



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO**

---

---

**DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL**

**MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA**

**ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DE TORONJIL  
ENCAPSULADOS CON PROTEÍNAS DE SEMILLA DE CALABAZA**

**TESIS**

Que como requisito parcial para obtener el grado de:  
**MAESTRA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA**



**APROBADA**

Presenta:

**ROCÍO SANTIAGO PELAGIO**

Bajo la dirección de: **ELEAZAR AGUIRRE MANDUJANO, DR.**



Chapingo, Estado de México, noviembre 2023.

**ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DE TORONJIL  
ENCAPSULADOS CON PROTEÍNAS DE SEMILLA DE CALABAZA**

Tesis realizada por Rocío Santiago Pelagio bajo la dirección del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA**

**DIRECTOR:** \_\_\_\_\_

  
**DR. ELEAZAR AGUIRRE MANDUJANO**

**CO-DIRECTOR:** \_\_\_\_\_

  
**DRA. CONSUELO SILVIA OLIVIA LOBATO CALLEROS**

**ASESOR:** \_\_\_\_\_

  
**DRA. BLANCA ELIZABETH HERNÁNDEZ RODRÍGUEZ**

**ASESOR:** \_\_\_\_\_

  
**DR. JUAN CARLOS CUEVAS BERNARDINO**

## TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE CUADROS .....	vi
LISTA DE FIGURAS .....	vii
ABREVIATURAS USADAS .....	ix
DEDICATORIAS.....	x
AGRADECIMIENTOS .....	xi
DATOS BIOGRÁFICOS .....	xiii
RESUMEN GENERAL .....	xiv
GENERAL ABSTRACT.....	xv
1. INTRODUCCIÓN GENERAL .....	16
2. REVISIÓN DE LITERATURA .....	19
2.1  Toronjil morado ( <i>Agastache mexicana</i> ).....	19
2.2  Actividad antioxidante.....	21
2.3  Métodos para determinar la capacidad antioxidante.....	24
2.4  Calabaza ( <i>Cucurbita argyrosperma</i> ) .....	25
2.5  Hidrólisis enzimática .....	26
2.6  Sistemas de protección.....	27
2.7  Literatura citada.....	32
3. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DE TORONJIL ENCAPSULADOS CON PROTEÍNAS DE SEMILLA DE CALABAZA.....	37
3.1  Introducción .....	37
3.2  Materiales y métodos .....	39
3.2.1  Muestra y reactivos.....	39

<b>3.2.2</b>	<b>Acondicionamiento de las muestras .....</b>	<b>39</b>
<b>3.2.2.1</b>	<b>Deshidratación .....</b>	<b>39</b>
<b>3.2.3</b>	<b>Análisis químico proximal.....</b>	<b>40</b>
<b>3.2.4</b>	<b>Desgrasado de harina de semilla de calabaza (HSC).....</b>	<b>40</b>
<b>3.2.5</b>	<b>Obtención del aislado de proteína.....</b>	<b>40</b>
<b>3.2.6</b>	<b>Determinación de solubilidad de proteínas en función del pH</b>	<b>41</b>
<b>3.2.7</b>	<b>Potencial zeta (<math>\zeta</math>) .....</b>	<b>41</b>
<b>3.2.8</b>	<b>Digestibilidad relativa <i>in vitro</i> .....</b>	<b>42</b>
<b>3.2.9</b>	<b>Propiedades de emulsificación.....</b>	<b>42</b>
<b>3.2.10</b>	<b>Hidrólisis enzimática (HE) .....</b>	<b>43</b>
<b>3.2.11</b>	<b>Grado de hidrólisis (GH).....</b>	<b>43</b>
<b>3.2.12</b>	<b>Electroforesis (Peso molecular).....</b>	<b>44</b>
<b>3.2.13</b>	<b>Obtención del extracto de toronjil .....</b>	<b>45</b>
<b>3.2.14</b>	<b>Formación de complejos soluble.....</b>	<b>45</b>
<b>3.2.15</b>	<b>Emulsiones .....</b>	<b>45</b>
<b>3.2.16</b>	<b>Tamaño de gota.....</b>	<b>46</b>
<b>3.2.17</b>	<b>Reología .....</b>	<b>46</b>
<b>3.2.18</b>	<b>Microscopia óptica.....</b>	<b>47</b>
<b>3.2.19</b>	<b>Actividad antioxidante por captación del radical libre DPPH..</b>	<b>47</b>
<b>3.2.20</b>	<b>Actividad antioxidante por ABTS.....</b>	<b>47</b>
<b>3.2.21</b>	<b>Análisis estadístico .....</b>	<b>48</b>
<b>3.3</b>	<b>. Resultados y discusión .....</b>	<b>48</b>
<b>3.3.1</b>	<b>Análisis químico proximal.....</b>	<b>48</b>

3.3.2	Solubilidad de las proteínas en función del pH.....	49
3.3.3	Potencial zeta ( $\zeta$ ) .....	50
3.3.4	Digestibilidad relativa <i>in vitro</i> .....	51
3.3.5	Propiedad emulsionante.....	52
3.3.6	Grado de hidrólisis (GH).....	53
3.3.7	Electroforesis .....	54
3.3.8	Formación de complejos .....	56
3.3.9	Tamaño de gota.....	58
3.3.10	Microscopia óptica.....	59
3.3.11	Reología .....	60
3.3.11.1	Propiedades de flujo.....	60
3.3.11.2	Propiedades viscoelásticas .....	62
3.3.12	Actividad antioxidante .....	64
3.4	CONCLUSIONES.....	67
3.5	LITERATURA CITADA .....	68

## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Análisis químico proximal de las harinas de semilla de calabaza (HSC) y toronjil morado (HTM) .....	49
<b>Cuadro 2.</b> Tamaño de gota de aceite en las emulsiones de APSC:Pc e HiSC:Pc .....	59
<b>Cuadro 3.</b> Parámetros reológicos del modelo Carreau en el comportamiento de la viscosidad de las emulsiones.....	62

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructura de terpenos.....	20
<b>Figura 2.</b> Estructura del ácido rosmarínico.....	20
<b>Figura 3.</b> Estructura ácido cafeico.....	21
<b>Figura 4.</b> Estructura general de antioxidantes.....	21
<b>Figura 5.</b> Estructura de las antocianinas.....	22
<b>Figura 6.</b> Estructura de las catequinas.....	22
<b>Figura 7.</b> Estructura de los flavonoles.....	22
<b>Figura 8.</b> Estructura de ácido fenólico (resveratrol).....	23
<b>Figura 9.</b> Estructura de los lignanos.....	23
<b>Figura 10.</b> Estructura de taninos.....	24
<b>Figura 11.</b> Emulsión agua en aceite (O/W).....	28
<b>Figura 12.</b> Emulsión aceite en agua (W/O).....	29
<b>Figura 13.</b> Emulsión O/W/O.....	29
<b>Figura 14.</b> Emulsión W/O/W.....	29
<b>Figura 15.</b> Solubilidad de la proteína de harina de semilla de calabaza en función del pH.....	50
<b>Figura 16.</b> Potencial zeta del aislado de proteína de semilla de calabaza en función del pH.....	51
<b>Figura 17.</b> Grado de hidrólisis con la enzima Alcalasa® en distintas concentraciones en proteínas de semilla de calabaza a distintos tiempos, durante 60 min.....	54
<b>Figura 18.</b> Distribución de pesos moleculares de los hidrolizados de semilla de calabaza al 2 % con la enzima Alcalasa® de 0 min a 60 min.....	55

<b>Figura 19.</b> Variación de potencial zeta de las dispersiones de aislado de proteína de semilla de calabaza (APSC), hidrolizado de semilla de calabaza (HSC) y pectina cítrica (Pc).....	56
<b>Figura 21.</b> Relación de biopolímeros de aislado de proteína de semilla de calabaza (APSC) y pectina cítrica (Pc) .....	57
<b>Figura 20.</b> Relación de biopolímeros de aislado de proteína de semilla de calabaza (APSC) y pectina cítrica (Pc) .....	57
<b>Figura 22.</b> Relación de biopolímeros de hidrolizado de semilla de calabaza (HiSC) y pectina cítrica (Pc).....	58
<b>Figura 23.</b> Micrografías ópticas de las emulsiones O/W preparadas con diferentes relación de biopolímeros a) APSC:Pc b) HiSC:Pc a un día después de su almacenamiento .....	60
<b>Figura 24.</b> Comportamiento de la viscosidad aparente de emulsiones O/W en función de la tasa de corte .....	61
<b>Figura 25.</b> Variación de los módulos de almacenamiento ( $G'$ ) y de pérdida ( $G''$ ) en emulsiones APSC:Pc E Hisc:pC .....	63
<b>Figura 26.</b> Actividad antioxidante por % de inhibición del radical DPPH para hidrolizados de tiempo cero al minuto 60.....	64
<b>Figura 27.</b> Actividad antioxidante por % de inhibición del radical ABTS para hidrolizados de tiempo cero al minuto 60.....	65
<b>Figura 28.</b> a) Actividad antioxidante por % de inhibición del radical DPPH para extractos, HiSC, APSC:Pc HiSC:Pc b) Actividad antioxidante por % de inhibición del radical ABTS para extractos, HiSC, APSC:Pc HiSC:Pc.....	66

## ABREVIATURAS USADAS

HSC: Harina de semilla de calabaza

HTM: Harina de toronjil morado

HSCD: Harina de semilla de calabaza desgrasada

APSC: Aislado de proteína de semilla de calabaza

HiSC: Hidrolizado de semilla de calabaza

EA: Actividad emulsionante

ES: Estabilidad de la emulsión

GH: Grado de hidrólisis

APSC:Pc Aislado de proteína de semilla de calabaza: Pectina cítrica

HiSC:Pc Hidrolizado de semilla de calabaza: Pectina cítrica

G': Modulo de almacenamiento

G'': Modulo de perdida

## DEDICATORIAS

A mi mamá, quien es mi mayor inspiración y el mejor apoyo. Gracias por tu amor, paciencia y aliento; sin ti nada de esto sería posible. Te dedico este logro con todo mi amor y gratitud. ¡Gracias por ser mi roca y motivación! Te amo.

A mi tía Trini por ser una segunda mamá, por el apoyo, cariño y confianza. Con un gran agradecimiento te dedico este logro. Te quiero

A mis abuelos Josefa†, Ramon† y Chonita†, por todo el cariño y apoyo que me dieron, son la luz que guiara siempre mi camino.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Autónoma Chapingo, al Posgrado en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria y al Departamento de Ingeniería Agroindustrial por otorgarme las herramientas de continuar con mi formación profesional.

Al Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT) por la oportunidad de pertenecer a su programa durante mis estudios de maestría.

Al Dr. Eleazar Aguirre Mandujano por la dirección, apoyo en conocimientos, correcciones, confianza y respaldo para el desarrollo de este trabajo de tesis.

A la Dra. Blanca Hernández Rodríguez por su gran apoyo en conocimientos y su amabilidad para el desarrollo de este proyecto de tesis.

Al Dra. Consuelo S. O. Lobato Calleros y al Dr. Juan Carlos por sus aportaciones valiosas en este proyecto.

A la Dra. Itzel por su amistad, su apoyo y conocimientos compartidos durante esta etapa.

A mi hermana Roci, no de sangre, pero sí de corazón, por estar siempre para mí y ser mi persona, gracias por ser mi compañera de vida. Este logro no sería posible sin ti y tus consejos para mi crecimiento personal. ¡te quiero!

A mis amigas Kar O, Tere, Corey, Karla G y Zab por su apoyo y comprensión para culminar esta etapa y siempre estar ¡las quiero!

A Noe, Joan, Diana, Samir, Vick y Jan por su amistad y los grandes momentos que hemos compartido en esta etapa.

A mi prima Reina, por ser como una hermana para mí, tus palabras y cariño han sido fundamentales.

A mis madrinas Roci y Refu y padrino Tino† por su cariño, motivación y consejos para siempre superarme académicamente.

A mis compañeros de generación 2021-2023 y a los compañeros de laboratorio de Alimentos Funcionales.

## **DATOS BIOGRÁFICOS**

### **Datos personales**

Nombre: Rocío Santiago Pelagio

Fecha de nacimiento: 24 de mayo de 1996

Lugar de nacimiento: Zacatlán, Puebla

CURP: SAPR960524MPLNLC08

Profesión: Ingeniería en Industrias Alimentarias

Cedula profesional: 12875213



### **Desarrollo académico**

Licenciatura: Instituto Tecnológico Superior de la Sierra Norte de Puebla.

Bachillerato: General “Lic. Benito Juárez”.

## RESUMEN GENERAL

### ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DE TORONJIL ENCAPSULADOS CON PROTEÍNAS DE SEMILLA DE CALABAZA

El extracto de toronjil morado (*Agastache mexicana*) es una fuente rica de antioxidantes, que en condiciones ambientales sufren deterioro. Una forma de protegerlos es mediante el uso de complejos proteína-polisacáridos, como proteína de semillas de calabaza-pectina cítrica. Se obtuvo aislado de proteína a partir de semilla de calabaza (APSC), subproducto con alto contenido de proteínas, por precipitación isoeléctrica a pH 4.2. El APSC presentó un punto isoeléctrico de 4.2, una digestibilidad *in vitro* de 82.1 % lo que la hace viable para su consumo y la actividad emulsionante del aislado fue de 0.823 A. Se obtuvieron hidrolizados de semilla de calabaza (HiSC) a partir del APSC, con peso molecular entre 10-30 kDa. Por otro lado, se obtuvieron extractos de toronjil morado, los cuales presentaron altos valores de capacidad antioxidante de 73.31 % (por el método de DPPH) y de 85.44 % (por el método de ABTS). Se elaboraron complejos electrostáticos de APSC-pectina cítrica (APSC:Pc) con una relación 3:1 a pH 4.9; y HiSC-pectina cítrica (HiSC:Pc) relación 1:3 pH 3.9. Se elaboraron emulsiones aceite-agua (O/W), utilizando las relaciones mencionadas con objeto de proteger los extractos de toronjil morado. Los tratamientos con APSC:Pc presentaron valores menores de  $d_{3,2}$ , de 1.68  $\mu\text{m}$ . Las curvas de viscosidad aparente vs tasa de corte se ajustaron al modelo de Carreau. El tratamiento APSC:Pc presentó viscosidades aparentes más altas en todo el rango de tasas de corte, con un comportamiento de adelgazamiento al corte ( $N = 0.329$ ). La mayor actividad antioxidante fue la emulsión con HiSC:Pc (75.63 % para DPPH y 87.23 % para ABTS). Con lo anterior, emulsiones estabilizadas con hidrolizados de proteína de semilla de calabaza-pectina son adecuados para proteger extractos de toronjil y sus componentes bioactivos.

**Palabras clave:** Toronjil morado, semilla de calabaza, antioxidantes, emulsiones, proteína.

---

Tesis de Maestría en Ciencia, Programa de Posgrado en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: Rocío Santiago Pelagio

Director de Tesis: Dr. Eleazar Aguirre Mandujano

## GENERAL ABSTRACT

### ANTIOXIDANT ACTIVITY OF LEMONSEL EXTRACTS ENCAPSULATED WITH PUMPKIN SEED PROTEINS

Purple lemon balm extract (*Agastache mexicana*) is a rich source of antioxidants, which suffer deterioration under environmental conditions. One way to protect them is by using protein-polysaccharide complexes, such as pumpkin seed protein-citrus pectin. Protein isolate was obtained from pumpkin seeds (APSC), a byproduct with high protein content, by isoelectric precipitation at pH 4.2. The APSC had an isoelectric point of 4.2, an in vitro digestibility of 82.1%, which makes it viable for consumption, and the emulsifying activity of the isolate was 0.823 A. Pumpkin seed hydrolysates (HiSC) were obtained from the APSC, with molecular weight between 10-30 kDa. On the other hand, purple lemon balm extracts were obtained, which presented high antioxidant capacity values of 73.31% (by the DPPH method) and 85.44% (by the ABTS method). Electrostatic complexes of APSC-citrus pectin (APSC:Pc) were prepared with a 3:1 ratio at pH 4.9; and HiSC-citrus pectin (HiSC:Pc) ratio 1:3 pH 3.9. Oil-water (O/W) emulsions were prepared using the aforementioned ratios in order to protect the purple lemon balm extracts. Treatments with APSC:Pc presented lower  $d_{3.2}$  values of 1.68  $\mu\text{m}$ . The apparent viscosity vs shear rate curves were fitted to the Carreau model. The APSC:Pc treatment presented higher apparent viscosities throughout the range of shear rates, with shear thinning behavior ( $N = 0.329$ ). The highest antioxidant activity was the emulsion with HiSC:Pc (75.63% for DPPH and 87.23% for ABTS). With the above, emulsions stabilized with pumpkin seed protein-pectin hydrolysates are suitable to protect lemon balm extracts and their bioactive components.

**Keywords:** Purple lemon balm extract, pumpkin seed, antioxidants, emulsions, protein

---

Tesis de Maestría en Ciencia, Programa de Posgrado en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: Rocío Santiago Pelagio

Director de Tesis: Dr. Eleazar Aguirre Mandujano

## 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

Se sabe que una dieta y un estilo de vida adecuado son fundamentales para prevenir enfermedades. Actualmente se ha incrementado el estudio de extractos de plantas como fuentes de antioxidantes, enzimas y vitaminas, ya que pueden prevenir la autooxidación y así ser utilizados en la industria alimentaria para remplazar a los antioxidantes sintéticos, los cuales tienen efectos secundarios en el organismo provocando distintas enfermedades crónico-degenerativas (Bozin et al., 2007). Lo anterior ha provocado que se busquen nuevas fuentes de antioxidantes y bioactivos que puedan utilizarse en la industria alimentaria, uno de ellos es el toronjil morado.

