



UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN DE ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGÍA

TITULADO:

"Extracción del pigmento azul de la medusa comestible "bola de cañón" (*Stolobolopus
meleagris*) y la determinación de su actividad antioxidante".

Presenta:


I.A. Maribel Nopalitla Delgadillo

Asesoras:

Dra. Raquel García Barrientos

Dra. Isabel Guerrero Legarreta

Introducción.....	8
1. Revisión	
Bibliográfica.....	9
1.1.1. Anatomía.....	9
1.1.2. Localización geográfica	10
1.1.3. Captura de medusas.....	10
1.1.4. Principales especies de medusa para el consumo humano	10
1.1.5. Procesamiento de medusas con fines industriales	11
1.2. PIGMENTOS	12
1.2.1. Pigmentos sintéticos y naturales	12
1.2.3. Pigmentos en cnidarios	13
1.3. ANTIOXIDANTES.....	16
1.3.3. Determinación <i>in vitro</i> de la actividad antioxidante	18
1.3.4. Actividad quelante	19
1.4. CARACTERIZACIÓN DE LA MEDUSA BOLA DE CAÑÓN	20
1.4.1. Determinación de color	20
c) Sólidos de color (Sistema Munsell)	23
d) Sistema Hunter	24
1.4.5. Contenido proteico	30
a) Método de biuret.....	30
1.5. Análisis microbiológicos	31
2. OBJETIVOS	32
2.1. OBJETIVO GENERAL.....	32

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
3. JUSTIFICACION.....	33
4. HIPÓTESIS	33
5.1. Materia Prima.....	34
5.2. Análisis bromatológicos.....	35
5.2.3. Contenido proteico	36
5.3. Análisis fisicoquímicos.....	36
5.3.1. Actividad de agua (a_w).....	36
5.3.2. pH.....	37
5.4. Análisis microbiológicos	38
5.5. Extracción y caracterización del pigmento de mesoglea	39
	39
5.5.2.1. Extracción a partir de mesoglea fresca.....	40
5.5.2.2. Extracción a partir de mesoglea liofilizada	41
5.5.3. Obtención del pigmento.....	41
5.5.4. Liofilización del pigmento	45
5.5.5.1. Determinación de la actividad antioxidante de mesoglea	45
5.5.5.2. Determinación de la actividad quelante	46
5.5.5.3. Estabilidad del pigmento a la temperatura	46
5.5.5.4. Estabilidad del pigmento al pH.....	46
5.5.5.5. Electroforesis del pigmento (SDS-PAGE)	46
6. RESULTADOS Y DISCUSION.....	48

6.1.	Análisis bromatológicos	48
6.2.	Actividad de agua (a_w) y pH	48
6.3.	Color del pigmento extraído con agua de mar (pigmento fresco)	49
6.4.	Análisis Microbiológicos	51
6.5.	Extracción del pigmento con disolventes orgánicos	52
6.6.	Actividad antioxidante en mesoglea liofilizada	54
6.7.	Actividad antioxidante en pigmento dializado aislado con Agua de mar y..... búfer Na/K.....	56
6.8.	Actividad antioxidante y quelante de pigmento fresco aislado con agua de mar.....	56
6.9.	Estabilidad del pigmento aislado con agua de mar a la temperaturas.	57
6.10.	Estabilidad del pigmento aislado con agua de mar al pH	58
6.11.	Análisis electroforético del pigmento (SDS-PAGE)	59
7.	CONCLUSIÓN	61
8.	BIBLIOGRAFIA.....	62
7.	PRODUCTIVIDAD.....	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Anatomía general de una medusa.....	9
Figura 2. (a y b) Pesca de Medusa de mar Bola de Cañón.....	10
Figura 3. Especies comestibles de medusas (a) <i>Aurelia aurita</i> , (b) <i>Rhopilema esculentum</i> y (c) <i>Rhopilema hispidum</i>	11
Figura 4. Mesoglea de medusa de mar deshidratada.....	12
Figura 5. Medusa comestible Bola de Cañón (<i>Stolomophus meleagris</i>).....	14
Figura 6. Especies de medusas azules (a) <i>Sp Porpita porpita</i> , (b) <i>Sp Vellela vellela</i> y (c) <i>Sp Cassiopea Xamachana</i>	15
Figura 7. (a y b) Mezcla aditiva de luces coloreadas.....	23
Figura 8. Conversión del triángulo equilátero a rectángulo.....	23
Figura 9. (a y b) Conversión del triángulo rectángulo y posteriormente al triángulo rectángulo de coordenadas cromáticas x,y,z.....	24
Figura 10. Diagrama de cromaticidad CIE x,y, y la división de las cromaticidades reales en espectrales y no espectrales.....	25
Figura 11. Organización del tinte en el sólido de Munsell.....	27
Figura 12. Espacio de color CIE LAB (Hunter).....	29
Figura 13 Diagrama CIE L*a* b*.....	29
Figura 14. Bahía de Lobos, Sonora, México.....	37
Figura 15. Medusa bola de cañón (a) mesoglea y (b) tentáculos y mesoglea.....	37
Figura 16. Diagrama de análisis en mesoglea de medusa Bola de Cañón (<i>Stolomophus meleagris</i>).....	38

Figura 17. Higrómetro (DECAGOXI GH 303170).....	39
Figura 18. Procesos de mesoglea (Pruebas con disolventes).....	41
Figura 19. Disolventes usados para la extracción de pigmentos.....	41
Figura 20. Polaridad de disolventes orgánicos más usados.....	42
Figura 21 Medusa liofilizada en disolventes.....	43
Figura 22. Pigmento aislado con agua de mar.....	44
Figura 23. Mesoglea de medusa liofilizada.....	44
Figura 24. Diagrama de obtención de pigmento de medusa Bola de cañón (<i>Stolomophus meleagris</i>) con agua de mar.....	47
Figura 25. Diagrama de obtención del pigmento de medusa Bola de cañón (<i>Stolomophus meleagris</i>) con Buffer de fosfatos Na/K 0.05 M.....	50
Figura 26. Proceso de extracción de pigmento azul de Medusa comestible Bola de Cañón (<i>Stolomophus meleagris</i>).....	51
Figura 27. Pigmento al 80 y 50 % de saturación liofilizado (a) y (b) pigmento aislado al 80% liofilizado.....	52
Figura 28. Pigmento puro liofilizado.....	53
Figura 29. Color obtenido según coordenadas CIE L*a*b*.....	57
Figura 30. Barrido espectral en pigmento separado con agua de mar.....	58
Figura 31. (a) Crecimiento de población de Pseudomonas en Agar Flo y (b) Agar BVB (sin crecimiento).....	59
Figura 32. Pigmento de medusa con diferentes disolventes.....	60
Figura 33. Mesoglea liofilizada en agua, metanol 0.1% HCl y buffer de fosfatos.....	61
Figura 34. Pigmento fresco separado de mesoglea de medusa con agua de mar.....	62

Figura 35. Estabilidad del pigmento azul de medusa a diferentes Temperaturas.....	65
Figura 36. Estabilidad del pigmento azul de medusa a diferentes pH`s.....	65
Figura 37. Electroforesis SDS-PAGE de pigmento de medusa comestible “Bola de cañón” (<i>Stolomophus meleagris</i>).....	67
Figura 38. Densitograma de proteína de pigmento de medusa comestible Bola de cañón (<i>Stolomophus meleagris</i>).....	68

INTRODUCCIÓN

La medusa comestible “bola de cañón” (*Stolomophus meleagris*) se encuentra desde el Sur de California, Estados Unidos, hasta el ecuador (Gómez-Aguirre, 1999). El primer país que utilizó a este organismo para consumo humano fue China, extendiéndose el hábito alimentario por toda Asia, siendo Japón el mayor consumidor (Peggy, 1994). Los asiáticos reconocen el valor medicinal de las medusas; se cree en su poder como tranquilizante y se sabe que tiene actividad farmacológica, por lo que ha sido usada en China como tratamientos en la bronquitis, hipertensión, asma y úlceras gástricas (Yu, 2006).

Las reacciones de oxidación y sus efectos en la fisiología animal ha sido un tema de interés en el ámbito científico. La presencia de compuestos con capacidad oxidativa en el organismo humano, generados por diversas fuentes como el medio ambiente (principalmente las radiaciones), los contaminantes y los productos del metabolismo mismo, han sido el tema de numerosos estudios (Castañeda, 2008). Como consecuencia del estrés oxidativo, ocurre un daño a nivel tisular producido por especies reactivas de oxígeno (EROS) liberadas (Hidalgo y col, 2006). Los procesos oxidativos, mediados por la presencia de radicales libres, están asociados con enfermedades degenerativas en humanos, como cáncer y enfermedades coronarias.

Se ha propuesto la incorporación a los sistemas biológicos, tanto en los alimentos como en forma de fármacos, de diversos tipos de compuestos con actividad antioxidante. Entre estos están compuestos cromógenos (ABTS, DPPH, DMPD, DMPO y FRAP) con la capacidad de captar radicales libres generados, operando así en contra de los efectos perjudiciales de los procesos de oxidación que implican a especies reactivas de oxígeno (EROS) (Arnous y col., 2002; Kim y col., 2002; Shellapan y col., 2002). Al cuantificar *in vitro* la capacidad antioxidante total de un compuesto, uno de los métodos más empleados es la determinación de esta

actividad en presencia de sustancias cromógenas conteniendo radicales. La pérdida de color ocurre de forma proporcional con la concentración de los radicales (Arena y col., 2001; Moyer y col., 2002). En la medusa bola de cañón se encuentra el pigmento azul característico de esta especie, con posible acción antioxidante.

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1. LA MEDUSA

Las medusas son organismos que desempeñan un papel importante en la ecología del mar por sus hábitos depredadores y que pueden competir con otros organismos, como peces y crustáceos, por el alimento (Gómez-Aguirre, 1999). Además, tienen un alto valor nutricional y actividad farmacológica (Yu y col., 2006).

1.1.1. Anatomía

El cuerpo de la medusa consiste en una sombrilla hemisférica transparente; la boca se encuentra en la parte baja de esta sombrilla protegida por brazos orales llamados tentáculos (Makomoto-Omori y col., 2001; Hsieh y col., 2001) (Figura 1). Tienen tamaños variados, carecen de cabeza y esqueleto, y no poseen ningún órgano especializado en la reproducción y excreción, ya que realizan esta última por difusión a través de cualquier zona de su superficie corporal.

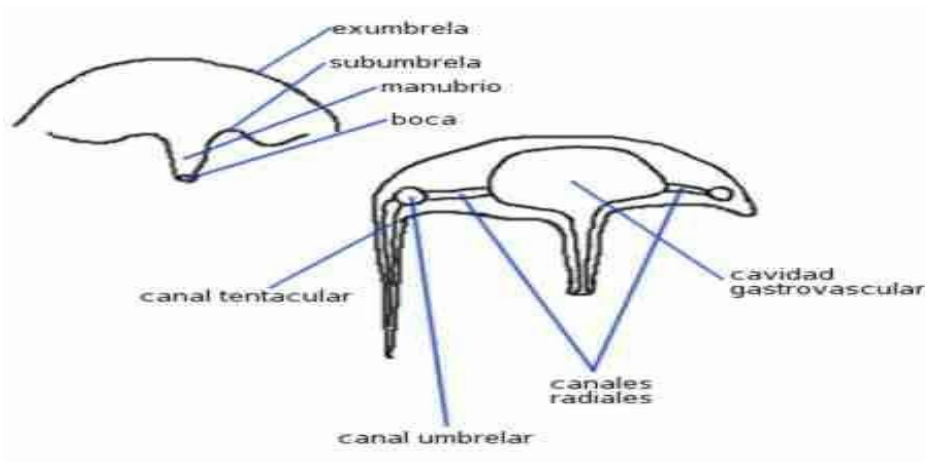


Figura 1. Anatomía general de una medusa.

1.1.2. Localización geográfica

La medusa comestible “bola de cañón” (*Stolomophus meleagris*) se encuentra desde el sur de estado de California, Estados Unidos, hasta el Ecuador. En el Pacífico oriental de México, esta especie se ha localizado en bahías y lagunas costeras, desde Sonora hasta Oaxaca (Chávez, 1979).

1.1.3. Captura de medusas

La captura mundial de la medusa se ha incrementado en los últimos años; las pesquerías comerciales reportan cerca de 500,000 TM/año. Sin embargo, no existe una pesca específica de medusa; su captura se relaciona con la de especies de mayor valor agregado y comercial, tales como pescados y mariscos, en las que se usan una gran variedad de técnicas incluyendo arrastres, cercos y redes cuchara.



Figura 2. Pesca de medusa “bola de cañón” (a); producto capturado (b).

1.1.4. Principales especies de medusa para el consumo humano

En el ámbito mundial, solamente diez especies han sido estudiadas y comercializadas para consumo humano. Estas son: *Cephea cephea*, *Aurelia aurita*, *Catostylus mosaicus*, *Dactylometra pacifica*, *Lobonema smithi*, *Shopilema asamushi*,

Rhopilema esculentum, *Rhopilema hispidum*, *Stomolophus nomurai* y *Stomolophus meleagris* (Hsieh y col., 1994).

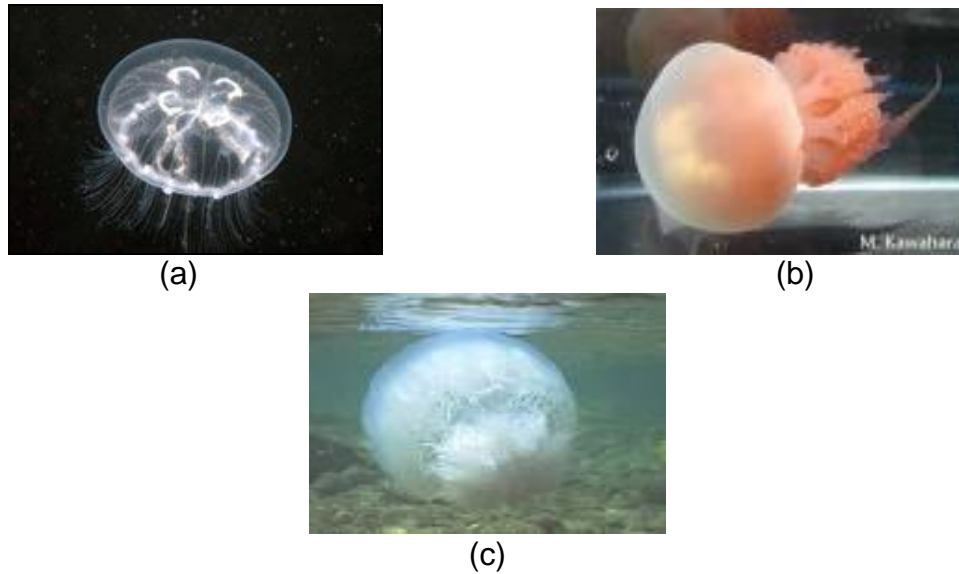


Figura 3. Tres especies comestibles de medusas:
(a) *Aurelia aurita*, (b) *Rhopilema esculentum* y (c) *Rhopilema hispidum*

1.1.5. Procesamiento de medusas con fines industriales

China fue el primer país que utilizó a la medusa para consumo humano (Morikawa, 1984); sin embargo, y a pesar de que este país ha sido consumidor de medusa por más de mil años, recientemente es cuando se ha industrializado este recurso. El procesamiento de la medusa en Asia requiere de un bajo costo de operación, pero de labor intensiva. En otros países en los que se procesan medusas se emplean técnicas chinas tradicionales con ligeras modificaciones.

