



Instituto tecnológico de Tuxtla Gutierrez

**“SOBREVIVENCIA DE *Lactobacillus plantarum* EN PAN VEGANO
ADICIONADO CON *Cnidoscopus aconitifolius*”**

QUE PRESENTA:
MAURICIO JIMENEZ PEREZ

ASESOR(A):
M.C CRISTINA VENTURA CANSECO

TUXTLA GUTUERREZ, CHIAPAS, JULIO 2017

RESUMEN

En el presente estudio se evaluó la actividad antioxidante, el contenido de fenoles y flavonoides, de los extractos de harina de chaya (*Cnidoscolus aconitifolius*) de manera libre y adicionado en panes empleando técnicas espectrofotométricas, así como también se realizaron análisis proximales de los panes adicionado con diferentes porcentajes de harina de chaya, los cuales fueron 0%, 3% y 5%. La harina utilizada se obtuvo a partir de hojas frescas de *C. aconitifolius*. Se realizaron curvas de calibración para cada determinación, utilizando estándares de ácido gálico, quercetina y ácido ascórbico para fenoles, flavonoides y actividad antioxidante respectivamente, siendo la concentración madre de 1 mg/ml para todos los estándares. Los panes fueron adicionados con la BAL *L. plantarum* KY131967, esperando obtener un producto con propiedades probióticas, pero después del proceso de horneado no se obtuvo ninguna sobrevivencia de la bacteria en ninguno de los panes. Las técnicas usadas para los análisis fitoquímicos demostraron la alta presencia de contenido de fenoles y flavonoides tanto en nuestra planta como en los panes a los que se les adicionó la harina de chaya, siendo para el caso de fenoles el 5% el cual presentó un contenido mayor con respecto a los otros dos tratamientos, con respecto al contenido de flavonoides se encuentra una diferencia estadística significativa entre los porcentajes 0%, 3% y 5% siendo el 5% con mayor contenido de flavonoides. En los análisis proximales, para el caso de humedad los datos obtenidos demuestran que no hay diferencia para ninguno de los porcentajes, el mismo caso es para el contenido de cenizas, en el análisis del contenido de proteína se encontró diferencia significativa entre los tratamientos de 0%, 3% y 5% siendo los valores obtenidos de 7.21%, 8.36% y 9.42% respectivamente, siendo 9.42% de proteína el valor más alto. Este es el primer reporte sobre la adición de *C. aconitifolius* en panes, siendo una gran alternativa para aumentar el contenido de metabolitos secundarios que son importantes para la prevención y regulación de distintas enfermedades.

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.- Esquema de la principales rutas de biosíntesis de metabolitos secundarios y sus interrelaciones con el metabolismo primario (Taiz & Zeiger, 2006).	22
FIGURA 2.- Estructura de fenol simple.	23
FIGURA 3.- Estructura básica de los flavonoides.	24
FIGURA 4.- Esquema de extracción Soxhlet.	30
Tabla 1.- Composición de la harina blanca de trigo.	8
Tabla 2.- Composición características básica de los ácidos grasos mayoritarios del aceite de oliva.	11
Tabla 3.- Componentes de la fracción minoritaria no glicérica del aceite de oliva. ...	11
Tabla 4.- Definiciones utilizadas por asociaciones científicas para probiótico y prebiótico.	13
Tabla 5.- Viabilidad de <i>L. plantarum</i> después de la encapsulación.	41
Tabla 6.- Formulación de los panes.	41
Tabla 7.- Contenido de los análisis proximales.	42
Tabla 8.- Barrido espectral para encontrar las concentraciones óptimas para la realización de la curva estándar.	44
Tabla 9.- Valores obtenidos para fenoles y flavonoides en panes y en harina de chaya.	46
Tabla 10.- Actividad antioxidante para los panes 0%, 3%, y 5% en el tiempo 0 y 5 (días).	47

Contenido

1.- INTRODUCCIÓN.....	1
2.- DESCRIPCIÓN DE LA EMPRESA	2
3.- PROBLEMAS A RESOLVER	2
4.- OBJETIVOS	3
4.1.- Objetivo general	3
4.2.- Objetivos específicos.....	3
5.- MARCO TEÓRICO.....	4
5.1.- ALIMENTO.....	4
5.1.1.- Alimento funcional	4
5.2.- PAN	5
5.2.1.- Pan funcional	6
5.2.2.- ASPECTOS GENERALES SOBRE EL PAN VEGANO	7
5.2.3.- COMPONENTES DEL PAN	7
5.2.3.1.- Harina de trigo.....	7
5.2.3.2.- Sal	9
5.2.3.3.- Mejorantes.....	9
5.2.3.4.- Levaduras	9
5.2.3.5.- Salvado.....	10
5.2.3.6.- Aceite de oliva.....	10
5.2.3.7.- Leche de almendra.....	12
5.3.1.- Probióticos en los alimentos.....	14
5.3.2.- Generalidades de la familia <i>Lactobacillus</i>	15
5.3.2.1.- Bacterias ácido lácticas (BAL).....	15
5.3.2.2.- <i>Lactobacillus plantarum</i>	16
5.3.2.3.- <i>Lactobacillus plantarum</i> KY131967	17
5.4.- GENERALIDADES DE LA PLANTA.....	18
5.4.1.- Genero <i>Cnidocolus</i>	18
5.4.2.- Hábitat y distribución geográfica	18
5.4.3.- Usos y propiedades	19
5.4.4.- Composición química de las hojas de <i>Cnidocolus aconitifolius</i>	20
5.5.- METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS.	21
5.5.1.- Terpenos.	22

5.5.2.- Alcaloides.....	23
5.5.3.- Compuestos fenólicos.....	23
5.5.3.1.- Fenoles y ácidos fenólicos simples.....	23
5.5.6.- Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos.....	25
5.6.- ANÁLISIS PROXIMALES.....	27
5.6.1.- Humedad.....	27
5.6.1.1.- Métodos de secado.....	28
5.6.2.- Cenizas.....	28
5.6.2.1.- Método de cenizas totales.....	29
5.6.3.- Lípidos.....	29
5.6.3.1.- Métodos de extracción y cuantificación.....	30
5.6.4.- Método de Kjeldahl.....	31
6.- METODOLOGÍA.....	33
6.1.- Preparación de harinas vegetales.....	33
6.2.- Cultivo de <i>Lactobacillus plantarum</i> KY131967 (Gutiérrez-Sarmiento, 2016)..	33
6.2.1.- Cultivo en matraz.....	33
6.2.2.- Cultivo en Biorreactor.....	33
6.2.3.- Cosecha de la biomasa.....	34
6.3.- Preparación de los agentes encapsulantes (Robles-Flores, 2015).....	34
6.3.1.- Leche de soya.....	34
6.3.2.- Maltodextrina al 35%.....	34
6.3.3.- Goma arábiga al 7.5%.....	34
6.4.- Preparación de la emulsión.....	35
6.4.1.- Secado por aspersion.....	35
6.4.2.- Viabilidad del <i>Lactobacillus plantarum</i> KY131967.....	35
6.5.- Productos de panificación.....	36
6.5.1.- Diseño experimental.....	36
6.6.- Análisis proximal de los productos de panificación.....	36
6.7.- Preparación de los extractos vegetales.....	38
6.9.- Análisis cuantitativo de metabolitos secundarios por espectrofotometría de adsorción de luz visible.....	38
6.9.1.- Cuantificación de fenoles totales.....	38
6.9.2.- Cuantificación de flavonoides.....	39
6.10.- Barrido espectral de DPPH y barrido de ácido ascórbico.....	39

6.10.1-	Evaluación de actividad antioxidante.	40
6.11.-	Sobrevivencia de <i>Lactobacillus plantarum</i> KY131967 en los productos de panificación.	40
7.-	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	41
7.1.-	RENDIMIENTO DE LA HARINA.	41
7.2.-	RENDIMIENTO DEL FERMENTADOR.	41
7.3.-	PORCENTAJE DE VIABILIDAD EN EL ENCAPSULADO.	41
7.4.-	PRODUCTOS DE PANIFICACIÓN.	41
7.5.-	ANÁLISIS PROXIMALES.	42
7.6.-	CONTENIDO DE FENOLES, FLAVONOIDES Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.	43
7.6.1.-	Barrido de DPPH	43
7.6.2.-	Barrido de ácido ascórbico.	44
7.6.3.-	Curvas de calibración.	44
7.6.3.1.-	Curva de actividad antioxidante.	44
7.6.3.2.-	Curva de flavonoides.	45
7.6.3.3.-	Curva de fenoles.	45
7.6.4.-	Contenido de fenoles y flavonoides.	46
7.6.5.-	Actividad antioxidante	47
7.7.-	SOBREVIVENCIA.	48
7.8.-	CONCLUSIONES.	49
7.9.-	RECOMENDACIONES	49
7.10-	COMPETENCIAS DESARROLLADAS Y/O APLICADAS	49
8.-	ANEXOS.	50
9.-	BIBLIOGRAFIA.	52

1.- INTRODUCCIÓN.

El pan constituye la base de la alimentación desde hace 7000 u 8000 años (16). La industria de panificación en México tiene un valor en el mercado de 6,500 millones de dólares y el consumo per cápita anual asciende a 34 kg. Los veganos son personas que no consumen productos de origen animal o cualquier otro tipo que proceda de estos, como leche, quesos, huevos y mariscos. (32), es por esto que el aporte de nutrimentos para las personas que llevan este tipo de dieta no es el suficiente debido a que los alimentos de origen animal proporcionan gran cantidad de nutrientes como, hierro, zinc, vitamina A, vitamina B12 y aminoácidos esenciales como la isoleucina, por ello la importancia de un alimento funcional es de suma importancia para regular el aporte de nutrientes a dichas personas. En la actualidad, en nutrición la importancia se centra en acentuar la importancia de los hábitos de vida diarios donde la elección racional de alimentos se basa no solo en la composición nutricional de los mismos sino también en sus propiedades (111). Por ende la elaboración de un producto funcional es de suma importancia. La adición de harinas vegetales a panes es una alternativa para mejorar el contenido nutrimental, debido a que diferentes estudios reportan un incremento en su contenido de proteínas y diversos minerales, haciendo de los panes un alimento apto para la dietas de las personas veganas. Por otra parte los alimentos con actividad probiótica y su demanda en el mercado nacional e internacional ha impulsado en los últimos años una nueva línea de alimentos funcionales que, además de su valor nutritivo intrínseco, ayudan a mantener el estado de salud general del organismo y a la vez pueden tener un efecto benéfico adicional, terapéutico o preventivo en el huésped. La superficie de la luz intestinal (equivalente a un campo de fútbol) acumula más de 100 trillones de microorganismos (10^{14}) lo que equivale a 10 veces el número de células que componen una persona adulta. El intestino humano es, por tanto, un verdadero ecosistema esencial para la absorción eficiente de nutrientes y para el mantenimiento de la salud en general (95). Por lo tanto en este proyecto de investigación se busca evaluar un producto de panificación adicionado con el microorganismo *L. plantarum* el cual tendría un efecto beneficioso para la salud de las personas veganas y adicionada con la planta *C. aconitifolius*, el cual aumente los niveles de nutrientes en el pan, para que así pueda ser un alimento funcional para el desarrollo integral del individuo.

2.- DESCRIPCIÓN DE LA EMPRESA

El proyecto se desarrollará en el laboratorio de Investigación ubicado en el edificio D, en el laboratorio de Microbiología ubicado en el Polo Tecnológico, en el laboratorio de Analítica ubicado en el edificio Z, todos ellos dentro de las instalaciones del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, ubicado en carretera panamericana kilómetro 1080, Terán, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México.