*Agastache mexicana* es conocido como toronjil morado, pertenece a la familia Lamiaceae y se ha demostrado que tiene poder antioxidante (Lemjallad et al., 2019). Generalmente, el toronjil morado se ha utilizado, como fuente terapéutica y profiláctica como extracto o aceite esencial por sus propiedades antioxidantes y microbianas, pero es una planta que ha sido subutilizada (Shanaida & Golembioyska, 2018). El ser humano necesita tener una ingesta regular de estas fuentes antioxidantes e incluir alimentos con alta capacidad antioxidante (Nieto et al., 2018). Sin embargo, estos antioxidantes son susceptibles a distintos factores como lo son la luz, temperatura, pH, contaminación ambiental, entre otros, por lo que sufren deterioro.

Para poder conservar las propiedades del toronjil se recomienda llevar a cabo procesos de protección, los cuales consisten en el atrapamiento de algunos compuestos activos dentro de un material protector que proporcione una protección física contra las condiciones externas y así aumentar la estabilidad de los compuestos bioactivos mejorando su vida útil (Olivares-Galván et al., 2020). Los extractos encapsulados con una alta cantidad de antioxidantes pueden ser incorporados en matrices alimenticias que pueden contribuir con la salud, previniendo enfermedades crono degenerativas. Existen reportes de microencapsulación de diversos aceites: pescado, colza, naranja y menta

utilizando diferentes biopolímeros, proteínas, gelatina, pectina, goma arábica, goma de mezquite, maltodextrina como agentes encapsulantes (Fabri & Marrs, 2005)

Uno de los biopolímeros que se ha utilizado para la protección de extractos antioxidantes son las proteínas, solas o mezcladas con otros biopolímeros, como los hidrocoloides catiónicos como lo es la pectina. Estas mezclas biopoliméricas interaccionan formando complejos electrostáticos con altas capacidades emulsificantes que brindan una protección adecuada a los bioactivos presentes de los extractos de plantas. Con esto en mente, también es importante buscar nuevas fuentes de proteínas que puedan utilizarse en estos procesos de protección de bioactivos. Sin embargo, es necesario investigar sus propiedades fisicoquímicas y su funcionalidad, de tal manera que permitan obtener sistemas de protección adecuadas.

La semilla de calabaza es un subproducto de la fruta y en algunos casos es considerada como desperdicio. Estudios recientes demuestran que tienen efectos beneficiosos para la salud, debido a su contenido de macro y micronutrientes, son una fuente natural de fitoesteroles, vitaminas, antioxidantes y una alta concentración de proteína, aportando efectos beneficiosos a la salud y por ello las semillas de calabaza pueden considerarse un alimento funcional natural (Olivares-Galván et al., 2020).

Al igual los péptidos han demostrado que pueden actuar como emulsionantes, un proceso para producir los péptidos es la hidrólisis enzimática. Con la hidrólisis, las proteínas son descompuestas en péptidos mediante la adición de enzimas las cuales rompen los enlaces peptídicos y así generan péptidos de diferentes pesos moleculares con propiedades bioactivas o funcionales (Adler-Nissen, 1986).

Siguiendo lo anterior, se planteó la siguiente hipótesis: La encapsulación de extractos de toronjil morado mediante péptidos y proteína de semilla de calabaza permitirá obtener una protección de la actividad antioxidante.

A partir de lo anterior el objetivo general de esta investigación fue evaluar la actividad antioxidante de extractos de toronjil morado encapsulados, empleando péptidos obtenidos por hidrólisis enzimática de proteína de semilla de calabaza producidas en el municipio de Ahuacatlán de la Sierra Norte de Puebla.

Para llevar a cabo el objetivo general se siguieron una serie de objetivos específicos: 1) Desarrollar los métodos estandarizados para obtener los extractos de toronjil morado de la Sierra Norte de Puebla; 2) Determinar la actividad antioxidante de los extractos de toronjil morado; 3) Estandarizar un método para la obtención de péptidos de semilla de calabaza mediante hidrólisis enzimática; 4) Determinar la capacidad antioxidante de los péptidos de semilla de calabaza y 5) Desarrollar el método que permita obtener una emulsión estable de extractos de toronjil con péptidos de semilla de calabaza.

El presente documento consta de una serie de apartados donde se abordará la introducción general, el estado del arte de la investigación, el desarrollo de metodologías que se emplearon para cumplir los objetivos, la presentación de resultados, el análisis de los resultados y por ultimo las conclusiones obtenidas en esta investigación.

## 2. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Toronjil morado (*Agastache mexicana*)

El *Agastache mexicana*, es una planta medicinal perteneciente a la familia *Lamiaceae*. El género *Agastache* consta de unas 20 especies distribuidas en Asia y América del Norte, 12 de estas son endémicas de México (Sanders, 1980). Se han identificado dos subespecies de *Agastache mexicana*, comúnmente conocidas como “toronjil morado” y “toronjil blanco” (Palma-Tenango et al., 2021). Se cultivan y utilizan como plantas medicinales en varias partes de México, como Hidalgo, Estado de México, Morelos, Puebla, Veracruz y Ciudad de México. Se preparan en agua hirviendo como infusión, pero también como maceración en etanol, utilizando toda la parte aérea o sólo las flores para tratar trastornos “nerviosos”, insomnio y cardiovasculares (Argueta et al., 1994).

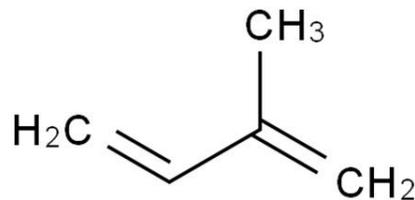
Los toronjiles son plantas herbáceas que crecen en los bosques de pino–encino y en huertos familiares, los tallos, de 120 cm de altura y erectos, están revestidos de hojas perfumadas de cidra. Las hojas son lanceoladas u oval-lanceoladas y rematadas con espigas de 40 cm de flores oscuras profundas con brácteas más profundas (Gonzales-Ramírez et al., 2012).

El toronjil morado se ha utilizado desde la antigüedad principalmente para tratar al sistema nervioso, al tracto gastrointestinal o el hígado, al igual para la digestión y dormir, ha demostrado que su ingesta no tiene efectos secundarios en los humanos (Vogl et al., 2013). Basándose en estudios se ha demostrado que tiene distintos usos como lo son antiinflamatorio, lipidémico, control glucémico, sedante, ansiolítico, antiespasmódico, antioxidante, anticancerígeno, antimicrobiano, antidepresivo (Dastjerdi et al., 2019).

Los extractos de toronjil alivian síntomas psicológicos, ya que inhibe la monoaminoxidasa y ayuda a beneficiar la salud mental, al igual actúa como inhibidor de la colinesterasa y mejora la acción de la sinapsis de Alzheimer debido a sus propiedades biológicas (Sharifi-Rad et al., 2021).

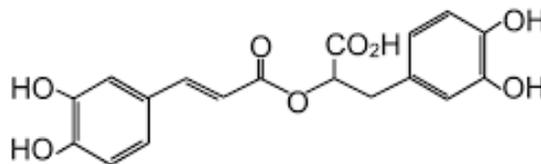
Las propiedades biológicas del toronjil morado tienen efectos bioactivos como lo son:

- a) Terpenos, que son compuestos orgánicos responsables del aroma y sabor, han demostrado propiedades medicinales, se liberan en forma de aceites naturales, la estructura de los terpenos son unidades básicas de isopreno, formado por cinco átomos de carbono y ocho de hidrogeno (Fig. 1).



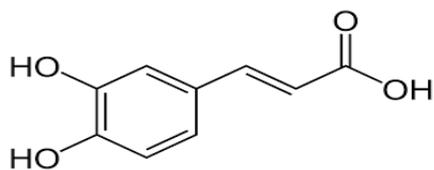
**Figura 1.** Estructura de terpenos

- b) Ácido rosmarínico, es un compuesto fenólico que se produce de forma natural y ha demostrado que posee una variedad de características biológicas como: antibacteriana y antiviral. Su estructura química (Fig. 2) es de un éster del ácido cafeico y ácido 3,4-dihidroxifenil láctico (Ijaz et al., 2023).



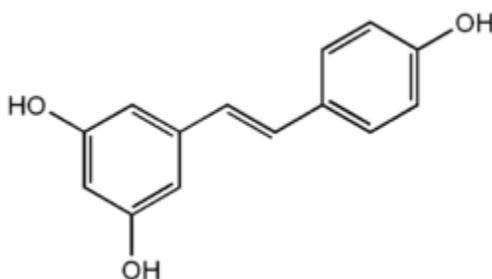
**Figura 2.** Estructura del ácido rosmarínico

- c) Ácido cafeico, antioxidante natural que ayuda a neutralizar a los radicales libres, es un ácido hidroxicinámico, en su estructura se incluye un anillo bencénico con dos grupos metoxi y un grupo carboxilo (Fig. 3).



**Figura 3.** Estructura ácido cafeico

d) Antioxidantes fenólicos, son compuestos químicos que tienen una acción importante para combatir a los radicales libres los cuales son especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (Fig. 4).



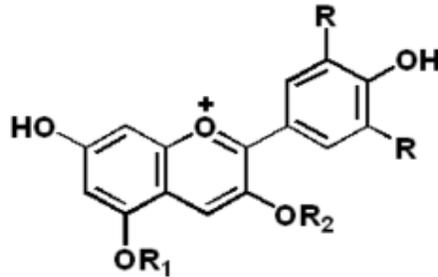
**Figura 4.** Estructura general de antioxidantes

## 2.2 Actividad antioxidante

Los antioxidantes tienen distintos mecanismos para combatir a los radicales libres, entre los cuales está la inhibición, la eliminación y el bloque de estas especies tóxicas. Su mecanismo de reacción es por la transferencia de un solo electrón (SET), la transferencia de átomos de hidrógeno (HAT) y la quelación de metales de transición (HAT). En el mecanismo HAT, los antioxidantes inactivan a los radicales libres con la ruptura del enlace O-H y transfieren átomos de hidrógeno; para SET, los antioxidantes donan electrones para los radicales libres y para el mecanismo de TMC los antioxidantes se quelan con iones metálicos y se forman complejos (Lang et al., 2024).

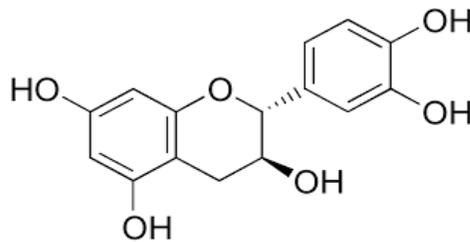
Los antioxidantes más importantes son los a) flavonoides, los cuales son un grupo de compuestos químicos polifenólicos se clasifican en: 1) antocianinas que están compuestas por un anillo aromático, un heterociclo de oxígeno que se conecta

con otro anillo aromático con un enlace de carbono simple (Fig. 5) (Lang et al., 2024).



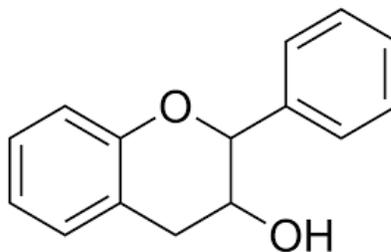
**Figura 5.** Estructura de las antocianinas

2) Catequinas su estructura se basa en anillos de benceno unidos por grupos hidroxilo y carbonos (Fig. 6). Son antioxidantes efectivos por sus propiedades estructurales con respecto a sus grupos hidroxilo y galato (Lang et al., 2024).



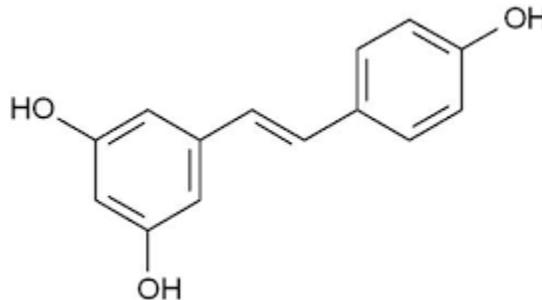
**Figura 6.** Estructura de las catequinas.

3) Flavonoles son la subclase principal de flavonoides, contiene tres anillos fenólicos, su principal distinción es el grupo hidroxilo y el grupo carbonilo (Fig. 7). Los tipos de flavonoles varían según la cantidad y la posición de los grupos hidroxilo en el anillo B (Arslanoğlu et al., 2010).



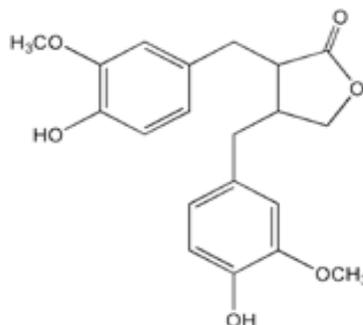
**Figura 7.** Estructura de los flavonoles

b) Ácidos fenólicos, es un ácido orgánico, se pueden encontrar en los metabolitos de las antocianinas, de acuerdo con su estructura se dividen en hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos. Tienen grupos hidroxilo y metoxilo en el anillo aromático y por consiguiente, presentan diferentes actividades biológicas (Fig. 8) (Rashmi & Negi, 2020).



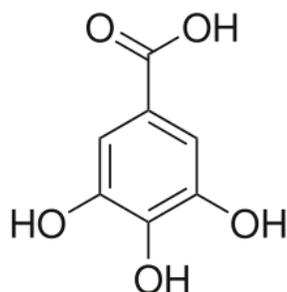
**Figura 8.** Estructura de ácido fenólico (resveratrol)

c) Lignanós son metabolitos secundarios, su estructura está compuesta por dos unidades de fenilpropanoides unidas por un enlace éter (Fig. 9). Tienen una gran diversidad por sus sustituyentes unidos a los átomos de carbono aromáticos y alifáticos (Li et al., 2018).



**Figura 9.** Estructura de los lignanos

d) Taninos, se clasifican en taninos hidrolizables y taninos condensados. Los taninos hidrolizables se caracterizan por la unidad estructural de ácido gálico y ácido elágico. Mientras que los taninos condensados se forman mediante la condensación de unidades estructurales que se unen por enlaces carbono-carbono (Fig. 10) (Buzzini et al., 2008).



**Figura 10.** Estructura de taninos.

Los principales factores que influyen de manera negativa en la capacidad antioxidante, es la estructura del núcleo, sus sustituyentes y las posición de éstos; al igual su estabilidad, ya que son relativamente débiles y se pueden ver afectados por los rayos ultravioleta, humo del cigarrillo, la exposición a contaminantes ambientales, luz, oxígeno o productos químicos tóxicos (Yang et al., 2019).

### **2.3 Métodos para determinar la capacidad antioxidante**

Existen distintos métodos para determinar la actividad antioxidante de forma *in vitro* o *in vivo*. De forma *in vitro* consiste en determinar la actividad antioxidante frente a sustancias cromógenas. Las determinaciones de la capacidad antioxidante realizadas *in vitro* pueden dar sólo una idea aproximada de lo que ocurre en situaciones complejas *in vivo* (Kuskoski et al., 2005). Los métodos más comunes que se utilizan para determinar la capacidad antioxidante son el ABTS (ácido 2,2-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico), DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), DMPD (Dihidrocloruro de N,N-dimetil-p-fenilendiamina) y FRAP (2,4,6-Tripyridyl-s-Triazine), los cuales captan los radicales libres generados, operando así en contra los efectos perjudiciales de los procesos de oxidación, que implican a especies reactivas de oxígeno (Kuskoski et al., 2005).

De los anteriores, los más utilizados son DPPH que es un compuesto orgánico, que es utilizado para medir como funciona un compuesto como antioxidante, se

basa en la capacidad del DPPH para aceptar electrones o hidrógenos de compuestos, resultando un cambio de color el cual es medido por un espectrofotómetro. Otro método muy utilizado es ABTS, ya que es una técnica rápida, sencilla y otorga información confiable, se basa en la capacidad del radical ABTS<sup>•+</sup> a oxidarse a ABTS<sup>2+</sup>. Ambos han presentado una excelente estabilidad en condiciones específicas. El DPPH es un radical libre que puede ser utilizado sin una preparación previa, mientras que el radical ABTS debe ser generado tras una reacción que puede ser química (persulfato potasio, dióxido de manganeso), enzimática (mioglobulina, peroxidasa) o electroquímica. Con el radical libre ABTS se puede medir la actividad de compuestos de naturaleza lipofílica e hidrofílica, mientras que con DPPH solo se debe disolver en un medio orgánico. El radical ABTS tiene la ventaja de que su espectro presenta máximos de absorbancia a 414, 654, 754 y 815 nm en medio alcohólico, mientras que el DPPH presenta un pico de absorbancia a 515 nm (Kuskoski et al., 2005).

#### **2.4 Calabaza (*Cucurbita argyrosperma*)**

Se ha descubierto que las proteínas vegetales son la fuente de proteínas más barata, abundante y también la mejor alternativa para las proteínas animales en diversas áreas, incluida la nutrición humana, productos funcionales y relacionados con la salud (Du et al., 2012).

El creciente interés mundial por los alimentos ricos en nutrientes, y que promueven la salud, en las últimas décadas suprimió la necesidad de alimentos refinados, y condujo a la reintroducción y exploración de recursos alimentarios ricos en nutrientes antiguos y alternativos. Las semillas constituyen alrededor del 3,2% al 4% de las frutas enteras y, en su mayoría, se desechan como desecho (Peiretti et al., 2017).

La calabaza *Cucurbita argyrosperma*, es una planta común que normalmente crece en regiones tropicales, subtropicales y cálidas en todo el mundo y es utilizada en la industria alimentaria para la producción de purés, jugos, mermeladas y bebidas alcohólicas (Mitić et al., 2018 ). Las semillas de calabaza

se utilizan ampliamente en la producción de aceites vegetales debido a su alto valor nutricional y efectos que promueven la salud (Aktas et al., 2018).

En la actualidad, se ha ido incrementando la demanda de semillas de calabaza ya que ha demostrado que tiene propiedades nutricionales y funcionales. Las semillas de calabaza son una rica fuente de grasas esenciales, proteínas, vitaminas, antioxidantes y compuestos fenólicos. Las semillas de calabaza han llamado mucho la atención por su alto contenido proteico (60-65 %) y las especiales características funcionales de sus proteínas vegetales. Además, la fracción principal de las proteínas de la semilla de calabaza es la globulina 12S, cuya estructura es similar a la de las globulinas de las semillas de leguminosas (Bučko et al., 2015). Esto podría indicar que los aislados de proteína de semilla de calabaza, tienen propiedades funcionales que se pueden comparar con las proteínas de semilla de leguminosas, como lo son: capacidades emulsionantes, espumantes y gelificantes (Yang et al., 2019).

