Tabla 3.7. Poder reductor de Fe⁺³ del ácido ascórbico y del aislado proteico de la semilla de *C. argyrosperma* H. a diferentes concentraciones

Concentración (ppm)	Absorbancia ác. ascórbico (UA)	Absorbancia proteína (UA)	Poder reductor (µg eq ác. ascórbico)
10	0.0439 ± 0.0018	0.0209 ± 0.0055	5.21 ± 0.47
20	0.1309 ± 0.0100	0.0733 ± 0.0165	9.61 ± 1.38
50	0.4699 ± 0.0018	0.1505 ± 0.0091	16.10 ± 0.76
80	0.8514 ± 0.0304	0.2192 ± 0.0145	21.87 ± 1.22
100	1.0328 ± 0.0500	0.2718 ± 0.0135	26.29 ± 1.14

**Figura 3.6.** Poder reductor de Fe⁺³ del ácido ascórbico y del aislado proteico de la semilla de *C. argyrosperma* H.

Se observó que el extracto mostró algún grado de capacidad donadora de electrones para todas las concentraciones empleadas, siendo, sin embargo, bajo en comparación con el poder reductor mostrado por el control positivo (ácido ascórbico). De modo similar a lo observado en la prueba de captación de radicales libres DPPH•, este resultado puede atribuirse a que las proteínas enteras presentes en el aislado proteico tienen menos residuos de aminoácidos expuestos disponibles para experimentar un proceso de óxido reducción con los iones Fe⁺³, ya que una parte considerable de ellos se encuentran dentro de su estructura interna, a diferencia de los hidrolizados proteicos.

A la mayor concentración empleada (100 ppm), el extracto proteico mostró un poder reductor equivalente a $26.29 \pm 1.14 \mu\text{g}$ de ácido ascórbico.

3.3. CALIDAD PROTEICA

3.3.1. Determinación del contenido de aminoácidos por RP-HPLC

3.3.1.1. Curva de calibración de los aminoácidos

El cromatograma correspondiente a la elución de la mezcla de 19 estándares de aminoácidos correspondientes a la determinación por hidrólisis ácida se presenta en la Figura 3.7, mientras que el correspondiente a la determinación del triptófano mediante hidrólisis básica se presenta en la Figura 3.8.

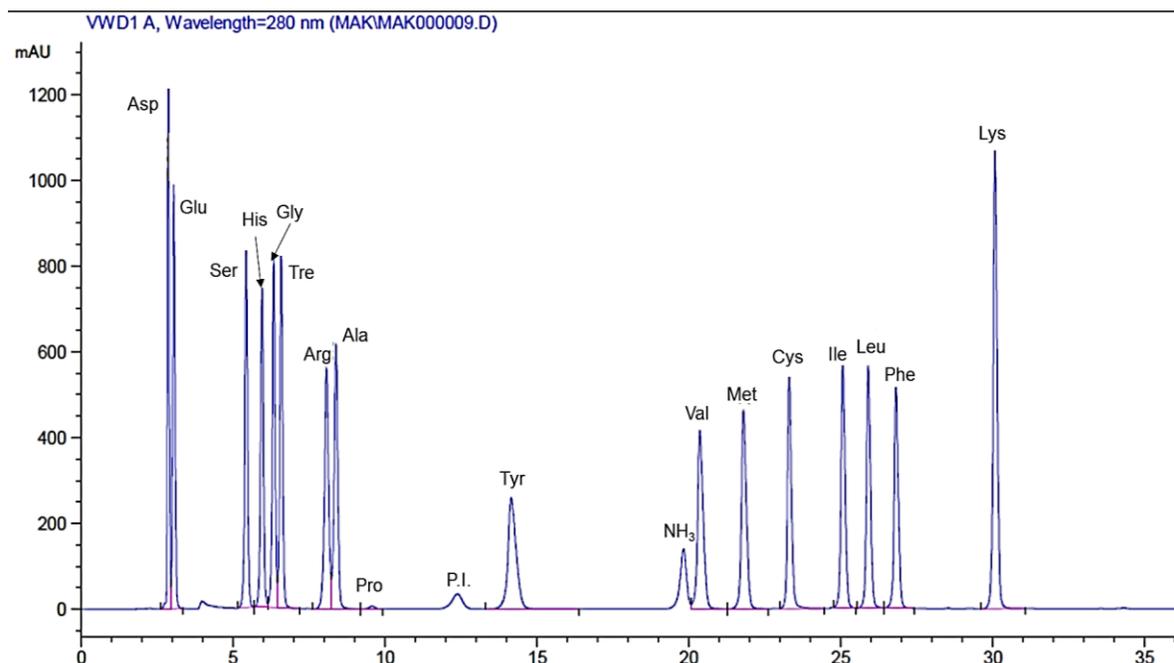


Figura 3.7. Patrón de elución de los derivados N-[2,2-bis(etoxicarbonil)vinil] de los aminoácidos presentes en la mezcla estándar (1500 pmol de cada aa).

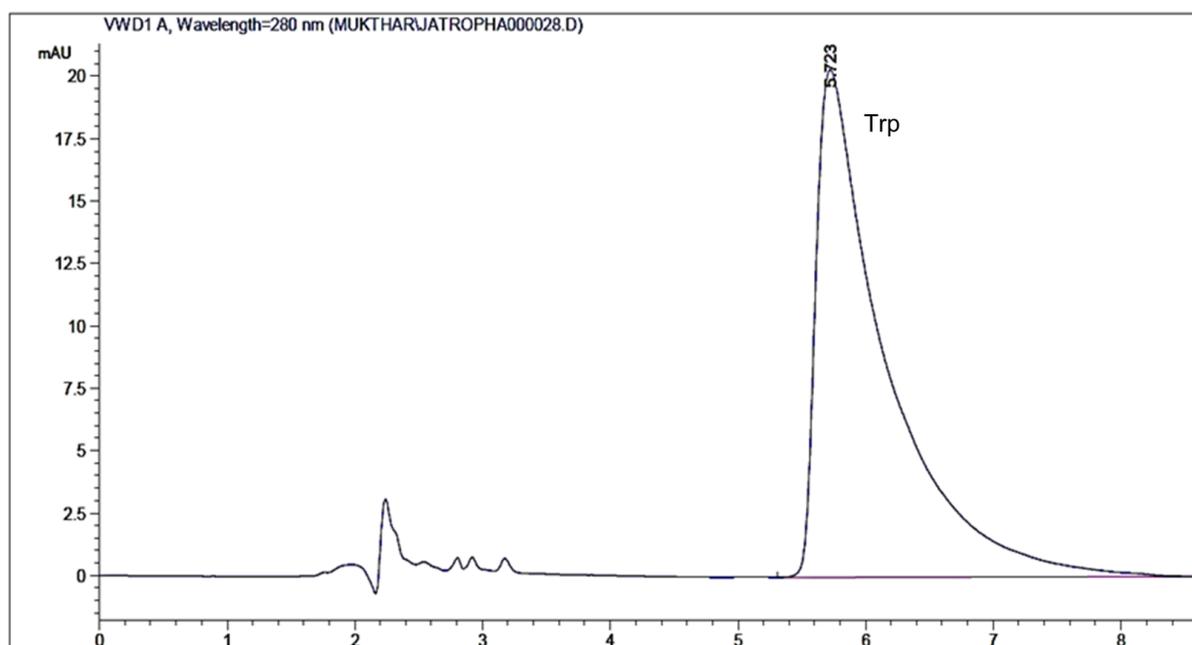


Figura 3.8. Patrón de elución del triptófano en la mezcla estándar (768 pmol)