3.- PROBLEMAS A RESOLVER

Según la Academia de Nutrición y Dietética de EE.UU., (AND, por sus siglas en inglés), "las dietas vegetarianas adecuadamente planificadas, incluyendo las dietas estrictamente vegetarianas o veganas, son saludables, adecuadas desde el punto de vista nutricional y pueden ser beneficiosas para prevenir y tratar determinadas enfermedades. Las dietas vegetarianas bien planificadas son apropiadas durante todas las etapas del ciclo vital, incluyendo el embarazo, la lactancia, la infancia, la adolescencia y la etapa adulta, así como para los atletas".

Es importante mencionar que cualquier dieta restrictiva puede dificultar la obtención de todos los nutrientes necesarios. Una dieta vegana elimina las fuentes de la vitamina B12, que se encuentra casi exclusivamente en los productos de origen animal, como la leche, los huevos y el queso. La dieta vegana también elimina los lácteos, que son una buena fuente de calcio.

Para asegurarse de seguir una dieta "bien planificada", los veganos deben encontrar fuentes alternativas de vitamina B12, calcio, vitamina D, proteínas, hierro, zinc y, en algunas ocasiones, de riboflavina (56). Una estrategia para enriquecer un alimento vegano desde el punto de vista nutricional o funcional es adicionar otros constituyentes.

Esas fuentes alternativas son obtenidas de suplementos alimenticios en forma de comprimidos, extractos de plantas, y/o plantas, entre muchas otras formas.

En este proyecto, además de producir un pan vegano que contenga *Lactobacillus plantarum* (libre y encapsulado) como probiótico, se adicionará hoja chaya (*Cnidoscolus chayamansa*) con la finalidad de obtener un alimento atractivo para la población vegana y que cumpla con sus necesidades nutrimentales. Además, se evaluará el contenido de metabolitos secundarios presentes en el pan después del horneado y durante su almacenamiento a condiciones controladas.

4.- OBJETIVOS

4.1.- Objetivo general

- Determinar parámetros fitoquímicos, proximales y microbiológicos en pan vegano adicionado con *Lactobacillus plantarum* y *Cnidoscolus aconitifolius*.

4.2.- Objetivos específicos

- Evaluar la supervivencia de *Lactobacillus plantarum* libre y encapsulado en los productos de panificación.
- Realizar análisis de metabolitos (fenoles y flavonoides) en el pan vegano y para la harina de *Cnidoscolus aconitifolius*.
- Determinar la actividad antioxidante en los productos de panificación y la harina de *Cnidoscolus aconitifolius*.

5.- MARCO TEÓRICO

5.1.- ALIMENTO

Los alimentos son sustancias que se ingieren para subsistir. De ellos se obtienen todos los elementos químicos que componen el organismo, excepto la parte del oxígeno tomada de la respiración. (28). La alimentación es el ingreso o aporte de los alimentos en el organismo humano. Es el proceso por el cual tomamos una serie de sustancias contenidas en el alimento que componen la dieta. Estas sustancias o nutrientes son imprescindibles para completar la nutrición (28).

Los nutrientes son sustancias presentes en los alimentos que son necesarios para el crecimiento, reparación y mantenimiento de nuestro cuerpo.

5.1.1.- Alimento funcional

Los alimentos funcionales son todos aquellos que tienen la capacidad de afectar de manera beneficiosa al organismo, en una o varias funciones, los cuales proporcionan beneficios al estado de salud. Estos alimentos, además, ejercen un papel preventivo ya que reducen los factores de riesgo que provocan aparición de enfermedades. Entre los alimentos funcionales más importantes se encuentran los alimentos enriquecidos.

Los alimentos funcionales deben consumirse dentro de una dieta sana y equilibrada y en las mismas cantidades en las que habitualmente se consumen los restos de los alimentos. Podemos encontrar diferentes productos como AF, tales como, cereales fortificados, leches fermentadas, panes enriquecidos, entre otros.

El interés actual radica en la relación entre alimentación y enfermedades crónicas no transmisibles, considerando los efectos de la nutrición sobre desarrollo cognitivo y psicomotor, inmunidad, crecimiento y composición corporal, entre otros. Los consumidores, conscientes de sus necesidades buscan en el mercado aquellos productos que contribuyan a su salud y bienestar. Siguiendo esta tendencia, reciben abundante información sobre las propiedades saludables de los alimentos, en especial de aquellos alimentos que ejercen una acción beneficiosa sobre algunos procesos fisiológicos y/o reducen el riesgo de padecer una enfermedad. Estos alimentos que promueven la salud han sido denominados Alimentos Funcionales (AF) y las empresas que los producen presentan una rápida expansión mundial.

Los AF son alimentos en los que algunos de sus componentes afectan funciones del organismo de manera específica y positiva, promoviendo un efecto fisiológico o psicológico más allá de su valor nutritivo tradicional. Dicho efecto puede ser contribuir a la mantención de la salud y bienestar, a la disminución del riesgo de enfermar, o ambas cosas (10).

5.1.2.- Alimento vegano

Un vegano es un sujeto que no ingiere productos alimenticios de origen animal. Al igual que los vegetarianos, los veganos no comen carne de ningún tipo (de cerdo, vaca, cordero, pescado, pollo, etc.) pero, a diferencia de los ovo-lácteos vegetarianos, tampoco consumen huevos, lácteos ni miel. La alimentación vegana se basa en el consumo de alimentos que no son de origen animal. Quien practica el veganismo normalmente lo hace por un doble motivo: porque considera que no es necesario para una vida saludable alimentarse con productos que provienen del mundo animal y, por otra parte, porque se trata también de un planteamiento vital basado en el respeto a los animales.

Las dietas veganas, bien planificadas, tienden a ser más ricas en fibra dietética, magnesio, ácido fólico (vitamina B₉), vitamina C, vitamina E y fitoquímicos, y más bajas en calorías, grasa saturada y colesterol. Sin embargo, como resultado de la eliminación de todos los productos de origen animal, pueden provocar importantes carencias nutricionales, principalmente vitamina B₁₂, vitamina D, calcio, ácidos grasos omega-3 y yodo, y en ocasiones hierro y zinc (Craig, W. 2009). La única forma de prevenir estas deficiencias nutricionales es mediante la elección de alimentos fortificados con estos nutrientes o la toma regular de suplementos.

Algunas investigaciones sobre el consumo de alimentos funcionales adicionados con otras harinas para enriquecer al alimento han demostrado que elevan el contenido de nutrientes en estos, como es el caso de galletas enriquecidas con moringa y otras especies de plantas tales como chaya, linaza, etc.

La elaboración de pan adicionado con polvos secos de vegetales ha permitido incrementar la calidad y las propiedades funcionales del pan. Algunos investigadores han incorporado plantas nativas como *Hypaene ghebaica* L. (China); bambara (*Vigna subterranea* (L.); ajonjolí (*Sesamun indicum*) en Egipto; *lupinus albusm* también en Egipto (70) entre otras.

5.2.- PAN

El pan se designa como el producto resultante de la cocción de una masa obtenida por la mezcla de harina de trigo, sal comestible y agua potable, fermentable por especies de microorganismos propios de la fermentación panaria, como el *Saccharomyces cerevisiae*. El pan proporciona carbohidratos en forma de almidón. También proporciona proteínas, aceites, fibras de celulosa y algunas vitaminas.

5.2.1.- Pan funcional

Los alimentos funcionales son aquéllos que proporcionan un efecto beneficioso para la salud más allá de su función básica nutricional. Resultan de la adición, sustitución o eliminación de ciertos componentes de los alimentos con la finalidad de reducir el riesgo de padecer enfermedades. De allí el interés en la búsqueda de nuevas fuentes como ingredientes en el desarrollo de alimentos que aporten estas características.

Los panes funcionales representan una alternativa interesante, por encontrarse el pan entre los alimentos más consumidos en muchos países. En Latinoamérica, Chile es el país de mayor consumo de pan, con valores de alrededor de 98 kg/hab/año. En Argentina, los valores son cercanos a los 72 kg/hab/año y la industria de panificación en México tiene un valor en el mercado de 6,500 millones de dólares y el consumo per cápita anual asciende a 34 kg.

Varios estudios muestran el uso de fuentes de fibra dietética en panes. Estos trabajos reflejan el interés por formular productos de consumo masivo enriquecidos con fibra dietética, ya que estos carbohidratos están asociados a la disminución del riesgo de ECNT tales como diabetes, enfermedades coronarias y del tracto intestinal.

5.2.2.- ASPECTOS GENERALES SOBRE EL PAN VEGANO

5.2.3.- COMPONENTES DEL PAN

5.2.3.1.- Harina de trigo

La harina es el componente más importante en la formulación de un producto de panificación. Se entiende por harina, al producto finamente triturado, obtenido de la molturación del grano de trigo maduro, sano y seco e industrialmente limpio. La harina es el mayor componente estructural de la masa, este ingrediente es responsable de las características visco-elásticas de la misma y de su capacidad de retener el gas, así como de formar la estructura.

La harina de trigo es una buena fuente de hidratos de carbono complejos. Su contenido en proteínas, lípidos, vitaminas, tales como tiamina, riboflavina y niacina, y minerales es relativamente importante. Entre las proteínas, la más representativa es el gluten, que confiere a harina la característica típica de elasticidad durante la panificación, para llegar a obtener un producto final poroso y esponjoso. Las proteínas no tienen un gran valor biológico, son deficientes en lisina y en treonina; sin embargo, actualmente las harinas se suelen enriquecer con estos aminoácidos y algunas vitaminas y minerales.

El contenido en proteínas varía según el tipo de trigo, época de cosecha y grado de extracción (proporción de grano completo que se emplea para obtener una cantidad determinada de harina). La harina integral, al tener un alto grado de extracción, por conservar la cubierta, el germen y la capa de aleurona, al no haber sido sometido el grano a un proceso de refinado, aporta mayor cantidad de proteínas, grasas (aceite en el germen), minerales, vitaminas del grupo B (particularmente de ácido fólico), pero sobre todo de fibra. Precisamente el mayor aporte en fibra resulta positivo para el organismo al favorecer el tránsito intestinal.

Por otro lado, un componente que destaca en el trigo es el ácido fítico, el cual se encuentra en la capa de aleurona; así, la harina integral que contiene salvado y aleurona podrá dificultar la absorción de determinados minerales, como hierro y calcio, presentes en la harina misma o en otros alimentos.

Tabla 1.- Composición de la harina blanca de trigo.