## **2.5 Hidrólisis enzimática**

Los péptidos se pueden obtener de tres formas: i) descomponer proteínas mediante digestión *in vivo*, hidrólisis enzimática, fermentación microbológica e hidrólisis ácida o básica; ii) utilizar varios alfa aminoácidos y así sintetizar péptidos específicos que se basaran en secuencias peptídicas y iii) utilizar una técnica basada en ingeniería genética y así genera péptidos específicos (Gong et al., 2022). El método más utilizado es la hidrólisis enzimática, con distintas enzimas comerciales como las amilasas, proteasas, lipasas y celulasas (Ulug et al., 2021)

Algunos estudios han demostrado que alimentos comunes de origen animal y vegetal son importantes fuentes de péptidos, las fuentes vegetales generalmente incluyen cereales como el trigo, cebada, maíz, arroz, pseudocereales, amaranto, leguminosas soya, frijol, chícharos, girasol, entre otros (Malaguti et al., 2014).

Los péptidos están formados por varios aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. Estos se obtienen generalmente de proteínas que se basan en alimentos (Damodaran & Parkin, 2017).

Los péptidos son fuentes para la nutrición humana porque se absorben eficientemente a través del tracto gastrointestinal en comparación con las proteínas intactas, aquellos que son derivados de alimentos y aquellos que tienen funciones biológicas se les denominan **biopéptidos** (Pinho et al., 2021).

Desempeñan un papel de suma importancia en el área de los alimentos, por sus propiedades funcionales y bioactividades únicas (Zaky et al., 2022). Algunos péptidos han demostrado propiedades anfífilas y por lo tanto se pueden utilizar como emulsionantes (Lin et al., 2022). Los péptidos tienen secuencias de aminoácidos más cortas y tienen más residuos hidrofóbicos que las proteínas, lo que da como resultado una rápida adsorción en las interfases y, por lo tanto, gotas de la emulsión más pequeñas (Ricardo et al., 2021).

Otro beneficio importante es su actividad antioxidante en las interfases y esto ayuda a mejorar la estabilidad oxidativa de las emulsiones. Al igual los péptidos han demostrado que tienen una alergenicidad menor y se pueden digerir más fácilmente por el organismo (Chang et al., 2018).

## **2.6 Sistemas de protección**

La encapsulación es un campo de investigación en crecimiento que abre nuevas posibilidades para el desarrollo de alimentos más avanzados. Las ventajas de la encapsulación es la conservación de sabores o aromas, la liberación controlada y dirigida y una mayor biodisponibilidad de los encapsulados. La encapsulación a micro y nanoescala proporciona una plataforma amplia e intensa para el desarrollo de nuevas etapas en la producción de alimentos saludables. La microencapsulación y la nanoencapsulación son efectivas para proteger los sustancias de condiciones ambientales dañinas y al mismo tiempo permiten una liberación controlada y específica. Existen distintas técnicas para la

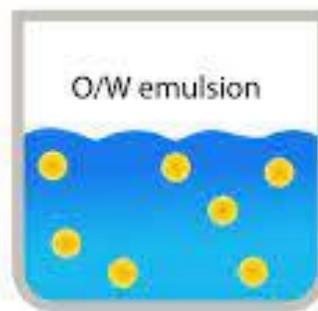
encapsulación de ingredientes alimentarios, incluida la emulsificación, la inclusión, la coacervación y la nanoprecipitación por complejación (Ghosh et al., 2021).

Se le puede definir como encapsulación al proceso de atrapar una sustancia, que puede ser un sabor, colorante, nutriente o conservante, dentro de otra sustancia y así liberarlo de manera que se controlada; se pueden utilizar distintos tipos de materiales para formar el núcleo y la cubierta según el tipo de sustancia que se requiera y sobre sus requisitos funcionales (Nezamdoost-Sani et al., 2024).

Existen distintas técnicas de encapsulación como lo son: secado por aspersión, inclusión molecular, cocrystalización, aplicación de fluidos supercríticos, coacervación, polimerización interfacial, extrusión, recubrimiento en lecho fluidizado o emulsificación. Estos procesos ayudan para crear productos innovadores y funcionales (Premjit et al., 2022).

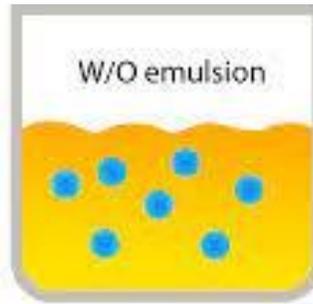
Una emulsión es una mezcla de dos líquidos que no se mezclarían, como lo son el agua y el aceite y los estabilizaría un agente emulsionante. Las emulsiones son utilizadas normalmente en la industria alimentaria, farmacéutica, cosmética, pinturas, entre otras. Son pequeñas gotas esféricas (de 100 nm a 100  $\mu$ m) existen diferentes tipos de emulsiones:

- i) aceite en agua (O/W) el aceite es el medio de dispersión y el agua es la fase dispersa (Fig. 11).



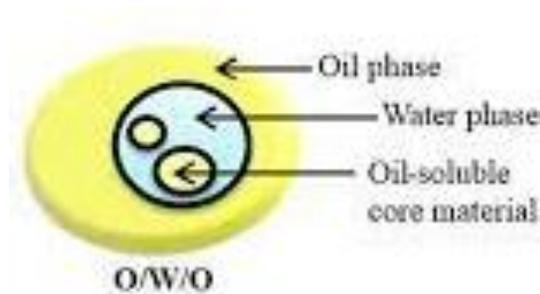
**Figura 11.** Emulsión agua en aceite (O/W)

ii) agua en aceite (W/O) el agua es el medio de dispersión y el aceite es la fase dispersa (Fig. 12).



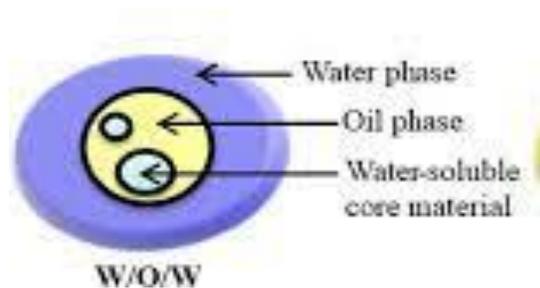
**Figura 12.** Emulsión aceite en agua (W/O)

iii) aceite-agua-aceite (O/W/O) se emulsiona un aceite dentro de una fase acuosa y luego se emulsiona esa mezcla en otro aceite (Fig. 13).



**Figura 13.** Emulsión O/W/O

iv) agua-aceite-agua (W/O/W) se emulsiona agua dentro de una fase oleosa y luego se emulsiona esa mezcla en agua (Mahdavi et al., 2022).



**Figura 14.** Emulsión W/O/W

Las emulsiones consisten en pequeñas gotas de aceite y se forman por una fase continua y otra dispersa. Son termodinámicamente inestables y con el tiempo se tienden a descomponer por distintos mecanismos que son:

- i) Floculación. Las gotas de un líquido están dispersas en otro líquido inmiscible, es decir, se unen y forman agregados más grandes. Se produce por la interacción entre partículas y se ve influenciado por el pH, temperatura y la fuerza iónica. Impacta significativamente en la estabilidad, viscosidad y capacidad de separación.
- ii) Coalescencia. Ocurre cuando gotas individuales entran en contacto entre sí, se puede ver influenciada por la agitación, concentración de emulsificante, temperatura, entre otros. Provocando separación de fases, pérdida en su estabilidad y cambios físicos.
- iii) separación de fases. Fenómeno en el que los componentes de la emulsión se separan formando capas distintas provocando inestabilidad y cambios en las propiedades físicas y químicas (McClements & Jafari, 2018).

Es por esto por lo que se deben incluir estabilizantes para mejorar su vida a largo plazo. Estos emulsionantes pueden ser proteínas, polisacáridos y otros polímeros tensioactivos; investigaciones actuales han identificado proteínas y fosfolípidos como los principales agentes emulsionantes (McClements & Jafari, 2018).

Las proteínas y las pectinas han demostrado tener propiedades para estabilizar emulsiones. Las proteínas son moléculas grandes y complejas que contienen tanto grupos hidrofílicos e hidrofóbicos, lo que les permite interactuar en fases acuosas u oleosas. Por su parte la pectina es un polisacárido que tiene la capacidad de formar geles y puede actuar como emulsificante por su estructura molecular. Las pectinas tienen grupos hidrofílicos que pueden formar enlaces con las moléculas del agua y con las de aceite lo que les permite formar emulsiones (Dickinson, 2009).

Combinar tanto proteínas como polisacáridos, como lo es la pectina, tiene grandes ventajas para desarrollar emulsiones y estabilizarlas. Los componentes

de proteína y pectinas pueden unirse mediante enlaces covalentes o interacciones electrostáticas a los pH adecuados para formar complejos electrostáticos que son los que estabilizarán a las emulsiones (Dickinson, 2009).

Uno de los sistemas de protección de antioxidantes como los del toronjil son las emulsiones de aceite en agua (O/W), de los cuales existen diversos reportes donde se mencionan las bondades que presentan como sistemas portadores de productos funcionales con sustancias bioactivas, una mejora en la estabilidad de los productos finales (López-Monterrubio et al., 2021). En estos estudios compara el efecto de la adición de un solo emulsificante, como proteínas, o emulsificantes de bajo peso molecular, o aquellos donde se adicionan mezclas de diferentes biopolímeros, formando complejos electrostáticos que se adsorben en la interfase aceite-agua y proporcionan una mayor estabilidad (McClements & Jafari, 2018). Los complejos de proteína-polisacárido han recibido mucha atención para la encapsulación de aceites volátiles, sabores, antioxidantes y otros compuestos bioactivos en el sector alimentario, debido a sus características únicas que incluyen una excelente solubilidad y capacidad emulsionante, propiedades antioxidantes, estabilidad en una amplia gama de valores de pH, temperatura y fuerza iónica, y proporciona una capa más gruesa, continua, viscoelástica y resistente al corte alrededor de las partículas de aceite y otros componentes bioactivos solubles en aceite (Lesmes & McClements, 2012).

Cuando los antioxidantes se dispersan en una emulsión estos son protegidos de la oxidación y la degradación, ya que las gotas de la emulsión actúan como una barrera evitando que agentes externos afecten a los antioxidantes (Lesmes & McClements, 2012).

## 2.7 Literatura citada

- Aguilar, C. N., Ruiz, H. A., Rubio-Ríos, A., Chávez-González, M. L., Sepúlveda, L., Rodríguez-Jasso, R. M., Loredó-Treviño, A., Flores-Gallegos, A. C., Govea-Salas, M., & Ascacio-Valdés, J. A. (2019). Emerging strategies for the development of food industries. *Bioengineered*, 10(1), 522-537. <https://doi.org/10.1080/21655979.2019.1682109>
- Aktaş, E., Sahin, H., Topaloğlu, Z., Oledinma, A., Huda, A. K. S., Irani, Z., Sharif, A. M., Wout, T. V., & Kamrava, M. (2018). A consumer behavioural approach to food waste. *Journal of Enterprise Information Management*, 31(5), 658-673. <https://doi.org/10.1108/jeim-03-2018-0051>
- Alam, M., Bristi, N. J., & Rafiquzzaman, M. (2013). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21(2), 143-152. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2012.05.002>
- Argueta, A., Cano, L., & Rodarte, M. (1994). *Atlas of the plants of Mexican traditional medicine*. National Indigene Institute.
- Arslanoğlu, H., Sadiq, A., Abbas, A., Mughal, E. U., Khan, K. M., & Ali, M. (2010). Isolation and synthesis of flavonols and comparison of their antioxidant activity. *Natural Product Research*, 24(11), 995-1003. <https://doi.org/10.1080/14786410902847302>
- Badarinath, A. V., Mallikarjuna Rao, K., Madhu Sudhana Chetty, C., Ramkanth, S., Rajan, T. V. S., & Gnanaprakash, K. (2010). A review on In-vitro antioxidant methods: Comparisons, correlations and considerations. *International Journal of PharmTech Research*, 2(2), 1276–1285.
- Božin, B., Mimica–Dukić, N., Samojlik, I., & Jovin, E. (2007). Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(19), 7879-7885. <https://doi.org/10.1021/jf0715323>
- Bučko, S., Katona, J., Popović, L., Vaštag, Ž., Petrović, L., & Vučinić–Vasić, M. (2015). Investigation on solubility, interfacial and emulsifying properties of pumpkin (*Cucurbita pepo*) seed protein isolate. *LWT*, 64(2), 609-615. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.06.054>
- Buzzini, P., Arapitsas, P., Goretti, M., Branda, E., Turchetti, B., Pinelli, P., Ieri, F., & Romani, A. (2008). Antimicrobial and antiviral activity of hydrolysable tannins. *Mini-reviews in Medicinal Chemistry*, 8(12), 1179-1187. <https://doi.org/10.2174/138955708786140990>
- Chang, C., Lahti, T., Tanaka, T., & Nickerson, M. T. (2018). Egg proteins: fractionation, bioactive peptides and allergenicity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(15), 5547-5558. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9150>
- Dastjerdi, M. N., Darooneh, T., Nasiri, M., Moatar, F., Esmaeili, S., & Ozgoli, G. (2019). Investigating the effect of *Melissa officinalis* on After-Pains: a randomized Single-Blind clinical trial. *Journal of Caring Sciences*, 8(3), 129-135. <https://doi.org/10.15171/jcs.2019.019>

- Damodaran, S. y Parkin, KL (2017). Aminoácidos, péptidos y proteínas. En *Química de los alimentos de Fennema* (págs. 235-356). Prensa CRC.
- Dickinson, E. (2009). Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers. *Food Hydrocolloids*, 23(6), 1473-1482. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.08.005>
- Du, Y., Jiang, Y., Zhu, X., Xiong, H., Shi, S., Hu, J., Peng, H., Zhou, Q., & Sun, W. (2012). Physicochemical and functional properties of the protein isolate and major fractions prepared from *Akebia trifoliata* Var. *Australis* seed. *Food Chemistry*, 133(3), 923-929. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.005>
- Gong, C., Lee, M. C., Godec, M., & Zhang, Z. (2020). Ultrasonic encapsulation of cinnamon flavor to impart heat stability for baking applications. *Food Hydrocolloids*, 99, 105316. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105316>
- González-Ramírez, A. E., González-Trujano, M. E., Pellicer, F., & López-Muñoz, F. (2012). Anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of the agastache mexicana extracts by using several experimental models in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*, 142(3), 700-705. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.05.044>
- Hosseinkhani, A., Ziaian, B., Hessami, K., Kashkoe, A., & Pasalar, M. (2021). An Evidence-Based review of antitussive herbs containing essential oils in traditional Persian medicine. *Current Drug Discovery Technologies*, 18(2), 179-185. <https://doi.org/10.2174/1568009620666200421091245>
- Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., Troncoso, A. M., Mancini-Filho, J., & Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Food Science and Technology*, 25(4), 726-732. <https://doi.org/10.1590/s0101-20612005000400016>
- Ijaz, S., Iqbal, J., Abbasi, B. A., Ullah, Z., Yaseen, T., Kanwal, S., Mahmood, T., Sydykbayeva, S., Ydyrys, A., Almarhoon, Z. M., Sharifi-Rad, J., Hano, C., Călina, D., & Cho, W. C. (2023). Rosmarinic Acid and its derivatives: Current insights on anticancer potential and other biomedical applications. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 162, 114687. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114687>
- Lang, Y., Gao, N., Zang, Z., Meng, X., Liu, Y., Yang, S., Yang, Y., Jin, Z., & Li, B. (2024). Classification and antioxidant assays of Polyphenols: a review. *Journal of Future Foods*, 4(3), 193-204. <https://doi.org/10.1016/j.jfutfo.2023.07.002>
- Li, Y., Xie, S., Ying, J., Wei, W., & Gao, K. (2018). Chemical structures of lignans and neolignans isolated from lauraceae. *Molecules*, 23(12), 3164. <https://doi.org/10.3390/molecules23123164>
- Lin, D., Sun, L., Chen, Y., Liu, G., Miao, S., & Cao, M. (2022). Peptide/protein hydrolysate and their derivatives: their role as emulsifying agents for enhancement of physical and oxidative stability of emulsions. *Trends in Food Science and Technology*, 129, 11-24. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.08.012>
- Lemjallad, L., Chabir, R., Rodi, Y. K., Ghadraoui, L. E., Chahdi, F. O., & Errachidi, F. (2019). Improvement of heliculture by three medicinal