En el patrón de elución se observó que la resolución de los picos cromatográficos correspondientes a cada uno de los aminoácidos de la mezcla es adecuado, por lo cual puede considerarse que las condiciones empleadas en el gradiente de elución son las más adecuadas (Figura 3.9). En el caso de los derivados de los ácidos aspártico y glutámico, si bien la separación entre los picos correspondientes es pequeña, sus tiempos de retención fueron repetibles, y además fue totalmente factible la integración de sus áreas respectivas para la realización de los cálculos químicos. Se observó también que el reactivo derivatizante EMMDE no presentó un pico cromatográfico que pudiera interferir con la identificación y cuantificación de los derivados N-[2,2-bis(etoxicarbonil)vinil] de los aminoácidos. Prácticamente no existieron picos cromatográficos no identificados, evidenciando que la reacción entre el derivatizante y los aminoácidos es cuantitativa y no generó productos interferentes en el rango de elución (Alaiz *et al.*, 1992). Por otro lado, las señales correspondientes al patrón interno (P.I.) y al amonio (NH_3) presentaron tiempos de retención similares en todas las concentraciones empleadas en la curva de calibración, contribuyendo de este modo a garantizar la precisión de los resultados.

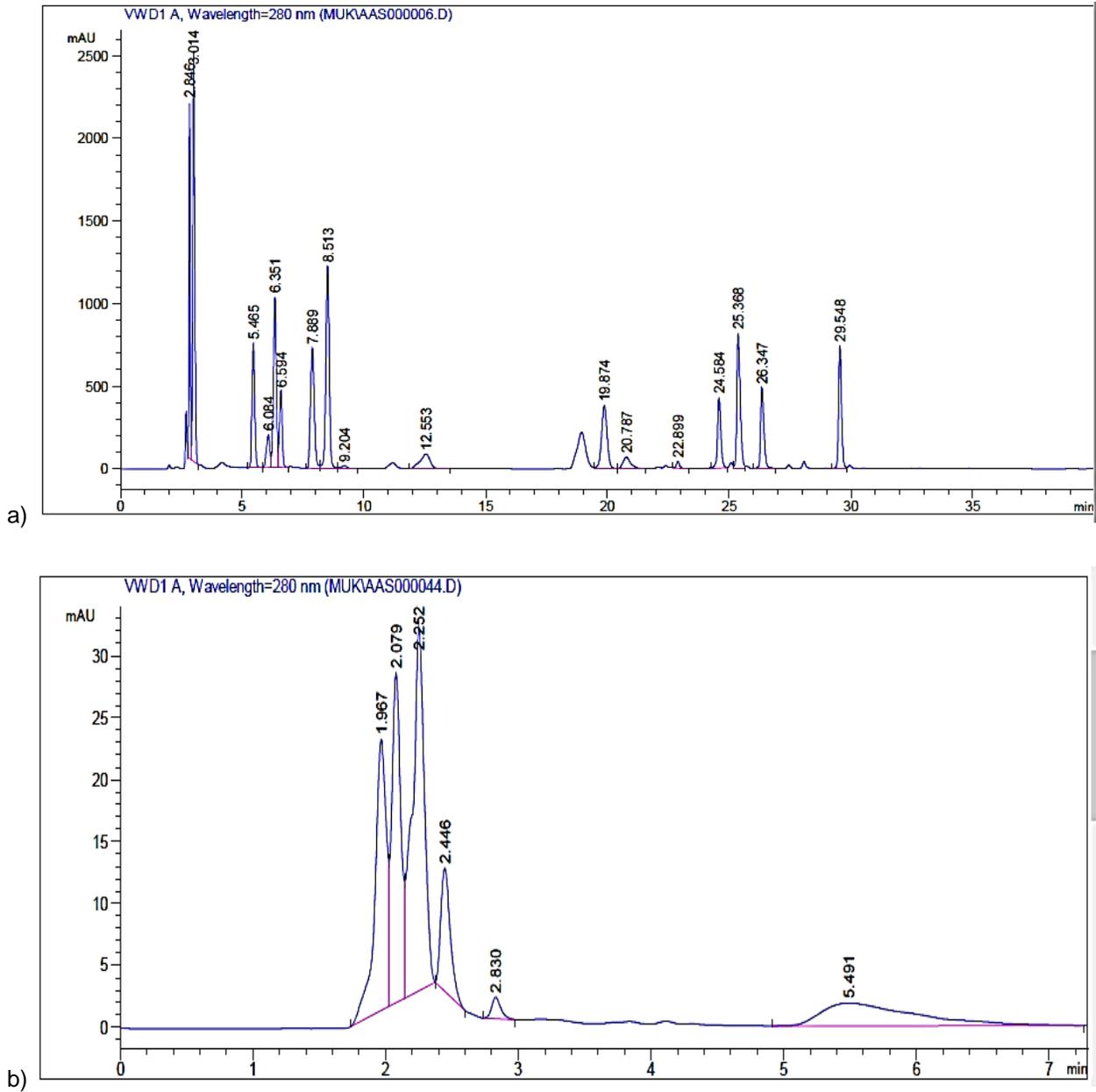


Figura 3.9. Cromatogramas correspondientes al análisis por RP-HPLC de los hidrolizados proteicos: a) hidrolizado ácido; b) hidrolizado básico (para la detección de triptófano)

En la Tabla 3.8 se presentan los tiempos de retención para cada uno de los aminoácidos analizados. Analizando los coeficientes de variación, se observó que la variación entre dichos valores fue mínima, lo cual permite inferir que los derivados son estables y las señales cromatográficas que generan son repetibles. Este comportamiento se observó en todo el rango de concentraciones evaluadas. El factor de respuesta corresponde a la pendiente de la curva de calibración de cada aminoácido analizado.