	Por 100 gr de porción comestible	Por ración (150 g)	Recomendaciones dia-hombre	Recomendaciones dia-mujer
Energía (Kcal)	368	36,8	3.000	2.300
Proteínas (g)	9,3	0,93	54	41
Lípidos totales (g)	14	1,4	<100	<77
AG saturados (g)	0,16	0,016	<23	<18
AG mono insaturados (g)	0,13	0,013	>57	>43
AG poliinsaturados (g)	0,51	0,051	10-20	8-15
ω-3 (g)	0,033	0,003	0,33-3,3	0,25-2,6
ω-6 (g)	0,48	0,048	1,3-16,5	1,2-10,4
Colesterol (mg)	0	0	<300	<230
Carbohidratos (g)	79,2	7,9	375-450	288-345
Fibra (g)	3,4	0,34	38	29
Agua (g)	6,1	0,61	1.000-2.000	1.000-2.000
Calcio (mg)	15	15	800	800
Hierro (mg)	1,1	1,1	10	18
Yodo (mg)	1	1	140	110
Magnesio (mg)	28	28	350	330
Zinc (mg)	0,8	0,8	15	15
Sodio (mg)	3	3	<2.400	<2.400
Potasio (mg)	130	130	3.500	3.500
Fosforo (mg)	120	120	700	700
Selenio (mg)	4	4	70	55
Tiamina (mg)	0,09	0,009	1,2	0,9
Riboflavina (mg)	0,06	0,006	1,8	1,4
Eq. Niacina (mg)	2,3	0,23	20	15
Vitamina B6 (mg)	0,15	0,015	1,8	1,6
Ácido fólico (ug)	22	2,2	400	400
Vitamina B12 (ug)	0	0	2	2
Vitamina C (mg)	0	0	60	60
Vitamina A: Eq. retinol (ug)	0	0	1.000	800
Vitamina C (mg)	0	0	5	5
Vitamina E (mg)	Tr	Tr	12	12

FUENTE: composición de alimentos. Moreira y col., 2007. (Harina blanca de trigo)

5.2.3.2.- Sal

Su principal característica es dar sabor a la masa de pan. El elevar la dosis en muchos casos es contraproducente ya que inhibe el trabajo de las células de levadura y por tanto frena la fermentación. Otra característica que se debe tener en cuenta es que si el agua utilizada es muy dura (con alta concentración de sales minerales) es aconsejable bajar la dosis de sal.

La sal actúa principalmente sobre la formación del gluten, ya que la gliadina, uno de sus dos componentes, tiene menos solubilidad en el agua con sal, lo que da lugar en una masa obtenida con agua salada a la formación de una mayor cantidad de glúten. La cantidad de sal influye también en la duración y estado de conservación del pan, debido a su capacidad higroscópica, (capacidad de absorber agua), ya que la sal tiende a adquirir la humedad del aire introduciéndola en el producto, si esta se encuentra en cantidades excesivas ejerce un efecto negativo sobre el tiempo de conservación. (20).

5.2.3.3.- Mejorantes.

Son agentes que se añaden en pequeñas cantidades como ingredientes del pan, con la intención de mejorar las características iniciales de la harina, referidas fundamentalmente al color, contenido en enzimas y características plásticas de la masa. El mejorante completo que normalmente emplea el panadero está compuesto de diacetil tartárico (E-472), ácido ascórbico (E-300) y enzimas α -amilasas. Esta mezcla de principios activos proporciona una gran expansión del pan en el horno. Cuando la subida del pan en la fase de cocción es exagerada se corre el riesgo de que el pan se arrugue durante el enfriamiento. Por tanto hay que moderar el uso de dichos mejorantes, consiguiendo el volumen durante la fermentación y no por la expansión del pan en el formado.

5.2.3.4.- Levaduras

Antes de nada debemos distinguir entre levadura biológica y gasificante, las primeras realizan la fermentación biológica del producto, transforma los azúcares en CO₂, alcohol etílico y energía, además de descomponer los azúcares complejos fermentables en otros más simples por mediación de la enzima Zymasa. Los gasificantes son productos empleados para provocar la hinchazón o elevación de la masa sin llegar a transformar ningún componente de la harina, en el modo que ocurre en la biológica. Son compuestos alcalinos como el bicarbonato amónico, sódico, etc. La levadura biológica es un hongo perteneciente al género de los hemiascomicetos y más especialmente a los miembros del género

Saccharomyces. No todas las levaduras son aptas para la panificación, la más utilizada por los panaderos es la Saccharomyces Cerevisiae. Estas son obtenidas industrialmente, cultivando razas puras en medios idóneos para su multiplicación y baratos, como son las melazas, que se acondicionan agregando otros nutrientes como fosfatos, sales minerales y mezclas de hidróxido amónico y sales de amonio.

5.2.3.5.- Salvado

Es el producto final que queda después de refinar el grano de trigo, de forma que se corresponde con las capas externas del grano (concretamente al pericarpio y sus diferentes subcapas, ricas en nutrientes esenciales).

En México, se producen entre 20 000 y 70 000 toneladas de salvado de maíz y trigo por mes, las cuales provienen de la producción de harina de maíz nixtamalizado y de harina de trigo respectivamente, las cuales se comercializan a bajo costo para la alimentación animal (INEGI, 2014).

Los compuestos fenólicos más abundantes en los cereales son los ácidos hidroxicinámicos, siendo el ácido ferúlico el principal, seguido por los ácidos diferúlicos y cumárico, también se ha reportado que 90 % del ácido ferúlico presente en los cereales se encuentra unido a arabinosilanos por medio de enlaces éster y el resto en forma libre (100, 56). El 98 % del total de ácido ferúlico se encuentra distribuido en los tejidos externos de los cereales, siendo la capa aleurona y el pericarpio externo los principales (58).

5.2.3.6.- Aceite de oliva

El aceite de oliva está formado por triacilgliceroles (98-99%). Además, contiene en muy bajas proporción otras moléculas lipídicas, como los fosfolípidos, y ácidos grasos libres; y numerosos compuestos de naturaleza química muy variada, como hidrocarburos, tocoferoles, alcoholes triterpenicos, esteroides, pigmentos, compuestos fenólicos y compuestos responsables del aroma pertenecientes al grupo de aldehídos, alcoholes y ésteres y otros.

La mayor parte de los ácidos grasos están presentes como triacilgliceroles.

Tabla 2.- Composición características básica de los ácidos grasos mayoritarios del aceite de oliva.

Ácidos grasos		Limites (%)
Palmítico	C 16:0	7.5-20
Palmitoléico	C 16:1	0.3-3.5
Estearico	C 18:0	0.5-5
Oleico	C 18:1	55-83
Linoleico	C 18:2	3.5-21
linolénico	C 18:3	≤ 1

Fuente: consejo oleícola internacional (IOOC) 2003.

En la siguiente se muestra un resumen de los componentes del aceite de oliva.

Tabla 3.- Componentes de la fracción minoritaria no glicérica del aceite de oliva.

Compuestos	Cantidad o proporción
Terpenos: Escualeno Carotenos	300-700 mg/g 0.5-10 mg/kg (expresado como β-caroteno)
Clorofilas	0 a 9.7 mg/kg
Tocoferoles: α- tocoferol β y γ-tocoferol δ-tocoferol	7-30 mg/100g ≥ 93% ≤ 10% del total de tocoferoles ≤ 1.5%
Esteroles: Campesterol Estigmasterol γ –sitoesterol+ Δ5 avanesterol	80-240 mg/100g 2-3% 1-2% 95-97%
Compuestos fenólicos	50-500 mg/kg (expresado como ácido caféico)
Otros: alcoholes, cetonas, éteres, esteres y derivados furánicos	

Fuente: *Mataix y martinez de victoria, 1988.*

5.2.3.7.- Leche de almendra.

Debido a que la leche de almendra es totalmente vegetal, natural y equilibrada, es sumamente nutritiva y saludable. No contiene aditivos ni conservadores, es rica en vitaminas A, D y E, proteínas, omega 6, zinc, calcio, hierro, magnesio y potasio, brindándole muchas ventajas al cuerpo.

Además tiene un contenido calórico más bajo que la leche de vaca, inclusive que las variedades como descremada y semidescremada, pues en la leche de vaca hay una mayor cantidad de colesterol. Mientras que un vaso de leche de almendras tiene alrededor de 70 calorías, un vaso de leche de vaca tiene aproximadamente 86 calorías.

Las personas que sufren de intolerancia a la lactosa padecen de dolor de estómago y otras incomodidades cuando consumen cualquier alimento que contenga lácteos, pues su cuerpo no produce la enzima necesaria para digerir la lactosa. La leche de almendra es una excelente alternativa para estos casos, ya que está libre de lactosa. Ayuda a mejorar los niveles de colesterol bueno y a reducir los niveles de colesterol malo y triglicéridos, además de fortalecer al corazón. Tiene un alto porcentaje en fibra, lo que ayuda a proteger la pared del intestino y color, y ayuda a regular la velocidad de absorción de azúcares, beneficiando la digestión y mejorando las condiciones gastrointestinales. Otra enorme ventaja es que contiene vitamina B2, la cual ayuda a las uñas y cabello a fortalecerse. Además esto mejora la hidratación de la piel (UNAM, 2015).

5.3.- PROBIÓTICOS.

El término “probiótico” fue introducido por primera vez en 1965 por Lilly y Stillwell; a diferencia de los antibióticos, los prebióticos fueron definidos como factores de origen microbiano que estimulan la proliferación de otros organismos. En 1989, Roy Fuller destacó el hecho que para considerarse probiótico, el microorganismo en cuestión debía estar presente en estado viable, e introdujo la idea de su efecto beneficioso sobre el huésped.

Tabla 4.- Definiciones utilizadas por asociaciones científicas para probiótico y prebiótico.

Probiótico	Microorganismo vivo que confiere un beneficio a la salud del huésped cuando se le administra en cantidades adecuadas.
Prebiótico	Ingredientes fermentados selectivamente que dan lugar a cambios selectivos en la composición y/o en la actividad de la flora gastrointestinal, confiriendo así beneficios a la salud del huésped

La flora del colon constituye un ecosistema donde muchas especies distintas participan de ciclos vitales interrelacionados o interdependientes, en un ámbito de gran biodiversidad. Unas especies viven de los productos generados por otras, y a su vez la actividad metabólica de las primeras beneficia la proliferación de terceras. Las bacterias de la flora están adaptadas a su hábitat, porque están asociadas con la vida del hombre desde hace milenios y han evolucionado junto con él (39).

Los probióticos son aquellos microorganismos vivos que, al ser agregados como suplemento en la dieta, afectan en forma beneficiosa al desarrollo de la flora microbiana en el intestino (31). Los probióticos estimulan las funciones protectoras del sistema digestivo. Son también conocidos como bioterapéuticos, bioprotectores o bioprofilácticos y se utilizan para prevenir las infecciones entéricas y gastrointestinales (82). Para que un microorganismo pueda realizar esta función de protección tiene que cumplir los postulados de Huchetson: ser habitante normal del intestino, tener un tiempo corto de reproducción, ser capaz de producir compuestos antimicrobianos y ser estable durante el proceso de producción, comercialización y distribución para que pueda llegar vivo al intestino (79). Es importante que estos microorganismos puedan ser capaces de atravesar la barrera gástrica para poder multiplicarse y colonizar el intestino. El efecto protector de estos microorganismos se realiza mediante 2 mecanismos: el antagonismo que impide la multiplicación de los patógenos y la producción de toxinas que imposibilitan su acción patogénica. Este antagonismo está dado por la competencia por los nutrientes o los sitios de adhesión. Mediante la inmuno-modulación protegen al huésped de las infecciones, induciendo a un aumento de la producción de inmunoglobulinas, aumento de la activación de las células mononucleares y de los linfocitos (82). Las bacterias ácido lácticas utilizan varios azúcares como la glucosa y la lactosa para la producción de

ácido acético mediante la fermentación. Algunas bacterias conocidas como anaerobias facultativas y otras como anaeróbicas obligadas pueden colonizar transitoriamente el intestino y sobrevivir durante el tránsito intestinal; además por su adhesión al epitelio, modifican la respuesta inmune local del hospedero (97). Está demostrada la eficacia de las bacterias vivas que se utilizan como fermentos lácticos en el tratamiento de los signos y síntomas que acompañan la intolerancia a la lactosa. Ha sido probado *in vitro* e *in vivo* el efecto de los probióticos en estados patológicos como diarreas, infecciones del sistema urinario, desórdenes inmunológicos, intolerancia a la lactosa, hipercolesterolemia, algunos tipos de cáncer y las alergias alimentarias (68).