- plants belonging to the Lamiaceae family. *The Scientific World Journal*, 2019, 1-7. <https://doi.org/10.1155/2019/2630537>
- Lesmes, U., & McClements, D. J. (2012). Controlling lipid digestibility: response of lipid droplets coated by B-lactoglobulin-dextran Maillard conjugates to simulated gastrointestinal conditions. *Food Hydrocolloids*, 26(1), 221-230. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.05.011>
- López-Monterrubio, D., Lobato-Calleros, C., Vernon-Carter, E., & Alvarez-Ramírez, J. (2021). Influence of B-carotene concentration on the physicochemical properties, degradation and antioxidant activity of nanoemulsions stabilized by whey protein hydrolyzate-pectin soluble complexes. *LWT*, 143, 111148. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111148>
- Malaguti, M., Dinelli, G., Leoncini, E., Bregola, V., Bosi, S., Cicero, A. F. G., & Hrelia, S. (2014). Bioactive peptides in cereals and legumes: agronomical, biochemical and clinical aspects. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(11), 21120-21135. <https://doi.org/10.3390/ijms151121120>
- Mata, R., Figueroa, M., Navarrete, A., & Rivero-Cruz, I. (2019). Chemistry and biology of selected Mexican medicinal plants. En *Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe* (pp. 1-142). [https://doi.org/10.1007/978-3-030-01099-7\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-030-01099-7_1)
- McClements, D. J., & Jafari, S. M. (2018). Improving emulsion formation, stability and performance using mixed emulsifiers: a review. *Advances in Colloid and Interface Science*, 251, 55-79. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.12.001>
- Mitić, M. N., Pavlović, A., Tošić, S. B., Mašković, P., Kostić, D. A., Mitić, S. S., Kocić, G., & Mašković, J. (2018). Optimization of simultaneous determination of metals in commercial pumpkin seed oils using inductively coupled atomic emission spectrometry. *Microchemical Journal*, 141, 197-203. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2018.05.022>
- Nezamdoost-Sani, N., Khaledabad, M. A., Amiri, S., Phimolsiripol, Y., & Khaneghah, A. M. (2024). A comprehensive review on the utilization of biopolymer hydrogels to encapsulate and protect probiotics in foods. *International Journal of Biological Macromolecules*, 254, 127907. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.127907>
- Nieto, G., Ros, G., & Castillo, J. (2018). Antioxidant and antimicrobial properties of rosemary (*Rosmarinus officinalis*, L.): a review. *Medicines*, 5(3), 98. <https://doi.org/10.3390/medicines5030098>
- Olivares-Galván, S., Marina, M. L., & García, M. C. (2020). Extraction and characterization of antioxidant peptides from fruit residues. *Foods*, 9(8), 1018. <https://doi.org/10.3390/foods9081018>
- Palma-Tenango, M., Sánchez-Fernández, R. E., & Soto-Hernández, M. (2021). A Systematic approach to Agastache Mexicana research: Biology, agronomy, phytochemistry, and bioactivity. *Molecules*, 26(12), 3751. <https://doi.org/10.3390/molecules26123751>
- Peiretti, P. G., Meineri, G., Gai, F., Longato, E., & Amarowicz, R. (2017). Antioxidative activities and phenolic compounds of pumpkin (*Cucurbita pepo*) seeds and amaranth (*Amaranthus caudatus*) grain extracts. *Natural*

- Product Research*, 31(18), 2178-2182.  
<https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1278597>
- Pinho, S., Faria, M. A., Melo, A., Alves, R., Cabrita, A. R., & Fonseca, A. J. (2021). Effect of skimmed milk on intestinal tract: Prevention of increased reactive oxygen species and nitric oxide formation. *International Dairy Journal*, 118, 105046. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105046>
- Premjit, Y., Pandhi, S., Kumar, A., Chandra, D., Duary, R. K., & Mahato, D. K. (2022). Current Trends in Flavor Encapsulation: A comprehensive review of emerging encapsulation techniques, flavour release, and mathematical modelling. *Food Research International*, 151, 110879. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110879>
- Rashmi, H. B., & Negi, P. S. (2020). Phenolic acids from Vegetables: A review on processing stability and health benefits. *Food Research International*, 136, 109298. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109298>
- Ricardo, F., Pradilla, D., Cruz, J. C., & Álvarez, Ó. (2021). Emerging Emulsifiers: Conceptual basis for the identification and rational design of peptides with surface activity. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), 4615. <https://doi.org/10.3390/ijms22094615>
- Sanders, R. W. (1987). Taxonomy of Agastache section Brittonastrum (Lamiaceae-Nepeteae). *Systematic botany monographs*, 15, 1. <https://doi.org/10.2307/25027677>
- Sharifi-Rad, J., Cruz-Martins, N., López-Jornet, P., Pons-Fuster, E., Harun, N., Yeskaliyeva, B., Beyatli, A., Sytar, O., Shaheen, S., Sharopov, F., Taheri, Y., Docea, A. O., Calina, D., & Cho, W. C. (2021). Natural coumarins: Exploring the pharmacological complexity and underlying molecular mechanisms. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021, 1-19. <https://doi.org/10.1155/2021/6492346>
- Srirama, R., Kumar, J., Seethapathy, G. S., Newmaster, S. G., Ragupathy, S., Ganeshiah, K. N., Shaanker, R. U., & Ravikanth, G. (2017). Species adulteration in the herbal trade: Causes, consequences and mitigation. *Drug Safety*, 40(8), 651-661. <https://doi.org/10.1007/s40264-017-0527-0>
- Sukhadiya, M. L., Thakur, N., Patel, V., Gunaga, R. P., Kharadi, V. B., Tyagi, K. K., & Singh, S. (2020). Provenance Variations in proximate principles, mineral matter, total phenols and phytochemicals of Melia dubia drupes: an unexplored alternate livestock feed stock. *Journal of Forestry Research*, 32(1), 119-131. <https://doi.org/10.1007/s11676-019-01080-y>
- Ulug, S. K., Jahandideh, F., & Wu, J. (2021). Novel technologies for the production of bioactive peptides. *Trends in Food Science and Technology*, 108, 27-39. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.12.002>
- Vogl, S., Picker, P., Mihály-Bison, J., Fakhrudin, N., Atanasov, A. G., Heiss, E. H., Wawrosch, C., Reznicek, G., Dirsch, V. M., Saukel, J., & Kopp, B. (2013). Ethnopharmacological in vitro studies on Austria's folk medicine—An unexplored lore in vitro anti-inflammatory activities of 71 Austrian traditional herbal drugs. *Journal of Ethnopharmacology*, 149(3), 750-771. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.06.007>
- Yang, C., Wang, B., Wang, J., Xia, S., & Wu, Y. (2019a). Effect of pyrogalllic acid (1,2,3-benzenetriol) polyphenol-protein covalent conjugation reaction

- degree on structure and antioxidant properties of pumpkin (*Cucurbita* sp.) seed protein isolate. *LWT*, 109, 443-449. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.04.034>
- Yang, C., Wang, B., Wang, J., Xia, S., & Wu, Y. (2019b). Effect of pyrogalllic acid (1,2,3-benzenetriol) polyphenol-protein covalent conjugation reaction degree on structure and antioxidant properties of pumpkin (*Cucurbita* sp.) seed protein isolate. *LWT*, 109, 443-449. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.04.034>
- Yang, F., Cao, X., Huang, M., Yang, Q., Cai, X., Chen, X., Du, M., Huang, J., & Wang, S. (2021). Molecular characteristics and structure–activity relationships of food-derived bioactive peptides. *Journal of Integrative Agriculture*, 20(9), 2313-2332. [https://doi.org/10.1016/s2095-3119\(20\)63463-3](https://doi.org/10.1016/s2095-3119(20)63463-3)
- Zaky, A. A., Simal-Gándara, J., Eun, J., Shim, J., & El-Aty, A. A. (2022). Bioactivities, Applications, safety, and Health Benefits of Bioactive Peptides from Food and By-Products: A review. *Frontiers in Nutrition*, 8. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.815640>

### **3. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DE TORONJIL ENCAPSULADOS CON PROTEÍNAS DE SEMILLA DE CALABAZA**

#### **3.1 Introducción**

La búsqueda de compuestos naturales que presenten propiedades antioxidantes ha despertado un interés en la industria alimentaria. De acuerdo con Fernández-Agulló et al. (2013), los antioxidantes son compuestos que pueden prevenir o retrasar el daño oxidativo en las células y tienen una relación con las enfermedades crónodegenerativas.

En este contexto el toronjil morado ha demostrado que es una fuente rica en compuestos fenólicos, terpenos, terpenoides, con potencial actividad antioxidante (Calvo-Irabien, 2018). Los compuestos fenólicos son antioxidantes que se encuentran en alimentos de origen vegetal (Shahidi & Ambigaipalan, 2018).

Sin embargo, la estabilidad y la biodisponibilidad de estos compuestos se ve comprometida a la degradación por distintos factores, son sensibles a la oxidación durante el procesamiento y almacenamiento de los alimentos, provocando una reducción de estos (Goula et al., 2012).

Para prevenir la degradación de los antioxidantes, la encapsulación de los extractos es una estrategia para proteger y mejorar la estabilidad de estos. En este sentido las emulsiones son utilizadas como sistemas portador de productos funcionales con sustancias bioactivas. Las proteínas de origen vegetal han cobrado interés por su bajo costo, al igual que pueden desempeñar un papel importante en la formación y estabilización de emulsiones, ya que pueden mejorar la textura y viscosidad. La semilla de calabaza son una opción viable de proteína de origen vegetal para proteger a los antioxidantes, ya que por su

naturaleza biocompatible es capaz de formar matrices estructurales y pueden actuar como agentes emulsionantes y estabilizante (Kadam et al., 2015).

El objetivo de esta investigación es evaluar la actividad antioxidante de los extractos de toronjil morado encapsulados con proteínas de semilla de calabaza con un enfoque en la capacidad para preservarlos y conocer si son ingredientes funcionales con aplicaciones potenciales en la industria alimentaria.

## **3.2 Materiales y métodos**

### **3.2.1 Muestra y reactivos**

El material biológico toronjil morado (*Agastache mexicana*) y la semilla de calabaza (*Cucurbita argyrosperma*), se recolectaron de Zacatlán, Puebla, México (19° 55' 55" N, 97° 57' 36" O, 2040 m.s.n.m) y Ahuacatlán, Puebla, México (20° 00' 27" N, 97° 51' 37" O, 1363 m.s.n.m); respectivamente, con los productores de la región.

Los reactivos analíticos 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH), ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS), albúmina sérico-bovina (BSA), dodecilsulfato de sodio (SDS), Folin-Ciocalteu, 2,4,6-Trinitrobencensulfónico (TNBS), L-leucina, persulfato de potasio ( $K_2S_2O_8$ ) y ácido gálico, al igual las enzimas Alcalasa<sup>®</sup>, proteasa bacteriana, se adquirieron de Sigma-Aldrich (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A). Los reactivos analíticos carbonato de sodio ( $Na_2CO_3$ ), tartrato de sodio y potasio ( $C_4H_8O_2$ ), sulfato de cobre ( $CuSO_4 \cdot 4H_2O$ ), hidróxido de sodio (NaOH), ácido clorhídrico (HCl), fosfato de sodio monobásico ( $NaH_2PO_4$ ), fosfato de sodio dibásico ( $Na_2HPO_4$ ), sulfito de sodio ( $Na_2SO_3$ ), etanol ( $C_2H_5OH$ ), metanol ( $CH_3OH$ ) y hexano fueron obtenidos de Química Meyer<sup>®</sup> (Química Suastes S.A de C.V., CDMX, México). En todos los experimentos se utilizó agua desionizada.

### **3.2.2 Acondicionamiento de las muestras**

#### **3.2.2.1 Deshidratación**

El toronjil morado se deshojó, mientras que las semillas se extrajeron cortando la calabaza y retirándolas del centro, posteriormente se lavaron y se secaron en una estufa (HCF-62, Riossa Digital, Ciudad de México, México) a 40 °C por 48 h con ventilación continua. Las harinas de semilla de calabaza (HSC) y toronjil morado (HTM), se obtuvieron a partir de la molienda en un procesador de alimentos (Nutribullet<sup>™</sup> NB-101B, velocidad 10 000 rpm, NutriBullet, México) por 3 minutos y las fracciones de HSC y HTM se colectaron. La HTM fue retenida en

un tamiz de malla No. 80 (Manufacturers of Industrial and Commercial Supplies, St. Louis, MO, EUA).

### **3.2.3 Análisis químico proximal**

Se llevo a cabo un análisis químico proximal (AOAC, 2000) para la HSC y HTM. El extracto etéreo se determinó por el método de Soxhlet AOAC 920.39; el contenido de proteína por el método de Kjeldahl ( $N \times 6.25$ ) AOAC 954.01; el porcentaje de cenizas por AOAC 942.05 y fibra cruda AOAC 991.42. Los carbohidratos totales se calcularon por diferencia (ecuación 1). Los resultados se expresaron en base seca.

$$\text{Carbohidratos totales} = \{100 (\% \text{ extracto etéreo} + \% \text{ proteína} + \% \text{ cenizas})\} \text{ (Ec. 1)}$$

### **3.2.4 Desgrasado de harina de semilla de calabaza (HSC)**

La HSC se desgraso a través de un equipo soxhlet, utilizando como disolvente para realizar la extracción al hexano. Se colocaron 30 g de HSC en cartuchos de papel filtro durante 7 horas a partir del primer sifón a 70 °C. Se retiro y se dejó secar a temperatura ambiente, la HSC se colecto y fue retenida en un tamiz de malla No. 80 para obtener la harina de semilla de calabaza desgrasada (HSCD) posteriormente se envaso y se selló herméticamente en bolsas de polietileno.

### **3.2.5 Obtención del aislado de proteína**

El aislado de proteína de semilla de calabaza (APSC) se obtuvo de acuerdo con la metodología descrita por Martínez y Añón (1996) con ligeras modificaciones. Se prepararon dispersiones de HSCD (100 g) en agua destilada (10 g/100 mL), se ajustó el pH con un potenciómetro (pH 120, Conductronic, Santa Cruz Buenavista, Puebla, México) a pH 10 con NaOH 1 N y se dejó en agitación continua durante 60 min. Posteriormente, las dispersiones se centrifugaron a 9200 x g a 10 °C por 10 min (Centrifuge 5810 R, Eppendorf, AG, Hamburgo, Alemania). Se colecto el sobrenadante y se ajustó a pH 4.2 (punto isoeléctrico) utilizando HCl 1 N en agitación constante a temperatura ambiente durante 1 h.

La proteína precipitada se aisló por centrifugación a 9200 x g a 4 °C por 10 min y se le realizaron 2 lavados con agua destilada, las muestras se secaron en una estufa (HCF-62, Riossa Digital, Ciudad de México, México) a 35 °C durante 24 h con ventilación continua. El aislado seco se molió manualmente en un mortero y se almaceno en bolsas de polietileno con cierre hermético a  $4 \pm 1$  °C hasta su uso. Al aislado de proteína se le determinó la proteína soluble por método Lowry modificado por Petterson (1977), se preparó una solución A, que consistió en carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 10 % (p/v), tartrato de sodio y potasio ( $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) 0.2 % (p/v) y sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) 0.1 % (p/v). La solución se mezcló con NaOH al 0.8 N y dodecilsulfato de sodio (SDS) 10 % (p/v) en una misma proporción. En un tubo se colocaron 10  $\mu\text{L}$  de muestra con 990  $\mu\text{L}$  agua destilada y 1 mL de la mezcla A, se agito y se dejó reposar a temperatura ambiente por 10 min. Transcurrido el tiempo se añadió, 0.5 mL de reactivo Folin-Ciocalteu 0.3 N y se dejó reaccionar por 30 min en oscuridad a temperatura ambiente. Se midió la absorbancia a 750 nm con un espectrofotómetro Genesys 10S-UV-VIS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Se construyo una curva estándar utilizando albúmina sérico-bovina (BSA) como estándar (0.1 - 0.01  $\text{mg mL}^{-1}$ ) para calcular la concentración de proteína.

### **3.2.6 Determinación de solubilidad de proteínas en función del pH**

La solubilidad de proteína se llevó a cabo por el método descrito por Yu et al. (2017). Se prepararon soluciones de las muestras (1 g/100 mL) en amortiguador fosfatos 0.01 M a pH 2, 4.2 (punto isoelectrico) 5, 7, 9 y 11. Las dispersiones se mantuvieron en agitación magnética por 60 min y se centrifugaron a 4400 x g por 20 min a temperatura ambiente y posteriormente se filtraron. El contenido de proteínas se determinó por el método de Lowry modificado por Petterson (1977).

### **3.2.7 Potencial zeta ( $\zeta$ )**

Se realizaron mediciones de los valores de potencial zeta ( $\zeta$ ) de dispersiones APSC (0.05 % p/p) con incrementos de 0.5 unidades en un intervalo de pH de 2 a 7, se ajustaron mediante la adición de HCl 0.1 N y NaOH 0.1 N. Las

dispersiones se colocaron en una celda de prueba de un equipo Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Worcestershire, Reino Unido). Se utilizó el modelo matemático de Smoluchowski (Cuevas-Bernardino et al., 2016).

### 3.2.8 Digestibilidad relativa *in vitro*

La digestibilidad relativa *in vitro* se llevó a cabo mediante el método de Martínez-Velasco et al., (2018). Se añadió la muestra de APSC (63.8 mg) en 10 mL de agua desionizada y se ajustó a pH 8 con NaOH 1 N. Se adicionó 1 mL de disolución acuosa enzimática, 1.58 mg de Tripsina pancreática porcina (tipo II, 48 unidades·mg<sup>-1</sup> de proteína), 3.65 mg de Quimotripsina pancreática b bovina (tipo II, 48 unidades·g<sup>-1</sup> de sólido) y 0.45 mg de Peptidasa intestinal porcina (P-7500, 115 unidades·g<sup>-1</sup> de sólido) se dejó en agitación durante 10 min a 37° C. Posteriormente se añadió 1.48 mg de proteasa bacteriana (tipo XIV, 4,4 unidades·g<sup>-1</sup> de proteína) y se continuo con la digestión durante 9 min a 55° C. El valor del pH se registró después de 1 minuto más y se utilizó para determinar el porcentaje de digestibilidad relativa de la proteína *in vitro* (RDP %) según la siguiente ecuación.

$$RDP (\%) = 234.84 - 22.56 X \dots\dots\dots(\text{Ec. 2})$$

Donde X es el pH final de la suspensión.

### 3.2.9 Propiedades de emulsificación

Se empleó un método turbidimétrico para determinar la actividad emulsionante (EA) y la estabilidad de la emulsión (ES) del APSC, como describe Horax et al. (2011). Se agregaron 40 mL de aceite de canola a 120 mL de solución de proteína (0.1%) y la mezcla se homogeneizó durante 3 min, utilizando un homogeneizador Ultra-Turrax® (T50 basic IKA Works, Inc. Wilmington, Usa) para formar una emulsión. Cincuenta microlitros de la emulsión se transfirieron a un tubo de ensayo que contenía 5 mL de SDS al 0.1 % (p/v) a 0 y 10 min después de la

homogeneización. La absorbancia de las soluciones se midió a 500 nm utilizando un espectrofotómetro. EA se expresó como la absorbancia a los 0 min de homogeneización de la emulsión, mientras que ES se calculó mediante la siguiente ecuación 3.

$$ES = T_0 X (\Delta t / \Delta T) \dots \dots \dots (\text{Ec 3})$$

En donde  $\Delta T$  fue el cambio en la turbidez de la absorbancia inicial ( $T_0$ ) que ocurrió en un período de 10 min ( $\Delta t$ ).