Tabla 3.8. Tiempos de retención (t_R) y factores de respuesta (F.R.) de los aminoácidos de la mezcla estándar

Aminoácido	t_R (min)	F.R.
Ácido aspártico ^a (Asp)	2.824 ± 0.106	1.2828
Ácido glutámico ^b (Glu)	2.917 ± 0.119	1.4099
Serina (Ser)	5.470 ± 0.256	1.4088
Histidina (His)	6.046 ± 0.195	1.2615
Glicina (Gly)	6.411 ± 0.111	1.3243
Treonina (Tre)	6.654 ± 0.145	1.4052
Arginina (Arg)	8.157 ± 0.266	1.4134
Alanina (Ala)	8.689 ± 0.289	1.3982
Prolina (Pro)	9.721 ± 0.202	0.0297
Tirosina (Tyr)	14.857 ± 0.274	1.3164
Valina (Val)	20.705 ± 0.221	0.5022
Metionina (Met)	22.069 ± 0.173	1.4008
Cisteína (Cys)	23.462 ± 0.188	1.3512
Isoleucina (Ile)	25.221 ± 0.187	1.439
Leucina (Leu)	26.043 ± 0.202	1.4044
Fenilalanina (Phe)	26.973 ± 0.254	1.3216
Lisina (Lys)	30.141 ± 0.337	2.5903
Triptófano (Trp)	5.95 ± 0.084	0.4869

^a Reportado como suma de ácido aspártico y asparagina; ^b reportado como suma de ácido glutámico y glutamina

3.3.1.2. Composición de los aminoácidos en la proteína de semilla de calabaza

En la Tabla 3.9 se presenta el contenido de aminoácidos en g aa/100 g de proteína presente en el aislado proteico, determinados a partir de las curvas de calibración obtenidas para cada uno de los aminoácidos analizados. A manera de comparación, se presentan también los contenidos mínimos recomendados de aminoácidos esenciales,

de acuerdo al patrón de referencia de la FAO/OMS para niños en edad preescolar (2-5 años) (FAO/OMS/ONU, 1985).

Tabla 3.9. Contenido de aminoácidos por 100 g de proteína en el aislado proteico, en comparación con el contenido mínimo recomendado por la FAO/OMS

Aminoácido	g aa/ 100 g proteína	g aa/ 100 g proteína (FAO 1985)
Ácido aspártico ^a (Asp)	7.06 ± 0.21	
Ácido glutámico ^b (Glu)	14.00 ± 0.30	
Serina (Ser)	4.03 ± 0.01	
Glicina (Gly)	4.76 ± 0.14	
Arginina (Arg)	8.94 ± 0.12	
Alanina (Ala)	6.62 ± 0.60	
Prolina (Pro)	9.82 ± 0.27	
Metionina (Met)	2.05 ± 0.06	2.5 ^a
Cisteína (Cys)	1.32 ± 0.04	
Fenilalanina (Phe)	5.05 ± 0.08	6.3 ^b
Tirosina (Tyr)	3.19 ± 0.10	
Treonina (Tre)	2.41 ± 0.03	3.4
Valina (Val)	12.94 ± 0.05	3.5
Histidina (His)	2.18 ± 0.02	1.9
Isoleucina (Ile)	3.43 ± 0.03	2.8
Leucina (Leu)	6.94 ± 0.06	6.6
Lisina (Lys)	3.21 ± 0.00	5.8
Triptófano (Trp)	1.34 ± 0.03	1.1

^a Met + Cys; ^b Tyr + Phe

De acuerdo a los datos obtenidos, se observó que los contenidos de aminoácidos esenciales satisfacen los contenidos mínimos requeridos de acuerdo a la FAO, excepto en el caso de la lisina, que fue el aminoácido limitante, y en el caso del triptófano, uno de

los aminoácidos que suele ser deficiente en las proteínas de origen vegetal, el aporte fue superior al mínimo recomendado. Está reportado que un alto contenido de histidina, prolina, alanina, valina, metionina y leucina puede incrementar la actividad antioxidante (Chen *et al.*,1996), y de acuerdo a los resultados obtenidos, se observó que las proteínas de la semilla de calabaza presentan alto contenido de aminoácidos que pudieran estar relacionados con una alta actividad antioxidante.

3.3.1.2. Distribución por grupos de los aminoácidos presentes en la proteína de semilla de calabaza

En la Tabla 3.10 se presenta la clasificación de los aminoácidos presentes en el aislado proteico por grupos. Se determinó que la proporción de aminoácidos esenciales fue cercana a la mitad del total de los aminoácidos presentes en el mismo. La alanina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, prolina y valina son conocidas por ser aminoácidos hidrofóbicos, y se observó un alto porcentaje de estos aminoácidos (46.12%), en relación a otros grupos de aminoácidos. El segundo grupo de aminoácidos en abundancia fueron los ácidos (21.06%), seguidos directamente por los básicos (14.33%) (Figura 3.10). Los aminoácidos sulfurados y de cadena aromática se encontraron en cantidades considerables, hecho que podría estar relacionado con la capacidad antioxidante del aislado proteico previamente mencionada.

Tabla 3.10. Abundancias relativas de los aminoácidos por grupos en el aislado proteico

Tipo de aminoácidos	Abundancia relativa (%)
Esenciales	44.06 ± 0.50
No esenciales	55.94 ± 1.65
Hidrofóbicos	46.85 ± 0.14
Básicos	14.33 ± 0.14
Ácidos	21.06 ± 0.51
Neutros	15.71 ± 0.32
Aromáticos	8.24 ± 0.18
Ramificados	23.31 ± 0.14
Sulfurados	3.37 ± 0.10

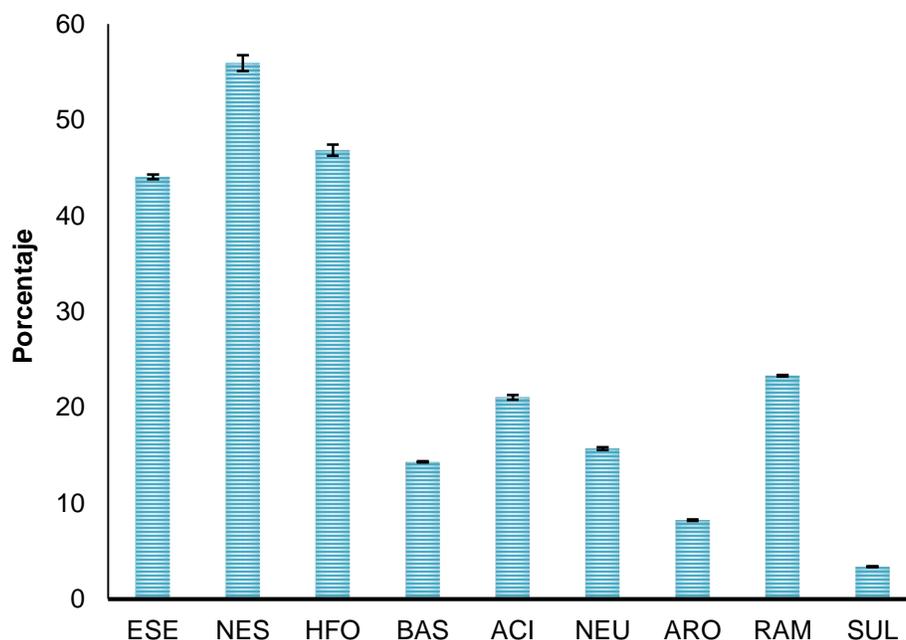


Figura 3.10. Distribución de los grupos de aminoácidos (ESE: esenciales; NES: no esenciales; HFO: hidrofóbicos; BAS: básicos; ACI: ácidos; NEU: neutros; ARO: aromáticos; RAM: ramificados; SUL: sulfurados)