5.3.1.- Probióticos en los alimentos.

Los microorganismos probióticos se utilizan sobre todo, aunque no exclusivamente, bacterias de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, y el número de alimentos probióticos puestos a disposición de los consumidores es cada vez mayor. Para comprender la importancia del concepto de alimento probiótico para la salud humana son necesarias algunas consideraciones ecológicas acerca de la flora intestinal. Las bacterias viven normalmente en el cuerpo humano (así como en el de los animales superiores y los insectos), incluido el aparato digestivo, donde existen más de 400 especies bacterianas: más de la mitad del peso de la materia que se encuentra en el colon corresponde a células bacterianas cuyo número es diez veces superior al de las células de los tejidos que constituyen el cuerpo humano.

El estómago contiene normalmente pocas bacterias (103 unidades formadoras de colonias por ml de jugo gástrico), mientras que la concentración bacteriana aumenta a lo largo del intestino hasta llegar a una concentración final en el colon de 10¹² bacterias/g. La colonización bacteriana del intestino comienza con el nacimiento, ya que los recién nacidos permanecen en un medio estéril hasta que comienza el parto, y continúa durante toda la vida, con cambios notables en función de la edad (64). Las bacterias, que forman la denominada microflora intestinal residente, no suelen tener efectos nocivos agudos, y se ha demostrado que algunas de ellas son necesarias para mantener el bienestar de su huésped.

Cabe citar como ejemplo de la función beneficiosa de la microflora intestinal lo que se ha denominado la "resistencia a la colonización" o "efecto de barrera", en referencia al mecanismo que utilizan las bacterias ya presentes en el intestino para mantener su presencia en ese medio y evitar la colonización de esas mismas zonas intestinales por microorganismos ingeridos recientemente, incluidos patógenos. Por consiguiente, cabe suponer que la manipulación alimentaria de la microflora intestinal con objeto de aumentar el número relativo de "bacterias beneficiosas" podría contribuir al bienestar del huésped.

Los microorganismos probióticos utilizados en los alimentos deberían ser capaces no sólo de sobrevivir al paso por el aparato digestivo, sino también de proliferar en

el intestino. Esto significa que deberían ser resistentes a los jugos gástricos y poder crecer en presencia de bilis, en las condiciones existentes en los intestinos, o ser consumidos en un alimento que, actuando como vehículo, les permita sobrevivir al paso por el estómago y a la exposición a la bilis.

La información reunida hasta la fecha indica que los lactobacilos se han utilizado desde hace tiempo como probióticos sin que se hayan determinado riesgos para los seres humanos, y ésta sigue siendo la mejor prueba de su inocuidad (96). Además, no se han encontrado propiedades patógenas o virulentas en lactobacilos, bífido bacterias o lactococos (7). A pesar de esto, la Consulta reconoció que, en ciertas condiciones, algunas cepas de lactobacilos han sido relacionadas con efectos perjudiciales, como por ejemplo raros casos de bacteriemia (96). Sin embargo, un estudio epidemiológico reciente sobre casos notificados de bacteriemia causada por lactobacilos, recogidos sistemáticamente en un país, ha demostrado que no se observa un aumento de la incidencia o la frecuencia de la bacteriemia cuando aumenta la utilización de lactobacilos probióticos (104).

Para garantizar que cualquier cultivo conserve sus propiedades beneficiosas, se debería mantener el material cultivado en condiciones apropiadas y comprobar periódicamente la identidad y las propiedades probióticas de la cepa. Por otra parte, se debería mantener la viabilidad y la actividad probiótica durante todo el proceso de elaboración, manipulación y almacenamiento del producto alimenticio que contiene el probiótico, verificándolas cuando concluya el período de conservación.

5.3.2.- Generalidades de la familia *Lactobacillus*.

5.3.2.1.- Bacterias ácido lácticas (BAL)

Las bacterias ácido lácticas son grupo Gram positivas, son ácido tolerantes, con actividad de catalasa negativa, anaerobias y no esporulantes, el ácido láctico es el mayor metabolito final producido durante la fermentación de carbohidratos (11). Esta bacteria se encuentra en un grupo heterogéneo de organismos con distintas capacidad metabólicas. Por esta razón, está altamente adaptados a una amplia gama de condiciones lo que los hace extremadamente exitosos en fermentaciones de alimentos. Las BAL son responsables de la fermentación de, leches, levaduras, yuca, verduras curtidas (36, 62, 26).

Las bacterias ácido lácticas incluyen cerca de 20 especies tales como, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Weisella*. *Lactobacillus* es el mayor de estos géneros con alrededor de 80 especies reconocidas (11; 63).

5.3.2.2.- *Lactobacillus plantarum*.

Lactobacillus spp. Ha sido dividido en tres grupos funcionales, dependiendo de sus habilidades de fermentación (47):

- Grupo I, homo-fermentativas obligadas: este grupo convierte hexosas a ácido láctico por medio de la ruta de glucolisis.
- Grupo II, hetero-fermentativas facultativas: este grupo usualmente fermenta hexosas convirtiéndoles en ácido láctico, pero bajo algunas condiciones extrañas, las hexosas pueden ser transformadas en mezclas de ácido láctico, dióxido de carbono y etanol. Las pentosas son fermentadas en ácido láctico y ácido acético por la ruta de fosfoetolasa.
- Grupo III, hetero-fermentativas obligadas: en este grupo *Lactobacillus* fermenta hexosas en mezclas de ácido láctico, dióxido de carbono y etanol. Las pentosas son convertidas a ácido láctico y ácido acético.

L. plantarum difiere de las otras bacterias de *Lactobacillus* spp. En los siguientes puntos:

- *L. plantarum* tiene un genoma relativamente largo en comparación con las otras especies de *Lactobacillus* spp. Esto indica una habilidad para adaptarse a diferentes condiciones (49).
- *L. plantarum* puede fermentar diferentes carbohidratos.
- *L. plantarum* tiene un alto requerimiento de manganeso para su crecimiento y puede almacenar altos niveles de manganeso de manera intracelular (9). El manganeso provee de defensa a *L. plantarum* contra el oxígeno tóxico, por reducción de radicales libres de oxígeno a peróxido de hidrogeno (9). La producción de peróxido de hidrogeno puede ser convertido a oxígeno y agua por cofactores pseudocatalasas de manganeso (52).
- *L. plantarum* tiene una alta tolerancia a pH bajos. Puede sobrevivir al viaje en tracto digestivo del humano bajo condiciones ácidas (45). También posee actividad de tanasa (77) y también son capaces de metabolizar ácidos fenólicos (13).

5.3.2.3.- *Lactobacillus plantarum* KY131967

Lactobacillus plantarum KY131967 es una bacteria ácido láctica que fue aislada de una bebida autóctona del estado de Chiapas (2). Este microorganismo ha sido evaluado *in vitro* (a nivel matraz) evidenciando interesantes atributos de importancia probiótica como una alta densidad poblacional (4.69×10^9 UFC/mL), tiempo de duplicación corto (1.16 ± 0.10 h), producción de ácido láctico (21.96 g/L), actividad positiva antimicrobiana contra patógenos (*E. coli*, *Salmonella typhimurium* y *Staphilococcus aureus*), alta supervivencia a condiciones gastrointestinales simuladas (81.59 %) y capacidad para disociar taurocolato de sodio (González, 2013). Otro estudio evaluó el crecimiento de *Lactobacillus plantarum* KY131967 en sistema de biorreactor de tanque agitado, éste estudio demostró una mejora en su crecimiento bajo condiciones de pH 6, una temperatura de 30°C y condiciones microaerófilas, reportando una densidad poblacional de 6.03×10^{10} UFC/mL y una producción de ácido láctico de 19.26 g/L (Gutiérrez et al 2014). Por otra parte, esta cepa fue evaluada *in vivo* demostrando su alta capacidad de colonizar el intestino de ratones BAL B/c (2.66×10^6 UFC/g), con una disminución de colesterol del 15.83 % y triglicéridos del 17.49 % en la sangre de estos roedores, además de no demostrar efecto tóxico alguno durante su administración diaria con dosis de hasta 1×10^{10} UFC/ml (Ramírez, 2015).

La misma bacteria, fue evaluada por Culej (2015), en cuanto al efecto de la temperatura, flujo de alimentación y porcentaje de maltodextrina en el soporte, durante el secado por aspersión, reportando que las condiciones óptimas son 159 °C, 3 ml/min y 10 % (p/v) de maltodextrina. Bajo estas condiciones se alcanza una eficiencia de microencapsulación del 76 %, supervivencia del 99% y a_w de 0.18, el autor concluye que la temperatura del aire de secado y el flujo de alimentación no tuvieron efecto estadístico significativo sobre la viabilidad celular, resultados que sugieren la resistencia térmica de *Lactobacillus plantarum* KY131967.

Por su parte Ramírez (2017) demostró que la cepa de *Lactobacillus plantarum* KY131967 sobrevivió almacenados en temperatura de 4°C y las UFC/g que se obtuvieron de la prueba para a los 8 meses de almacenamiento se encuentran entre los parámetros establecidos de un probiótico. La sobrevivencia varió entre del 85% y 95 % y resistencia gastrointestinal simulada varió entre de 75% y 95%.

5.4.- GENERALIDADES DE LA PLANTA

5.4.1.- Genero *Cnidoscolus*

La chaya pertenece a la sección *Calyptosolen* del género *Cnidoscolus*, el cual está cercanamente relacionado al mejor conocido género *Manihot*. Los dos géneros se encuentran dentro de la tribu *Manihoteae* de la subfamilia *Crotonoideae* de la *Euphorbiaceae* (112). Aunque *Cnidoscolus* ha sido comúnmente agrupado con *Jatropha*, es fácilmente separado del anterior por sus pelos urticantes, glándulas peciolares, y por tener una sola envoltura floral blanca (71).

5.4.2.- Hábitat y distribución geográfica

Se distribuye de manera natural desde la península de Yucatán, pasando por Guatemala, hasta la parte norte de Honduras. Crece desde el nivel del mar hasta los 1500 msnm en varios tipos de clima que son por lo general libres de heladas y con un nivel alto de precipitación. Naturalmente ocurre en diversos tipos de vegetación incluyendo secos y lluviosos, espinosos y bosques verdes. Frecuentemente es utilizado como cerco vivo, matorrales maderables, arroyos rocosos y dunas costaneras. Crece en suelos que van desde arcillas cafés hasta lateritas y en suelos derivados de roca madre ígnea y piedras limosas (66).

La chaya, una aportación de los mayas al mundo, es un arbusto domesticado la evidencia sugiere que la chaya era una planta importante para los antiguos mayas de la península de Yucatán y tal vez en otras partes de la región maya (66).

Es un arbusto que llega a medir hasta 3 m de alto, con ramillas delgadas de 1 cm de diámetro, corteza gruesa, casi blanca y pelillos un poco urticantes (90).

La chaya es resistente a la sequía por lo que es una valiosa cosecha en las zonas con corto periodo de lluvia, la propagación es simple y requiere poco mantenimiento, no hay enfermedad o plaga importante en la planta. Investigaciones realizadas en el género *Cnidoscolus* han dado a conocer que la chaya se adapta bien a regiones tropicales húmedas y secas (Retalhuleu, Suchitepéquez en Guatemala y en la península de Yucatán) con distintas clases de suelo; su crecimiento principia a los cuatro meses de haber sido sembrada y pueden ser podadas al año (93).

5.4.3.- Usos y propiedades

La hoja de chaya ha sido utilizada como alimento desde la época precolombina, lo cual fue documentado por Diego de Landa; las hojas eran utilizadas por los mayas para mezclarlas con maíz (25).