### 3.2.10 Hidrólisis enzimática (HE)

Para la hidrólisis se controlaron las condiciones de temperatura y agitación. El APSC (1 g) se disolvió en 20 mL de amortiguador Tris 0.1 M a pH 8 a 50 °C. En viales se colocaron 100  $\mu$ L de la enzima Alcalasa® a las relaciones enzima/sustrato (E/S) al 2 %, 4% y 8% y se agito. La dispersión de APSC se acondiciono a 50 °C a pH 8. La hidrólisis se inició al adicionar la enzima Alcalasa® y se realizó un seguimiento de la hidrólisis por 60 min con muestreos a 0, 5, 10, 20, 30, 40 y 60 min. Cada alícuota se llevó a baño maría a 100 °C por 15 min para inactivar la enzima. Posteriormente se centrifugo a 8000 rpm durante 15 min a 4 °C y los sobrenadantes de hidrolizado de semilla de calabaza (HiSC) se usaron para análisis posteriores.

### 3.2.11 Grado de hidrólisis (GH)

El porcentaje de GH se calculó determinando los grupos amino libres mediante la reacción con **TNBS**, para lo cual se utilizó un estándar de leucina (Addler-Nissen, 1979). En tubos de color ámbar se colocó la muestra (64  $\mu$ L), posteriormente 1 mL de amortiguador de fosfatos a pH 8.2 (0.2 M) seguido de 0.5 mL de TNBS al 0.01 % v/v. Se colocaron a 50 ° C durante 30 min en oscuridad. Transcurrido el tiempo se añadió 1 mL de sulfito de sodio 0.1 M y se dejó reposar por 15 min a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo se midió la absorbancia a 420 nm en un espectrofotómetro. El número total de grupos  $\alpha$ -

amino en la muestra, se determinó por el método de hidrólisis ácida, en una ampollita de vidrio se vertió 0.1 g de APSC y se le adiciono 0.9 mL de HCL 6 N, la ampollita se selló al vacío y se incubo en una estufa (Riossa Digital HCF-62, Ciudad de México, México) a  $100 \pm 1$  °C durante 24 h. Transcurrido el tiempo, la mezcla se neutralizó adicionando 0.9 mL de NaOH 6 N. Utilizando un papel filtro Whatman No.1 la muestra se filtró para la remoción de cenizas y por medio de la ecuación se calculó el porcentaje de GH.

$$\% GH = [((NH_2)_{t_x} - (NH_2)_{t_0}) / ((NH_2)_{HT} - (NH_2)_{t_0}) ] \times 100 \dots \dots \dots (\text{Ec. 4})$$

Donde  $(NH_2)_{t_x}$  = cantidad de grupos  $\alpha$ -amino terminal al tiempo  $t_x$ ,  $(NH_2)_{t_0}$  = cantidad de grupos  $\alpha$ -amino terminal al tiempo 0,  $(NH_2)_{HT}$  = cantidad de grupos  $\alpha$ -amino terminal.

### 3.2.12 Electroforesis (Peso molecular)

La electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) se realizó al hidrolizado con Alcalasa®, respecto a la alícuota al minuto 40, se llevó a cabo mediante el método reportado por Laemmli (1970) con ligeras modificaciones. El sistema utilizado consistió en un gel de apilamiento de acrilamida al 4 % (p/v) y un gel separador de acrilamida al 12 % (p/v). Se tomaron 33  $\mu$ L de muestra y se disolvieron en una disolución amortiguadora (Tris/HCl 0.5 M pH 6.8, 10% de SDS, 10 mL L<sup>-1</sup> de 2- $\beta$ mercaptoetanol, 25 mL L<sup>-1</sup> de glicerol y azul de bromofenol 0.20 g L<sup>-1</sup>). Se utilizó un estándar de bajo y alto peso molecular. La electroforesis se llevó a cabo a 150 V hasta que el colorante rastreador llego al fondo del gel. Después de la electroforesis, los geles se tiñeron por 30 min con azul brillante de Coomassie G-250 al 0.1 % (m/v) y desteñidos con dos lavados por 30 min cada uno (ácido acético 10 % (v/v), metanol 40 % (v/v) y agua desionizada 50% (v/v)).

### **3.2.13 Obtención del extracto de toronjil**

Se tomaron 10 g de toronjil morado, se le añadió 500 mL de EtOH a temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  °C) y se tuvo en agitación magnética por 24 horas. Transcurrido el tiempo con ayuda de un papel filtro (Whatman No. 1) se realizó una filtración. Posteriormente en un rotavapor se concentró el extracto (Digital D-402-10) a 40 °C por 4 h. Se retiró el extracto y se mantuvo en oscuridad para sus análisis posteriores (Lin et al., 2012).

### **3.2.14 Formación de complejos soluble**

Para la formación de los complejos solubles se determinó el potencial zeta del APSC, HiSC y la pectina cítrica (Pc) en un rango de 2 a 7, como se menciona en el apartado (1.1.7) para así determinar el pH de la posible ventana de interacción y realizar los complejos solubles. Se prepararon dispersiones acuosas, como describe Cuevas- Bernardino et al. (2018), de APSC y HiSC ( $30 \text{ mg mL}^{-1}$ ) con agua desionizada a temperatura ambiente ( $20 \pm 2$  °C), aplicando agitación magnética continua durante 2 h y se refrigeraron ( $4 \pm 1$  °C) durante la noche para su hidratación. Transcurrido el tiempo se ajustó el pH a 7.0, utilizando NaOH 0.1 N y se centrifugó por 30 min a 3000 rpm y se midió la absorbancia a 278 nm en un espectrofotómetro. Para Pc ( $30 \text{ mg mL}^{-1}$ ), se dispersó en agua desionizada a temperatura ambiente durante 2 h y se almacenó a 4 °C para su completa hidratación. Las dispersiones de los biopolímeros de APSC, HiSC y Pc se mezclaron para obtener una relación APSC:Pc y HiSC:Pc que oscilaban entre 5:1 y 1:5, el valor del pH se ajustó a 4.9 (APSC:Pc) y 3.9 (HiSC:Pc) con HCl (0.1 N) y NaOH (0.1 N) y se almacenaron por 24 h a 4 °C. Se realizó un procedimiento turbidímetro a los complejos, se centrifugaron a 1600 rpm durante 30 min y se midió la absorbancia a los sobrenadantes a 600 nm.

### **3.2.15 Emulsiones**

Se elaboraron emulsiones con el extracto de toronjil morado, siguiendo el método propuesto por López-Monterrubio et al. (2021), con ligeras modificaciones. La

fase oleosa de las emulsiones se preparó mezclando aceite de canola y extracto de toronjil ( $50 \text{ mg g}^{-1}$ ) se colocó en agitación magnética por 20 min y se sometió a sonicación durante 5 min con la ayuda de un Procesador Ultrasónico (Ultrasonic processor, Model VCX 130PB 500 y 750 W, 20 kHz. Newtown, CT, EUA) con una punta de 8 mm. Se utilizó un baño de agua helada para dispersar el calor producido. La fase oleosa se dispersó gota a gota en la fase acuosa, la cual se integró con los complejos solubles APSC:Pc y HiSC, con un homogeneizador (Ultra-Turrax® T50 basic IKA Works, Inc. , Wilmington, EE.UU), inicialmente a 6000 rpm por 1 min, continuo con 3 min a 8000 rpm y finalmente a 10 000 rpm durante 1 min. Las emulsiones se colocaron en refrigeración para análisis posteriores.

### **3.2.16 Tamaño de gota**

El tamaño de gota de las emulsiones se midió con un analizador de tamaño de gota Malvern (Malvern 3000, Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, Reino Unido). Se utilizó un índice de obscuración del 3 al 8 % y un índice de refracción de 1.333 con un índice de absorción de 0.001. Se registró el diámetro medio volumétrico ( $d_{4,3}$ ) y el tamaño de partícula promedio del área superficial ( $d_{3,2}$ ) de la emulsión.

### **3.2.17 Reología**

El comportamiento de las emulsiones se determinó un día después de su elaboración, con curvas de flujo y pruebas de frecuencia en un reómetro Physica MCR 301 (Anton Paar, Messtechnik, Stuttgart, Alemania), se utilizó una geometría de cilindros concéntricos (diámetro interior = 14 mm y diámetro exterior = 15 mm). Se colocó la muestra en el sistema de medición y se dejó por 3 min para equilibrar la muestra. Las curvas de flujo se realizaron aplicando velocidad de corte  $10^{-3}$  a  $10^3 \text{ s}^{-1}$  y la viscosidad aparente se ajustó ( $R^2 = 91.01$ ) al modelo de Carreau. Para los barridos de amplitud, a las muestras se les aplicó un rango de deformación de 1 a 100 % con una frecuencia de 1 Hz. Los valores de los

módulos de almacenamiento ( $G'$ ) de pérdida ( $G''$ ) y  $\tan \delta$  fueron determinados. se obtuvieron con el software del equipo.

### 3.2.18 Microscopia óptica

Con objeto de determinar la morfología de las gotas de las emulsiones, se obtuvieron micrografías en un microscopio óptico optical microscope (Olympus BX53, Olympus Optical Co., Tokyo, Japan) coupled to an AxioCam ERc 5 S camera (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen, Germany). Se colocaron 100  $\mu$ L de emulsión en portaobjetos y se observaron a un aumento de 40X.

### 3.2.19 Actividad antioxidante por captación del radical libre DPPH

Para la actividad de eliminación de radicales DPPH (2,2 difenil-1-picrilhidrazil), se tomó una alícuota de muestra (500  $\mu$ L) y 1500  $\mu$ L de DPPH 0.08 M (preparado con (CH<sub>3</sub>OH) seguido de incubación durante 60 min en la oscuridad. La absorbancia frente al blanco de reactivo preparado se determinó a 515 nm en un espectrofotómetro (Genesys 10S-UV-VIS Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). El porcentaje de inhibición del radical se calculó mediante la ecuación.

$$\text{Inhibición (\%)} = \left[ \frac{Abs_{control} - Abs_{muestra}}{Abs_{control}} \right] * 100 \dots \dots \dots \text{(Ec. 5)}$$

Donde  $Abs_{control}$  es la absorbancia sin añadir la muestra.

### 3.2.20 Actividad antioxidante por ABTS

La determinación de actividad antioxidante mediante la medición de la capacidad de inhibición del radical libre ABTS (2,2 'azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)), se determinó mediante el método propuesto Re et al. (1999) con ligeras modificaciones. La obtención del radical ABTS<sup>•+</sup> se realizó mediante la reacción de 10 mL de ABTS 7.4 mM con persulfato de potasio 2.6 mM. La mezcla se incubo en oscuridad a  $\pm 25$  °C durante 16 h antes de su uso. Una vez formado el radical ABTS<sup>•+</sup> (600  $\mu$ L) se diluyeron con etanol hasta obtener una absorbancia de  $0.700 \pm 0.002$  a 734 nm en un espectrofotómetro, que es la longitud de onda de máxima absorción). Para las muestras, se mezcló la disolución del radical

ABTS (960 µL) con 40 µL de las muestras, se incubó durante 6 min a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo en un espectrofotómetro se midió la absorbancia a 734 nm, utilizando metanol como blanco. El porcentaje de inhibición del radical se calculó mediante la siguiente ecuación.

$$\text{Inhibición}(\%) = \left( \frac{\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{muestra}}}{\text{Abs}_{\text{muestra}}} \right) * 100 \dots \dots \dots (\text{Ec. 6})$$

### 3.2.21 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de las propiedades se aplicó un diseño completamente al azar (DCA), todos los experimentos se realizaron por triplicado para identificar las diferencias estadísticas. Los resultados se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) con una confiabilidad del 95 %, al igual que una comparación de medias con el estadístico de prueba Tukey ( $\alpha \leq 0.05$ ).

## 3.3. Resultados y discusión

### 3.3.1 Análisis químico proximal

La composición química proximal de HSC y HTM en base seca se muestran en el cuadro 1. Las harinas de semillas pueden ser utilizadas como ingredientes con gran potencial debido a sus componentes (Karakas et al., 2014). Dimitry et al. (2022) reportaron para *C. máxima* un contenido de cenizas de 4.02 %, mientras que para *C. mostacha* fue de 3.68 %, estos valores son menores a lo obtenido en esta investigación con un 7.14 % de cenizas para HSC. Las proteínas y lípidos (extracto etéreo), son los componentes principales y más importantes de las semillas; Rezig et al. (2013) obtuvieron un 43.1 % de proteína cruda para la variedad de *C. máxima*. El contenido de proteínas en la semilla de melón amargo es de 43.5 % (Horax et al., 2010); mientras que Vinayashree & Vasu (2021) reportaron un 35.18 % para proteína cruda y para lípidos un 33.48 % en la variedad *C. moschata*. En la variedad *C. máxima* el porcentaje de lípidos fue de 58.68 % (Dimitry et al., 2022). Para la variedad *C. argyrosperma* se encontró un 40.03 % que se encuentra dentro de los valores mencionados anteriormente. Para fibra y extracto libre de nitrógeno se obtuvieron valores inferiores a los

reportados para la variedad *C. máxima* 2.18 y 8.24 % respectivamente; *C. moschata* presento un 2.93 y un 7.81 % (Dimitry et al., 2022).

Las variaciones encontradas para HSC en cada parámetro y las de los resultados reportados por los distintos autores pueden deberse al tipo de suelo, clima y variedad. Al igual debido a su alto contenido en proteína las semillas de calabaza variedad *C. argyrosperma* las hacen una buena fuente de proteínas vegetales extraíbles (Vinayashree & Vasu, 2021)

**Cuadro 1.** Análisis químico proximal de las harinas de semilla de calabaza (HSC) y toronjil morado (HTM)

Parámetros	% (Base seca)	
	HSC	HTM
<b>Cenizas (C)</b>	7.14 ± 0.01	10.44 ± 0.05
<b>Proteína Cruda (PC)</b>	40.03 ± 0.50	27.37 ± 0.01
<b>Extracto Etéreo (EE)</b>	50.20 ± 0.05	5.65 ± 0.24
<b>Fibra Cruda (FC)</b>	1.71 ± 0.03	10.92 ± 0.48
<b>Extracto libre de nitrógeno (ELN)</b>	0.92 ± 0.04	45.62 ± 0.05

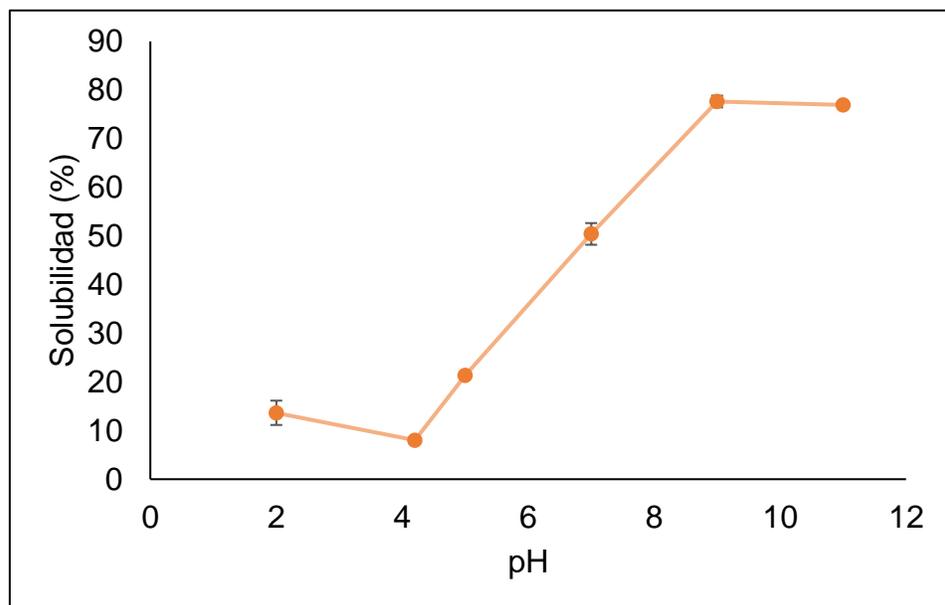
Para la HTM, Wu & Wang (2001) reporta un 12.03 % de cenizas para *M. officinalis* y para *C. citratus* un 8.84 %, esto es similar a lo obtenido en esta investigación y se encuentra en el rango de porcentaje de cenizas para plantas medicinales según la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2015 que establece un 10 % máximo. Para la proteína cruda y extracto etéreo (Wu & Wang, 2001) reportan un 30.41 y 3.08 % respectivamente, estos valores son similares a los obtenidos en esta investigación. Para carbohidratos este mismo autor reporto un 64.80 % que es mayor a lo obtenido con un 45.62 %, estas diferencias pueden deberse a las condiciones del cultivo, condiciones climáticas, madurez de la planta y su procesamiento posterior.

### 3.3.2 Solubilidad de las proteínas en función del pH

La solubilidad de las proteínas es una propiedad funcional de suma importancia, para la solubilidad de la semilla de calabaza en función del pH se muestra en la

Figura 15, donde el valor más bajo se presentó en 4.2, es decir el punto isoeléctrico con un  $8.02 \pm 0.01$  %, la solubilidad aumento en pH superiores a 5, la mayor solubilidad fue a pH 9 ( $77.65 \pm 1.2$  %). Vinayashree & Vasu (2021) reportan valores similares para la proteína de semilla de calabaza de la variedad *Cucurbita mostacha*, con una solubilidad mínima entre pH 4-5 y la mayor solubilidad a pH 12, al igual mencionan que la proteína de semilla de calabaza es comparable con la proteína de aislado de soya con un 80.34 % de solubilidad a pH 12. Para la proteína de guisantes y trigo se reportó una solubilidad baja en pH 4-6 y 6-7 respectivamente, es decir en el punto isoeléctrico (Zhao et al., 2020).

Los valores obtenidos coinciden con los autores mencionados anteriormente, una mayor solubilidad se puede asociar a un bajo número de residuos hidrofóbicos, hidratación iónica a un pH ya sea mayor o menor al punto isoeléctrico y una mayor carga.