3.3.2. Calidad de la proteína de la semilla de calabaza

En base a los resultados de la composición de aminoácidos, se obtuvieron los indicadores de calidad proteica (Tabla 3.11)

Tabla 3.11. Indicadores de calidad de la proteína de la semilla de calabaza

Indicador	Valor
IVD (aislado, %)	78.79 ± 1.73 ^a
IVD (harina, %)	69.84 ± 0.98 ^b
E/T (%)	44.06 ± 1.46
EAAI	1.36 ± 0.02
CS (% , Lys)	55 ± 0.00
BV	62.27 ± 0.05
PER ₁	2.02 ± 0.04
PER ₂	2.34 ± 0.04
PER ₃	1.94 ± 0.17
PDCAAS (% , Lys)	43.33 ± 0.87

La digestibilidad proteica *in vitro* (IVD) con pepsina fue bastante buena, y fue considerablemente mayor para el aislado proteico (78.79%) en comparación con la de la harina desgrasada, hecho que se suele observar en los aislados proteicos, ya que las proteínas pueden ser parcialmente desnaturalizadas durante la preparación de los mismos, haciéndolos más accesibles a las proteasas, y de esta forma incrementando la digestibilidad (Lynch *et al.*, 1977). Los valores obtenidos fueron mayores a los observados en el sorgo y el mijo (59-63.2 y 74.8, resp.), y ligeramente menor al del trigo, maíz y arroz (85.8, 85.3 y 83.8, resp.) (Mertz *et al.*, 1984).

La tasa de aminoácidos esenciales con respecto a los aminoácidos totales (E/T) fue cercana a la mitad del total de aminoácidos (44.06%), mientras que el índice de aminoácidos esenciales (EAAI) tuvo un valor notablemente elevado (1.36). Bunda *et al.* (2015) proponen que una proteína de alta calidad tiene un valor de EAAI de 0.90 o mayor, una proteína útil está próxima a un valor de 0.80, y una proteína incompleta tiene un valor de EAAI de 0.70 o menor, por lo cual este indicador señala a la proteína de semilla de calabaza como de muy buena calidad nutricional. Respecto al valor biológico predicho (BV), el cual es un estimado de que proporción de la proteína ingerida se incorpora en el organismo, tuvo un valor de 65.47, lo que se relaciona con una alta calidad proteica, ya que un valor biológico alto (70-100 %) está relacionado con las proteínas de alta calidad nutrimental (Oser, 1959).

La razón de eficiencia proteica (PER) ha sido reconocida como un buen parámetro de estimación de la calidad proteica (Oser, 1951) y se obtuvieron tres valores estimados de PER tal como se describe en la introducción, dependientes de la concentración de Leu (PER₁), Leu y Tyr (PER₂) y Met, Leu, His y Tyr (PER₃). Se sabe que las proteínas de baja calidad tienen valores de PER menores que 1.5, y valores por encima de 2 suelen considerarse típicamente como proteínas de alta calidad nutricional (Friedman, 1996) por lo cual los tres valores de PER obtenidos para las proteínas de semilla de calabaza (2.02, 2.34 y 1.94), son indicadores de su buena calidad nutricional, mayores a los encontrados, por ejemplo, en el cacahuate (1.45-1.76) (Ghuman *et al.*, 1990), y cercano al de otras proteínas comunes como la soya (2.57) (Wolzak *et al.*, 1981).

En el caso del PDCAAS, éste tuvo una magnitud 43.33 ± 0.87 , siendo este valor similar al del maíz (48.5), trigo (46.88), sandía (46.67), sorgo (45.88), porotos (43.37) y mayor a la naranja (42.03), las castañas (40.9), tomate (39.18), dátil (37.3), uva (37.2), escarola (36.52), avellanas (35.92), fresa (35.36), hongos (32.87), dátil (31.66) y pepino (30.54) (Suárez-López *et al.*, 2006).

En base a los resultados observados, se hace evidente que la semilla de calabaza (*C. argyrosperma* H.) es una fuente importante de proteína de calidad. En primera instancia, su contenido proteico es elevado, comparado con muchas de las fuentes proteicas vegetales disponibles actualmente en el mercado, tanto con leguminosas de alto contenido proteico, tales como la soya, con semillas de tipo oleaginoso como los cacahuates, almendras, y en mucha mayor medida que los cereales, que suelen ser de muy bajo contenido proteico, aún en el caso de los de mayor contenido como el amaranto y la quinoa.

Además, se ha discutido previamente que una fuente proteica de calidad no lo es solamente por el hecho de contener una elevada cantidad de proteína bruta en su composición, sino que además debe presentar una concentración de aminoácidos esenciales suficiente para satisfacer los requerimientos nutricionales y características que permitan su correcta asimilación y empleo como componentes estructurales del organismo humano. En este sentido, de nueva cuenta se hace evidente que las características de las proteínas presentes en las semillas de calabaza la apuntalan como de alto valor nutrimental, ya que la cantidad de aminoácidos esenciales en su estructura es, además de elevada, acorde a los requerimientos establecidos por la FAO en su patrón para infantes de 2-5 años de edad, incluso superándolos en muchas ocasiones (a excepción de la lisina, que es el aminoácido limitante. De esta manera, se cumple la segunda condición de calidad proteica. La tercera condición también se cumple, al observar que los indicadores de calidad suelen ser iguales o mayores a los establecidos como marco de referencia de calidad proteica, siendo similares o mayores a los reportados en proteínas de alta calidad, por lo cual la combinación de todos estos factores permite afirmar la alta calidad proteica y el valor como fuente de proteína dietaria de la semilla de calabaza.

CAPÍTULO 4. CONCLUSIONES

La semilla de calabaza *C. argyrosperma* Huber fue abundante en grasas y proteínas, siendo la porción lipídica un poco menos de la mitad del peso total, mientras que las proteínas fueron aproximadamente un tercio de la composición de la semilla entera. Cuando la harina se desgrasó para la obtención del aceite, se obtuvo una harina desgrasada con un contenido proteico muy elevado, mayor a la mitad del peso total del mismo, lo que lo convierte en una fuente proteica para consumo.

El procedimiento de extracción empleado para la generación de aislados proteicos generó un producto con un elevado contenido proteico (91%), que permite considerarlo como tal. Dicho aislado tuvo un punto isoeléctrico de 4.5, el cual es acorde con la mayoría de las proteínas alimentarias vegetales, y presentó una solubilidad creciente en medio neutro y alcalino, y menor en medio ácido. El fraccionamiento Osborne reveló que la fracción más abundante fueron las globulinas, lo cual está acorde con las observaciones reportadas en otras especies de cucurbitáceas y en las leguminosas, presentando tanto el aislado como las fracciones matices de color de alta luminosidad, con pequeñas tendencias al verde y al amarillo, baja saturación de color y una tonalidad de baja intensidad. Además, presentó una actividad captadora de radicales libres y un poder reductor de Fe^{+3} considerable, aunque menor al del control positivo (ácido ascórbico), debido a que se emplearon las proteínas enteras y no en forma de hidrolizado.