El interés en la hoja de chaya se debe a su excepcional composición química y nutricional, posee propiedades que permiten utilizarla como un alimento alternativo, por su excelente contenido de calcio, ácido ascórbico, hierro, retinol y proteína cruda, como medicina alternativa es utilizada en el tratamiento de enfermedades crónicas degenerativas como la diabetes y el cáncer, de esto deriva su reconocimiento como “la planta maravillosa” (69; 44, 94). La chaya tradicionalmente ha sido recomendada para una serie de enfermedades como obesidad, cálculos renales, hemorroides, acné, antiparasitario y problemas de los ojos; los brotes de chaya y las hojas se han tomado como laxante, diurético, lactógeno, estimulante de la circulación, de la digestión, y para endurecer las uñas, se emplea como protector hepático, ya que reduce en un 40 % el aumento de enzimas hepáticas (aspartato aminotransferasa AST, transaminasa glutámico pirúvica TGP), (80) también su látex es utilizado para eliminar verrugas. Se ha determinado que por su alto contenido en ácido ascórbico (vitamina C) actúa como un buen antioxidante, es por esto que se debe incluir entre el grupo de vegetales que proporcionan micronutrientes beneficiosos para la salud (76; 54).

Actualmente se consumen la hoja tierna en la cocina tradicional, aun sabiendo científicamente que la edad del brote no es significativa en su composición química (44), utilizando variadas formas de presentación, como ensaladas, guisos, sopas, infusiones y hasta refrescos (81). La concentración de vitamina C en el proceso de cocinado (fritura) no representa una baja significativa (29).

En la industria alimentaria se utiliza para la elaboración de queso y como suavizante de carnes, debido a la enzima proteolítica (33), se presume que esta enzima puede ser muy parecida a la encontrada en la yuca (linamarasa) que permite la liberación de HCN, cuando las hojas por acción mecánica son trituradas o fragmentas la enzima entra en contacto con el cianuro ligado, produciéndose la liberación del tóxico. En Chiquimula la infusión del *C. aconitifolius* conocida como shatate, es utilizada para calmar la diarrea (33).

5.4.4.- Composición química de las hojas de *Cnidoscolus aconitifolius*.

La composición química de las hojas de chaya (*C. aconitifolius*) es importante para la nutrición humana el contenido de vitamina C de la hoja es siete veces mayor que la naranja (59 mg/100 g de hoja fresca) y el limón (51 mg/100 g de hoja fresca) así como el contenido de proteína en base seca es superior al frijol (25 %). La vitamina C tiene un efecto protector, ya que reducen significativamente la probabilidad de padecer de cáncer de esófago, estómago, colon y de recto (66). *C. aconitifolius* es un fuente rica de antioxidantes naturales especialmente en las hojas crudas, los principales flavonoides aislados de esta especie fueron kaempferol-3-O-glucosido y el glucósido-quercetina-3-O, teniendo *C. aconitifolius* mayor cantidad de glucósidos flavonoides en comparación con *C. chayamansa* (53, 78).

El reconocido valor nutricional de la chaya ha motivado a muchos investigadores nacionales y extranjeros al estudio de este material vegetal, entre las investigaciones podemos mencionar que en Costa Rica se ha iniciado una investigación para rescatar algunos cultivos, el proyecto se inició con el análisis de tres plantas: el chicasquil (*C. aconitifolius*), las hojas de chaya (*C. chayamansa*) y el zorrillo (*Cestrum racemosum*) realizándoles análisis químicos en el laboratorio para determinar los componentes nutricionales y así saber el nivel de antioxidantes, fibra, proteína y carbohidratos. Los primeros resultados indican que el chicasquil y el zorrillo tienen niveles de fibra más altos que frutas como el higo y la anona, considerados muy ricos en fibra. El nivel de antioxidantes es alto en la chaya y el chicasquil. El chicasquil tiene 564 ORAC (unidad de medición de antioxidantes), y la chaya, 614 ORAC. Estos valores son superiores a los de frutas como el jorco o borjón. Lo que nos indica que estas hojas son alimentos funcionales que proporcionan nutrientes y protegen de enfermedades (92; 42).

5.5.- METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS.

Las plantas producen una gran cantidad y diversidad de compuestos orgánicos que no parecen tener una función directa en el crecimiento y desarrollo. Estas sustancias se conocen con el nombre de metabolitos secundarios, productos secundarios o productos naturales. Los metabolitos secundarios no tienen función reconocida o directa en los procesos de fotosíntesis, respiración, transporte de solutos, síntesis de proteínas, asimilación de nutrientes, diferenciación o formación de carbohidratos, proteínas y lípidos. Los metabolitos secundarios también difieren de los Metabolitos primarios (aminoácidos, nucleótidos, azúcares, acil lípidos) en que tienen una distribución restringida en el reino vegetal es decir, un metabolito secundario determinado se encuentran con frecuencia en una sola especie vegetal o grupo de especies relacionadas, mientras que los metabolitos primarios se encuentran en todo el reino vegetal. Se sintetizan en pequeñas cantidades y no de forma generalizada, estando a menudo su producción restringida a un determinado género de plantas, a una familia, o incluso a algunas especies. Algunos productos del metabolismo secundario tienen funciones ecológicas específicas como atrayentes o repelentes de animales. Muchos son pigmentos que proporcionan color a flores y frutos, jugando un papel esencial en la reproducción atrayendo a insectos polinizadores, o atrayendo a animales que van a utilizar los frutos como fuente de alimento, contribuyendo de esta forma a la dispersión de semillas. Otros compuestos tienen función protectora frente a predadores, actuando como repelentes, proporcionando a la planta sabores amargos, haciéndolas indigestas o venenosas. También intervienen en los mecanismos de defensa de las plantas frente a diferentes patógenos, actuando como pesticidas naturales. También es importante destacar tienen un importante y significativo valor medicinal y económico, derivado éste último de su uso en la industria cosmética, alimentaria, farmacéutica. Un gran número de estos productos naturales, que ya se usaban en la medicina antigua como remedios para combatir enfermedades, se utilizan en la actualidad como medicamentos, resinas, gomas, potenciadores de sabor, aromas, colorantes, etc.

Las principales rutas de biosíntesis de metabolitos secundarios derivan del metabolismo primario del carbono (105).

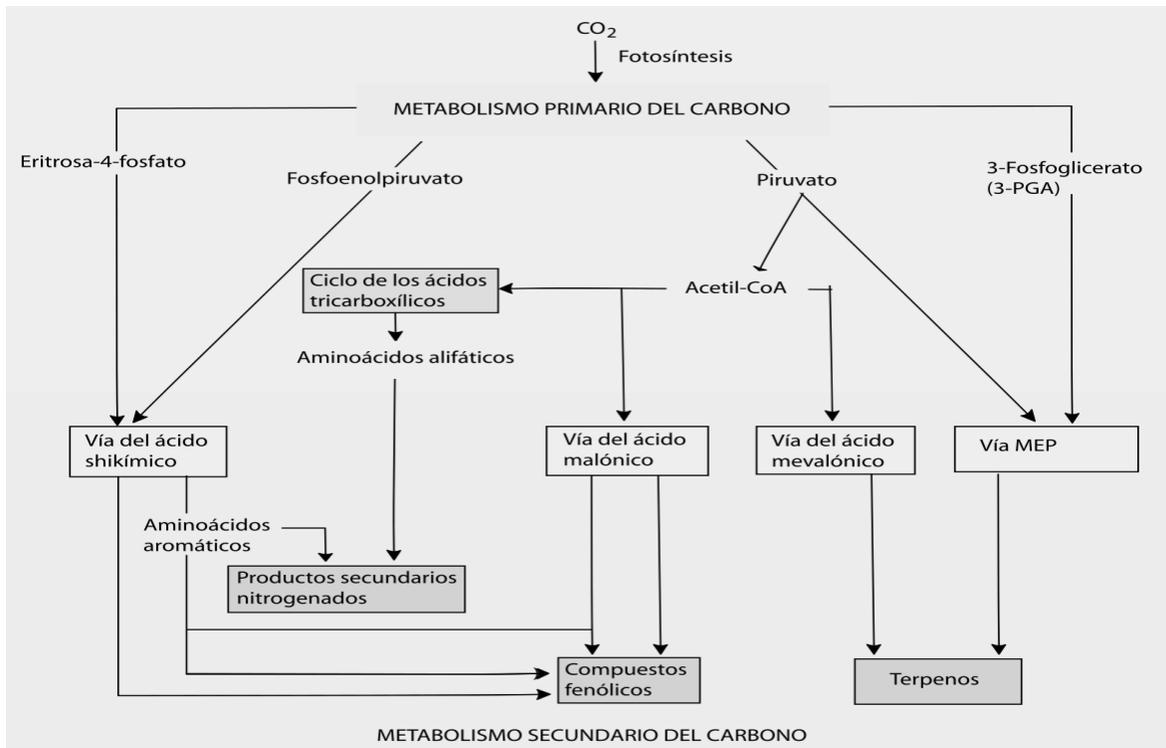


FIGURA 1.- Esquema de la principales rutas de biosíntesis de metabolitos secundarios y sus interrelaciones con el metabolismo primario. (105)

La clasificación de los metabolitos secundarios puede hacerse de acuerdo a sus estructuras, a su bioformación, a la fuente de producción o a su acción biológica. En relación al criterio biosintético, los metabolitos secundarios pueden ser clasificados de forma general en: Terpenos o terpenoides, compuestos fenólicos y sus derivados, y los compuestos nitrogenados o alcaloides, todos ellos, sintetizados a partir del CO₂, como fuente de carbono.

5.5.1.- Terpenos.

Constituyen el mayor grupo de productos secundarios, los diferentes compuestos de esta clase son generalmente insolubles en agua. Son biosintetizados a partir de acetil CoA o de intermediarios glicolíticos. Los terpenos y sus derivados, se encuentran en los aceites esenciales, resinas y ciertas partes de la plantas como las flores y frutos. La ruta biosintética de estos compuestos da lugar tanto a metabolitos primarios como secundarios de gran importancia para el crecimiento y supervivencia de las plantas (15).

5.5.2.- Alcaloides.

Los alcaloides son una gran familia de más de 15.000 metabolitos secundarios que contienen nitrógeno en su estructura, se encuentran habitualmente en las semillas, hojas y corteza de las plantas. En estas sustancias, el átomo de nitrógeno está formando parte de un anillo heterocíclico, un anillo que contiene átomos de nitrógeno y de carbono, tienen en común tres características: son solubles en agua, contienen al menos un átomo de nitrógeno en la molécula, y exhiben actividad biológica. Son sintetizados normalmente a partir de unos pocos aminoácidos comunes, como la lisina, tirosina y triptófano. Los alcaloides son muy conocidos por sus impresionantes efectos farmacológicos sobre animales vertebrados (34).

5.5.3.- Compuestos fenólicos.

Las plantas producen una gran variedad de productos secundarios que contienen un grupo fenol, un grupo funcional hidroxilo en un anillo aromático:

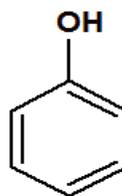


FIGURA 2.- Estructura de fenol simple.

Estas sustancias se clasifican como compuestos fenólicos. Los compuestos fenólicos de las plantas forman un grupo heterogéneo de 10000 compuestos, son solubles en compuestos orgánicos, otros son ácidos carboxílicos y glucósidos solubles en agua, mientras otros son grandes polímeros muy insolubles.