El proceso se inicia en la medusa fresca con la remoción de los brazos orales de la mesoglea. Las medusas son entonces lavadas con agua de mar para eliminar las membranas mucoidales y la material gonadal. Tanto la mesoglea como los brazos

orales son usados en el procesamiento. Posteriormente es salada con una mezcla sal-alumina para reducir el contenido de agua (Hsieh y col., 2001). El proceso, en su totalidad, puede durar de 20 a 40 días hasta obtener un producto final con 60 a 70% de humedad y 16 a 25% de sal (Huang, 1988) (Figura 4).



Figura 4. Mesoglea de medusa deshidratada.

1.2. PIGMENTOS

Los colores de los alimentos se deben a diferentes compuestos, principalmente orgánicos que actúan como sustancias pigmentantes. En la mayoría de los casos estos pigmentos tienen también una función biológica; este es el caso del papel de la clorofila en la fotosíntesis. En algunos casos, los compuestos pigmentantes se extraen de su fuente natural y se añaden a otro material, empleándose como colorantes en gran número de alimentos (Guerrero y col., 2006).

1.2.1. Pigmentos sintéticos y naturales

La industria de los pigmentos es una de las de mayor volumen de ventas a nivel mundial; se producen 700 TM/año. Los pigmentos pueden dividirse en sintéticos y naturales; los sintéticos requieren de certificación ya que se les han atribuido posibles efectos dañinos en la salud humana. A pesar de estas certificaciones, aún

está en duda su inocuidad, por lo cual se ha reducido cada vez más su uso en alimentos. Las ventajas de los pigmentos sintéticos son: firmeza de color; amplio intervalo de tinte, bajo costo y homogeneidad entre lotes. Los pigmentos naturales son aquellos obtenidos de fuentes presentes en la naturaleza, se usan para impartir color a algunos productos; son generados por microorganismos, vegetales, animales o minerales.

1.2.2. Pigmentos en alimentos

Los diversos pigmentos encontrados en la naturaleza difieren en su estructura química y en su origen; los más ampliamente distribuidos en los alimentos pueden agruparse en ocho categorías:

1. Carotenoides
2. Clorofilas.
3. Pigmentos fenólicos: flavonoides, antocianinas y taninos.
4. Betalaínas.
5. Hemopigmentos
6. Otros pigmentos naturales.

En relación a las características antioxidantes de los pigmentos, que es el tema del presente trabajo de Especialización, los que han tenido particular interés por la reducción de enfermedades degenerativas son: flavonoides, antocianinas y carotenoides (Guerrero y col., 2006).

1.2.3. Pigmentos en cnidarios

Se ha determinado que los pigmentos de una gran variedad de cnidarios tienen estructura de carotenoproteínas, las cuales producen un espectro de absorción dependiendo de la naturaleza, tanto de de fracción carotenoide como de la proteica

(Blanquet y Phelan, 1987). La medusa comestible “bola de cañón” (*Stolomophus meleagris*) es muy llamativa a simple vista debido a su coloración azul (Figura 5).



Figura 5. Medusa comestible “bola de cañón” (*Stolomophus meleagris*)

Considerando la diversidad espectral de los pigmento generalmente presentes en animales, la pigmentación azul es muy poco común. Sin embargo, los carotenopigmentos púrpura o azul son comunes en algunos cnidarios como es el caso de las medusas *Porpita porpita*, *Vellela vellela* y *Cassiopea Xamachana*, entre otros.

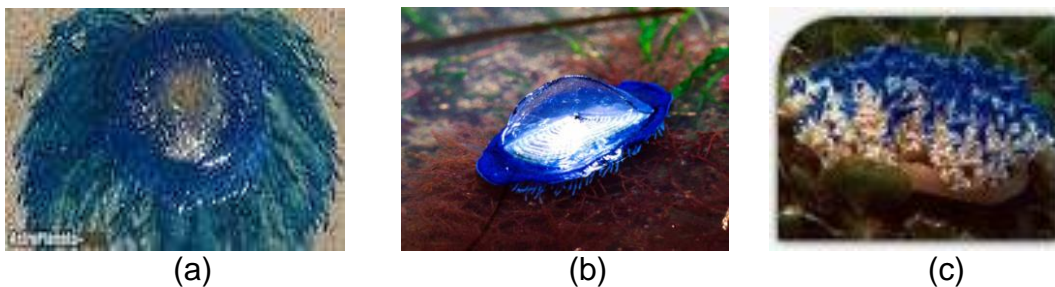


Figura 6. Especies de medusas azules (a) *Porpita porpita*, (b) *Vellela vellela* y (c) *Cassiopea xamachana*

De hecho, la estructura de los pigmentos azules es más compleja que la de los amarillos-rojos. En muchos organismos la coloración azul se logra mediante la combinación de un cromóforo con una apoproteína específica que cambia la estructura espacial del cromóforo, produciendo el desplazamiento al rojo tras la unión con ligandos específicos. Por ejemplo la carotenoproteína crustacianina es un

pigmento azul estudiado a partir de la cáscara de langosta de color naranja; el pigmento presente es el carotenoide astaxantina, de color rojo-naranja, pero se produce un fuerte cambio batocrómico debido a la unión covalente la crustacianina (Bulina y col., 2004).

1.2.4. Obtención de pigmentos carotenoides: uso de disolventes orgánicos

Una de las técnicas más ampliamente empleadas para la extracción de pigmentos carotenoides de fuentes naturales es la extracción por disolventes orgánicos. En esta técnica se hace uso del hecho que las sustancias no polares o débilmente polares se disuelven en disolventes no polares o ligeramente polares; los compuestos altamente polares lo hacen en disolventes de alta polaridad (una sustancia disuelve a otra similar). Un ejemplo es el metanol que es un compuesto orgánico muy polar, este es totalmente soluble en agua. Esta correspondencia de polaridad se debe a que dos átomos unidos por un enlace covalente comparten electrones y sus núcleos son mantenidos en la misma nube electrónica. En consecuencia, un extremo del enlace es relativamente negativo y otro positivo, formándose un polo negativo y otro positivo. Se dice que este es un enlace polar o que tiene polaridad. La polaridad afecta los puntos de fusión, ebullición y a la solubilidad. En el caso del metanol, los puentes de hidrógeno entre las moléculas de agua y las de metanol pueden remplazar fácilmente a los puentes de hidrógeno formados entre las moléculas del metanol y las moléculas de agua (Morrison, 1990).

Tabla 1. Polaridad de algunos disolventes

Disolvente	Índice de polaridad
Hexano	0.0
Éter	2.8
Cloroformo	4.1
Acetona	5.2
Etanol	5.4
Agua	9.0

1.3. ANTIOXIDANTES

Para hacer frente a la presencia de los radicales libres, o EROS, los organismos vivos están equipados con un sistema efectivo de defensa que incluye varias enzimas y antioxidantes de alto y bajo peso molecular. Los antioxidantes neutralizan el efecto de los radicales libres por donación de electrones poniendo fin a la reacción de secuestro de electrones. Estos son sustancias capaces de estabilizar a los radicales libres; la FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos, de los Estados Unidos, por sus siglas en inglés) define a los antioxidantes como sustancias empleadas para conservar a los alimentos al retardar su deterioro, rancidez o decoloración causada por oxidación (Nishina y col., 1991).

La peroxidación lipídica es una de las principales reacción de deterioro de los alimentos durante el procesamiento y almacenamiento. Los antioxidantes detienen la serie de reacciones oxidativas, iniciadas por los radicales libres por contribución de hidrógeno de los grupos hidroxilo, formando radicales libres estables que no inician o propagan otras reacciones de oxidación de lípidos.

1.3.1. Antioxidantes sintéticos y naturales

Por su origen, los antioxidantes se clasifican de la siguiente forma:

a) Antioxidantes sintéticos.

Los antioxidantes más importantes de esta clase son hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT, hidroquinona terbutilada (TBHQ) y propilgalato (PG). BHA y BHT son antioxidantes fenólicos monohidroxicos muy solubles en grasa e insolubles en agua; tienen un excelente poder antioxidante en grasas animales (Shahidi y col., 1992; Macrae y col., 1993; Nawar, 1993). Por su naturaleza volátil, se utilizan como aditivos en materiales de empaque debido a que pueden migrar a los alimentos. Asimismo, cuando se agregan en combinación presentan efecto sinérgico

(Shahidi y col., 1992). La toxicología de estos antioxidantes ha sido controversial, en estudios a largo plazo que indican que BHA y BHT en dosis altas pueden producir tumores en animales (Madhavi y col., 1996).

b) Antioxidantes naturales.

Dentro de éstos se consideran algunos compuestos presentes naturalmente en la carne como los fosfolípidos, la vitamina E, enzimas como superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y catalasa, entre otras. No toda la actividad antioxidante es conferida a interceptores de radicales libres; existen agentes que su función es transferir átomos de hidrógeno. Algunos de estos son el ácido ascórbico, los sulfitos, la glucosa oxidasa y ácido eritórbito; son efectivos en alimentos; aunque se degradan durante la manufactura o el almacenamiento de los productos.

El ácido ascórbico y el tocoferol son ampliamente usados como antioxidantes naturales, pero su actividad es mucho más baja que la de los antioxidantes sintéticos (Nishina y col., 1991); el ácido fítico, uno de los principales componentes de las semillas, es un potente agente secuestrante de metales; las proantocianidinas de las frutas, tales como uvas, grosellas y arándanos, actúan como inactivadores del radical anión superóxido. Las antocianinas, uno de los principales pigmentos de las plantas superiores, también presentan actividad antioxidante. Recientemente se ha reportado actividad antioxidante en péptidos de hidrolizados enzimáticos, como los obtenidos a partir de caseína de la leche (Yong-Liang y col., 2010), y las proteínas miofibrilares de cerdo (Saiga y col., 2003). En estos hidrolizados proteicos, la composición y los niveles de aminoácidos libres y pépticos han sido reportados como una forma de medir la actividad antioxidante (Wu y col., 2003). Otra proteína con posible actividad antioxidante es el colágeno, debido a que es rico en aminoácidos hidrofóbicos (Rajapakse y col., 2005; Lin y Li, 2006)

1.3.2. Radicales libres

El oxígeno, esencial para la vida, también genera compuestos potencialmente dañinos, principalmente los radicales libres; estos son altamente reactivos y con alto nivel de energía debido a los electrones no apareados que contienen. Ejemplos de radicales libres derivados de oxígeno incluyen: superóxidos (O_2^-), grupos hidroxilo (OH^-), hidroperoxilo (HOO^-), peroxilo (ROO^-) y alcoxilo (RO^-). Otras especies reactivas de oxígeno (EROS) producidas por el cuerpo humano incluyen óxido nítrico (NO^-) y el anión peroxinitrito ($ONOO^-$) (Prior y Cao, 2000).

Normalmente los radicales libres atacan a las moléculas estables más cercanas, es decir “secuestran” a sus electrones. Cuando una molécula es atacada y pierde electrones, se convierte en un radical libre y genera una reacción en cadena. Al inicio de este proceso ocurre una peroxidación del lípido, la cual da como resultado la desestabilización y desintegración de las membranas celulares u oxidación de otros componentes celulares, principalmente proteínas y ADN; finalmente se produce la ruptura de las células. La oxidación causada por los radicales libres reduce la capacidad del organismo para combatir enfermedades, incluyendo cáncer, daño a riñones y enfermedades del corazón (Arne, 1983).

1.3.3. Determinación *in vitro* de la actividad antioxidante

Una de las estrategias más aplicadas en el análisis *in vitro* de la capacidad antioxidante total de un compuesto, mezcla o alimento. Consiste en determinar la actividad del antioxidante en comparación con sustancias cromógenas de naturaleza radical; la pérdida de color ocurre de forma proporcional con la concentración (Arena, 2001; Moyer, 2002). Alternativamente, diversos compuestos cromógenos (ABTS, DPPH, DMPD, DMPO y FRAP) se utilizan para determinar la capacidad de los compuestos fenólicos para captar los radicales libres generados, operando así en contra los efectos perjudiciales de los procesos de oxidación que implican a especies

reactivas de oxígeno (EROS) (Arnous, 2002; Giusti, 2001; Kim, 2002; Re, 1999; Sellappan, 2002). Con el método de ABTS es posible medir la actividad antioxidante de compuestos de naturaleza hidrofílica y lipofílica, mientras que DPPH solo es soluble en medio orgánico, y DMPD solo en medio acuoso (Re, 1999; Arnao, 2000; Antolovich, 2002; Fogliano, 1999). El radical ABTS•+ tiene, además, la ventaja de que su espectro de absorción presenta máximos a 414, 654, 754 y 815 nm en medio alcohólico (Fogliano, 1999)

1.3.4. Actividad quelante

Los métodos de determinación de actividad quelante utilizan la habilidad de un compuesto de unirse selectivamente a otro. La sal sódica de 3-(2-píndil)-5,6-bis(acidón 4-fenilsulfónico)1,2,4-tricina, al mezclarse con hierro ferroso forma un complejo de tris-ferrosina (hierro complejo) $Fe(Fe_2)^3$. Una concentración conocida de iones ferrosos, si es incubada con una muestra de péptidos, se fija específicamente con estos péptidos. Los iones ferrosos restantes no fijados se miden con la reacción de ferrosina. La diferencia entre la cantidad de hierro no fijado y la cantidad de hierro agregada a la muestra equivale a la cantidad fijada de los péptidos. Esta es la capacidad de fijación del hierro de la muestra. El hierro ferroso al estar en contacto con la ferrosina forma un complejo de color rojo; la intensidad de la coloración es directamente proporcional a la concentración de hierro y se mide a una longitud de onda de 562 nm. El porcentaje del efecto secuestrante se calcula empleando la Ecuación 1.

$$\text{Efecto secuestrante (\%)} = \frac{Ac - Am}{Ac} * 100 \quad (\text{Ecuación 1})$$

donde:

Ac = absorbancia del control

Af = absorbancia de la muestra

1.4. CARACTERIZACIÓN DE LA MEDUSA BOLA DE CAÑÓN

1.4.1. Determinación de color

En términos generales hay siete procedimientos para identificar el color de un producto.