El análisis cromatográfico de los hidrolizados del aislado proteico reveló una alta concentración de aminoácidos esenciales. El aislado presentó altos contenidos de aminoácidos esenciales sulfurados y de tipo aromático, además de los no esenciales valina, ácido glutámico y prolina. Aunque el aislado proteico presentó cantidades relativamente bajas de lisina, está bien balanceado y presenta elevadas concentraciones de todos los otros aminoácidos esenciales, las cuales satisfacen de manera adecuada los requerimientos nutricionales establecidos por la FAO/OMS, haciendo de la semilla de calabaza una fuente proteica de notable relevancia.

Los indicadores de calidad proteica fueron en su mayoría elevados y satisfactorios, especialmente los correspondientes a la digestibilidad *in vitro*, la tasa de aminoácidos esenciales, el índice de aminoácidos esenciales, el valor biológico y la tasa de eficiencia proteica. La combinación de varios indicadores de calidad satisfactorios permite señalar la elevada calidad proteica de la proteína presente en las semillas de calabaza.

De esta manera, los resultados confirman que las semillas de *C. argyrosperma* Huber son una excelente fuente proteica de origen vegetal, y podrían ser empleadas además para la preparación de una harina desgrasada con un elevado contenido proteico y la obtención de aislados proteicos con buenas características nutricionales, los cuales podrían ser útiles para la revalorización de esta especie, de tal forma que fuera más ampliamente cultivada de lo que ha sido en el pasado. Este aislado proteico puede proveer una cantidad extra de proteínas y aminoácidos esenciales en aplicaciones tales como alimentos nutricionales balanceados y productos dietarios ricos en proteínas de elevada calidad, así como también podrían ser empleados como ingredientes en la preparación de otros productos de consumo.

CAPÍTULO 5. BIBLIOGRAFÍA

- Achouri, A., Nail, V., & Boye, J. (2012). Sesame protein isolate: fractionation, secondary structure and functional properties. *Food Research International*, *46*, 360-390.
- Achu, M., Fokou, E., Tchiégang, C., Fotso, M., & Tchouanguep, F. (2005). Nutritive value of some Cucurbitaceae oilseeds from different regions in Cameroon. *African Journal of Biotechnology*, *4*(11), 1329-1334.
- Alaiz, M., Navarro, J. L., Girón, J., & Vioque, E. (1992). Amino acid analysis by high-performance liquid chromatography after derivatization with diethylethoxymethylenemalonate. *Journal of Chromatography*, *591*, 181-186.
- Alias, C., & Linden, G. (1991). *Food Biochemistry*. New York: Ellis Horwood Ltd.
- Alsmeyer, R., Cunningham, A. E., & Happch, M. L. (1974). Equations predict PER from amino acid analysis. *Food Technology*, *28*, 34-38.
- Argos, P., Nayarana, S. V., & Nielsen, N. C. (1985). Structural similarity between legumin and vicilin storage proteins from legumes. *The EMBO Journal*, *4*(5), 1111-1117.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). (2005). *Official Methods of Analysis of AOAC International*. Gaithersburg, MD: AOAC International.
- Astwood, J., Leach, J., & Fuchs, R. (1996). Stability of food allergens to digestion in vitro. *National Biotechnology*, *14*, 1269-1273.
- Bello Gutiérrez, J. (2000). *Ciencia bromatológica. Principios generales de los alimentos*. Madrid: Díaz de Santos.
- Bera, M. B., & Mukherjee, R. K. (1989). Solubility, Emulsifying, and Foaming Properties of Rice Bran Protein Concentrates. *Journal of Food Science*, *54*(1), 142-145.
- Biel, W., & Jacyno, E. (2013). Chemical composition and nutritive value of spring hulled barley varieties. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, *19*(4), 721-727.

- Bock, S. (1986). The Natural History of Adverse Reactions to Foods. *Allergy and Asthma Proceedings*, 7(6), 504-510.
- Bourges Rodríguez, H., Morales de León, J., Camacho Parra, M. E., & Escobedo Olea, G. (Edits.). (1996). *Tablas de composición de alimentos*. México, D.F.: Subdirección de Nutrición Experimental y Ciencias de los Alimentos, Instituto Nacional de Nutrición Salvador Zubirán.
- Bradford, M. A. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28, 25-30.
- Bucko, S., Katona, J., Popovic, L., Vastag, Z., Petrovic, L., & Vucinic-Vasic, M. (2015). Investigation on solubility, interfacial and emulsifying properties of pumpkin (*Cucurbita pepo*) seed protein isolate. *LWT - Food Science & Technology*, 64, 609-615.
- Bunda, M., Tumbokon, B., & Serrano, A. (2015). Composition, chemical score (CS) and essential aminoacid index (EAAI) of the crinkle grass *Rhizoclonium* sp. as ingredient for aquafeeds. *International Journal of The Bioflux Society*, 8(3), 411-419.
- Carpentier, S., Panis, B., Vertommen, A., Swennen, R., Sergeant, K., Renaut, J., & Laukens, K. (2008). Proteome analysis of non-model plants: a challenging but powerful approach. *Mass Spectrometry Reviews*, 27(4), 354–377.
doi:10.1002/mas.20170
- Carr, D. (2014). *A guide to the analysis and purification of proteins and peptides by Reversed-Phase HPLC*. Aberdeen, Escocia: Ace HPLC Columns. Obtenido de http://www.hplc.eu/Downloads/ACE_Guide_Peptides.pdf

- Casey, R., & Domoney, C. (1984). The genetics of legume storage proteins. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 304(1120), 349-358.
- Chandi, G. K. (2007). Biochemical characterisation of rice protein fractions. *International Journal of Food Science and Technology*, 42, 1357–1362.
- Chao, A., Thun, M. J., Connell, C. J., McCullough, M. L., Jacobs, E. J., Flanders, D., . . . Calle, E. E. (2005). Meat consumption and risk of colorectal cancer. *Journal of the American Medical*, 293(2), 172-182.
- Chen, H.-M., Muramoto, K., Yamauchi, F., & Nokihara, K. (1996). Antioxidant activity of designated peptides based on the antioxidative peptide isolated from digests of a soybean protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(9), 2619-2623.
- Cruces-Carbajal, R. (2006). *Lo que México aportó al mundo*. México, D.F.: Quarzo.
- Damodaran, S. (1997). Food proteins: An overview. En S. Damodaran, & A. Paraf (Edits.), *Food proteins and their applications* (págs. 1-21). Nueva York: Marcel Dekker.
- Deng, Q., Wang, L., Wei, F., Xie, B., Huang, F. H., & Huang, W. (2011). Functional properties of protein isolates, globulin and albumin extracted from Ginkgo biloba seeds. *Food Chemistry*, 124, 1458-1465.
- Doxastakis, G. (2000). Lupin seed proteins. En G. Dozastakis, & V. Kiosseoglou (Edits.), *Developments in Food Science*, 41 (págs. 7-38). Elsevier.
- El-Adawy, T., & Taha, K. (2001). Characteristics and composition of watermelon, pumpkin and paprika seed oils and flours. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 1253-1259.
- Elhardallou, S. B., Khalid, I. I., & Gobouri, A. A. (2015). Amino Acid Composition of Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) Flour and Its Protein Isolates. *Food and Nutrition Sciences*, 6, 790-797.