De acuerdo a su diversidad química los fenoles tienen funciones muy diversas en la plantas. Se puede clasificar los compuestos fenólicos según su complejidad química, entre los más importantes encontramos los siguientes grupos:

5.5.3.1.- Fenoles y ácidos fenólicos simples.

Se caracterizan por la presencia del esqueleto fenólico, que se compone de un anillo aromático con un grupo hidroxilo. Los más abundantes en la naturaleza son los derivados del ácido benzoico y el ácido cinámico. Se encuentran en vegetales y la mayor parte de las veces conjugados con ésteres o glicosidos. Los ácidos fenólicos se dividen en tres grupos.

- Derivados del ácido benzoico: que poseen 7 átomos de carbono (C6-C1) y son los más simples que se encuentran en la naturaleza.
- Derivados de los ácidos cinámicos: que poseen 9 átomos de carbono (C6-C3).
- Cumarinas: son compuestos derivados del ácido cinámico por ciclación de la cadena lateral del ácido o-cumarico y todos estos compuestos poseen un sustituyente hidroxilico en posición 7 libre o combinado con grupos metilo, azúcares, u otros funcionales.

5.5.4.- Flavonoides.

Los flavonoides son compuestos polifenólicos ampliamente distribuidos en la naturaleza, de los cuales se ha detectado aproximadamente 4000 estructuras diferentes. Se ubican principalmente en las hojas y en el exterior de las plantas.

Su esqueleto básico está formado por estructuras del tipo C6-C3-C5. La más básica consiste en dos anillos aromáticos unidos por una cadena alifática de tres carbonos, los cuales normalmente condensan para formar un anillo pirano y menos común un anillo furano.

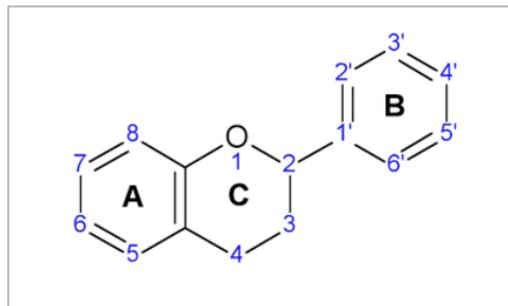


FIGURA 3.- Estructura básica de los flavonoides.

El anillo aromático que cicla el grupo c3 para formar el anillo pirano se denomina anillo A, el ciclopirano C, y el anillo restante se denomina anillo N. Los distintos grupos hidroxilo son añadidos, metilados, sulfatados o glicosilados en los procesos metabólicos de las plantas.

Los flavonoides se clasifican a partir de sus variaciones estructurales, dentro de estas las más destacables son las flavonas, isoflavonas, flavonoles, flavonols y antocianidinas.

A los flavonoles y flavonols se unen azúcares, preferentemente en la posición C3 y con menor frecuencia al C7 del anillo A, de forma que estos compuestos se encuentran comúnmente como O-glicosidos, siendo la D-glucosa el residuo de azúcar más frecuente. Los flavonoides también se pueden encontrar en forma polimérica, estando presentes en plantas, las frutas, legumbres y cereales (73).

5.5.6.- Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos.

El oxígeno está asociado a las condiciones de vida aerobia, representa la fuerza motriz para el mantenimiento del metabolismo y la viabilidad celular, al mismo tiempo que puede causar un peligro potencial debido a las especiales características de este gas, responsable de la formación de intermediarios parcialmente reducidos, dotados de una alta reactividad, llamados especies oxigenicas reactivas (ROS por sus siglas en ingles).

Las especies oxigenicas reactivas (ROS), formadas metabólicamente como intermediarios parcialmente reducidos, son especies moleculares activadas, dotadas de un electrón desapareado (Radical libre) en un nivel energético superior y por tanto dotadas de propiedades paramagnéticas que les confieren una alta e indiscriminada reactividad.

Las ROS producen diversas acciones sobre el metabolismo de los principios inmediatos, que pueden. En la actualidad son muchos los procesos relacionados con la producción de radicales libres como son: mutagénesis, transformación celular, cáncer, arteriosclerosis, infarto de miocardio, procesos de isquemia/reperfusión, diabetes, asfixia de neonato, enfermedades inflamatorias, trastornos del sistema nervioso central, envejecimiento, entre otros. Además, un creciente número de estudios soportan la teoría que el estrés oxidativo está envuelto en la progresión de VIH (65)

En la actualidad los compuestos fotoquímicos presentan un gran interés nutricional por su contribución al mantenimiento de la salud humana. Así, muchas de las propiedades beneficiosas descritas en los alimentos de origen vegetal, asociadas a la actividad antioxidante, están relacionadas con la presencia y con el contenido de compuestos fenólicos. Según los estudios de Rice-Evans y colaboradores (1996), junto con Fukumoto & Mazza (2000), los compuestos de mayor actividad antioxidante son los de estructura flavonoidea.

Según los estudio de Martínez-Flórez y colaboradores (2002) los flavonoides son pigmentos naturales, que se encuentran en los vegetales y protegen al organismo

de los daños causados por la oxidación y evitan la toxicidad de los metales pesados, esto se debe principalmente a su estructura química (43). La estructura fundamental de los flavonoides permite una multitud de patrones de sustitución.

Su acción antioxidante va a depender tanto del tipo de flavonoide como el número de monómeros que conforman su estructura, así como la presencia de distintas modificaciones o grupos funcionales y de su posición (73).

Los parámetros estructurales que afectan a la actividad antioxidante son:

- Grupos hidroxilo: la presencia y posición de grupos hidroxilo en distintas partes de la molécula va a influir notablemente en los mecanismos de actividad antioxidante. La capacidad de neutralización de radicales libres va a depender fundamentalmente de la reactividad de los sustituyentes hidroxilo.
- Doble enlace en las posiciones 2-3 y el grupo carbonilo 4: investigaciones mostraron que la capacidad antioxidante sobre un sistema microsomial se vio incrementada cuando el doble enlace se encontraba conjugado con un grupo carbonilo en la posición 4.
- Esterificación con grupos no glicosilicos: Es común la esterificación de los flavonoides con diversos ácidos orgánicos. Entre ellos el ácido gálico es el más frecuente unido a este tipo de sustancias, habitualmente en el grupo hidroxilo de la posición 3. Los flavonoides esterificados se denomina galatos.
- Esterificación con grupos glicosilo: las gliconas son antioxidantes más potentes que sus correspondientes glicosidos. La capacidad antioxidante de un flavonoide glicosilado depende de la estructura y posición del azúcar.
- Grado de polimerización: Estudios realizados sobre la relación entre el grado de polimerización de las procianidinas y la capacidad antioxidante de las mismas contra el anión superóxido encontraron que los dímeros y trímeros resultaron más efectivos que los flavonoides monoméricos contra el anión superóxido, de la misma manera, tetrámeros, hexámeros y heptámeros mostraron todavía mayor capacidad de neutralización del anión superóxido que dímeros y trímeros.
-

5.6.- ANÁLISIS PROXIMALES

Existen un número considerable de técnicas analíticas para determinar una propiedad particular del alimento. De ahí que es necesario seleccionar la más apropiada para la aplicación específica. La técnica seleccionada dependerá de la propiedad que sea medida, del tipo de alimento a analizar y la razón de llevar a cabo el análisis.

Las determinaciones que se realizan más frecuentemente para conocer la composición de los alimentos incluyen la determinación de humedad, cenizas, extracto etéreo (grasa cruda), proteína total, fibra y carbohidratos asimilables, en un protocolo conocido como Análisis Proximal. Así mismo, dependiendo del objetivo del análisis, resultan importantes las determinaciones relacionadas con la caracterización de algún grupo de nutrientes en particular, tal es el caso del análisis de carbohidratos en el que se podría considerar la diferenciación de los que presentan poder reductor, del contenido total. En el mismo sentido se podrían analizar las proteínas solubles o considerar la caracterización de los lípidos extraídos de un alimento.

5.6.1.- Humedad

Todos los alimentos, cualquiera que sea el método de industrialización a que hayan sido sometidos, contienen agua en mayor o menor proporción. Las cifras de contenido en agua varían entre un 60 y un 95% en los alimentos naturales. En los tejidos vegetales y animales, puede decirse que existe en dos formas generales: “agua libre” Y “agua ligada”. El agua libre o absorbida, que es la forma predominante, se libera con gran facilidad. El agua ligada se halla 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. (40).

Existen varias razones por las cuales, la mayoría de las industrias de alimentos determinan la humedad, las principales son las siguientes:

- El comprador de materias primas no desea adquirir agua en exceso.
- El agua, si está presente por encima de ciertos niveles, facilita el desarrollo de los microorganismos.
- Los materiales pulverulentos se aglomeran en presencia de agua, por ejemplo azúcar y sal.
- La cantidad de agua presente puede afectar la textura.
- La determinación del contenido en agua representa una vía sencilla para el control de la concentración en las distintas etapas de la fabricación de alimentos.

5.6.1.1.- Métodos de secado.

Los métodos de secado son los más comunes para valorar el contenido de humedad en los alimentos; se calcula el porcentaje en agua por la pérdida en peso debida a su eliminación por calentamiento bajo condiciones normalizadas. Aunque estos métodos dan buenos resultados que pueden interpretarse sobre bases de comparación, es preciso tener presente que a) algunas veces es difícil eliminar por secado toda la humedad presente; b) a cierta temperatura el alimento es susceptible de descomponerse, con lo que se volatilizan otras sustancias además de agua, y c) también pueden perderse otras materias volátiles aparte de agua. (48).

5.6.1.1.1.- Método por secado en estufa de vacío.

Se basa en el principio fisicoquímico que relaciona la presión de vapor con la presión del sistema a una temperatura dada. Si se abate la presión del sistema, se abate la presión de vapor y necesariamente se reduce su punto de ebullición. Si se sustrae aire de una estufa por medio de vacío se incrementa la velocidad del secado. Es necesario que la estufa tenga una salida de aire constante y que la presión no exceda los 100 mm Hg. y 70°C, de manera que la muestra no se descomponga y que no se evaporen los compuestos volátiles de la muestra, cuya presión de vapor también ha sido modificada (75).

5.6.1.1.2.- Método de secado en termo balanza.

Este método se basa en evaporar de manera continua la humedad de la muestra y el registro continuo de la pérdida de peso, hasta que la muestra se sitúe a peso constante. El error de pesada en este método se minimiza cuando la muestra no se expone constantemente al ambiente (75).

5.6.2.- Cenizas.

Las cenizas de un alimento son un término analítico equivalente al residuo inorgánico que queda después de calcinar la materia orgánica. Las cenizas normalmente, 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.

El valor principal de la determinación de cenizas (y también de las cenizas solubles en agua, la alcalinidad de las cenizas y las cenizas insolubles en ácido) es que

supone un método sencillo para determinar la calidad de ciertos alimentos, por ejemplo en las especias y en la gelatina es un inconveniente un alto contenido en cenizas. Las cenizas de los alimentos deberán estar comprendidas entre ciertos valores, lo cual facilitará en parte su identificación. (48).

En los vegetales predominan los derivados de potasio y en las cenizas animales los del sodio. El carbonato potásico se volatiliza apreciablemente a 700°C y se pierde casi por completo a 900°C. El carbonato sódico permanece inalterado a 700°C, pero sufre pérdidas considerables a 900°C. Los fosfatos y carbonatos reaccionan además entre sí. (40).