1. Mediante curvas espectrofotométricas.
2. Por mezclas aditivas de los colores rojo, verde y azul.
3. Por localización en un sólido de color tridimensional.
4. Empleando un método sustractivo de tres tintes primarios.
5. Mediante localización en un ordenamiento visual sistemático de placas coloreadas (Diccionario Munsell).
6. Por localización respecto a un ordenamiento de placas obtenidas por mezclas sustractivas sistemáticas de blanco, negro y pigmentos coloreados de cada tinte por separado.

1.1.4.1. Sistemas de medición de color

a) Mezcla aditiva de colores

La mezcla aditiva de colores emplea tres coordenadas linealmente dependientes. Se representan en un triángulo equilátero donde cada vértice es 100% de los colores rojo (R), verde (G) y azul (B). Los coeficientes especifican la cromaticidad del color (Figura 7); el triángulo equilátero, a la vez, puede ser transformado en un triángulo rectángulo, conservando los colores en los vértices (Figura 8). Las longitudes de onda (λ) de cada vértice son: R=700 nm; G=546 nm y B=436 nm (González-Manresa, 2007).

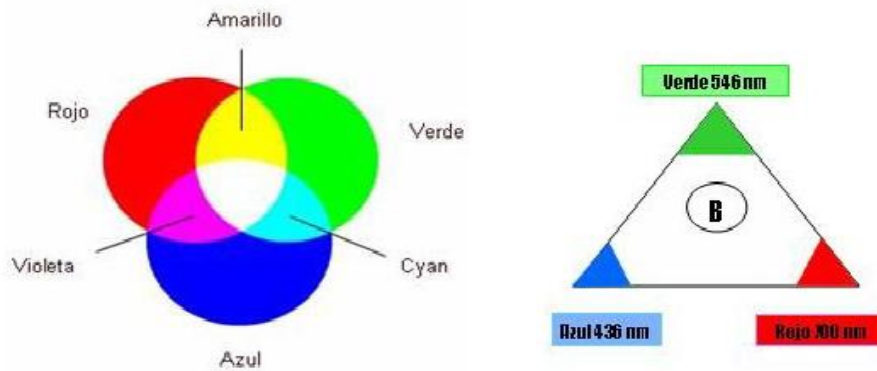


Figura 7. Mezcla aditiva de luces coloreadas (González-Manresa, 2007)

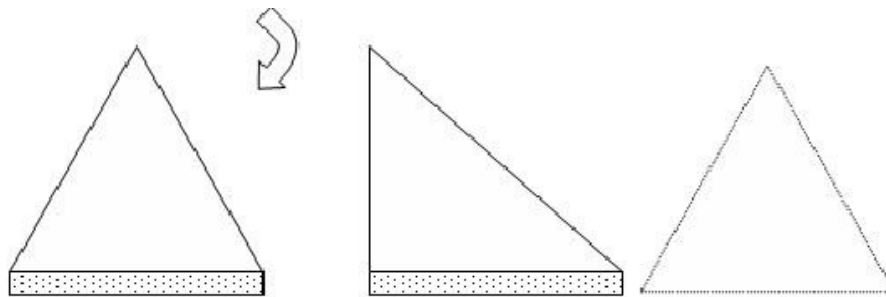


Figura 8. Conversión del triángulo equilátero a rectángulo (González-Manresa, 2007)

Sin embargo, la aparición de valores negativos al momento de comparar a los colores dificulta los cálculos matemáticos; la interpretación de la sensación percibida de color con términos negativos es prácticamente imposible. Por esta razón, se desarrolló un sistema para obtener luces primaria irreales o imaginarias a partir de los colores primarios reales, cuyas adiciones podrían representar todos los colores espectrales. Esto se hizo gráficamente como se muestra en la Figura 9a, reduciendo el triángulo obtuso a uno rectángulo (Figura 9b).

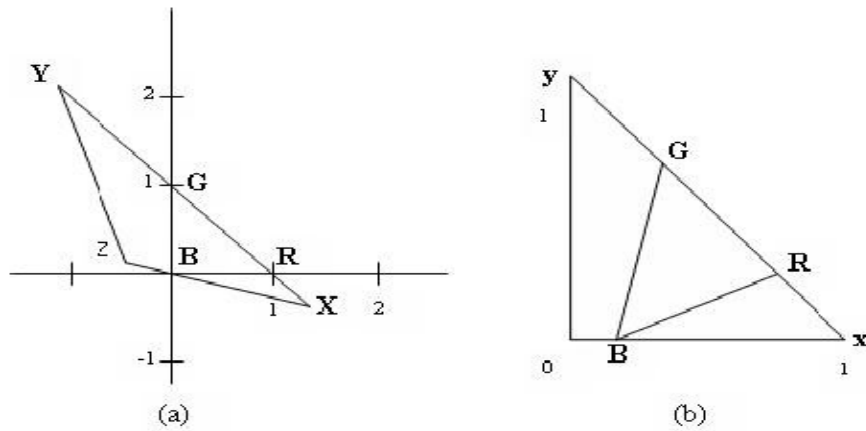


Figura 9. Conversión al triángulo obtuso y posteriormente al triángulo rectángulo de coordenadas cromáticas x , y (González-Manresa, 2007)

b) Sistema CIE

En la mayor parte de los casos se pueden hacer transformaciones de coordenadas para expresar los resultados en el sistema CIE X , Y y Z y establecer una base común de comparación. El sistema CIE denomina a los primarios irreales como X , Y y Z , los cuales no existen como luces que puedan proyectarse en una pantalla, pero pueden calcularse, denominándose valores triestímulos. Con estos se obtiene un plano semejante a una herradura el cual se denomina "locus espectral". La Figura 10 muestra a este locus, el cual comprende todas las cromaticidades reales; incluye los valores del espectro visible y los no espectrales (tonos púrpura y magenta). (González- Manresa, 2007).

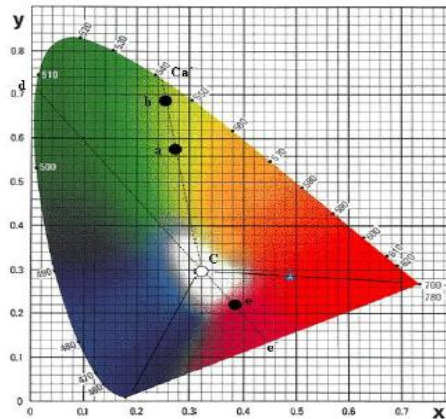


Figura 10. Diagrama de cromaticidad CIE xy y división de las cromaticidades reales en espectrales y no espectrales (González-Manresa, 2007).

c) Sólidos de color (Sistema Munsell)

Se basa en un sólido o espacio de color sobre la base de los colores percibidos. La Figura 11 muestra un corte horizontal dado al sólido de color de Munsell en el que está representada la organización del tinte (alrededor de la circunferencia). Cada matiz representa mediante un número que indica la posición relativa del color dentro del grupo de colores de igual matiz (por ejemplo: 2.5R; 5R y 10R) y una letra que no es mas que la inicial del nombre del color en idioma inglés (por ejemplo: Rojo, R; Verde,G; Azul, B; etcétera) (González-Manresa, 2007).

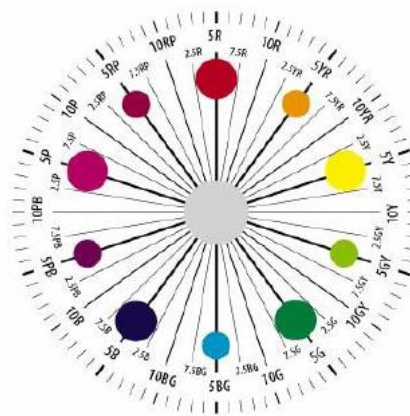


Figura 11. Organización del tinte en el sólido de Munsell (González-Manresa, 2007)

d) Sistema Hunter

Los instrumentos fotoeléctricos para la medición del color se pueden dividir en dos tipos: tricromático y espectrofotométrico. El más exitoso es el primero el cual incluye tres bandas de color rojo, verde y azul (MacDougall, 2002). En el sistema CIE-Lab se define un espacio de coordenadas rectangulares $L^*a^*b^*$ y otro en coordenadas cilíndricas (L^*, C^*, H^*), también conocidos como parámetros de color psicométrico (Figura 12) (González-Manresa, 2007). El primero define un espacio cartesiano en el que L^* corresponde a la claridad y a^* y b^* a la cromaticidad. L^* que representa la luminosidad y cuyos valores van de $L=100$ que corresponde al blanco, hasta $L=0$ para el negro.

El parámetro a^* define el componente rojo-verde, rojo para valores positivos y verde para valores negativos. El parámetro b^* define el componente amarillo-azul; amarillo para los valores positivos y azul para los valores negativos. Los colores son más saturados en cuanto más separados se encuentran del centro del gráfico. Con las variables a^* y b^* se calculó el ángulo de tonalidad (*hue*) (Ecuación 2), que es un valor angular que indica el cuadrante correspondiente al color de la muestra en un sistema cartesiano, donde el eje X corresponde a los valores de a y el eje Y a los de b , 0° =rojo-púrpura; 90° =amarillo; 180° =verde y 270° = azul (McGuire, 1992) y C^* corresponde a la saturación (*chroma*) (Ecuación 3).

$$\text{Tonalidad: } H^* = \arctan b^*/a^* \quad (\text{Ecuación 2})$$

$$\text{Cromaticidad o saturación: } C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2} \quad (\text{Ecuación 3})$$

donde:

L^* = valor de luminosidad en el sistema $L^* a^* b^*$.

C^* = cromaticidad o croma métrico.

H^* = ángulo de tono.

Las características necesarias para definir un color son: brillo, matiz y saturación. El brillo incorpora la noción cromática de intensidad. El matiz es el atributo asociado con la longitud de onda dominante en la mezcla de las longitudes de onda, es el color percibido por el observador, cuando una persona define un objeto de cierto color, esta definiendo su matiz. La saturación se refiere a la pureza relativa o a la cantidad de luz blanca mezclada con un matiz. El matiz y la saturación en conjunto se denominan cromaticidad. Por lo tanto un color puede definirse por su brillo y cromaticidad.

Los términos para diferenciar el matiz, la luminosidad y la cromaticidad son los siguientes (González-Manresa, 2007):

- Matriz: tono, tinte, *hue*: Caracterizado por la longitud de onda de la radiación. Es lo que hace diferente un color de otro.
- Luminosidad: Brillantez, brillo, *value*: Dado por el contenido total de energía. Da lugar a los colores claros y oscuros.
- Cromaticidad: Saturación, Intensidad, pureza, *chroma*. Define la intensidad o pureza espectral del color que va de los tonos grises, pálidos, apagados a los más fuertes y vivos

Para la evaluación de un color se diseña un círculo cromático con los colores alrededor de la circunferencia. Sobre el descansan dos ejes perpendicularmente entre sí (a^* , b^*) graduados de 0-60. Perpendicular al plano a^* , b^* y en su centro, se encuentra un eje L^* que representa la Luminosidad ($L^*=0$, $L^*=100$) (Figuras 12 y 13).

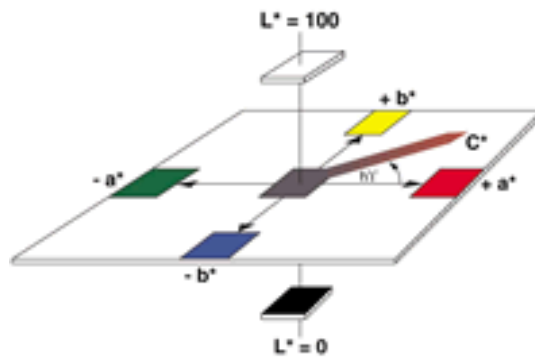


Figura 12. Espacio de color CIE LAB (Hunter)

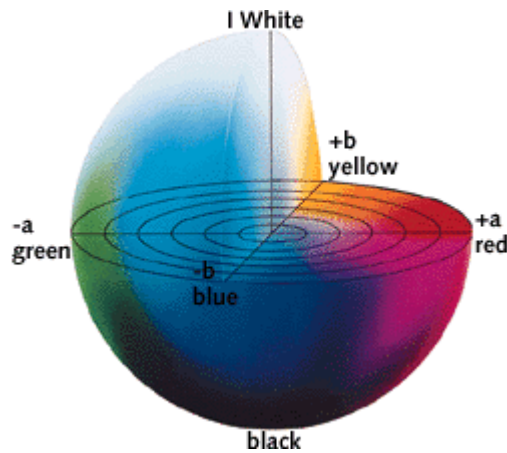


Figura 13. Diagrama CIE $L^*a^*b^*$ (González- Manresa, 2007)

1.1.4.2. Relación color-estructura

Algunos pigmentos son sensibles a diferentes longitudes de onda, estos incluyen longitudes con absorción máxima de 420 nm (azul), 535 nm (verde) y 565 nm (rojo) (Figura y Teixeira, 2007). La absorción esta asociada con los cambios de energía descrita en la ecuación Einstein-Bohr ($E=h\nu$); la diferencia de energía ΔE entre el estado de excitación es directamente proporcional a la frecuencia observada (ν) e

inversamente proporcional a la longitud de onda (λ) de la absorción. Se puede aplicar la teoría molecular para encontrar estructuras moleculares comunes en colorantes contenidos en alimentos ya que existe una relación entre la absorción máxima y la estructura del compuesto. Por ejemplo, los carotenos con apariencia amarillo/naranja tienen un espectro de absorción máximo a una longitud de onda ($\lambda_{\text{máx}}$) de cerca de 497 nm (MacDougall, 2002).

1.4.2. pH

El pH es el logaritmo común del número de litros de disolución que contiene un equivalente gramo de iones hidrógeno [$\text{pH} = -\log_{10}(\text{H}^+)$]. El intervalo de pH es de 0 a 14; un valor por debajo de 7 representa una disolución ácida, 7 una disolución neutra, y por encima de 7 una disolución alcalina. El pH puede determinarse colorimétricamente utilizando indicadores pero es más exacto por métodos eléctricos (Pearson, 1993).

1.4.3. Humedad y actividad de agua (a_w)

El contenido en agua varía entre un 60 y un 95% en los alimentos. En los tejidos vegetales y animales existe en dos formas de humedad: “agua libre” Y “agua ligada”. El agua libre o absorbida es la forma predominante, se libera con facilidad, por presión simple. El agua ligada está combinada o absorbida. Se encuentra en los alimentos como agua de cristalización (en los hidratos) o ligada a las proteínas y a las moléculas de sacáridos y absorbida sobre la superficie de las partículas coloidales (Hart, 1991). El agua libre es la humedad de los alimentos; el agua ligada se relaciona a la actividad de agua.