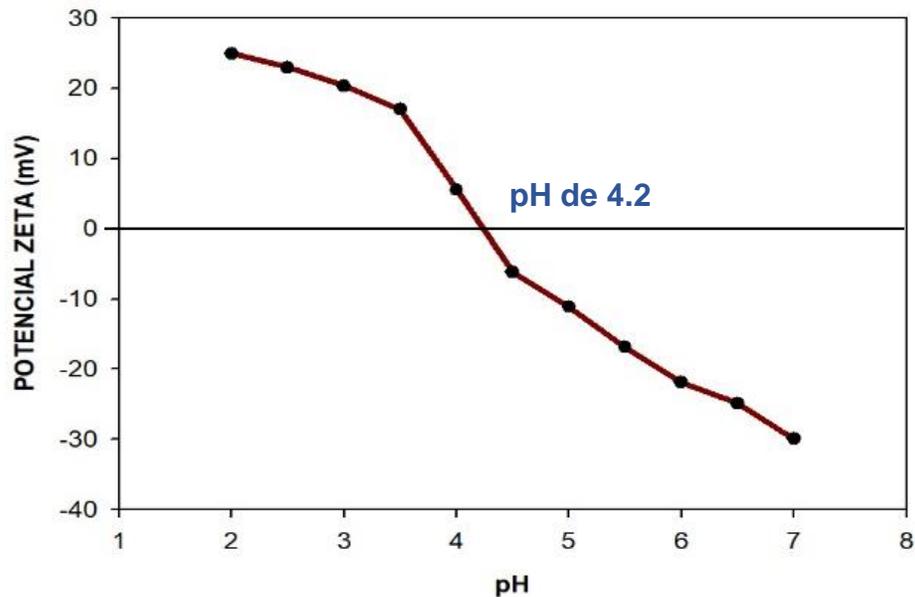


**Figura 15.** Solubilidad de la proteína de harina de semilla de calabaza en función del pH

### 3.3.3 Potencial zeta ( $\zeta$ )

El potencial zeta ( $\zeta$ ) se emplea para determinar el pH en el cual una molécula, como una proteína o una molécula coloidal tiene una carga neta igual a cero

(punto isoeléctrico), es decir, donde el número de cargas positivas es igual al número de cargas negativas (López et al., 2018).



**Figura 16.** Potencial zeta del aislado de proteína de semilla de calabaza en función del pH

La variación del potencial  $\zeta$  del APSC con el pH se presenta en la (Fig. 16), en la que se puede observar una carga neta cero en un valor de pH de 4.2, siendo este el punto isoeléctrico, lo que da que las proteínas precipiten por las fuerzas de atracción de Van der Waals y presentan el menor porcentaje de solubilidad. El potencial  $\zeta$  cambio  $+25 \pm 0.5$  mV a un pH de 2 y  $-30 \pm 0.02$  mV en un pH de 7 aproximadamente. En valores por debajo del punto isoeléctrico indican un aumento de las cargas negativas, es decir la ionización de los grupos carboxílicos ( $-\text{COOH}$ ) para dar carboxilatos ( $-\text{COO}^-$ ). Por otra parte, para dar valores positivos se debe dar una protonación de grupos amino ( $-\text{NH}_2$ ) para dar grupos de amonio ( $-\text{NH}_3^+$ ). Bucko et al. (2016) reportaron para la semilla de calabaza variedad *Cucurbita pepo* un punto isoeléctrico entre pH 4 y pH 5, similar a lo obtenido en esta investigación.

### 3.3.4 Digestibilidad relativa *in vitro*

Una herramienta útil para evaluar su composición y biodisponibilidad de los aminoácidos así como la calidad nutricional de una proteína alimentaria es la

digestibilidad *in vitro* de proteínas (Sá et al., 2019). En este trabajo se reveló una digestibilidad relativa *in vitro* de  $82.1 \pm 0.5$  % para el APSC, este resultado es mayor a la obtenido con otras investigaciones, como lo reportado por Venuste et al. (2013) en harina de semilla de calabaza, donde el valor obtenido oscilo en un 71.3 %; pero fue inferior a lo reportado por Sá et al. (2019) con un 85 % para *Cucurbita*. El-Adawy & Taha (2001b) obtuvieron una digestibilidad de proteínas *in vitro* de 90.0 % en la semilla de calabaza, seguida de un 87.91 % para la harina de semilla de sandia y un 72.7 % para la harina de semillas de pimentón. Al igual los resultados coinciden con la proteína de quinoa que se encontraron entre un 75.3 % y un 84 % (Repo-Carrasco-Valencia & Serna, 2011) y un  $78.37 \pm 1.08$  % en el aislado de proteína de quinoa (El.Sohaimy et al., 2015).

El resultado obtenido muestra el potencial de la semilla de calabaza como una fuente alterna de proteína para el consumo humano por su fácil digestión.

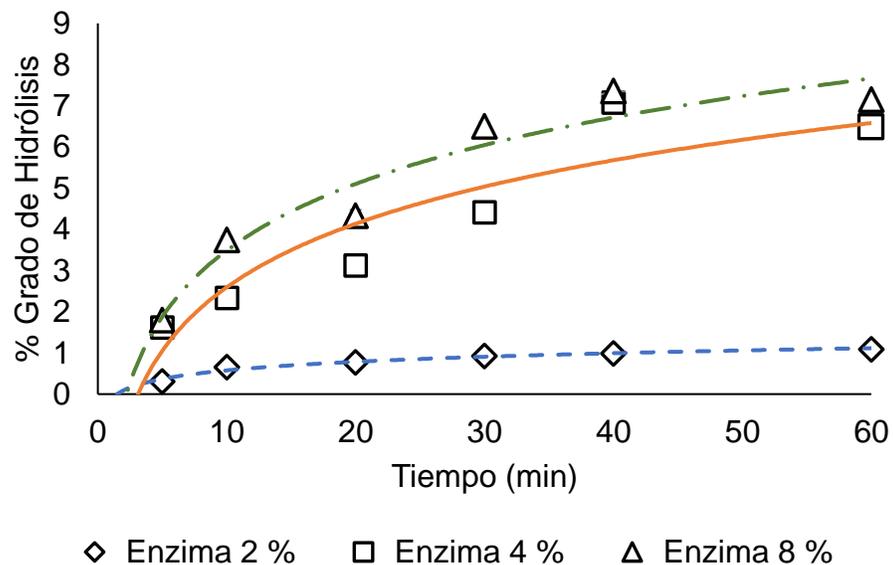
### **3.3.5 Propiedad emulsionante**

La propiedad emulsionante incluye a la actividad emulsionante y a la estabilidad de la emulsión. La propiedad emulsionante se refiere a la capacidad de una sustancia para estabilizar a una emulsión, es decir, la capacidad de la proteína para formar la emulsión, mientras que la estabilidad de la emulsión es su capacidad para mantenerse uniforme sin separarse, que cada gota permanezca dispersa, sin flocularse, fusionarse o forme crema. Estas propiedades pueden ser afectadas por el pH, temperatura, hidrofobicidad y cargas (Vinayashree & Vasu, 2021b). Para la actividad emulsionante y estabilidad de la emulsión de APSC se obtuvieron valores de  $0.873 \pm 0.02$  y  $21.75 \pm 0.05$  %, respectivamente; en trabajos anteriores se ha reportado una actividad emulsionante de  $0.930 \pm 0.015$  y una estabilidad emulsionante de  $23.65 \pm 3.15$  para el aislado de *C. mostacha*, mientras que para la proteína de soya presento una actividad emulsionante de  $0.990 \pm 0.001$  y una estabilidad del  $27.41 \pm 1.17$  (Vinayashree & Vasu, 2021b)., los valores obtenidos son mayores a los de la semilla de melón amargo con una

actividad del  $0.360 \pm 0.02$  y una estabilidad del  $63.6 \pm 8.3$  (Horax et al., 2011). El APSC es una proteína viable y funcional para el uso alimentario.

### **3.3.6 Grado de hidrólisis (GH)**

El APSC fue sometido a una hidrólisis enzimática con Alcalasa® la cual es una proteasa serina que mejora las propiedades funcionales y nutricionales de las proteínas, ya que tiene la capacidad de hidrolizar enlaces peptídicos en condiciones alcalinas (Hamada, 2000). La hidrólisis de APSC por Alcalasa® se realizó a tres concentraciones de enzima (2 , 4 y 8 %) y se controló por 60 min (Fig. 17). En todas las concentraciones de enzima los valores de GH incrementaron con respecto al tiempo de reacción. Los valores más altos de grado de hidrólisis oscilaron entre  $7.35 \pm 0.01$  % y  $7.15 \pm 0.02$  % para la concentración de enzima de 4 y 8 %; con la excepción de la enzima al 2 % que fue del  $1.08 \pm 0.01$  %. Adjonu et al. (2013) reportaron un  $11.8 \pm 0.2\%$  y  $14.1 \pm 1.7$  % con las enzimas pepsina y tripsina respectivamente para proteína de suero. Para hidrolizados con aislado de proteína de canola Cumby et al. (2008), mencionan un 6.33 % de grado de hidrólisis con la enzima Flavourzyme y un 20.6 % con la enzima Alcalasa®. Por otro lado, Vařtag et al. (2011) reportan un 19 % de hidrólisis al min 60 para el aislado proteico de semilla de calabaza. Estos valores son superiores a los reportados en esta investigación, esto puede deberse a que normalmente, las enzimas pueden hidrolizar en distintos grados por su especificidad enzima-peptido, es decir su actuar en los distintos puntos de la cadena polipeptídica.



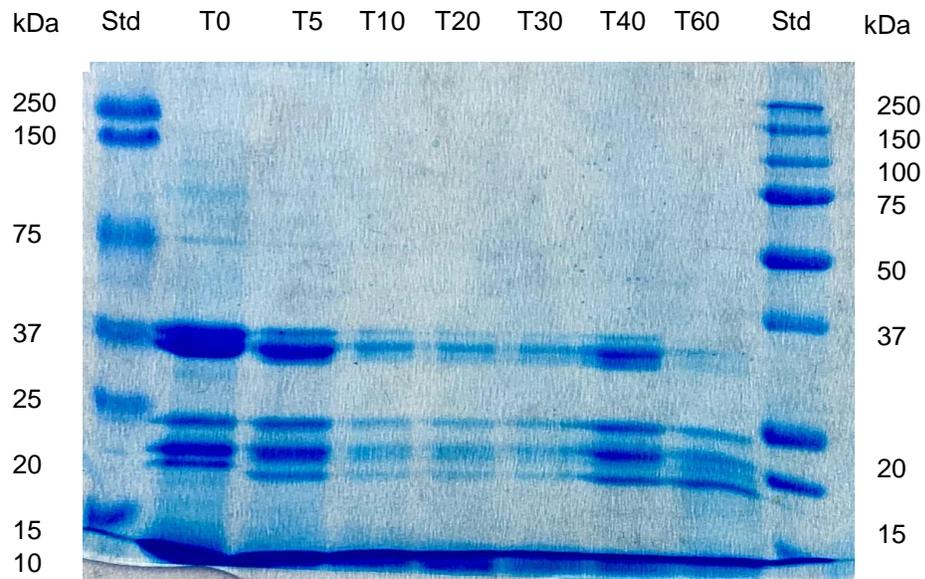
**Figura 17.** Grado de hidrólisis con la enzima Alcalasa® en distintas concentraciones en proteínas de semilla de calabaza a distintos tiempos, durante 60 min.

### 3.3.7 Electroforesis

Los perfiles SDS-PAGE de los péptidos de aislado de proteína de semilla de calabaza se muestran en la Figura 18, tratados con la enzima Alcalasa®. Se determinó la distribución de los pesos moleculares de la muestra sin hidrolizar (T0) y posteriormente en los hidrolizados enzimáticos a los tiempos 5, 10, 20, 30, 40 y 60 min.

Las bandas de mayor intensidad corresponden a pesos moleculares estimados alrededor de 37 kDa seguidas de 20 kDa y 15 kDa. Con respecto al tiempo de hidrólisis, se observó mayor intensidad en las bandas a los tiempos cero, cinco y cuarenta minutos. Al tiempo cero se conservan las proteínas con su estructura nativa, a los cinco minutos no se observan cambios en la distribución de los pesos moleculares, mientras que para el tiempo 10, 20 y 30 se observa una disminución gradual en la intensidad, debido al proceso de hidrólisis enzimática. Para el minuto 40 de hidrólisis, las bandas oscilaron de 36 kDa y de 15 a 20 kDa. En el

tiempo 60 minutos, las bandas de mayor intensidad se ubicaron en el rango entre 15 y 20 kDa.

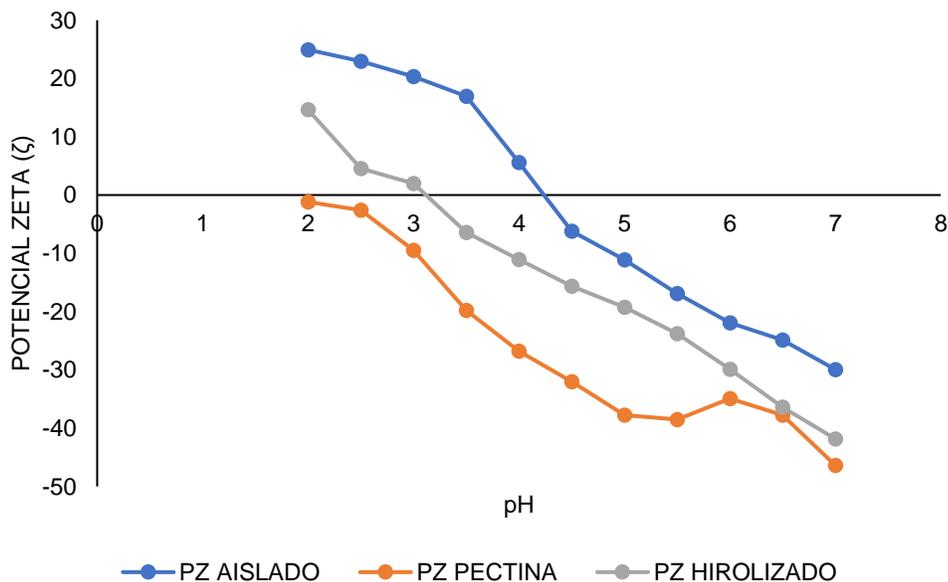


**Figura 18.** Distribución de pesos moleculares de los hidrolizados de semilla de calabaza al 2 % con la enzima Alcalasa® de 0 min a 60 min.

El trabajo reportado por Fang et al. (2012) donde analizan la distribución de proteínas de las semillas de calabaza (*Cucurbita sp*) asocian la banda observada a 15 kDa a la albúmina 2S. Nielson (1990) menciona que para la soya (*Glycine max*) las bandas proteicas observadas a 20 kDa corresponden a subunidades básicas de glicinina (globulina 11S); mientras que Kim et al. (2010) asocian la banda observada a 37 kDa a dos subunidades ácidas de esta misma proteína de almacenamiento. Con respecto a las bandas observadas en el tiempo cero, el cual es previo a la hidrólisis y de acuerdo con los autores mencionados anteriormente, se puede atribuir que los péptidos que se van generando provienen principalmente de estas proteínas, ya que son las de mayor concentración.

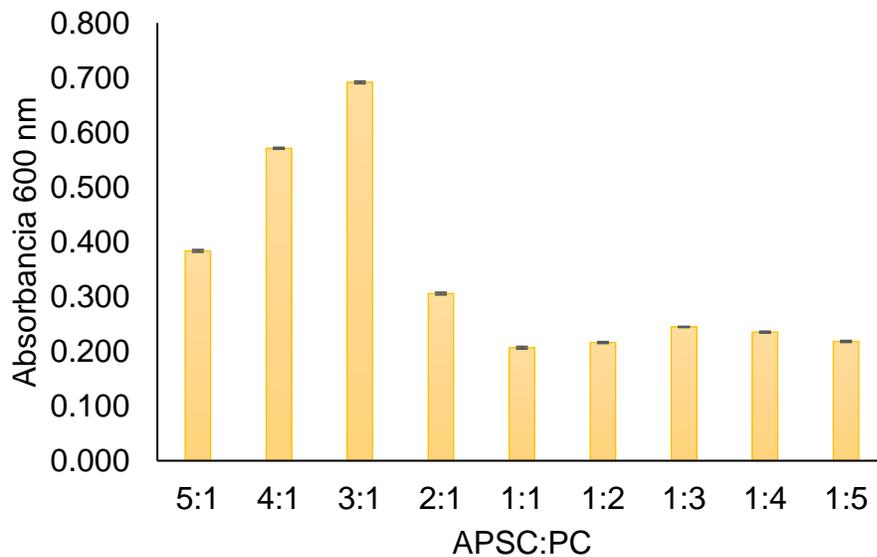
### 3.3.8 Formación de complejos

En la Figura 19 se muestra el potencial  $\zeta$  para las soluciones de APSC, HiSC y Pc. Las proteínas están compuestas por aminoácidos lo que permite tengan cargas positivas y negativas. Los valores positivos del potencial  $\zeta$  se deben a la protonación de moléculas amino (-NH<sub>2</sub>) que dan lugar a los grupos amonio (-NH<sup>+</sup>), mientras que para los valores negativos son por la ionización de las moléculas de ácido carboxílico (COOH) a grupos carboxilato (-COO<sup>-</sup>). El punto isoeléctrico corresponde a la carga cero de las proteínas, en el caso del APSC y el HiSC, es 4.2 y 3.1 respectivamente. Para la solución de Pc, los valores obtenidos tuvieron carga negativa neta que osciló entre  $-1.19 \pm 0.1$  mV y  $-46.37 \pm 0.1$  mV. La pectina es un biopolímero aniónico y como consecuencia de sus valores bajos de pKa de grupos carboxilo (Jones et al., 2009). Para la formación de complejos solubles se necesitan interacciones electrostáticas débiles entre ambos polímeros (APSC:Pc y HiSC:Pc) y debe estar por encima del punto isoeléctrico. En el caso del complejo APSC:Pc se seleccionó el pH de 4.9 y para HiSC:Pc un pH de 3.9.