5.6.2.1.- Método de cenizas totales

La determinación en seco es el método más común para cuantificar la totalidad de minerales en alimentos y se basa en la descomposición de la materia orgánica quedando solamente materia inorgánica en la muestra, es eficiente ya que determina tanto cenizas solubles en agua, insolubles y solubles en medio ácido. En este método toda la materia orgánica se oxida en ausencia de flama a una temperatura que fluctúa entre los 550 -600°C; el material inorgánico que no se volatiliza a esta temperatura se conoce como ceniza. (75).

5.6.3.- Lípidos.

Los lípidos, junto con las proteínas y carbohidratos, constituyen los principales componentes estructurales de los alimentos. (74). Los lípidos se definen como un grupo heterogéneo de compuestos que son insolubles en agua pero solubles en disolventes orgánicos tales como éter, cloroformo, benceno o acetona. Todos los lípidos contienen carbón, hidrógeno y oxígeno, y algunos también contienen fósforo y nitrógeno (5). Los lípidos comprenden un grupo de sustancias que tienen propiedades comunes y similitudes en la composición, sin embargo algunos, tales como los triacilgliceroles son muy hidrofóbicos. Otros, tales como los di y monoacilgliceroles tienen movilidad hidrofóbica e hidrofílica en su molécula por lo que pueden ser solubles en disolventes relativamente polares (74)

5.6.3.1.- Métodos de extracción y cuantificación.

El contenido total de lípidos se determina comúnmente por métodos de extracción con disolventes orgánicos (por ejemplo Soxhlet, Goldfish, Mojonnier), sin embargo también puede cuantificarse por métodos de extracción que no incluyen disolventes (por ejemplo, Babcock, Gerber) y por métodos instrumentales que se basan en propiedades físicas o químicas de los lípidos (por ejemplo, infrarrojo, densidad y absorción es rayos X) (74).

5.6.3.1.1.- Método de Soxhlet.

Es una extracción semicontinua con un disolvente orgánico. En este método el disolvente se calienta, se volatiliza y condensa goteando sobre la muestra la cual queda sumergida en el disolvente.

Posteriormente éste es sifoneado al matraz de calentamiento para empezar de nuevo el proceso. El contenido de grasa se cuantifica por diferencia de peso (74).

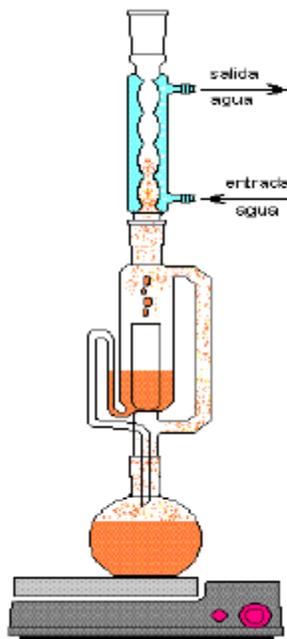


FIGURA 5.- Esquema de extracción Soxhlet.

5.6.4.- Método de Kjeldahl.

En el trabajo de rutina se determina mucho más frecuentemente la proteína total que las proteínas o aminoácidos individuales. En general, el procedimiento de referencia Kjeldahl determina la materia nitrogenada total, que incluye tanto las no proteínas como las proteínas verdaderas (5)

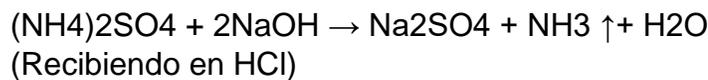
El método se basa en la determinación de la cantidad de Nitrógeno orgánico contenido en productos alimentarios, compromete dos pasos consecutivos:

- La descomposición de la materia orgánica bajo calentamiento en presencia de ácido sulfúrico concentrado.
- El registro de la cantidad de amoniaco obtenida de la muestra durante el proceso de descomposición ocurre la deshidratación y carbonización de la materia orgánica combinada con la oxidación de carbono a dióxido de carbono. El nitrógeno orgánico es transformado a amoniaco que se retiene en la disolución como sulfato de amonio. La recuperación del nitrógeno y velocidad del proceso pueden ser incrementados adicionando sales que abaten la temperatura de descomposición (sulfato de potasio) o por la adición de oxidantes (peróxido de hidrógeno, tetracloruro, persulfatos o ácido crómico) y por la adición de un catalizador. (75) El método de Kjeldahl consta de las siguientes etapas:

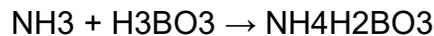
- Digestión



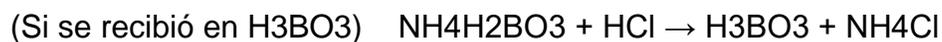
- Destilación



(Recibiendo en H₃BO₃)



- Titulación



En la mezcla de digestión se incluye sulfato sódico para aumentar el punto de ebullición y un catalizador para acelerar la reacción, tal como sulfato de cobre. El amoníaco en el Antología de Fundamentos 21 destilado se retiene o bien por un ácido normalizado y se valora por retroceso, o en ácido bórico y valora directamente.

El método Kjeldahl no determina, sin embargo, todas las formas de nitrógeno a menos que se modifiquen adecuadamente; esto incluye nitratos y nitritos. (Pearson, 1993).

Para convertir el nitrógeno a proteína se emplea el factor de 6.25 el cual proviene de la consideración de que la mayoría de las proteínas tienen una cantidad aproximada de 16% de nitrógeno.

$$\text{factor} = \frac{100g \text{ Proteína}}{16g \text{ Nitrógeno}} = 6.25$$

6.- METODOLOGÍA.

6.1.- Preparación de harinas vegetales.

La harina se elaboró empleando hojas de chaya (*Cnidioscolus aconitifolius*) adquiridas en el mercado de Terán en Tuxtla Gutiérrez Chiapas. Las hojas fueron lavadas con agua clorada (0.2 a 5 ppm) a exposición de 3 a 5 minutos a pH de 6.5 a 7.5.

La chaya (*Cnidioscolus aconitifolius*), se sometió un proceso de escaldado por 1.5 min a 100°C, posteriormente las hojas fueron secadas a la sombra, se molieron y tamizaron en malla N° 100 y fueron almacenadas herméticamente en frascos color ámbar bajo condiciones de refrigeración hasta su empleo.

6.2.- Cultivo de *Lactobacillus plantarum* KY131967 (Gutiérrez-Sarmiento, 2016).

6.2.1.- Cultivo en matraz.

En un matraz Erlenmeyer de 500 ml con 205 ml de caldo MRS (marca DIFCO), se inoculó el contenido de 2 tubos de ensaye que contienen 10 ml cada uno de *Lactobacillus plantarum* KY131967. El matraz fue incubado durante 8 h a 110 rpm en una agitadora THERMO SCIENTIFIC modelo MAXQ 2000 a temperatura ambiente (25 °C)

6.2.2.- Cultivo en Biorreactor.

El caldo microbiano del cultivo anterior se introdujo en un biorreactor de tanque agitado modelo Z611000310 (Applikon, Schiedam, The Netherlands) con 2.045 L de caldo MRS, el biorreactor está equipado con accesorios para control de agitación, aireación, temperatura y pH. Las condiciones de operación del biorreactor fueron de 300 rpm, 36°C, pH 6 (controlado mediante la adición de NaOH 5 M), con aireación de 0.25 vvm durante 8 Horas.

6.2.3.- Cosecha de la biomasa.

Al término del cultivo la biomasa producida en el fermentador fue cosechada por medio de centrifugación con una centrifuga Eppendorf modelo 5810R a 4000 rpm por 20 min a 4°C.

6.3.- Preparación de los agentes encapsulantes (Robles-Flores, 2015).

6.3.1.- Leche de soya.

La leche de soya se obtuvo de una proporción 7 L de agua por 1 kg de frijol de soya marca CEREPACK, el cual previamente se deberá hidratar con agua purificada cubriendo el nivel del frijol durante un tiempo de 12 h, al término de esta deberá drenar el líquido. Los granos fueron licuados para luego filtrar con ayuda de una tela de algodón (pañalina).

El líquido obtenido del filtrado se hirvió por 30 min, retirando la espuma generada durante la cocción de la leche. La leche de soya obtenida se dosificó en frascos para esterilizar a 13 lb/pulg² durante 10 min.

6.3.2.- Maltodextrina al 35%.

Se preparó la maltodextrina marca INAMALT al 35% en agua, evitando la formación de grumos, la mezcla se dejó reposar durante 15 h a temperatura ambiente (25°). Posteriormente la goma se depositó a un matraz para esterilizar a 15 lb/pulg² por 15 min

6.3.3.- Goma arábica al 7.5%.

Se preparó la goma arábica marca HYCEL al 7.5% en agua, evitando la formación de grumos, la mezcla se hidrató durante 15 h a temperatura ambiente (25°). Posteriormente la goma se depositó a un matraz para esterilizar a 15 lb/pulg² por 15 min.

6.4.- Preparación de la emulsión.

Se mezcló la leche de soya, inulina PREVENTY, goma arábica al 7.5%, maltodextrina al 35% y el pellet celular previamente cosechado. Para homogenizar se empleó el equipo IKA- Ultraturrax a 5200 rpm, durante 15 min. Se Conservó 1 ml de la emulsión para posteriormente sembrar en placa.

6.4.1.- Secado por aspersion.

La emulsión resultante se alimentó a un secador por aspersion escala laboratorio marca BÜCHI Mini Spray Dryer Modelo B-290 a una temperatura de entrada 160°C y un flujo continuo de 9 ml/min.

Las microcápsulas obtenidas se recuperaron del interior del ciclón y de la tolva de recepción, se pesó y se conservaron en bolsas metálicas herméticas selladas al vacío, empleando una selladora TORO REY modelo EVD8 y se almacenó a 4°C, hasta su empleo.

6.4.2.- Viabilidad del *Lactobacillus plantarum* KY131967.

La viabilidad de *L. plantarum* KY131967 en la emulsión se determinó mediante la técnica de siembra en placa. Para ello, se realizaron diluciones seriadas hasta el orden de 10⁻⁹ usando como medio agua peptonada estéril (15 g/L). Se realizó la siembra por duplicado de las últimas tres diluciones con un volumen de inóculo de 100 µL en cajas Petri con agar MRS (Dibico). Mismas que se incubaron a 35°C por 48h.

En el caso de la viabilidad en el polvo seco, se rehidrato 1 g de éste en 9 mL de agua peptonada estéril. La muestra se agitó en un vortex hasta obtener una suspensión homogénea y se realizó diluciones seriadas según se requiriera.

Se llevó a cabo la cuenta en placa y la determinación del porcentaje de sobrevivencia de *L. plantarum* KY131967, después del proceso de secado por aspersion se determinó mediante la siguiente ecuación.

$$\text{Sobrevivencia \%} = \frac{\log N}{\log Ni} * 100$$

Donde N será el número de colonias presentes después del secado y Ni el número de colonias determinados en la emulsión.

6.5.- Productos de panificación.

Los productos de panificación fueron elaborados con la siguiente formulación: 49.7% de harina, 14.3% agua, 3.3% levadura, 17.43% de leche de almendra, 1.6% sal, 4.8% aceite de oliva, 2.09% harina de maltan 2.09% salvado de trigo y 2.09% de mejorante. Los ingredientes son mezclados en una batidora marca Hamilton Beach. La masa obtenida se dejó reposar a temperatura 28 A 30 °C durante 30 minutos en moldes metálicos. Finalmente la masa fue horneada a 180°C durante 20 min. Se evaluaron sustituciones de harina de trigo por 0, 3 y 5 % de las harinas de hojas de chaya (*Cnidioscolus aconitifolius*), además de la carga microbiana de probiótico libre e inmovilizada a una concentración de alrededor de 4 X10⁶ UFC/g de producto final. Las unidades experimentales se almacenaron individualmente en empaques plásticos cerrados, los cuales se almacenaron en lugar fresco y seco, La preparación del pan se llevó a cabo con buenas prácticas de higiene de acuerdo a la norma NOM-120-SSA-1994 (Secretaría de Salud, 1994).