La humedad se mide utilizando estufa y balanza analítica, incluye la preparación de la muestra, pesado, secado, enfriado y pesado nuevamente de la muestra (Nollet, 1996). Para su cuantificación se utiliza la siguiente fórmula (Ecuación 4):

$$\%H = \frac{A - B}{M} \times 100$$

(Ecuación 4)

donde:

A=Peso charola + muestra húmeda

B=Peso charola + muestra después de secar

M=Peso de la muestra húmeda

La actividad de agua (a_w) se define como la presión de vapor de la solución, dividida por la presión de vapor del disolvente (agua) (Frazier, 1993). La medida de a_w es una herramienta para la predicción de la estabilidad física, química y microbiológica, y de la vida útil de los alimentos (Labuza, 1980). Determina la cantidad de agua disponible para los microorganismos o la utilizada como barrera de protección de los lípidos frente al oxígeno. Esta determinación se puede realizar de diferentes formas: midiendo la presión manométrica de vapor de agua (Benado y Rizbi, 1987); midiendo la humedad relativa de equilibrio mediante el uso de higrómetros (Labuza, 1976; Troller, 1977); realizando la interpolación entre dos soluciones de conocidas (Landrock y Protock, 1951) o en función de la composición química (Lupin y col, 1981).

La mayoría de las bacterias crecen en un medio cuya a_w tenga un valor próximo a 1.00; sin embargo, a_w óptima y el límite inferior para que puedan crecer son distintos para cada especie, variando también en función del tipo de alimento, de la temperatura, del pH y de la presencia de oxígeno. Por ejemplo, *Pseudomonas* crecen a $a_w = 0.97$, 0.96 para *Escherichia coli*, 0.95 para *Bacillus subtilis*, 0.945 para *Enterobacter aerogenes*, 0.86 para *Staphylococcus aureus* y 0.93 para *Clostridium botulinum*. Otras bacterias crecen a a_w inferiores a 0.90 (Frazier. 1993).

1.4.4. Cenizas

Las cenizas en un alimento se refieren al residuo inorgánico que queda después de calcinar la materia orgánica. Las cenizas no son las mismas sustancias inorgánicas presentes en el alimento original, debido a las pérdidas por volatilización o a las interacciones químicas entre los constituyentes (Kirk y col., 1996). La determinación de cenizas se basa en la descomposición de la materia orgánica quedando solamente materia inorgánica de la muestra. En este método, toda la materia orgánica se oxida en ausencia de flama a una temperatura que fluctúa entre los 550 y los 600°C; el material inorgánico que no se volatiliza a esta temperatura se conoce como ceniza (Nollet, 1996). Para su cuantificación se aplica la siguiente fórmula (Ecuación 5):

$$\%H = \frac{A - B}{M} \times 100 \quad \text{(Ecuación 5)}$$

donde:

A=Peso crisol + cenizas

B=Peso crisol vacío

M=Peso de la muestra.

1.4.5. Contenido proteico

Existen varios métodos para la determinación del contenido proteico. A continuación se describen dos de los más empleados en investigación de alimentos.

a) Método de biuret

Comprende un ensayo colorimétrico de un paso donde se cuantifica la formación de un complejo estable entre proteínas y cobre (II). El complejo presenta un color violeta característico que se lee a 310 nm o 540-560 nm, resultado de la coordinación de un átomo de cobre con cuatro átomos de nitrógeno. El complejo se forma por la desprotonación de los grupos amida para formar el enlace con el cobre (II) o por el establecimiento de un enlace coordinado entre el metal y los pares de electrones libres de los átomos de oxígeno y de nitrógeno del péptido. Después de la adición del reactivo de cobre se requiere de tiempo para desarrollar una coloración de biuret estable; es necesario considerar la posible influencia de aminoácidos libres que forman un búfer con el amoníaco (Nollet, 1996). Es necesario construir previamente una curva estándar.

b) Método de Bradford

Se basa en la cuantificación de la unión del colorante Azul Brillante de Croomassie a una proteína desconocida. El complejo colorante-proteína presenta un máximo de absorción a 595 nm. De la misma forma que en el método de biuret, para su cuantificación se requiere de una curva estándar.

1.5. Análisis microbiológicos

Las aguas (dulces y marinas) no solo contienen una flora microbiana propia, también incluyen microorganismos del suelo, los provenientes de animales y plantas, e incluso de material cloacal. Las aguas superficiales de arroyos y corrientes y las aguas almacenadas en lagos y grandes charcas varían considerablemente en su contenido bacteriano. Las bacterias que se encuentran en las aguas naturales pertenecen principalmente a los siguientes géneros: *Pseudomonas*, *Chromobacterium*, *Proteus*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Streptococcus* (enterococos), *Enterobacter* y *Escherichia*. Estos tres últimos son posibles contaminantes y no forman parte de la flora natural. Cuando estas bacterias se encuentran en aguas marinas donde hay peces y otros seres vivos, se establecen en las superficies externas y en el tracto intestinal de los mismos (Frazier, 1993).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Obtener el pigmento azul de la medusa comestible “bola de cañón” (*Stomolophus.meleagris*) y determinar su actividad antioxidante.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ※ Evaluar la materia prima mediante análisis bromatológico, microbiológico y fisicoquímico
- ※ Establecer el método para extraer el pigmento azul de la medusa con solventes y ácidos orgánicos
- ※ Determinar la actividad antioxidante y quelante del pigmento extraído
- ※ Identificar por métodos espectrofotométricos y electroforéticos el tipo de pigmento extraído

3. JUSTIFICACION

La medusa bola de cañón (*Stomolophus meleagris*) es un problema para los pescadores de la región, porque cuando aumenta la población de estos organismos se reduce el volumen de la pesca hasta en 50%. Una alternativa es el aprovechamiento de la medusa la obtención del pigmento azul que tiene actividad biológica, y que puede ser utilizado en la industria farmacéutica y alimentaria.

4. HIPÓTESIS

El pigmento azul de la medusa de mar “bola de cañón” (*Stomolophus meleagris*) extraído con solventes orgánicos puede tener una alta actividad antioxidante y, por lo tanto, tener potencial en la industria farmacéutica y alimentaria.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Materia Prima

La medusa “bola de cañón” (*Stolomophus meleagris*) se obtuvo del Pacífico Mexicano, a través del Instituto Tecnológico de Sonora. Se capturó en la Bahía de Lobos, localizada en el Municipio San Ignacio Río Muerto en el Estado de Sonora, México (Figura 14).

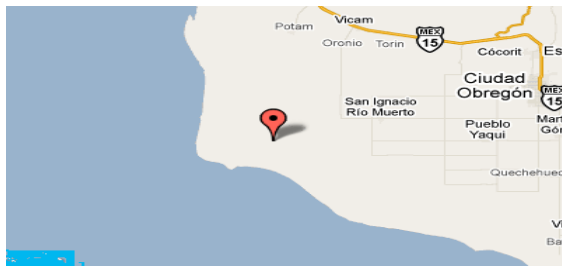
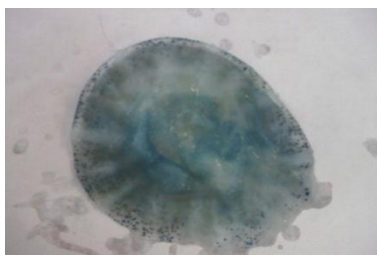


Figura 14. Localización del lugar de captura (Bahía de Lobos, Sonora, México).

No se registró el método de captura; ni tamaño, edad o condiciones de los especímenes antes de la captura. Las medusas se limpiaron y lavaron, separando la mesoglea de los tentáculos y almacenándola a -70°C hasta su uso. Una muestra de medusa se utilizó en fresco y otra liofilizada para realizar la extracción y análisis del pigmento.



(a)



(b)

Figura. 15. Medusa “bola de cañón” (a) mesoglea y (b) tentáculos y mesoglea

Los análisis practicados en la mesoglea se dividieron en tres partes, como se muestra en la Figura 16.

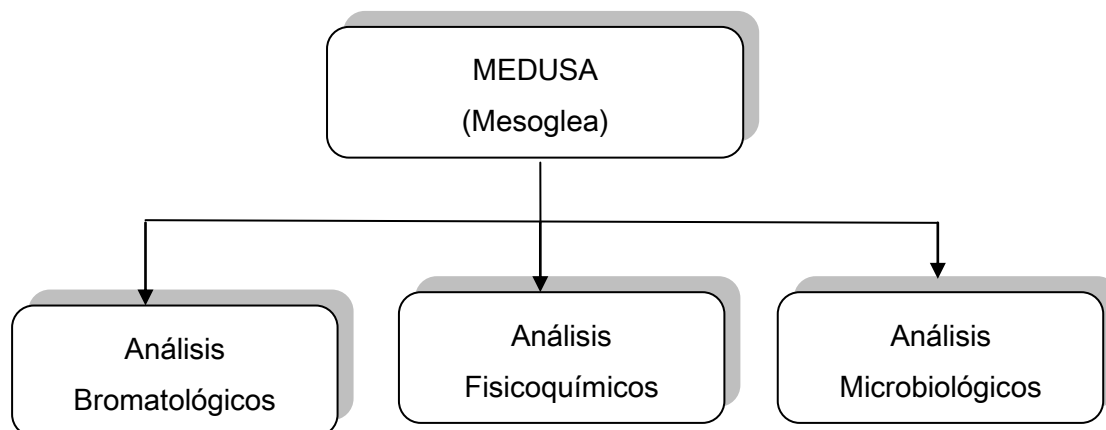


Figura 16. Análisis practicados en mesoglea

5.2. Análisis bromatológicos

Estos se llevaron a cabo en muestras en fresco, e incluyeron humedad, cenizas y proteína.

5.2.1. Humedad.

Se realizó por secado en horno a 110°C hasta peso constante (método AOAC número 952.08). Se calculó el porcentaje de agua con base en la pérdida de peso al eliminarse por calentamiento bajo condiciones normalizadas. Para esto, se pesó aproximadamente 1 g de muestra y se colocó en charolas de aluminio las cuales se habían llevado a peso constante (en estufa por 24 h a 110°C) registrándose el peso antes y después del calentamiento. Las muestras se colocaron en la estufa a 110°C por 24 h, pasado este tiempo se sacaron y dejaron enfriar en desecador por aproximadamente 20 min; posteriormente se pesaron.

5.2.2. Cenizas

Se llevó a cabo por incineración en mufla (método AOAC número 920.39 B). Se calculó el porcentaje de materia inorgánica con base en la calcinación de la materia orgánica. Para ello, se utilizó el residuo obtenido del análisis de humedad; este se pesó y se colocó en crisoles a peso constante (24 h en estufa a 110°C), llevando un control de los pesos antes y después de colocarlos en la estufa. Las muestras se calcinaron en una mufla (Lindberg, modelo 046453) por 3 h a 500-550 °C. Una vez concluido el tiempo de calcinación, los crisoles con las muestras se dejaron enfriar y pesaron nuevamente.

5.2.3. Contenido proteico

En un tubo de vidrio de 10 mL se agregaron 3 mL del reactivo de biuret y 1 ml de muestra (pigmento semipurificado). Se agitó ligeramente, esperando de 5 a 10 min antes de leer la absorbancia a 540 nm contra una referencia a la cual se agregó agua en lugar de la muestra. El contenido de proteína se obtuvo a partir de una curva estándar previamente construida (Anexo 1).

5.3. Análisis fisicoquímicos

5.3.1. Actividad de agua (a_w)

Se pesaron 5 g de muestra fresca y se colocó en el portamuestras de higrómetro Decagoxi modelo GH 303170 (Figura 17); se registró la actividad de agua y la temperatura.



Figura. 17. Higrómetro (Decagoxi GH 303170)

5.3.2. pH

Se analizó por el método descrito por Guerrero-Legarreta y col. (2002); 10 g de muestra se homogenizaron en una batidora mecánica con 90 mL de agua destilada durante 1 min. El pH se midió en el sobrenadante con un potenciómetro digital (Beckman 50). Previamente, el electrodo se ajustó con dos amortiguadores de fosfatos de sodio y potasio de pH 4.0 y 7.0.

5.3.3. Color

La determinación se realizó por triplicado, utilizando un colorímetro Hunter Lab modelo D25-PC2 (Chroma Meter CR-200), colocando 10 g de muestra en un vaso de vidrio de 50 mL, cubriendo el fondo del vaso con la muestra. Se calibró el equipo, utilizando como estándares los valores de $L=94.5$, $a=1.0$, $b=1.9$, obtenidas de un patrón. A continuación se tomó la lectura en tres posiciones de la muestra, colocándola en el porta muestras y procurando no dejar espacios con aire en el recipiente, rotándola 90° entre cada lectura. Los parámetros estándar determinados fueron: L , a y b . Los valores de a y b se transformaron a coordenadas polares para obtener los valores de cromaticidad y tonalidad mediante las Ecuaciones 2 y 3 (inciso 1.1.4.1.d). El valor de la luminosidad (L^*) se tomó directamente de la lectura en el colorímetro.

5.4. Análisis microbiológicos

Los análisis microbiológicos se realizaron con el fin de conocer la carga microbiana de la medusa, específicamente en cuanto a microorganismos Gram negativos, y en cuanto a psicrotófos, principalmente *Pseudomonas*. Para ello, se homogenizaron 10 g de mesoglea en 100 mL de agua destilada previamente esterilizada en una batidora mecánica. Con una micropipeta se inocularon 400 µL de esta mezcla en cuatro puntos de cajas Petri con agar bilis verde brillante (BVB) para la determinación de coliformes y agar Flo para la determinación de pseudomonas. Las cajas se incubaron a 37°C por 24 h.

5.5. Extracción y caracterización del pigmento de mesoglea

5.5.1. Extracción con disolventes orgánicos

Se extrajo el pigmento tanto de mesoglea en fresco como liofilizada, como se describe en la Figura 18. Se utilizaron diferentes disolventes orgánicos con polaridad variable (Figuras 19).