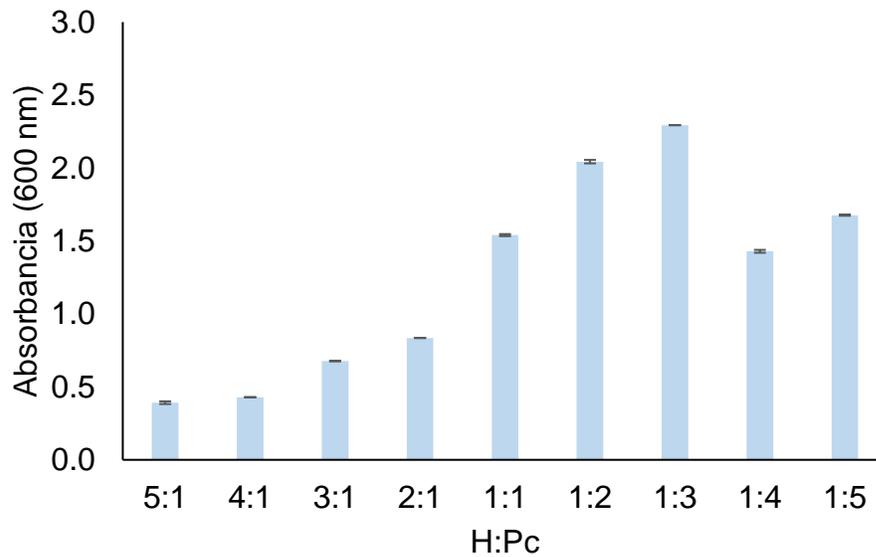


**Figura 19.** Variación de potencial zeta de las dispersiones de aislado de proteína de semilla de calabaza (APSC), hidrolizado de semilla de calabaza (HSC) y pectina cítrica (Pc)

Al igual se estableció la relación de biopolímeros APSC:Pc y HiSC:Pc para formar los complejos solubles, los cuales fueron en una relación 5:1 a 1:5. En la Figura 21 se muestra la absorbancia del sobrenadante de los complejos de APSC:Pc, la absorbancia más alta de complejo soluble fue en una relación 3:1, mientras que para HiSC:Pc la absorbancia más alta se presentó en 1:3 (Fig. 22). Con base en esto para la formación de complejos se seleccionó para APSC:Pc un pH de 4.9 y una relación 3:1 y para el HiSC:Pc un pH de 3.9 y relación 1:3.



**Figura 20.** Relación de biopolímeros de aislado de proteína de semilla de calabaza (APSC) y pectina cítrica (Pc)



**Figura 22.** Relación de biopolímeros de hidrolizado de semilla de calabaza (HiSC) y pectina cítrica (Pc)

### 3.3.9 Tamaño de gota

En el cuadro 2 se pueden observar los tamaños de gotas de aceite de las emulsiones tanto para APSC:Pc y HiSC:Pc, se presentó diferencia estadística significativa ( $p \leq 0.05$ ). El tamaño de partícula del área superficial ( $d_{3,2}$ ) es afectado por el emulsificante utilizado, específicamente a sus propiedades sensoriales y fisicoquímicas (McClements, 2009), siguiendo esto el APSC:Pc demuestra ser más efectivo que el HiSC como emulsionante para estabilizar las emulsiones con un  $1.68 \mu\text{m}$ .  $d_{3,2}$  ya que presentaron las gotas más pequeñas.

Tener distribuciones de tamaño estrechas de gotas de emulsión, por un diámetro de medio volumétrico ( $d_{4,3}$ ) pequeño, reflejara una estabilidad mayor y así coadyubara a prevenir la coalescencia promoviendo la estabilidad interfacial y su capacidad para que se forme la emulsión (Li et al., 2023). Los valores de diámetro de medio volumétrico ( $d_{4,3}$ ) para el APSC:Pc fue de  $2.181 \pm 0.07 \mu\text{m}$ , mientras que para el HiSC:Pc fue de  $4.104 \pm 0.03 \mu\text{m}$  por lo tanto las emulsiones estabilizadas con APSC:Pc presentaron un mejor tamaño de gota, estabilidad y

comportamiento de agregación que las emulsiones estabilizadas por HiSC, lo mencionado se puede observar de manera visual en la Figura 23.

**Cuadro 2.** Tamaño de gota de aceite en las emulsiones de APSC:Pc e HiSC:Pc

	<b>d<sub>3,2</sub> (μm)</b>	<b>d<sub>4,3</sub> (μm)</b>
APSC:Pc	1.68 ± 0.01 <sup>a</sup>	2.181 ± 0.07 <sup>a</sup>
HiSA:Pc	2.64 ± 0.01 <sup>b</sup>	4.104 ± 0.03 <sup>b</sup>

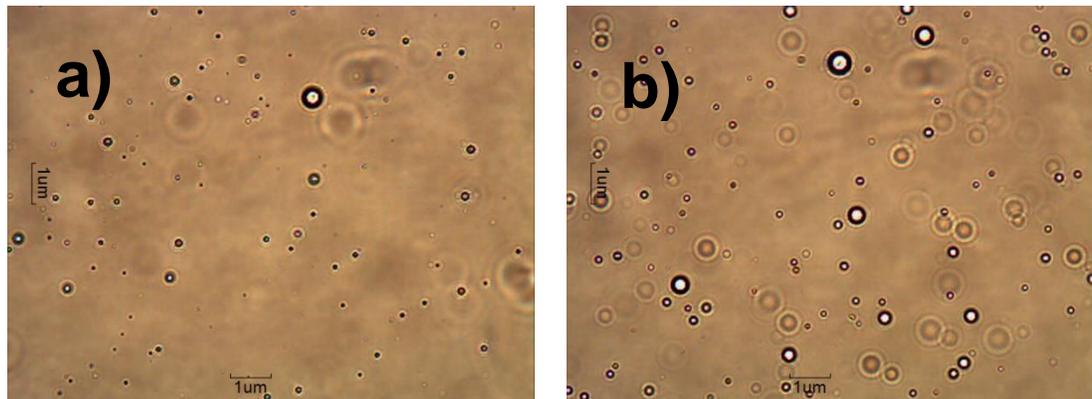
Los datos son medias ± desviación estándar  
Diferentes superíndices en una misma columna indican diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ).

### 3.3.10 Microscopia óptica

Las emulsiones se analizaron en un microscopio óptico. En la Figura 23 se muestran las micrografías ópticas de las emulsiones O/W estabilizadas con APSC:Pc e HiSC:Pc, en las cuales se muestran las gotas formadas con un contorno definido y esférico. En ambos casos las gotas conservaron su individualidad y no se observan gotas demasiado grandes, pero sí de distintos tamaños pequeños, sin embargo, no se mostró una mayor agregación en las gotas.

Al igual se puede apreciar que las gotas de menor tamaño son para la emulsión estabilizada con APSC:Pc (Fig. 23a) esto complementa visualmente la información obtenida con el tamaño de partícula. Mientras que para HiSC:Pc (Fig. 23b) se pueden observar tamaño de gota más grande.

Las emulsiones O/W confirmaron la formación de una emulsión O/W simple que consiste en pequeñas gotas esféricas de aceite dispersas individualmente en la fase acuosa continua. De estas observaciones se puede concluir que el proceso de emulsificación fue suficiente y los biopolímeros que se involucraron, así como el trabajo mecánico durante la homogeneización intervinieron efectivamente en el desarrollo de la emulsión.



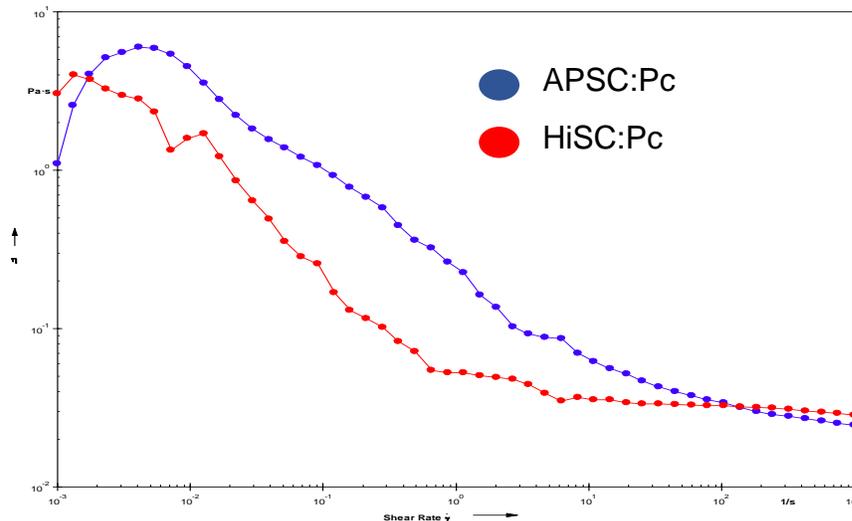
**Figura 23.** Micrográficas ópticas de las emulsiones O/W preparadas con diferentes relación de biopolímeros a) APSC:Pc b) HiSC:Pc a un día después de su almacenamiento

### 3.3.11 Reología

#### 3.3.11.1 Propiedades de flujo

Las curvas de flujo permiten conocer la estabilidad de una emulsión, al igual que un producto forme crema y su vida útil se relaciona con la viscosidad de la emulsión. Tanto APSC:Pc e HiSC:Pc mostraron buenas propiedades emulsificantes, en la Fig. 24 se muestran los valores obtenidos de viscosidad aparente versus la velocidad de corte para las emulsiones O/W en función de la tasa de corte. Previamente se realizaron combinaciones de mezcla de polímeros hasta encontrar la relación adecuada para las condiciones de viscosidad y estabilidad.

Se presentaron curvas de flujo típicas (Fig. 24), donde las dos emulsiones mostraron un comportamiento newtoniano a velocidades de corte bajas, conforme la velocidad de corte aumento se presento un comportamiento de adelgazamiento. Para la emulsión de HiSC:Pc mostro un adelgazamiento por cizallamiento más débil, mientras que para APSC:Pc mostro el adelgazamiento por cizallamiento más fuerte. Según Kim et al. (2006) cuando la viscosidad aparente de materiales pseudoplásticos aumenta, la tasa de corte igual. La viscosidad aparente alta en las dos emulsiones indica presencia de cargas negativas es lo que estabiliza a las emulsiones por la repulsión electrostática, al igual con la formación de complejos se presentan puentes de hidrógeno el cual es otro factor que aumenta la viscosidad (Liu et al., 2018).



**Figura 24.** Comportamiento de la viscosidad aparente de emulsiones O/W en función de la tasa de corte

APSC:Pc: emulsión con mezcla de concentrado de aislado de proteína de semilla de calabaza-pectina cítrica; HiPS:Pc: Hidrolizado de semilla de calabaza-Pectina cítrica.

A partir de los datos experimentales estos fueron ajustados a diversos modelos matemáticos y el que mejor se ajustó fue el de Carreau. En el modelo de Carreau, se obtienen los parámetros reológicos  $n$ ,  $\lambda$  y  $\eta_0$ , al igual que la  $R^2$  (91.07). En el cuadro 3 se presentan los parámetros reológicos del modelo Carreau en el

comportamiento de la viscosidad de las emulsiones. Ambas emulsiones presentaron diferencia estadística significativa ( $p \leq 0.05$ ).

**Cuadro 3.** Parámetros reológicos del modelo Carreau en el comportamiento de la viscosidad de las emulsiones

Tratamiento	n	$\lambda$ (s)
APSC:Pc	$0.329 \pm 0.00^a$	$88.048 \pm 0.00^a$
HiSC:Pc	$0.319 \pm 0.00^a$	$70.80 \pm 0.00^b$

Los datos son medias  $\pm$  desviación estándar

n es el índice de comportamiento de flujo,  $\lambda$  es un tiempo constante relacionada con el tiempo de relajación de las emulsiones.

Diferentes superíndices en una misma columna indican diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ )

Los valores más altos fueron para APSC:Pc eso implica que las relaciones intermoleculares fueron mayores, por lo tanto, interacción entre los complejos de biopolímeros son más fuertes. En  $\lambda$  APSC:Pc en comparación con HiSC:Pc que es el valor más bajo indica un mayor tiempo para que su estructura se recupere.

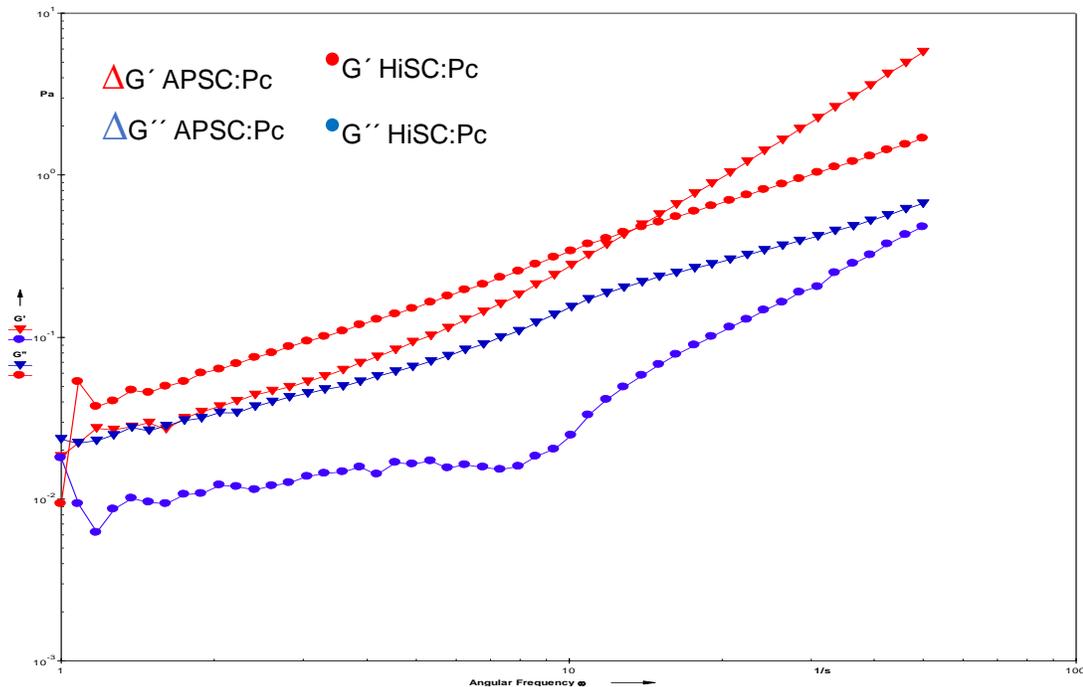
Mientras que para n se relaciona el índice de comportamiento de flujo, si  $n = 1$  se presenta un comportamiento newtoniano,  $n < 1$  se presenta un comportamiento de adelgazamiento al corte y al contrario si  $n > 1$  hay un comportamiento de espesamiento (Ibanoglu, 2009). En ambos casos las emulsiones presentaron valores menores a 1 lo que indica que tienen un comportamiento de adelgazamiento al corte y esto se puede observar en las curvas de flujo (Fig. 20) las cuales no son lineales y presentan un comportamiento no Newtoniano.

### 3.3.11.2 Propiedades viscoelásticas

Las pruebas viscoelásticas u oscilatorias sirven para definir cambios en la estructura cuando se aplican pequeños esfuerzos es decir son pruebas oscilatorias de baja amplitud, es decir, los esfuerzos aplicados son muy pequeños. Los parámetros obtenidos son  $G'$  y  $G''$  donde  $G'$  es el módulo de almacenamiento, los valores de  $G'$  en las emulsiones representan una medida

de la naturaleza elástica.  $G''$  es el módulo de pérdida y representa la naturaleza viscosa (Lobato-Calleros et al., 2006)

En la Figura 25, se presentan las variaciones de  $G'$  y el módulo de pérdida de las emulsiones del APSC:Pc e HiSC:Pc. En el eje de las "x" se encuentra la frecuencia (Hz) de las emulsiones evaluadas y en el eje de las "y" son los módulos de  $G'$  y  $G''$ . En ambas emulsiones se presentó una dependencia en la frecuencia, con un incremento conforme la frecuencia aumentaba, pero si se observaron diferencias en el comportamiento de  $G'$  y  $G''$  en el rango de frecuencia estudiado. Para las muestras APSC:Pc e HiSC:Pc presentaron un comportamiento de sistema viscoelástico sólido, dado que  $G' > G''$  en todo el rango de frecuencia estudiado, López-Monterrubio et al. (2021) mencionan que los valores de  $G'$  más altos que los valores de  $G''$  en deformaciones relativamente bajas (<10%), establecen un comportamiento viscoelástico predominantemente sólido o elástico.



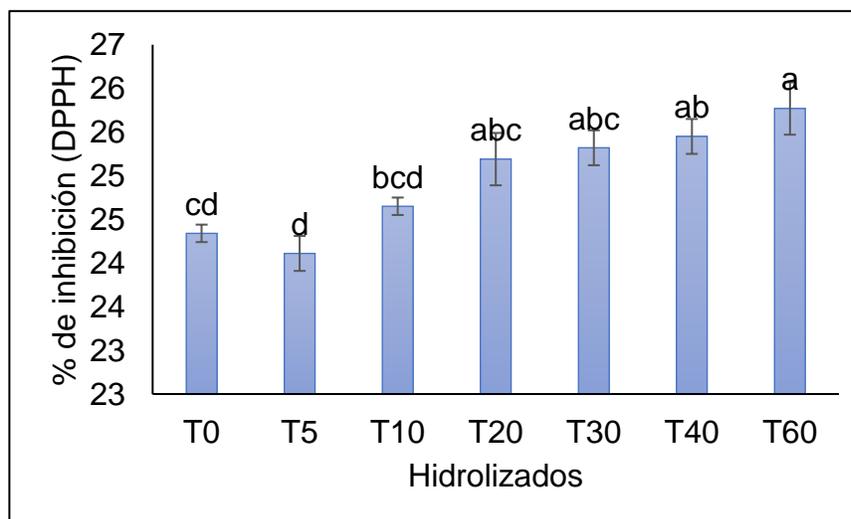
**Figura 25.** Variación de los módulos de almacenamiento ( $G'$ ) y de pérdida ( $G''$ ) en emulsiones APSC:Pc E Hisc:pC

### 3.3.12 Actividad antioxidante

#### Actividad antioxidante por % de inhibición de DPPH y ABTS

Se determino la actividad antioxidante por los radicales DPPH y ABTS en los hidrolizados de semilla de calabaza del tiempo 0 al min 60. Los minutos 20, 30, 40 y 60 no mostraron diferencia estadística significativa (Fig. 26).