- Elias, R., Kellerby, S., & Decker, E. (2008). Antioxidant activity of proteins and peptides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48, 430-441.
- FAO/OMS. (1991). *Protein Quality Evaluation. FAO Food and Nutrition Paper 51*. Report of Joint FAO/WHO Expert Consultation, USA.
- FAO/WHO. (1989). *Protein quality evaluation. Report of the joint FAO/WHO expert consultation. Food and nutrition paper No. 51*. Roma, Italia: Food and Agriculture Organizations and the World Health Organization.
- FAO/WHO/UNU. (1985). *Energy and protein requirements. Report of the joint FAO/WHO expert consultation*. Geneva, Suiza: FAO, WHO & the United Nations University.
- Fernández-Quintela, A., Larralde, J., Macarulla, M. T., Marcos, R., & Martínez, J. A. (Febrero de 1993). Leguminosas y concentrados de proteína: Nuevas perspectivas y aplicaciones. *Alimentaria*, 59-63.
- Fox, B. A., & Cameron, A. (1982). *Food Science. A chemical approach*. UK: Hodder and Stoughton Educational.
- Friedman, M. (1996). Nutritional value of proteins from different sources: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 6-29.
- Fukushima, D. (1991). Structures of plant storage proteins and their functions. *Food Reviews International*, 7(3), 353-381.
- Gálvez-Mariscal, A., Flores-Arguello, I., & González-Sarabia, A. (2006). Proteínas. En S. Badui, *Química de los alimentos*. México, D.F.: Pearson.
- García Blandón, P. A. (1983). *Fundamentos de nutrición*. Costa Rica: Universidad Estatal a Distancia.
- Gil, A. (2010). *Tratado de nutrición. Composición y calidad nutritiva de los alimentos* (2 ed., Vol. 2). Madrid: Editorial Médica Panamericana.

- González-Pérez, S., Vereijken, J. M., Van Koningsveld, G. A., Gruppen, H., & Voragen, A. G. (2005). Physicochemical properties of 2S albumins and the corresponding protein isolate from sunflower (*Helianthus annuus*). *Food Chemistry and Toxicology*, *70*(1), 98-103.
- Gujaska, E., & Khan, K. (1991). Functional properties of extrudates from high starch fractions of navy and pinto beans and corn meal blended with legume high protein fractions. *Journal of Food Science*, *56*, 431-435.
- Habib, A., Biswas, S., Hai-Siddique, A., Manirujjaman, M., Uddin, B., Hasan, S., . . . Rahman, M. (2015). Nutritional and Lipid Composition Analysis of Pumpkin Seed (*Cucurbita maxima* Linn.). *Journal of Nutrition & Food Sciences*, *5*(4), 374.
- Hefle, S. L., Nordlee, J. A., & Taylor, S. L. (1996). Allergenic Foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *36S*, S69-S89.
- Hernández, B. (1978). Cucurbitáceas. En S. Cervantes (Ed.), *Recursos genéticos disponibles a México* (págs. 357-367). Chapingo, México: SOMEFI.
- Horax, R., Hettiarachchy, N., Kannan, A., & Chen, P. (2011). Protein extraction optimisation, characterisation, and functionalities of protein isolate from bitter melon (*Momordica charantia*) seed. *Food Chemistry*, *124*, 545-550.
- Horax, R., Hettiarachchy, N., Over, K., & Chen, P. (2010). Extraction, Fractionation and Characterization of Bitter Melon. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, *58*, 1892–1897.
- Hsu, H. W., Vavak, D. L., Satterle, L. D., & Miller, G. A. (1977). A multienzyme technique for estimating protein digestability. *Journal of Food Science*, *42*, 1269-1273.
- Huang, Y., & Khan, K. (1997). Characterization and quantification of native glutenine aggregates by multistacking sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) procedures. *Cereal Chemistry*, *74*(3), 229-234.

- Idouraine, A., Kohlhepp, E., & Weber, C. (1996). Nutrient Constituents from Eight Lines of Naked Seed Squash (*Cucurbita pepo* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(3), 721–724.
- Insel, P., R. Turner, R., & Ross, D. (2004). *Nutrition* (Vol. 1). EUA: American Dietetic Association.
- Ju, Z. N., Hettiarachchy, N., & Rath, N. (2001). Extraction, denaturation and hydrophobic properties of rice flour proteins. *Journal of Food Science*, 66(2), 229-232.
- Juliano, B. (1985). *Rice Chemistry and Technology*. St. Paul, Minnesota, USA: American Association of Cereal Chemists Inc.
- Kim, M., Kim, E., Kim, Y., Choi, C., & Lee, B. (2012). Comparison of the chemical compositions and nutritive values of various pumpkin (*Cucurbitaceae*) species and parts. *Nutrition Research and Practice*, 6(1), 21-27.
- Kloss, J. (2000). *Regreso al Edén*. Loma Linda, California, EE. UU.: Lotus Press.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–686.
- Landry, J., & Moureaux, T. (1970). Hétérogénéité des gluténines du grain de maïs: extraction sélective et composition en acides aminés des trois fractions isolées. *Bulletin de la Société de Chimie Biologique*, 52(10), 1021–1037.
- Lapedes, D. N. (1977). *Ency Food Agricultural Nutrition*. New York: McGraw-Hill.
- Larsen, C. (2003). Animal source foods and human health during evolution. *Journal of Nutrition*, 133(11), 3893S-3897S.
- Lawal, O. (2004). Functionality of African locust bean (*Parkia biglobossa*) protein isolate: effects of pH, ionic strength and various protein concentrations. *Food Chemistry*, 86, 345-355.
- Lehninger, A. L., & Cox, M. M. (2006). *Principios de bioquímica*. Madrid, España: Omega.