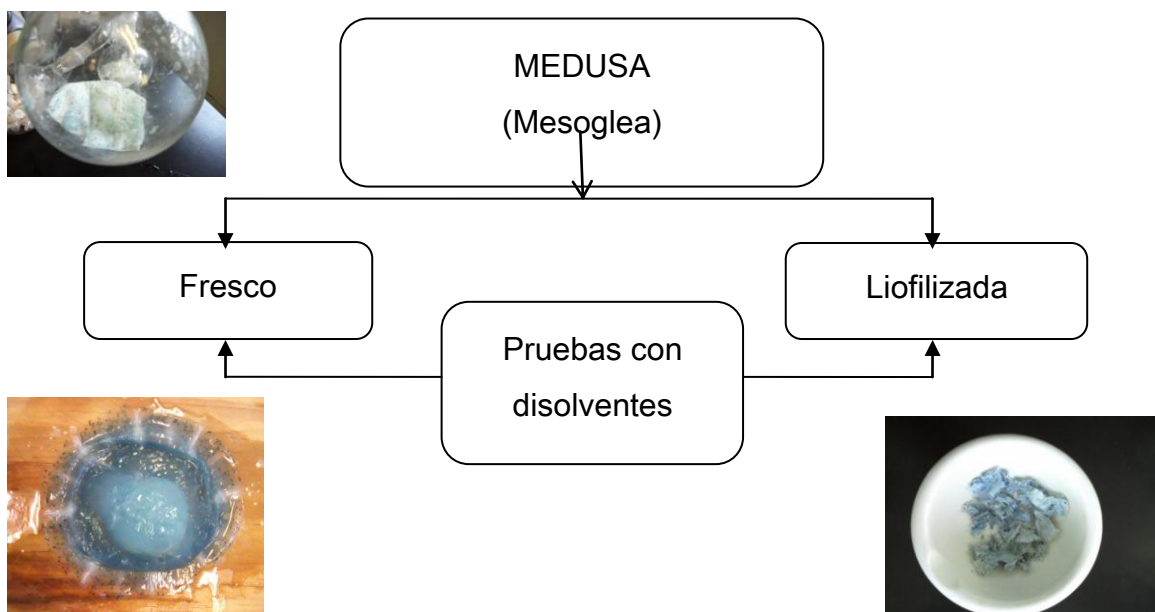


Figura 18. Procesos de mesoglea (Pruebas con disolventes)

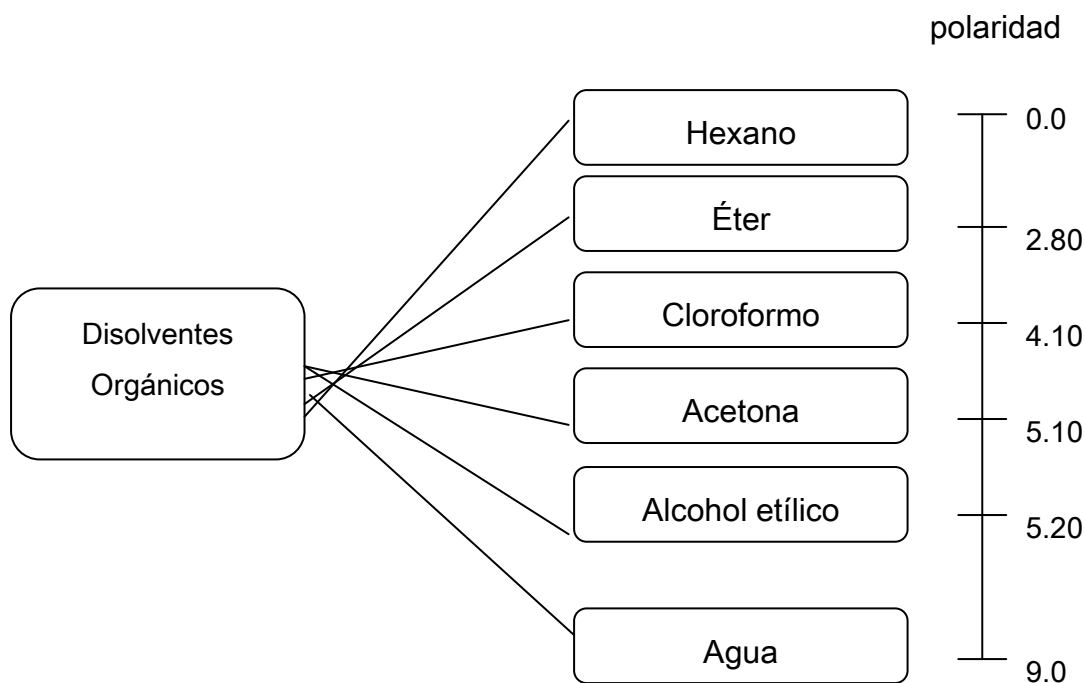


Figura 19. Disolventes usados para la extracción de pigmentos y su polaridad.

Como se discute en el inciso 6.5. (Extracción con disolventes orgánicos), de los disolventes indicados en la Figura 19 solamente el agua tuvo capacidad de extracción del pigmento de mesoglea. Por lo que, se probaron también los siguientes disolventes: búfer de fosfato de sodio 20 mM pH 7, y metanol acidificado con HCl 0.01%, este último empleado para la extracción y cuantificación de antocianinas.

5.5.2. Pruebas preliminares de extracción del pigmento

5.5.2.1. Extracción a partir de mesoglea fresca

De la mesoglea homogenizada en agua, se tomaron 100 μ L; se colocaron en tubos de ensayo de vidrio y se agregó 1 mL de uno de los siguientes disolventes: cloroformo, agua, alcohol etílico anhidro, hexano o éter, agitando posteriormente.

5.5.2.2. Extracción a partir de mesoglea liofilizada

La mesoglea se liofilizó, trituró y guardó en frascos ámbar hasta posteriores análisis. Para la extracción de los pigmentos a partir de mesoglea liofilizada, se tomaron 0.01 g de estay se añadió 1 mL de cada uno de los disolventes orgánicos indicados anteriormente en una serie de tubos de ensayo.

Debido a que se observó que solamente se extrajo pigmento azul empleando agua, la muestra así obtenida se dializó y liofilizó. Esta muestra se etiquetó como “pigmento liofilizado” en los análisis que se llevaron posteriormente.

5.5.2.3. Extracción empleando agua de mar artificial

De igual forma, se probó la eficiencia de extracción del pigmento empleando agua de mar artificial (Kester y col, 1967); la muestra obtenida se almacenó a -20° C hasta su uso.

5.5.3. Obtención del pigmento

Para la obtención del pigmento se utilizaron dos métodos que se describen a continuación.

Método 1: Se siguió la secuencia descrita en las Figuras 20 y 21. Se utilizó la mesoglea triturada para facilitar la extracción; se añadieron 120 mL de agua de mar artificial (Kester y col, 1967), se homogenizó con una batidora mecánica. El homogenizado se centrifugó a 9000 rpm a 4° C por 15 min en un equipo Beckman. Una vez separado el precipitado del sobrenadante, se realizaron tres lavados más en el precipitado hasta obtener un volumen total de 600 mL, separando por centrifugación en cada lavado. El sobrenadante se mezcló con sulfato de amonio

(NH₄)₂SO₄ hasta 50% de saturación, dejando en reposo a 4°C por 24 h, lo que precipitó al pigmento; este se separó por centrifugación a 9000 rpm, 4°C y 15 min. El pigmento remanente en el sobrenadante se precipitar de nuevo por saturando a 80% con (NH₄)₂SO₄ dejando nuevamente en refrigeración por 24 h para separar un segundo pigmento por medio de centrifugación en las mismas condiciones que anteriormente se describen.

Método 2: En el segundo método la mesogela en trozos se mezcló con 120 mL de búfer de fosfatos de sodio y potasio, 0.05M, pH 7. El resto del procedimiento fue similar al Método 1.

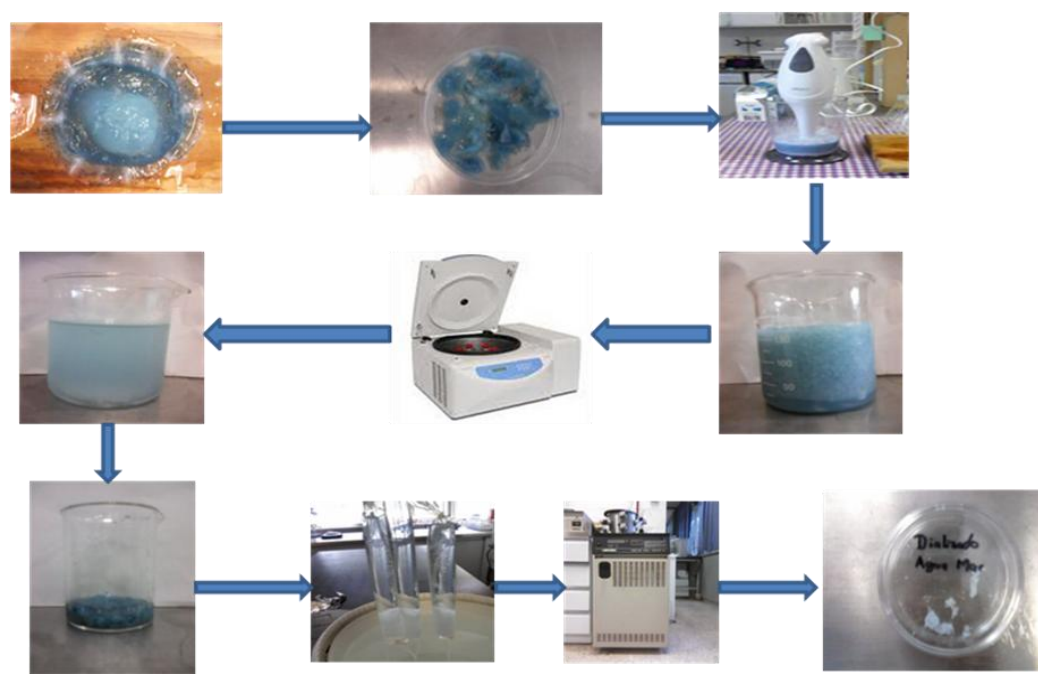
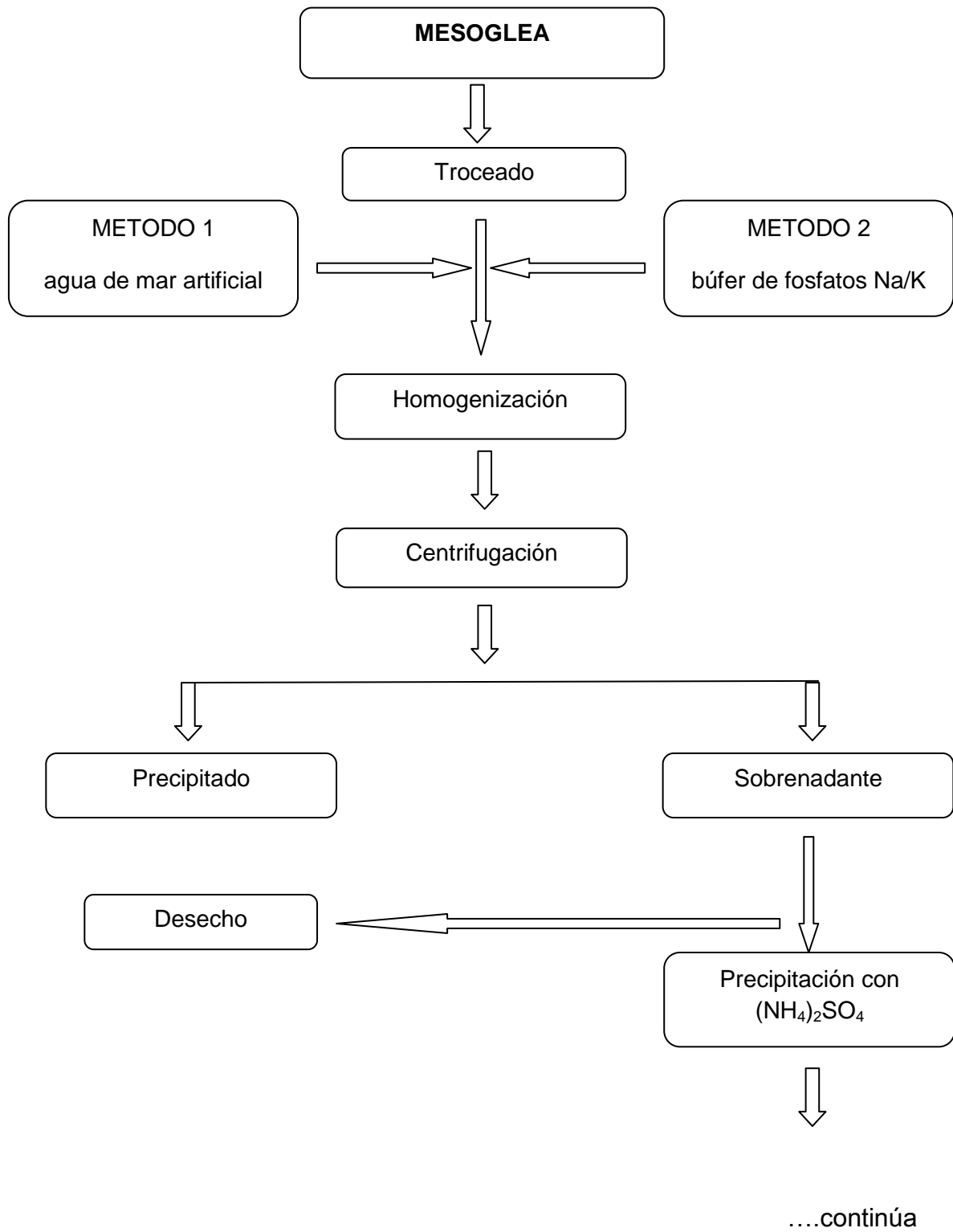


Figura 20. Proceso de extracción del pigmento azul de medusa "bola de cañón" (*Stolomophus meleagris*)



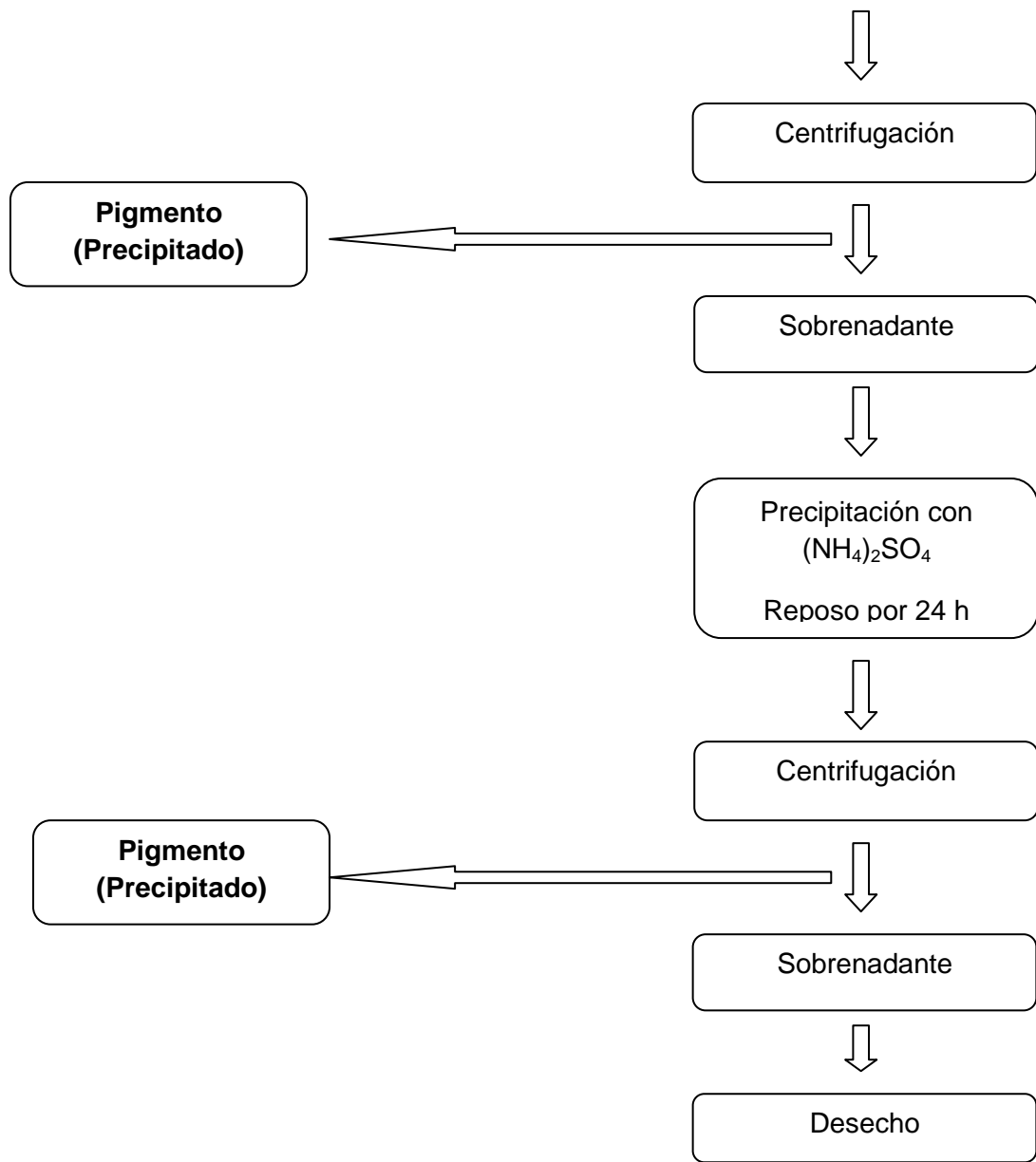


Figura 21. Extracción del pigmento de mesoglea siguiendo el Método 1 (agua de mar) y el Método 2 (búfer de fosfatos Na y K)

5.5.4. Liofilización del pigmento

El pigmento se precipitado por saturación con 50 y 80% de sulfato de amonio, según el método descrito en el punto 5.5.3., se resuspendió en búfer de fosfatos pH 7 y se dializó. Una parte del pigmento dializado se colocó en viales y almacenó a -20°C, mientras que otra parte se liofilizó para posteriores estudios.