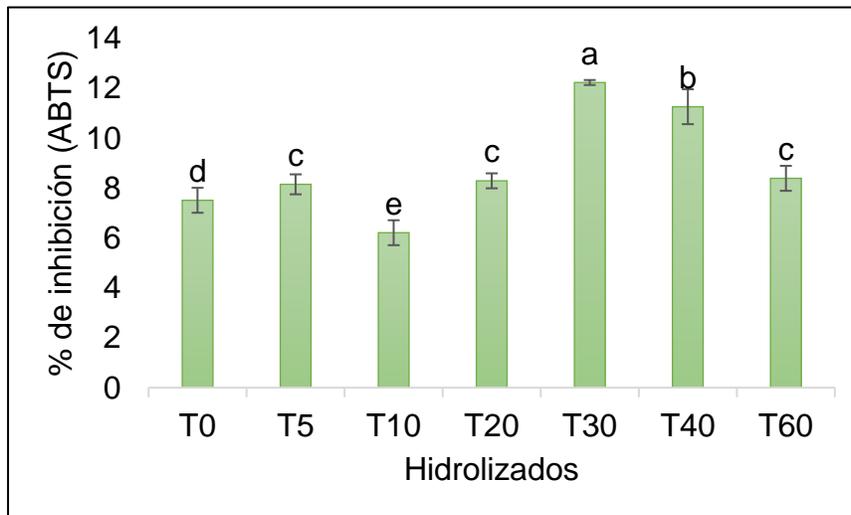
Al igual se puede observar un incremento en el porcentaje de actividad antioxidante con forme el tiempo de grado de hidrólisis transcurría, esto se puede deber a que los péptidos bioactivos surgen a mayor tiempo hidrólisis enzimática, en este caso como solo fue una hidrólisis de 60 minutos, el porcentaje de actividad antioxidante oscilo entre  $24.11 \pm 0.2 \%$  y  $25.77 \pm 0.3 \%$ , siendo este último el valor más alto, seguido del min 40 con un  $25.45 \pm 0.2 \%$ . Para el radical ABTS (Fig. 27) los mismos tiempos si muestran diferencia estadística significativa, siendo el min 30 los que mostraron los valores más altos de actividad antioxidante.



**Figura 26.** Actividad antioxidante por % de inhibición del radical DPPH para hidrolizados de tiempo cero al minuto 60

Chen et al. (2024) mencionan que para hidrolizados de granos de destilería de cebada presentaron un 47.17 % de DPPH y para ABTS un 30.23 %. Con un proceso optimizado del hidrolizado de proteínas a partir de residuos de harina de

semillas de uva desgrasados mostró que la solución de enzimólisis preparada con proteasa alcalina tuvo los mejores resultados (Cejudo-Bastante et al., 2022), con esto se puede inferir que los hidrolizados presentan actividad antioxidante y conforme la hidrólisis avance estos aumentaran su actividad biológica.



**Figura 27.** Actividad antioxidante por % de inhibición del radical ABTS para hidrolizados de tiempo cero al minuto 60

Diferentes letras indican diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ )

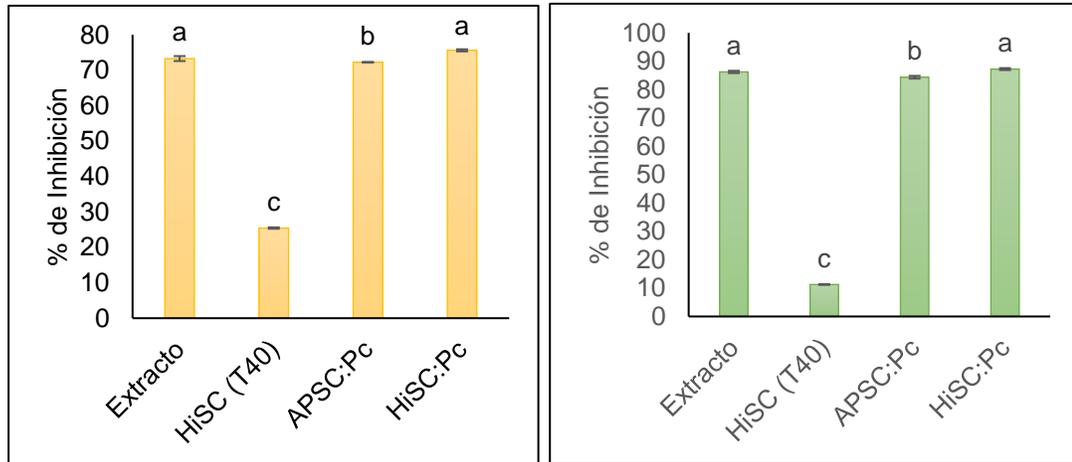
Para la actividad antioxidante con los radicales DPPH y ABTS los extractos de toronjil morado, hidrolizados al minuto 40 y las emulsiones preparadas con APSC:Pc e HiSC:Pc se presentan en la Figura 28. Tanto para los radicales DPPH y ABTS los extractos y los HiSC:Pc no presentan diferencia estadística significativa ( $p \leq 0.05$ ) mientras que el tratamiento APSC:Pc mostro una ligera disminución en el porcentaje de inhibición de los radicales.

Los extractos de toronjil morado presentaron valores para DPPH y ABTS de  $73.31 \pm 0.57 \%$  y  $85.44 \pm 0.16 \%$ , respectivamente, Lin et al. (2012) reportaron valores inferiores con una inhibición de  $78.45 \%$  del radical DPPH y  $86.23 \%$  para ABTS. Estas diferencias se pueden atribuir al efecto del secado por convección sobre los compuestos antioxidantes.

En las emulsiones de HiSC:Pc donde se encapsuló el extracto de toronjil se tuvo un  $75.23 \%$  esto puede deberse a que los hidrolizados también presentaron

actividad antioxidante y al realizar las emulsiones este aumento. En cambio para las emulsiones con APSC:Pc hubo una ligera disminución del porcentaje de inhibición a 72.27 %.

En el caso del radical ABTS se obtuvieron valores más altos de porcentaje de inhibición, para los extractos un 86.23 % y para el HiSC:Pc un 87.23, al igual para las emulsiones estabilizadas con APSC:Pc se tuvo una perdida 84.36 %.



**Figura 28.** a) Actividad antioxidante por % de inhibición del radical DPPH para extractos, HiSC, APSC:Pc HiSC:Pc b) Actividad antioxidante por % de inhibición del radical ABTS para extractos, HiSC, APSC:Pc HiSC:Pc

Diferentes letras indican diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ).

Para emulsiones donde encapsularon  $\beta$ -caroteno Lopez-Monterrubio et al., (2021) mencionan un 80.39 y 84.33 % de DPPH estos valores son similares a los obtenidos en esta investigación.

### 3.4 CONCLUSIONES

El aislado de proteína de semilla de calabaza (APSC) obtenido presentó un punto isoeléctrico de 4.2, mientras los valores de actividad emulsionante y estabilidad de la emulsión fueron de 0.873 y 23.65 %, respectivamente. La digestibilidad *in vitro* del aislado de semilla de calabaza fue de 82.1 % lo que la hace viable para el consumo humano. Con respecto al proceso de hidrólisis enzimática con la enzima Alcalasa<sup>®</sup>, se determinó que al minuto 40 fue el indicado y así los péptidos obtenidos se encuentran en un rango de peso molecular de 10-30 kDa, los péptidos fueron empleados en la siguiente fase experimental, que consistió en el diseño y preparación de emulsiones.

Las emulsiones se prepararon con complejos de aislado de proteína de semilla de calabaza junto a pectina cítrica en una relación 3:1 a pH 4.9 e hidrolizado de semilla de calabaza y pectina cítrica relación 1:3 a pH 3.9. Las emulsiones elaboradas a partir de aislado de proteína de semilla de calabaza presentaron el mejor tamaño de partícula al igual que las propiedades de flujo lo que demuestra que son un buen emulsificante al combinarse con la pectina cítrica. Por otro lado, las emulsiones de hidrolizados de semilla de calabaza presentaron los mejores porcentajes de actividad antioxidante al proteger a los extractos de toronjil morado adicionado con los antioxidantes presentes en los hidrolizados.

### 3.5 LITERATURA CITADA

- Adjonu, R., Doran, G., Torley, P., & Agboola, S. (2014). Formation of whey protein isolate hydrolysate stabilised nanoemulsion. *Food Hydrocolloids*, 41, 169-177. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.04.007>
- Adler-Nissen, J. (1979). Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27(6), 1256-1262. <https://doi.org/10.1021/jf60226a042>
- And, E. N. M., & Añón, M. C. (1996). Composition and structural characterization of amaranth protein isolates. An electrophoretic and calorimetric study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(9), 2523-2530. <https://doi.org/10.1021/jf960169p>
- Bučko, S., Katona, J., Popović, L., Vaštag, Ž., Petrović, L., & Vučinić-Vasić, M. (2015). Investigation on solubility, interfacial and emulsifying properties of pumpkin (*Cucurbita pepo*) seed protein isolate. *LWT*, 64(2), 609-615. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.06.054>
- Cejudo-Bastante, M. J., Oliva-Sobrado, M., González-Miret, M. L., & Heredia, F. J. (2022). Optimisation of the methodology for obtaining enzymatic protein hydrolysates from an industrial grape seed meal residue. *Food Chemistry*, 370, 131078. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131078>
- Chen, L., Chen, S., Rong, Y., Zeng, W., Hu, Z., Ma, X., & Feng, S. (2024). Identification and evaluation of antioxidant peptides from Highland Barley Distiller's grains protein hydrolysate assisted by molecular docking. *Food Chemistry*, 434, 137441. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137441>
- Cuevas-Bernardino, J. C., Leyva-Gutierrez, F. M., Vernon-Carter, E., Lobato-Calleros, C., Román-Guerrero, A., & Davidov-Pardo, G. (2018). Formation of biopolymer complexes composed of pea protein and mesquite gum – impact of quercetin addition on their physical and chemical stability. *Food Hydrocolloids*, 77, 736-745. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.11.015>
- Cuevas-Bernardino, J. C., Lobato-Calleros, C., Román-Guerrero, A., Alvarez-Ramírez, J., & Vernon-Carter, E. (2016). Physicochemical characterisation of hawthorn pectins and their performing in stabilising oil-in-water emulsions. *Reactive and Functional Polymers*, 103, 63-71. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2016.03.024>
- Cumby, N., Zhong, Y., Naczki, M., & Shahidi, F. (2008). Antioxidant activity and water-holding capacity of canola protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 109(1), 144-148. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.12.039>
- Dimitry, M. Y., Thérèse, B. A. M., Edith, D. M. J., Emmanuel, P. A., Armand, A. B., & Nicolas, N. Y. (2022). Hypolipidemic and antioxidant effects of vegetal milk produced with *mucuna pruriens* L. seed in rats fed a high-

fat diet. *Heliyon*, 8(11), e11835.  
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e11835>

- El-Adawy, T. A., & Taha, K. M. (2001). Characteristics and composition of different seed oils and flours. *Food Chemistry*, 74(1), 47-54.  
[https://doi.org/10.1016/s0308-8146\(00\)00337-x](https://doi.org/10.1016/s0308-8146(00)00337-x)
- Fang, E. F., Wong, J. H., Lin, P., & Ng, T. B. (2010). Biochemical characterization of the RNA-hydrolytic activity of a pumpkin 2S albumin. *FEBS Letters*, 584(18), 4089-4096.  
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.08.041>
- Horax, R., Hettiarachchy, N., Kannan, A., & Chen, P. (2011a). Protein extraction optimisation, characterisation, and functionalities of protein isolate from bitter melon (*Momordica charantia*) seed. *Food Chemistry*, 124(2), 545-550. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.06.068>
- Horax, R., Hettiarachchy, N., Kannan, A., & Chen, P. (2011b). Protein extraction optimisation, characterisation, and functionalities of protein isolate from bitter melon (*Momordica charantia*) seed. *Food Chemistry*, 124(2), 545-550. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.06.068>
- Hamada, JS (2000). Caracterización y propiedades funcionales del salvado de arroz. Proteínas modificadas por exoproteasas y endoproteasas comerciales. *Revista de ciencia de los alimentos*, 65,305–310.
- Jones, O. G., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2009). Formation of biopolymer particles by thermal treatment of B-lactoglobulin–pectin complexes. *Food Hydrocolloids*, 23(5), 1312-1321.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.11.013>
- Kim, S. Y., Park, P. S. W., & Rhee, K. C. (1990). Functional properties of proteolytic enzyme modified soy protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(3), 651-656.  
<https://doi.org/10.1021/jf00093a014>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.  
<https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Lemjallad, L., Chabir, R., Rodi, Y. K., Ghadraoui, L. E., Chahdi, F. O., & Errachidi, F. (2019). Improvement of heliculture by three medicinal plants belonging to the Lamiaceae family. *The Scientific World Journal*, 2019, 1-7. <https://doi.org/10.1155/2019/2630537>
- Li, J., Hartinger, C. G., & Zhu, F. (2023). Physicochemical properties of infant formula model emulsions stabilised by different whey protein hydrolysates and characteristics of interfacial peptides. *Food Hydrocolloids*, 145, 109035.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.109035>
- Lin, J., Chen, Y., Lee, Y., Hou, C. R., Chen, F., & Yang, D. (2012a). Antioxidant, anti-proliferative and cyclooxygenase-2 inhibitory activities of ethanolic extracts from lemon balm (*Melissa officinalis* L.) leaves. *LWT*, 49(1), 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.04.009>
- Lin, J., Chen, Y., Lee, Y., Hou, C. R., Chen, F., & Yang, D. (2012b). Antioxidant, anti-proliferative and cyclooxygenase-2 inhibitory activities

- of ethanolic extracts from lemon balm (*Melissa officinalis* L.) leaves. *LWT*, 49(1), 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.04.009>
- López-Monterrubio, D., Lobato-Calleros, C., Vernon-Carter, E., & Alvarez-Ramírez, J. (2021). Influence of B-carotene concentration on the physicochemical properties, degradation and antioxidant activity of nanoemulsions stabilized by whey protein hydrolyzate-pectin soluble complexes. *LWT*, 143, 111148. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111148>
- Lobato-Calleros, C., Rodríguez, E., Sandoval-Castilla, O., Vernon-Carter, E., & Álvarez-Ramírez, J. (2006). Reduced-fat white fresh cheese-like products obtained from W1/O/W2 multiple emulsions: viscoelastic and high-resolution image analyses. *Food Research International*, 39(6), 678-685. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2006.01.006>
- Martínez-Velasco, A., Lobato-Calleros, C., Hernández-Rodríguez, B. E., Román-Guerrero, A., Alvarez-Ramírez, J., & Vernon-Carter, E. (2018). High intensity ultrasound treatment of Faba bean (*Vicia faba* L.) protein: effect on surface properties, foaming ability and structural changes. *Ultrasonics Sonochemistry*, 44, 97-105. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.02.007>
- Nielsen, N. C. (1985). The structure and complexity of the 11S polypeptides in soybeans. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 62(12), 1680-1686. <https://doi.org/10.1007/bf02541665>
- Peterson, G. L. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry*, 83(2), 346-356. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(77\)90043-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(77)90043-4)
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A. R., Pannala, A. S., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231-1237. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(98)00315-3)
- Repo-Carrasco-Valencia, R., & Serna, L. A. (2011). Quinoa (*Chenopodium quinoa*, willd.) as a source of dietary fiber and other functional components. *Food Science and Technology*, 31(1), 225-230. <https://doi.org/10.1590/s0101-20612011000100035>
- Rezig, L., Chibani, F., Chouaibi, M., Dalgarrondo, M., Hessini, K., Guéguen, J., & Hamdi, S. (2013). Pumpkin (*Cucurbita maxima*) seed proteins: sequential extraction processing and fraction characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(32), 7715-7721. <https://doi.org/10.1021/jf402323u>
- Sá, A. G. A., Moreno, Y. M. F., & Carciofi, B. A. M. (2019). Food processing for the improvement of plant proteins digestibility. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(20), 3367-3386. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1688249>
- Vaštag, Ž., Popović, L., Popović, S., Krimer, V., & Peričin, D. (2011). Production of enzymatic hydrolysates with antioxidant and angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity from pumpkin oil cake protein

- isolate. *Food Chemistry*, 124(4), 1316-1321.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.062>
- Venuste, M., Zhang, X., Shoemaker, C. F., Karangwa, E., Abbas, S., & Kamdem, P. E. (2013). Influence of enzymatic hydrolysis and enzyme type on the nutritional and antioxidant properties of pumpkin meal hydrolysates. *Food & Function*, 4(5), 811.  
<https://doi.org/10.1039/c3fo30347k>
- Vinayashree, S., & Vasu, P. (2021). Biochemical, nutritional and functional properties of protein isolate and fractions from pumpkin (*Cucurbita moschata* Var. Kashi harit) seeds. *Food Chemistry*, 340, 128177.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128177>
- Wu, Z., & Wang, S. Y. (2001). Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5165-5170. <https://doi.org/10.1021/jf010697n>
- Yu, M., Zeng, M., Qin, F., He, Z., & Chen, J. (2017). Physicochemical and functional properties of protein extracts from *Torreyia grandis* seeds. *Food Chemistry*, 227, 453-460.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.114>
- Zhao, H., Shen, C., Wu, Z., Zhang, Z., & Xu, C. (2020). Comparison of wheat, soybean, rice, and pea protein properties for effective applications in food products. *Journal of Food Biochemistry*, 44(4).  
<https://doi.org/10.1111/jfbc.13157>