- León-Sanz, M. (2006). *Proteínas en nutrición artificial. Nutrición enteral*. Barcelona: Abbott.
- Lira, R. (1995). Estudios Taxonómicos y Ecogeográficos de las Cucurbitáceas Latinoamericanas de Importancia Económica. En *Systematic and Ecogeographic Studies on Crop Gene pools* (págs. 281-285). Roma: International Institute of Plant Genetic Recourses.
- Lira, R., & Montes, S. (1994). Cucurbits (Cucurbita spp.). En J. Hernández-Bermejo, & J. León (Edits.), *Neglected crops. 1492 from a different perspective* (págs. 63-78). Roma: FAO Plant Production and Protection Series.
- Lqari, H., Vioque, J., Pedroche, J., & Millán, F. (2002). Lupinus angustifolius protein isolates: chemical composition, functional properties and protein characterization. *Food Chemistry*, 76, 349–356.
- Macarulla, J. M., & Goñi, F. (2002). *Biomoléculas. Lecciones de Bioquímica Estructural*. Barcelona: Reverté.
- Mansour, E., Dworschak, E., Lugasi, A., Barna, E., & Gergely, A. (1993). Nutritive Value of Pumpkin (Cucurbita pepo Kakai 35) Seed Products. *Journal of the Science and Food Agriculture*, 61, 73-78.
- Marcone, F. M., Kakuda, I., Kakuda, Y., & Yada, R. (1998). Salt-soluble seed globulins of various dicotyledonous and monocotyledonous plants I. Isolation-purification and characterization. *Food Chemistry*, 62(1), 24-47.
- Marín Rodríguez, Z. R. (1988). *Elementos de nutrición humana*. Costa Rica: Universidad Estatal a Distancia.
- Marquez, U., & Lajolo, F. (1981). Composition and digestability of albumin, globulins and glutelins from Phaseolus vulgaris. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 29, 1068-1074.
- Martínez Maqueda, D., Hernández Ledezma, B., Amigo, L., Miralles, B., & Gómez Ruiz, A. (2013). Extraction/Fractionation techniques for proteins and peptide and

- protein digestion. En F. Toldrá, & L. M. Nollet (Edits.), *Proteomics in foods: Principles and Applications* (págs. 21-42). Nueva York: Springer Science+Business Media.
- Mathews, C. K., Van Holde, K., & Ahern, K. (2002). *Bioquímica*. Madrid: Pearson & Addison Wesley.
- Mazurek, J., Holbert, L., Parrish, M. K., & Salehi, E. (2005). Raw eggs-lessons learned from an outbreak of Salmonella serotype enteritidis infections associated with meringue pie. *Journal of Public Health Management & Practice*, 11(3), 201-207.
- McKee, T., & McKee, J. R. (2003). *Bioquímica, la base molecular de la vida*. Madrid, España: McGrawHill/Interamericana de España S.A.U.
- Méndez de Inocencio, J. I. (Ed.). (2008). *Alergia: Enfermedad multisistémica. Fundamentos básicos y clínicos*. México, D.F.: Editorial Médica Panamericana.
- Merrick, L. (1995). Squashes, pumpkins and gourds. En J. Smartt, & N. Simmonds (Edits.), *Evolution of Crop Plants* (págs. 97-105). Londres: Longman Scientific and Technical.
- Mertz, E. T., Hassen, M. M., Cairns-Whittern, C., & Kirleis, A. W. (1984). Pepsin digestability of protein in sorghum and other major cereals. En *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (Vol. 81, págs. 1-2).
- Mertz, E. T., Hassen, M. M., Cairns-Whittern, C., Kirleis, A. W., Tu, L., & Axtell, J. D. (1984). Pepsin digestibility of protein in sorghum and other major cereals. En *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (Vol. 81, págs. 1-2). USA.
- Mokrane, H., Amoura, H., Belhaneche-Bensemra, N., Courtin, C., Delcour, J., & B., N. (2010). Assessment of Algerian sorghum protein quality [Sorghum bicolor (L.) Moench] using amino acid analysis and in vitro pepsin digestibility. *Food Chemistry*, 121, 719-723.

- Monteiro, P. V., & Prakash, V. (1994). Functional properties of homogeneous protein fractions from peanut (*Arachis hipogaea* L.). *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 42, 274-278.
- Mora, R. (2002). *Soporte nutricional especial*. Bogotá: Editorial Médica Panamericana.
- Morup, I. K., & S., O. E. (1976). New method for prediction of protein value from essential pattern. *Nutritional Report International*, 13, 355-365.
- Mudambi, S., & Rajagopal, M. (2001). *Fundamentals of Foods and Nutrition* (4 ed.). Nueva Delhi, India: New Age International Publishers.
- Muschler, R., Gutiérrez, I., & Rivas-Platero, G. G. (2008). *Producción ecológica de cultivos anuales básicos: maíz, frijol y calabaza*. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas: Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza.
- Nee, M. (1990). The domestication of Cucurbita (Cucurbitaceae). *Economic Botany*, 44(S3), 56-68.
- Nielson, S. (1988). Degradation of beans proteins by endogenous and exogenous proteases - a review. *Cereal Chemistry*, 65, 435-442.
- OMS/FAO/UNU. (2007). *Protein and aminoacids requirements in human nutrition*. Ginebra: WHO Technical Reports 935.
- Osborne, T. (1985). The proteins of barley. *Journal of the American Chemical Society*, 17, 539-567.
- Oser, B. (1951). Methods for the integrating essential amino acid content in the nutritional evaluation of protein. *Journal of the American Dietetic Association*, 27(5), 399-404.
- Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*, 44, 307-315.

- Pedreschi, R. H., Lilley, K. S., & Nicolaïl, B. (2010). Proteomics for the food industry: opportunities and challenges. . *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50(7), 680–692. doi:10.1080/10408390903044214
- Pitchford, P. (2007). *Sanando con alimentos integrales*. Berkeley: North Atlantic Books.
- Pozio, E. (2007). World distribution of *Trichinella* spp. Infections in animals and humans. *Veterinary Parasitology*, 149(1-2), 3-21.
- Quanhong, L., & Caili, L. (2005). Application of response surface methodology for extraction, optimization of germinant pumpkin seeds protein. *Food Chemistry*, 92, 701-706.
- Ramos, F., Silveira, I., Silva, J., Barbosa, J., Cruz, C., Martins, J., . . . Alves, C. (2004). Proposed guidelines for clenbuterol food poisoning. *American Journal of Medicine*, 117(5), 362.
- Ranjan, S., Matcha, R., Madhuri, B., & Babu, N. (2012). Comparative evaluation of protein extraction methods from few leguminous seeds. *International Journey of Advanced Biotechnology and Research*, 3(2), 558-563.
- Rodríguez-Miranda, J., Hernández-Santos, B., Herman-Lara, E., Vivar-Vera, M., Carmona-García, R., Gómez-Aldapa, C., & Martínez-Sánchez, C. (2012). Physicochemical and functional properties of whole and defatted meals from Mexican (*Cucurbita pepo*) pumpkin seeds. *Food Science & Technology*, 47, 2297-2303.
- Roma, A. A., & Prayson, R. A. (2005). Bovine spongiform encephalopathy and variant Creutzfeldt-Jakob disease: how safe is eating beef? *Cleveland Clinic Journal of Medicine*, 72(3), 185-186, 189-90, 192-194.
- Sampson, H. (1999). Food allergy. Part 1: immunopathogenesis and clinical disorders. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 103(5), 717-728.