5.5.5. Análisis de las propiedades del pigmento

5.5.5.1. Determinación de la actividad antioxidante de mesoglea

Se llevó a cabo por un método modificado de formación de radicales ABTS⁺, según lo reportado por Re y col. (1999), donde el radical ABTS⁺ se obtiene tras la reacción de ABTS (7 mM) con persulfato potásico (2.45 mM), incubándose estos a temperatura ambiente (aproximadamente 18°C) y en obscuridad durante 16 h. Una vez generado el radical, este se diluyó en agua destilada hasta obtener una absorbancia de 0.7(±0.1) leída a 754 nm. Se utilizaron 0-20 mg/100 mL) de ácido ascórbico (vitamina C) como estándar de referencia.

La determinación de la actividad antioxidante de la mesoglea se llevó a cabo en dos sustratos: mesoglea liofilizada y pigmento aislado liofilizado. En el caso de la mesoglea liofilizada se pesaron 0.05 g de muestra que se colocaron, por triplicado, en un tubo de ensayo de vidrio mesoglea y se colocó en un tubo de vidrio agregando a cada tubo agua destilada, 2 mL de metanol acidificado y búfer de fosfato de sodio pH 7, 20mM, respectivamente. De cada muestra se tomaron 40 µL y se añadieron a 1960 µL del reactivo diluido de ABTS⁺, se leyó la absorbancia a 754 nm, 30°C a los 0, 1, 4 y 7 min inmediatamente después de realizarse la mezcla. Los resultados se expresaron como actividad antioxidante equivalente a vitamina C (µmol/mL).

5.5.5.2. Determinación de la actividad quelante

Se basó en la capacidad del pigmento para quelar al hierro. A 1 mL de muestra del pigmento liofilizado diluido en agua, se añadió 1 mL de sulfato ferroso (0.125 mM), se dejó en reposo por 5 min a temperatura ambiente y se añadió 1 mL de ferrosina (0.315 mM). La muestra se dejó en reposo por 10 min a 37 °C y se leyó a 562 nm en un espectrofotómetro Beckman DU-650.

5.5.5.3. Estabilidad del pigmento a la temperatura

Una muestra del pigmento liofilizado se colocó en viales y se disolvió en 1 mL de agua de mar. Estos se sometieron a calentamiento de 30 hasta 70°C. Se hizo un barrido espectral de 250 a 800 nm con cada una de las muestras.

5.5.5.4. Estabilidad del pigmento al pH

Las muestras del pigmento liofilizado en viales y disueltas en 1 mL de agua de mar se llevaron a pH de 2 a 9. Se llevó un barrido espectral en las muestras como se indicó en el punto anterior.

5.5.5.5. Electroforesis del pigmento (SDS-PAGE)

Se llevó a cabo una electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% (SDS-PAGE). Pigmento liofilizado, utilizando una cámara vertical de electroforesis Mini-Protean II Slab cell de Bio-Rad (Richmond, California). Como referencia se aplicó un marcador que contenían 9 proteínas de peso molecular conocido: miosina (200kDa), β -galactosidasa (120 kDa), albúmina de suero bovino (91 kDa), glutamato (62 kDa), ovoalbumina (46 kDa), anhidrasa carbónica (38 kDa), mioglobina (26 kDa), lisosima

(19 kDa) y apoproteína (9 kDa) (Amresco Blue Step K973). Los geles se analizaron con ayuda de un programa autoanalizador de imagen (Dscan Exeval).

6. RESULTADOS Y DISCUSION

6.1. Análisis bromatológicos

El análisis de humedad practicado a la medusa fresca no coincidió con los reportados anteriormente por otros autores en la misma especie. Se encontró un contenido de humedad en este trabajo de 82%, mientras que se ha reportado hasta 96.1% (Hsieh, 2001). El contenido de cenizas fue de 1.9%, posiblemente debido al contacto directo que tiene esta especie con la arena, mientras que el contenido proteico fue 72.1 $\mu\text{g/mL}$ debido, en gran parte, a la cantidad de colágeno presente en el cuerpo de la medusa. En estudios en mesoglea y tentáculos de medusa se ha reportado una alta concentración de glicina e hidroxiprolina, ambos aminoácidos son indicadores de la presencia de colágeno como la proteína que se encuentra en alta cantidad en la mesoglea (Kimura y col, 1983). Esto se corrobora con el hecho de que se encontró un alto contenido de proteína, debido a la cantidad de colágeno en esta especie.

6.2. Actividad de agua (a_w) y pH

La actividad de agua de la mesoglea (a_w) fue 0.98, muy próxima a 1.0 que es el del en el cual se desarrolla. Se encontró pH 6.75, cercano a la neutralidad. El pH es de gran importancia ya que de él depende el tipo de flora bacteriana que puede crecer y, con ello, contaminar la muestra acelerando el proceso de descomposición. En el pH encontrado en la mesoglea pueden crecer la mayoría de las bacterias, por lo cual es de suma importancia el manejo sanitario de la medusa desde su captura hasta su consumo.

6.3. Color del pigmento extraído con agua de mar (pigmento fresco)

La Figura 22 muestra el pigmento obtenido con agua de mar; el color se analizó de acuerdo a la metodología reportada en el inciso 5.3.3.



Figura 22. Pigmento extraído de mesoglea con agua de mar.

Los valores del estándar fueron: L^* 37.43; a^* = -11.11 y b^* = -9.87, con las cuales se procedió al cálculo de tres parámetros de color que se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Parámetros de color L^* (Luminosidad), C^* (Cromaticidad) y H^* (Tonalidad) en pigmento fresco extraído con agua de mar, antes de dializar

Parámetros de color	Valor
L^*	33.1
C^*	10.4
H^*	225.6

Con estas tres variables calculadas se procedió a la ubicación de los parámetros de color en las coordenadas CIE Lab, obteniendo un color azul que describió al pigmento de mesoglea (Figura 23).

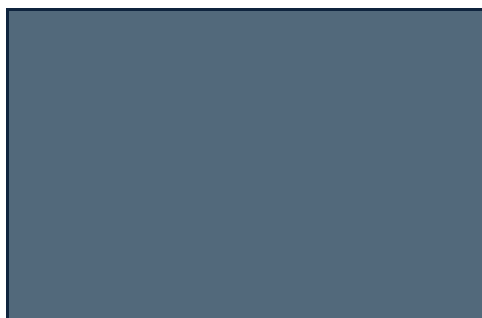


Figura 23. Color obtenido según coordenadas CIE L*a*b*

En el barrido espectral del pigmento se obtuvo una absorción máxima entre 500 y 520 nm, aproximadamente (Figura 24).

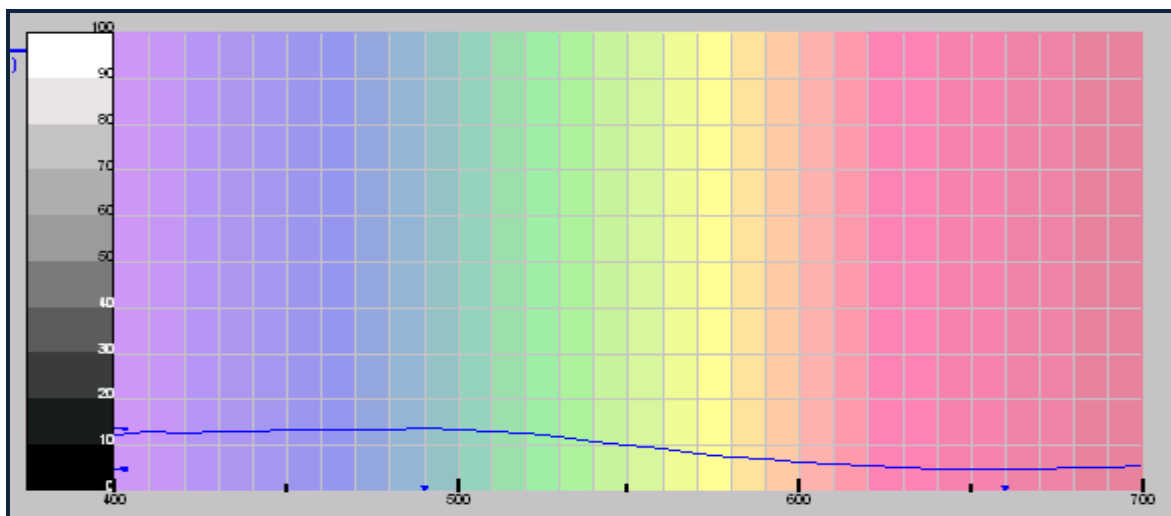


Figura 24. Barrido espectral en pigmento extraído con agua de mar.

En el barrido espectral del pigmento dializado sin liofilizar (en fresco) extraído al 80% de saturación con sulfato de amonio se obtuvo una absorbancia máxima entre 631-633nm. Estos valores de absorbancia fueron muy cercanos a los obtenidos en la especie azul *Casiopea xamachana*, donde la proteína extraída mostró una absorción máxima a 620, 587, 555 y 415 nm; al desnaturizar a la proteína con SDS, cambió el tono del pigmento a rosa, dando una absorción máxima de 507nm (Blanquet, 1987).

En el caso de la especie *Vellela*, se observó un pigmento con absorción máxima entre 655-685 nm y 425-475 nm; también se observó una absorción máxima entre 590-594 nm en la misma especie, mientras que en *Porpita* la absorción máxima observada fue de 650 nm (Herring, 1971).

6.4. Análisis Microbiológicos

No se encontró crecimiento en el agar bilis verde brillante (BVB), usado para determinar el grado de contaminación por coliformes; sin embargo en el agar Flo, utilizado para determinar el grado de contaminación por *Pseudomonas*, se encontró crecimiento de 250 UFC/g (Figura 25). Esta contaminación pudo originarse en la manipulación de los pescadores u otros operarios al momento de su captura, o a la presencia de estos organismos en el agua salada, el medio en el que vive esta especie. En el caso del agua de mar, esta no sólo contiene su propia flora microbiana, también contiene microorganismos procedentes del suelo y posiblemente otros procedentes de los animales y de las aguas residuales (Frazier. 1993). Se conoce que las especies bacterianas existentes en las aguas naturales son mayormente de los géneros *Pseudomonas*, *Chromobacterium*, *Proteus*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Streptococcus* (*Enterococcus*), *Enterobacter* y *Escherichia*. Las tres últimas posiblemente ingresan por contaminación de otras fuentes. Cuando las bacterias de estos géneros se encuentran en el agua que rodea a la medusa, colonizan su superficie (Frazier. 1993), provocando su contaminación.

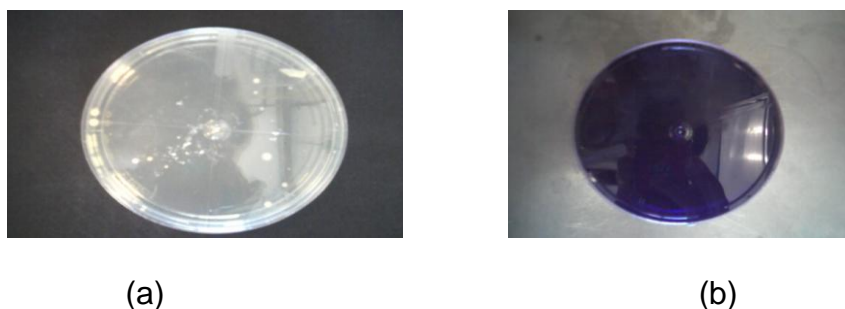


Figura 25. (a) Crecimiento de población de *Pseudomonas* en agar Flo; (b) agar BVB (sin crecimiento)

6.5. Extracción del pigmento con disolventes orgánicos

Sólo se observó extracción del pigmento solamente con agua a partir de la mesoglea liofilizada (Figura 26). Con los otros disolventes empleados (etanol, éter, cloroformo, alcohol etílico anhidro y hexano) no se observó extracción del pigmento. Esto es debido a que el pigmento tiene carácter polar, por tanto el agua, el disolvente de mayor polaridad de los empleados, si tuvo capacidad de extraerlo (Figura 27). Herring (1971) observó, en el caso de las especies *Velella* y *Porpita*, que el pigmento es más fácil de extraer que el de otros animales.



Figura 26. Mesoglea liofilizada



Figura 27. Mesoglea liofilizada, tratada con disolventes

Se llevó a cabo otra serie de pruebas con los siguientes disolventes: agua, búfer de fosfato de sodio 20 mM pH 7, y metanol acidificado con HCl 0.01% (Figura 28), así como con agua de mar (Figura 29).

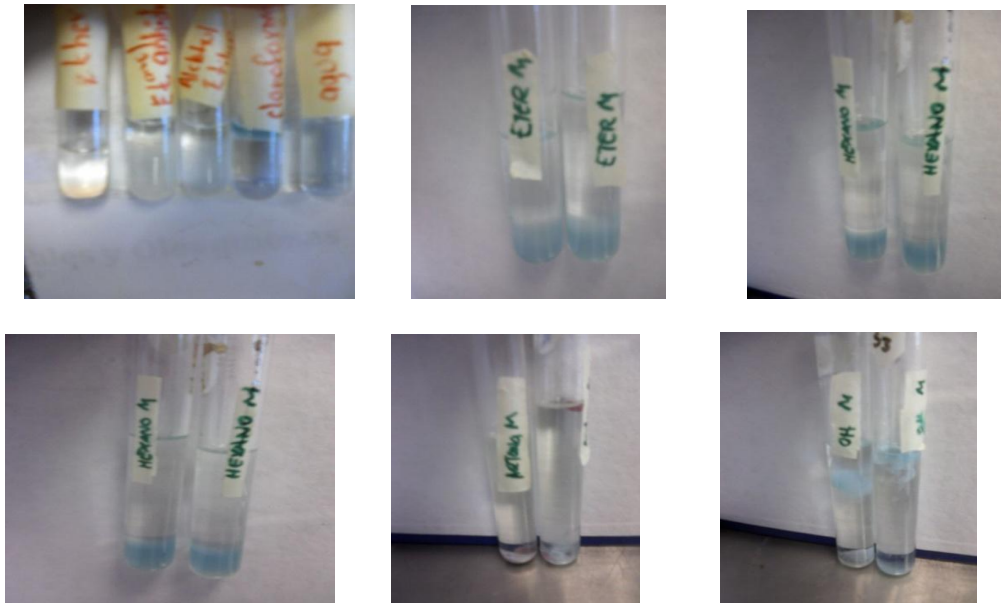


Figura 28. Extracción del pigmento de medusa con diferentes disolventes



Figura. 29 Pigmento aislado con agua de mar.

La Figura 30 muestra al pigmento liofilizado obtenido por precipitación con 50 y 80% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (b).

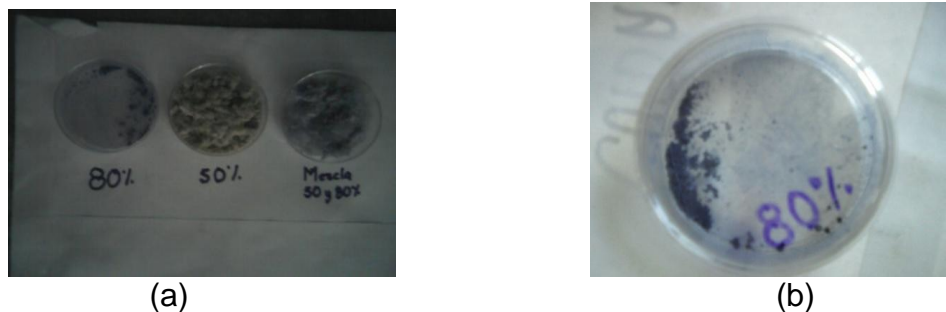


Figura 30. Pigmento liofilizado, obtenido por precipitación con 50 y 80% (a) y con 80% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (b)



Figura 31, Pigmento aislado liofilizado.

6.6. Actividad antioxidante en mesoglea liofilizada

La Tabla 3 muestra los resultados de la actividad antioxidante del pigmento expresada en $\mu\text{mol/mL}$ equivalentes de ácido ascórbico. Hubo mayor actividad antioxidante del pigmento extraído con en agua y con búfer de fosfato, que con metanol acidificado. No se encontró información en la literatura acerca de la actividad antioxidante de pigmentos azules de medusa, por lo que no es posible comparar estos valores con alguno ya reportado.

Tabla 3. Actividad antioxidante en mesoglea liofilizada expresado en $\mu\text{mol/mL}$ equivalentes de ácido ascórbico.

Tiempo	Mesoglea liofilizada (equivalente a 50 mg)		
	Agua destilada	Buffer fosfato de Na, pH 7, 20mM	Metanol HCl
Min 0	165.62	144.27	64.50
Min 1	192.49	172.97	82.23
Min 4	229.50	294.63	104.31
Min 7	243.25	228.59	113.02

Tanto el en el caso de la extracción con agua como con búfer se observó mayor estabilidad en el color del pigmento. Sin embargo, el pigmento de mesoglea no fue estable en metanol acidificado ya que cambió de color azul a un tono rosáceo (Figura 32). Algunos autores han reportado que la disociación o asociación de las carotenoproteínas azules es respuesta de su ambiente iónico (Chessman y col., 1966; Ceccaldi y Zagalsky, 1967; Zagalsky y col., 1970).



Figura 32. Pigmento de mesoglea liofilizada extraído con agua, metanol 0.1% HCl y búfer de fosfatos.

6.7. Actividad antioxidante en pigmento dializado aislado con Agua de mar y búfer Na/K.

Asimismo, al comparar los métodos de extracción de pigmento con agua de mar y con búfer de Na/K, se observó mayor eficiencia actividad antioxidante en el pigmento extraído con agua de mar, posiblemente a la alta concentración de iones en el medio de extracción en comparación con el búfer de fosfatos (Tabla 4).

Tabla 4. Actividad antioxidante en pigmento extraído con agua de mar y búfer Na/K expresados en $\mu\text{mol/mL}$ equivalentes de ácido ascórbico.

Tiempo (min)	Pigmento puro (equivalente. a 50 mg)	
	Pigmento dializado-liofilizado agua mar	Pigmento dializado-liofilizado (búfer Na/K)
0	1431.43	1050
1	1584.35	1187.75
4	1819.47	1349
7	1971.44	1462.75

6.8. Actividad antioxidante y quelante de pigmento fresco aislado con agua de mar

La Tabla 5 muestra los resultados de la actividad antioxidante del pigmento extraído al 50 y 80% de saturación con sulfato de amonio, observándose una mayor actividad en el pigmento extraído al 80% de saturación. En estas también se mantuvo un color azul más intenso, por lo que las pruebas del efecto secuestrante se centraron sólo en

este pigmento aislado al 80% de saturación con sulfato de amonio. Este pigmento tuvo la capacidad de impedir que el metal presente prosiga con reacciones químicas como robar electrones a estructuras celulares, ocasionando la formación de radicales libres y con ello acelerando el proceso de envejecimiento de las células. Estos estudios podrán ser profundizados a futuro para las aplicaciones del pigmento con fines funcionales, ya sea en la industria farmacéutica como alimentaria.

Tabla 5. Actividad antioxidante del pigmento aislado, expresada en equivalentes de Vitamina C ($\mu\text{mol/mL}$) y actividad quelante expresada como porcentaje de efecto secuestrante.

Tiempo (min)	Actividad antioxidante ($\mu\text{mol/mL}$)		Actividad quelante(%)
	Pigmento (80%)	Pigmento (50%)	Pigmento 80%
0	0,258	0,184	
1	0,467	0,351	80.13
4	0,766	0,562	
7	0,955	0,689	

6.9. Estabilidad del pigmento aislado con agua de mar a la temperaturas.

De las temperaturas de calentamiento a las que se sometió el pigmento aislado con agua de mar (30, 40, 50, 60, 70, 80 y 90°C) sólo fue estable en el intervalo de de 30 a 60°C manteniéndolo el color azul y cambiando a rosáceo en condiciones extremas (70 a 90°C) (Figura 33). Estos resultados coinciden con los reportados para otros pigmentos extraídos de especies de coloración azul. Buchwald y Jenks (1968) notaron que los cambios espectrales ocurren a consecuencia del calentamiento a altas temperaturas, lo cual provoca la desnaturalización gradual de proteínas o debido a procesos intermedios.



Figura 33. Estabilidad del pigmento azul de medusa a la temperaturas.

6.10. Estabilidad del pigmento aislado con agua de mar al pH

Se observó estabilidad del pigmento en un intervalo de pH entre 4 y 9, manteniéndose el color azul. A pH de 3 a 4, el color cambio a rosáceo (Figura 34). Los cambios espectrales ocurren a consecuencia una baja en la fuerza iónica.



Figura 34. Estabilidad del pigmento azul de medusa al pH

6.11. Análisis electroforético del pigmento (SDS-PAGE)

Se encontró unida al pigmento una proteína con peso molecular aproximado de 38 KDa (figura 35 y 36). Los análisis de electroforesis realizados por Blanquet (1987) en el pigmento azul aislado de medusa *Cassiopea xamachana*, reportaron dos bandas: una de 34,500 Da aproximadamente y una pequeña de 30,300 Da. En el pigmento azul aislado de medusa de *Rhizostoma pulmo*, sometido a electroforesis SDS-PAGE, hubo una migración hacia un peso molecular aproximado de 32,000 Da (Bulina y col., 2004). En ambos estudios, la forma de la extracción y especie estudiada fueron diferentes a los presentados en este trabajo.

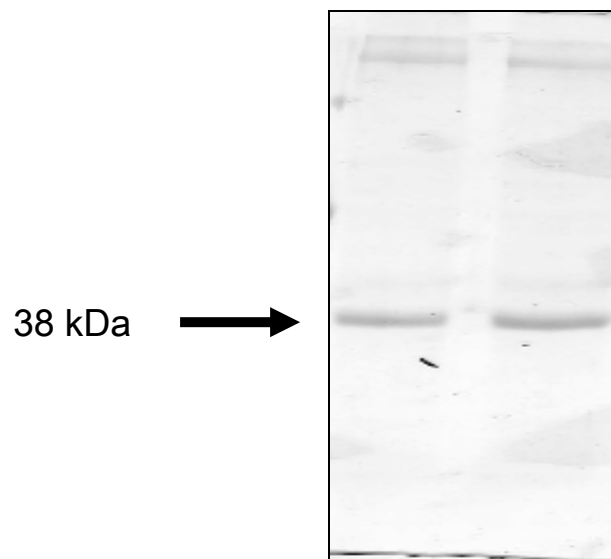


Figura 35. Electroforesis SDS-PAGE de pigmento aislado

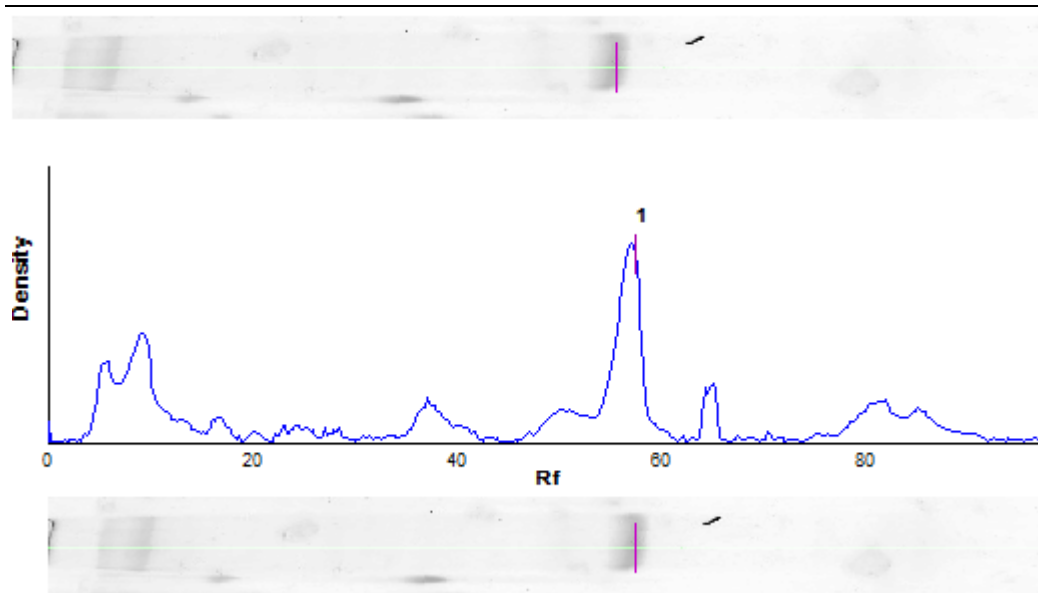


Figura 36. Densitograma de la proteína asociada al pigmento aislado

7. CONCLUSIÓN

El pigmento obtenido es de naturaleza polar, por lo que la extracción más eficiente fue con agua. Este pigmento presenta poca estabilidad a la temperatura extrema, así como a pH ácido. Por análisis electroforéticos se observó que, unida al pigmento, se encuentra una proteína con un peso aproximado de 38,000 Da.

Por otra parte, el pigmento presenta actividad antioxidante y quelante que, en conjunto, podrían contrarrestar el daño perjudicial provocado por la presencia de radicales libres a las células del organismo.

El aprovechamiento de este producto marino podría ser una alternativa en la obtención de productos bioactivos. Este es el caso de los pigmentos, los cuales tienen la función doble de proporcionar coloración y de actuar como nutraceuticos, al proporcionar beneficios a la salud humana.

8. BIBLIOGRAFIA

- Antolovich M., Prenzler P.D., Patsalides E., McDonald S., Robards K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *Analyst* 127,138-198.
- Arena E., Fallico B., Maccarone E. (2001). Evaluation of antioxidant capacity of blood orange juices as influenced by constituents, concentration process and storage. *Food Chem* 74, 423-427.
- Arnao M.B. (2000). Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends Food Sci Technol* 11, 419-421.
- Arne B.N. (1983). Dietary carcinogens and anticarcinogens oxygen radicals and degenerative diseases. *Science* 221, 1256-1262.
- Arnous A., Makris D., Kefalas P. (2002). Correlation of pigment and flavanol content with antioxidant properties in selected aged regional wines from Greece *J Food Comp Anal* 15, 655-665.
- Buchwald M., Jenks W. P. (1968) Properties of the crustacyanins and the yellow lobster shell pigment. *Biochemistry* 7, 844-859.
- Bulina E.M. (2004). New class of blue animal pigments based on frizzled and kringle protein domains. *J Biol Chem* 279, 43367-49370.
- Castañeda C.B, Ramos Q.F., Ibáñez V.L. (2008). Evaluation of the antioxidant capacity of seven Peruvian medicinal plants. *Rev Horiz Méd*, Vol. 8.
- Ceccaldi H.J., Zagalsky P.F. (1967) Studies on the caroteno-protein from the stomach wall of *Aristeus antennatus*. *Comp Biochem Physiol* 21, 435-438.
- Chávez E.A. (1979). Análisis de la comunidad de una laguna costera en la costa sur occidental de México. *Anales del Centro de Ciencias del Mar y Limnología* , UNAM 6(2), 15-44.
- Chessman D.F., Zagalasky P.F., Ceccaldi H.J. (1966) Purification and properties of crustacyanin. *Proc R Soc B* 149, 571-587.
- Kim, D.O. Lee K.W., Lee H.J., Lee C.Y. (2002). Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolics phytochemicals. *J Agric Food Chem* 50, 3713-3717.