- Sedano-Castro, G., González-Hernández, V. A., Engleman, E., & Villanueva-Verduzco, C. (2005). Dinámica del crecimiento y eficiencia fisiológica de la planta de calabacita. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 11, 291-297.
- Segura-Nieto, M., & Jiménez-Flores, R. (1999). Genetic modifications of plant seed storage proteins for food production. En O. Paredes-López, & O. Paredes-López (Ed.), *Molecular Biotechnology for Plant Food Production* (págs. 411-474). USA: Technomic Publishing Co. Inc.
- Sharma, P., Lal, B., Madaan, T., & Chatterjee, S. (1986). Studies on the nutritional quality of some cucurbit kernel proteins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 37(4), 418-420.
- Shenkin, A., & Wretling, A. (1978). Parenteral Nutrition. *World Review of Nutrition and Dietetics*, 28, 1-111.
- Shevkani, K., Kaur, A., Kumar, S., & Singh, N. (2015). Cowpea protein isolates: Functional properties and application in gluten-free rice muffins. *Food Science and Technology*, 63, 927-933.
- Shewry, P. R., & Halford, N. G. (2002). Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *Journal of Experimental Botany*, 53(370), 947-958.
- Siow, H.-L., & Gang, C.-Y. (2014). Functional protein from cumin seed (*Cuminum cyminum*): Optimization and characterization studies. *Food Hydrocolloids*, 41, 178-187.
- Stone, P. J., & Savin, R. (1999). Grain and its physiological determinants. En E. H. Satorre, & G. A. Slafer (Eds.), *Wheat. Ecology and Physiology of Yield Determination* (págs. 85-102). New York: Food Products Press.
- Suárez-López, M. M., Kizlansky, A., & López, L. B. (2006). Evaluación de la calidad de las proteínas en los alimentos calculando el score de aminoácidos corregido por digestibilidad. *Nutrición Hospitalaria*, 47-51.

- Taylor, S. L., & Hefle, S. L. (2001). Food Allergies and Other Food Sensitivities. *Food Technology*, 55(9), 68-83.
- Tecson, E. M., Esmama, B. V., Lontok, L. P., & Juliano, B. O. (1971). Studies on the extraction and composition of rice endosperm, glutelin, and prolamin. *Cereal Chemistry*, 48, 168-181.
- U.S. Food and Drug Administration. (2 de Agosto de 2004). Food Allergen Labelling and Consumer Protection Act of 2004. *Federal Register*. Washington, D.C.
- Vastag, Z., Popovic, L., Popovic, S., Krimer, V., & Pericin, D. (2011). Production of enzymatic hydrolyzates with antioxidant and angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity from pumpkin oil cake protein isolate. *Food Chemistry*, 124, 1315-1321.
- Veeramachaneni, V., & Makalowski, W. (2004). Visualizing Secuence Similarity of Protein Families. *Genome Research*, 14, 1160-1169.
- Velásquez, G. (2006). *Fundamentos de alimentación saludable*. Antioquía: Universidad de Antioquía.
- Villaño, D., García, M., & Morales, M. (2006). Alergia alimentaria. En A. Caméan, & M. Repetto, *Toxicología alimentaria* (págs. 581-594). Madrid: Ediciones Díaz de Santos.
- Voet, D., Voet, J. G., & Pratt, J. C. (2007). *Fundamentos de Bioquímica. La vida a nivel molecular*. Madrid, España: Editorial Médica Panamericana.
- Whitaker, T. (1968). Ecological aspects of the cultivated Cucurbita. *HortScience*, 3(1), 9-11.
- Wu, H., Wang, Q., Maa, T., & Ren, J. (2009). Comparative studies on the functional properties of various protein concentrate preparations of peanut protein. *Food Research International*, 42, 343-348.

Yulinana, M., Truong, C. T., Huynh, L. H., Ho, Q. P., & Ju, Y. H. (2014). Isolation and characterization of protein isolated from defatted cashew nut shell: influence of pH and NaCl on solubility and functional properties. *LWT - Food Science and Technology*, 55, 621-626.

Yust, M. M., Pedroche, J., Girón-Calle, J., Vioque, J., & Millán, A. M. (2004). Determination of tryptophan by high-performance liquid chromatography of alkaline hydrolysates with spectrophotometric detection. *Food Chemistry*, 85, 317-320.

ANEXOS

ANEXO I. Solubilidad de AP a diferentes valores de pH e influencia de la concentración

pH	Solubilidad (%)
11	98.62 ± 0.97
10	95.3 ± 0.53
9	93.67 ± 0.09
8	85.55 ± 0.10
7	75.44 ± 1.48
6	39.52 ± 0.22
5	26.96 ± 0.51
4.5	20.88 ± 0.63
4	24.36 ± 0.22
3	27.93 ± 0.60
2	46.33 ± 0.28

C _{disp}	Concentración			Porcentaje disuelto		
	pH 3	pH 5	pH 8	pH 3	pH 5	pH 8
2	0.68	0.58	1.74	34	29	87
3	1.05	0.87	2.64	35	29	88
4	1.18	1.13	3.46	29.5	28.25	86.5
5	1.51	1.35	4.35	30.2	27	87
6	1.85	1.63	4.65	30.83	27.17	77.5
7	2.12	1.94	5.44	30.29	27.71	77.71
8	2.59	2.11	6.09	32.38	26.38	76.13
9	2.62	2.36	6.12	29.11	26.22	68
10	2.59	2.57	6.34	25.9	25.7	63.4

ANEXO II. Turbidimetría a 320 nm del aislado (AP) y las fracciones proteicas

pH	Absorbancia			
	Extracto	Albúmina	Globulina	Glutelina
11	0.007	0.2706	0.5048	0.0248
10	0.1074	0.2749	0.175	0.0979
9	0.1728	0.2146	0.1237	0.0536
8	0.5041	0.3256	0.4448	0.1223
7	0.4551	0.4315	0.4543	0.3626
6	0.5559	0.3367	0.658	1.0237
5	2.1678	0.6967	1.9329	1.3259
4.5	2.5829	1.231	2.3321	0.4449
4	0.8917	1.4882	1.7876	0.3555
3.5	0.4447	0.9347	1.6299	0.3406
3	0.4532	0.547	1.5389	0.444
2	0.3644	0.4947	1.1734	0.3297

ANEXO III. Determinación del contenido proteico por el método de Bradford

	Muestra (μg)	Proteína (μg)	Proteína (%)	Proteína promedio (%)
	40	36.1702	90.43	
Extracto	60	54.9858	91.64	91.00 \pm 0.50
	80	72.7518	90.94	
	40	31.2021	78.01	
Albúmina	60	46.7518	77.92	78.02 \pm 0.09
	80	62.5071	78.13	
	40	34.5745	86.44	
Globulina	60	52.5142	87.52	87.2 \pm 0.54
	80	70.1206	87.65	
	40	36.539	91.35	
Glutelina	60	54.8652	91.44	91.76 \pm 0.52
	80	73.9894	92.49	
	40	13.805	34.51	
H. Entera	60	20.2872	33.81	34.17 \pm 0.29
	80	27.3617	34.2	
	40	24.8475	62.12	
H. Desgr.	60	37.6064	62.68	63.32 \pm 1.32
	80	52.1206	65.15	

ANEXO IV. Curvas de calibración de los aminoácidos

Las curvas empleadas se obtuvieron en el rango 37.5 – 300 pmol para cada aminoácido (24-240 pmol para el caso del Trp).