-
- Figura O.L., Teixeira A. (2007). Food Physics. Springer– Verlag Berlin Heidelberg
- Fogliano V., Verde V., Randazzo G, Ritieni. (1999). A method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines. J Agric Food Chem 47, 1035-1040.
- Frazier W.C. (1993). Microbiología de los Alimentos. Editorial Acribia, Zaragoza.
- Giusti M.M., Wrolstad R.E. (2001). Anthocyanins. Characterization and measurement with UV-Visible spectroscopy. En: Current Protocols in Food Analytical Chemistry, Wrolstad R.E. (editor). John Wiley & Sons, Nueva York.
- Gómez Aguirre, S (1999). *Stolomophus meleagris* (Scyphozoa: Rhizostomeae) en dos lagunas costeras de Oaxaca, México. Anales del Instituto de Biología UNAM, Serie Zoología, 70(2).
- González C.R. (2002). **NOMBRE DEL LIBRO** Woods E. R. (editor). Prentice Hall
- González Manresa A, Vicente I. (2007). El color en la Industria de los Alimentos. Editorial Universitaria. **CIUDAD, PAIS**
- Guerrero Legarreta I., Ponce E., Pérez Chabela M.L. (2002). Curso práctico de tecnología de carnes y pescado. Publicado por Universidad Autónoma Metropolitana. México D.F.
- Guerrero Legarreta I., López E., Armenta R. (2006). Pigmentos. En: Química de Alimentos. Badui, S. (editor). Pearson Educación, México.
- Hart F. L. (1991). Análisis Moderno de los Alimentos. Editorial Acribia. Zaragoza.
- Herring P.J. (1971). Stability of the blue pigment of *Verella* and *Porpita* (Coelenterata: Siphonophora). Comp Biochem Physiol 39B, 1039-1043.
- Hidalgo M.E., Fernández E., Cabello A., Rivas C., Fontecilla F., Morales L., Aguirre A., Cabrera E. (2006). Evaluation of the antioxidant response of *Chiton granosus* Fremby, 1928 (Mollusca: Polyplacophora) a contaminantes oxidativos. Rev Biol Marina Ocean (Chile) 41(2): 155-165
- Hsieh Y.H.P., Ming F., Rudloe J. (1994). Potential of utilizing jellyfish as food in Western countries. Trends Food Sci Technol 5, 225-229
- Hsieh Y.H.P., Ming F., Rudloe J. (2001). Jellyfish as food. Department of Nutrition and Food Science. Auburn University, Alabama.

-
- Huang Y.W. (1988). Cannonball jellyfish, *Stomolophus meleagris* as a food resource. *J Food Sci* 53, 341–343.
- Kester D.R., Duedall, I.W., Connors D.N., Pytkowicz R.M. (1967). Preparation of artificial seawater. *Limnol Oceanogr* 12(1), 176-179.
- Kim D.O., Lee K.W., Lee H.J., Lee C.Y. (2002). Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolics phytochemicals. *J Agric Food Chem* 50, 3713-3717.
- Labuza T.P. (1980). The effect of water activity on reaction kinetics of deterioration. *Food Technol* 34, 36-42.
- Labuza T.P, Acott K., Tatini S.R., Lee R.Y. (1976). Water activity determination: A collaborative study of different methods. *J Food Sci* 41, 910-917.
- Landrock A.H., Proctor, B. (1951). A new graphical interpolation method for obtaining humidity equilibria data, with special reference to its role in food packing study. *Food Technol* 5, 332-337.
- Lin L., Li B.F. (2006). Radical scavenging properties of protein hydrolysates from Jumbo flying squid (*Dosidicus eschrichtii* steenstrup) skin gelatin. *J Sci Food Agric* 86(14):2290-2295.
- Lupin H.M., Boeri R.L., Moischiar S.M., (1981). Water activity and salt content relationship in moist salted fish products. *J Food Technol* 16, 31-38.
- MacDougall D.B. (2002), *Colour in food: Improving quality*. Woodhead Publishing . Inglaterra.
- Macrae R., Robinson R.K., Sadler M.J. (1993). Chromatography. En: *Encyclopaedia of Food Science. Food Technology and Nutrition, Volumen II*, Academic Press, San Diego.
- Madhavi, D.L., Singhal R.S., Kulkarni P.R. (1996). Technological aspects of food antioxidants. En: *Food Antioxidants. Technological, Toxicological and Health Perspectives*, Marcel Dekker. Nueva York.
- Makomoto O., Nakano E. (2001). Jellyfish fisheries in Southeast Asia. *Hydrobiologia* 451, 19-26.
- Morikawa, T. (1984). Jellyfish. *FAO Infofish Marketing Digest* 1, 37–39.
- Morrison R.T., Boyd R.N. (1990). *Química Orgánica*. Addison- Wesley Iberoamericana. México D.F.

-
- Moyer R.A., Hummer K.E., Finn C.E., Frei B., Wrolstad R.E (2002). Anthocyanins, phenolics and antioxidant capacity in diverse small fruits: vaccinium, rubus, and Ribes. *J Agric Food Chem*, 50, 519-525.
- Nagai T., Ogawa T., Nakemura T., Ito T., Nakagawa H., Fujiki K., Nakao M., Yano T., 1999. Collagen of edible jellyfish exumbrella. *J Sci Food Agric* 79 (6), 855-858.
- Nawar W.W. (1993). Lípidos. En: *Química de los Alimentos*. Fennema, O. R. (editor) Editorial Acribia, S. A., Zaragoza, España.
- Nishina A., Kuboto K., Kameoka H., Osawa T. (1991). Antioxidizing component, musizin, in *Rumex japonicus*. Houtt. *J Am Oil Chem Soc* 68, 735-739.
- Nollet L.M.L (1996). *Handbook of Food Analysis*. Marcel Dekker, Nueva York.
- Pearson. D (1993). *Técnicas de laboratorio para el análisis de alimentos*. Editorial Acribia.
- Prior R.L., Cao G. (2000). Antioxidant phytochemicals in fruits and vegetables: diet and health implications. *Hort Sci* 35, 588±592.
- Blanquet R.S., Phelan M.A. (1987). An unusual mesogleal protein from the mangrove jellyfish *Cassiopea xamachana*. *Marine Biol* 94, 423-430.
- Rajapakse N., Mendis E., Byun H., Kim S.K., (2005). Purification and *in vitro* antioxidative effects of giant squid muscle peptides on free radical-mediated oxidative systems. *J Nutrit Biochem* 16(9): 562-569.
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evens C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biol Med* 26(9/10), 1231-1237.
- Kimura S., Miura S., Park Y.H. (1983). Collagen as the major component of jellyfish (*Stolomophus meleagris*). *J Food Sci*. REFERENCIA
- Saiga A., Tanabe S., Nishimura T. (2003). Antioxidan activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment. *J Agric Food Chem* 51(12), 3661-3667.
- Sellappan S., Akoh C.C., Krewer G. (2002). Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-grown blueberries and blackberries. *J Agric Food Chem* 50, 2432-2438.

Shahidi F., Janitha P. K., Wanasundara, P. D. (1992). Phenolic antioxidants. *Critical Rev Food Sci Nutrition* 32(1), 67-103.

Troller, J.A. (1977). Statical analysis of aw measurements obtained with the sina scope. *J Food Sci* 42, 86-90.

Yu H.H., Liu X.G., Xing R.E., Liu S., Guo Z.Y., Wang P.B., Li P.C. (2006). *In vitro* determination of antioxidant activity of proteins from jellyfish *Rhopilema esculentum*. *Food Chem* 95(1), 123-130.

Zagalsky P.F., Ceccaldil H.J., Daumas R. (1970) Comparative studies on some decapods crustacean carotenoproteins. *Comp Biochem Physiol* 34, 579-607.

Zhuang Y.L., Sun L.P., Zhao X., Hou H., Li B.F. (2010). Investigation of gelatin polypeptides of jellyfish (*Rhopilema esculentum*) for their antioxidant activity *in vitro*. *Food Tech Biotech* 48(2), 222-228.

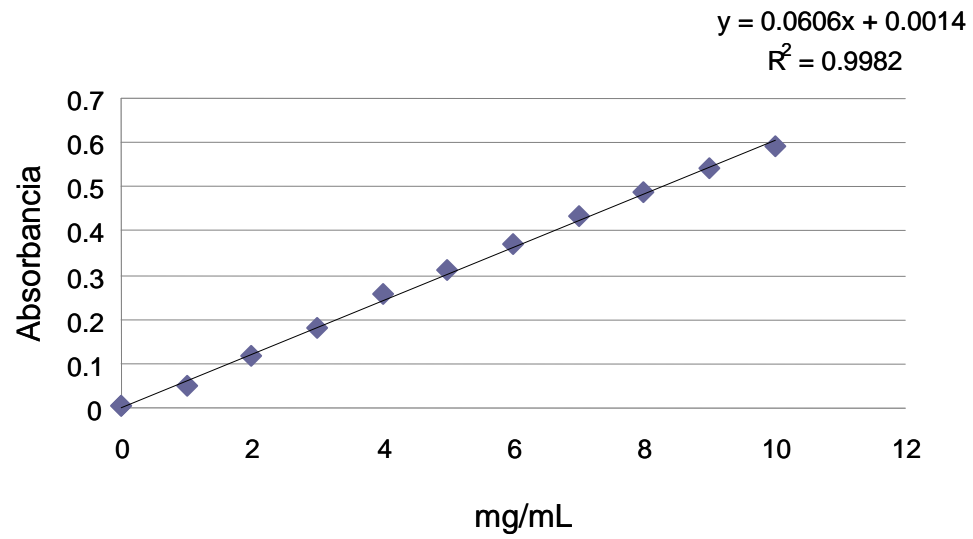
7. PRODUCTIVIDAD

Los resultados obtenidos en este trabajo se presentaron en los siguientes eventos especializados:

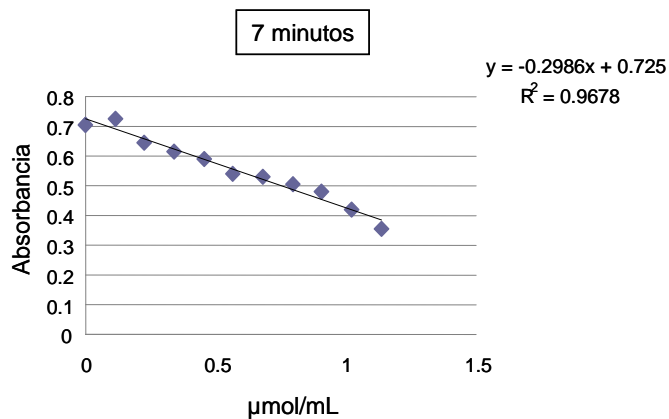
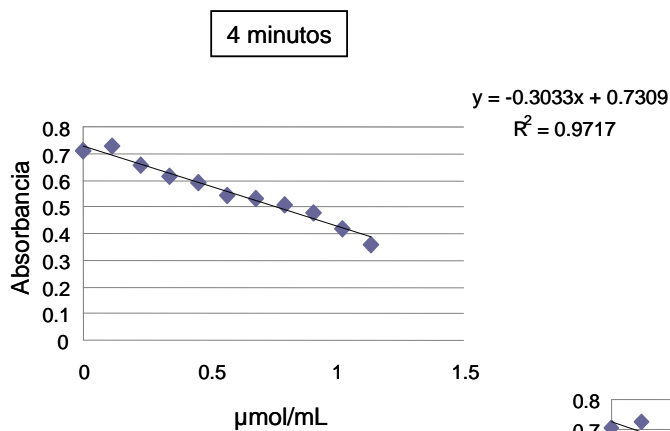
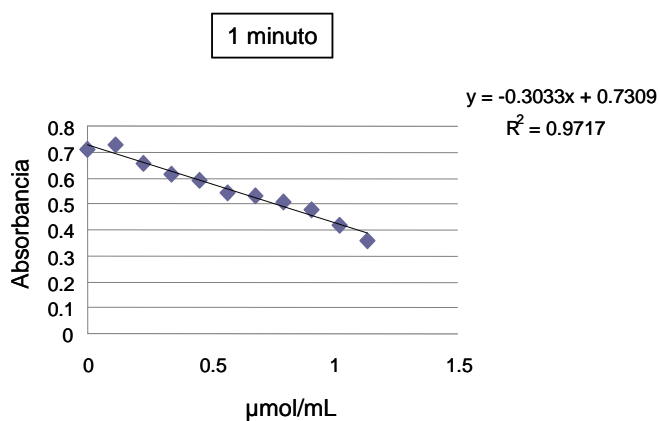
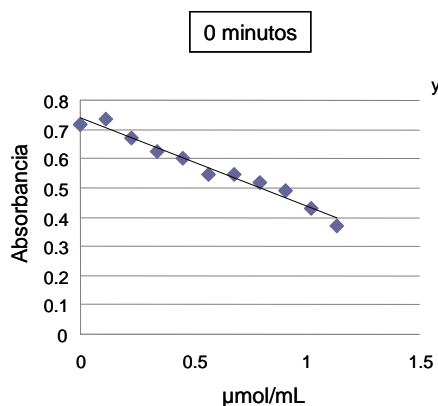
- ❖ XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Análisis espectral y de color de medusa comestible Bola de Cañón (*Stolomophus meleagris*). Presentado, Mayo 2011.
- ❖ Congreso Iberoamericano de Ingeniería de los Alimentos (Lima – Perú). Pigmento azul de la medusa comestible Bola de Cañón (*Stolomophus meleagris*) como una alternativa antioxidante en la industria de alimentos. Presentado, Octubre 2011.

ANEXOS

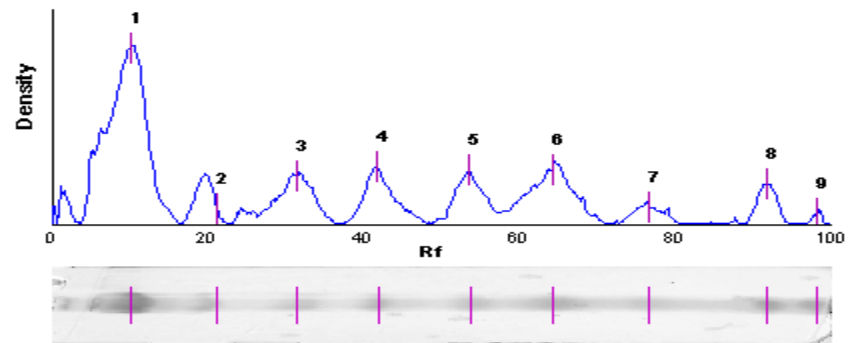
Anexo 1. Curva patrón para la determinación de proteína por el método de biuret



Anexo 2. Curvas de actividad antioxidante de ácido ascórbico a diferentes tiempos



Anexo 3. Electrograma del marcador utilizado en electroforesis SDS-PAGE (Amresco Blue step, K973).



Proteínas del marcador: miosina (200 kDa), β -galactosidasa (120 kDa), albúmina sérica bovina (91 kDa), glutamato (62 kDa), ovoalbumina (46 kDa), anhidrasa carbónica (38 kDa), mioglobina (26 kDa), lisozima (19 kDa) y apoproteína (9 kDa).