6.5.1.- Diseño experimental.

Los factores a estudiar serán: tipo de harina (chaya), porcentaje de sustitución de la harina en la mezcla (0, 3 y 5%) y la adición del microorganismo libre y micro encapsulado. Todos los resultados serán analizados mediante un análisis de varianza con un nivel de probabilidad de 0.05 y las medias serán comparadas mediante el análisis de LSD. El monitoreo se realizará terminado el horneado, a los 5 días y 10 días de almacenamiento.

6.6.- Análisis proximal de los productos de panificación.

6.6.1.- Cenizas

Este método se basa en la destrucción de la materia orgánica presente en la muestra por calcinación y determinación gravimétrica del residuo.

Se pesaron en crisoles 4 gr de cada muestra previamente secada y pulverizada en un mortero. Se pre calcinaron un parrilla marca Labconco Microdigistor kjeldahl hasta que las muestras obtuvieran un color negro. Enseguida los crisoles se pasaron a un horno marca COLE PALMER modelo Stable Temp a 550 °C y se dejaron durante 2 horas. Pasado ese tiempo se pre enfriaron a 100°C para posteriormente dejarlos en un desecador de 20 a 30 min. Finalmente cuando alcanzaron la temperatura ambiente se pesaron cada uno de los crisoles en una balanza analítica.

El porcentaje de cenizas totales se calculó con la siguiente ecuación:

$$\% \text{cenizas totales} = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \times 100$$

6.6.2.- Nitrógeno total

Se pesaron 0.15 gramos de muestra seca en papel arroz libre de nitrógeno, doblando cuidadosamente el papel evitando que se caiga la muestra, y se colocó en el matraz Kjeldahl (seco). Se adicionaron 0.5 gramos de muestra catalizadora (CuSO_4), 3 ml de ácido sulfúrico concentrado y 0.3 gramos de Sulfato de potasio para elevar el punto de ebullición del ácido sulfúrico. Se colocó el matraz en la parrilla de digestión marca Labconco Microdigistor kjeldahl comenzando a calentar a baja temperatura hasta alcanzar ebullición homogénea, en seguida se aumentó la temperatura; el matraz se giraba ocasionalmente. La digestión finalizaba hasta que la muestra obtuviera un color verde claro.

Terminada la digestión, se colocó la muestra digerida en un matraz de destilación de 500 ml, lavando el matraz Kjeldahl con pequeñas porciones de agua destilada. Se agregaron 200 ml de agua destilada al matraz de destilación y 15 ml de Hidróxido de sodio al 40%. El matraz se colocaba al sistema de destilación, en el cual, a la salida del refrigerante se adaptó una manguera con un tubo que se colocó dentro de un matraz Erlenmeyer y que contenía 10 ml de ácido bórico al 4% y dos gotas de indicador Shiro Tashiro(preparación).

El contenido de la destilación pasaba de un color azul a negro. La destilación se detenía cuando las primeras gotas del destilado hacían virar el color del indicador de violeta a verde. Posteriormente se tituló con una solución de ácido clorhídrico 0.1 N, hasta que la solución cambiara de verde a violeta.

El cálculo de % proteína y % nitrógeno aplicando las siguientes ecuaciones:

$$\% \text{ Nitrógeno} = \frac{\text{ml de HCl} \times N \times 0.014 \times 100}{\text{muestra en gramos}}$$

$$\% \text{ Proteínas} = \% \text{ Nitrógeno} \times \text{Factor}$$

6.7.- Preparación de los extractos vegetales.

Se pesaron 2 g de la harina de Chipilín y se colocaron en tubos Falcon de 50 ml. Dado que los compuestos fenólicos y flavonoides son de naturaleza polar se utilizó metanol para su extracción en un volumen de 10 ml. Con el fin de liberar los compuestos fenólicos contenidos en la membrana celular la mezcla fue sometida a sonicación en un sonicador marca Cole palmer modelo 08855-00 durante 2 horas a una temperatura de 10 °C, y posteriormente se centrifugo a 3000 rpm durante 10 min a 4 °C con una centrifuga marca Eppendorf modelo 5810R. Se almaceno a -20 °C cubriéndolos de la luz hasta su uso.

6.8.- Obtención del extracto de pan (Chlopicka et al, 2012).

Se tomaron 2 gramos de muestra previamente seca y pulverizada en tubos Falcon de 50 ml. Las muestras fueron extraídas por dos horas con 20 ml de solvente compuesto de una mezcla de metanol, HCl 0.16 M y agua en una proporción 8:1:1 respectivamente. Posteriormente el extracto fue separado por decantación y los residuos sólidos fueron extraídos de nuevo con 20 ml de acetona al 70% durante dos horas. Se añadió el extracto metanólico inicial para preparar una mezcla, la cual se procedió a centrifugar a 4000 rpm durante 10 min a -4 °C en una centrifuga marca Eppendorf modelo 5810R. Luego el sobrenadante fue almacenado a -20 °C hasta su empleo.

6.9.- Análisis cuantitativo de metabolitos secundarios por espectrofotometría de adsorción de luz visible.

6.9.1.- Cuantificación de fenoles totales.

La concentración de fenoles totales se determinó por el método escrito por Singleton (1999) con modificaciones, utilizando ácido gálico como estándar. Este método se fundamenta en el empleo del reactivo de Folin-Ciocalteu, que mezcla ácidos fosfotúngstico y fosfomolibdico, los cuales se reducen para oxidar a los fenoles, en una mezcla de óxido de tungsteno y molibdeno, transformando la solución a color azul. Esta coloración presenta su absorción máxima alrededor de los 765 nm y es proporcional a la concentración de compuestos fenólicos en la muestra.

A 0.1 ml de extracto o estándar correspondiente se añadieron 7.9 ml de agua destilada y 0.5 ml de reactivo de Folin-Ciocalteu, la mezcla se agitó vigorosamente con la ayuda de un vortex y después de 5 minutos se agregó 1.5 mL de solución acuosa de carbonato de sodio al 20% agitando nuevamente.

La mezcla se dejó en reposo a oscuridad total durante 2 horas, posteriormente se determinó la absorbancia de la muestra a una longitud de onda de 765 nm en un espectrofotómetro marca COLE PARMER. Los resultados se expresan como mg equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto o polvo (mg equiv. ácido Gálico/g harina de chaya).

6.9.2.- Cuantificación de flavonoides.

Para determinar el contenido de flavonoides totales se utilizó la formación del complejo flavonoides- AlCl_3 en medio metanólico (Chang et al., 2002).

A 0.5 ml de muestra diluida se agregaron 1.5 ml de etanol puro, 0.1 ml de AlCl_3 al 10%, 0.1 ml de acetato de potasio 1M y 2.8 ml de agua destilada. La cantidad de Cloruro de aluminio al 10% y de muestra se sustituye por la misma cantidad de agua destilada para el blanco. La concentración de flavonoides se expresó como mg equivalentes de quercetina $\cdot\text{mL}^{-1}$, con base a la curva estándar obtenida a diferentes concentraciones a partir de una solución patrón de 0.1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de Quercetina en etanol A.C.S.

Se dejó reaccionar por 30 minutos a temperatura ambiente y en total oscuridad. Posteriormente se leyó la absorbancia a 415 nm.

6.10.- Barrido espectral de DPPH y barrido de ácido ascórbico.

Se realizó un barrido espectral de DPPH 300 μM en metanol, empleando soluciones de ácido ascórbico a una concentración final de 11.36, 28.4, 56.8, 85.2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Las lecturas de absorbancia se leyeron cada 5 minutos hasta llegar al tiempo 40 en un espectrofotómetro modelo COLE PALMER, a una longitud de onda de 545 nm.

A su vez también se realizó un barrido de diferentes concentraciones de ácido ascórbico para conocer las concentraciones óptimas para realizar la curva estándar en el equipo usado bajo nuestras condiciones, las lecturas se hicieron con la longitud de onda a 545 nm.

Todo lo anterior se manejó en condiciones de oscuridad y la preparación de ácido ascórbico se realizó en un baño de hielo.

6.10.1- Evaluación de actividad antioxidante.

La capacidad antioxidante se determinó con el método de DPPH, (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate) de acuerdo a lo reportado por Mensor (2001) con modificaciones. Se preparó en un frasco ámbar una solución madre de ácido ascórbico [1 mg/ml], la cual durante su preparación se mantuvo en baño de hielo y en total oscuridad. A partir de esta solución se realizaron soluciones a una concentración final de 1, 2, 10, 20, 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ en metanol. De las soluciones preparadas se realizaron tubos muestra tomando una alícuota de 2.5 ml a un tubo de ensayo añadiéndole 1 ml de solución DPPH \cdot a una concentración de 0.3 mM (previamente preparada) por duplicado. Se dejó reposar por 30 minutos en oscuridad. Una vez transcurrido el tiempo se procedió a leer absorbancia a 545 nm en un espectrofotómetro modelo COLE PALMER.

Los resultados se convirtieron en porcentaje de actividad antioxidante (% AA) usando la siguiente ecuación:

$$\text{AA}\% = 100 - \frac{(\text{Abs muestra} - \text{Abs blanco}) * 100}{\text{Abs control}}$$

Se utilizó para cada muestra, como blanco 2.5 mL de la solución, según corresponda, más 1 mL de metanol. Como control negativo a 2.5 mL de metanol se le adicionó 1 mL de la solución DPPH \cdot y se calibró el equipo con metanol.

6.11.- Sobrevivencia de *Lactobacillus plantarum* KY131967 en los productos de panificación.

Para la evaluación de la sobrevivencia del *L. plantarum* KY131967 de los productos de panificación, se tomó 1 g de cada pan y se agregó en 9 mL de agua peptonada estéril (15g/L). La muestra se agitó en un vortex hasta obtener una suspensión homogénea y se realizaron diluciones seriadas y siembra en placa con agar MRS según se requiera.

Se llevó a cabo el conteo de las unidades formadoras de colonias (UFC) y el porcentaje de sobrevivencia de *L. plantarum* KY131967 antes y después del proceso de horneado y durante el almacenamiento, la sobrevivencia se determinó mediante la siguiente ecuación.

$$\text{Sobrevivencia \%} = \frac{\log N}{\log N_i} * 100$$

Donde N es el número de colonias presentes antes del horneado y Ni el número de colonias determinados después del horneado o durante el monitoreo

7.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

7.1.- RENDIMIENTO DE LA HARINA.

Por cada 6.4kg de hoja fresca de chaya se obtiene 1.6 kg de harina, con un rendimiento del 25%

7.2.- RENDIMIENTO DEL FERMENTADOR.

7.3.- PORCENTAJE DE VIABILIDAD EN EL ENCAPSULADO.

Tabla 5.- Viabilidad de *L. plantarum* después de la encapsulación.

lote	UFC/g en la emulsión	UFC/g en el polvo	Sobrevivencia %
1	6.933×10^{10}	8.433×10^{10}	100
2	1.095×10^{11}	5.000×10^{10}	94
3	8.166×10^{10}	5.066×10^{10}	97

Ramírez en 2017 evaluó la viabilidad de las micro cápsulas obtenidas utilizando leche de soya, maltodextrina y obtuvo una sobrevivencia de 85%-95%. Comparando lo obtenido con nuestro encapsulado se puede observar en la tabla 5 que nuestra sobrevivencia fue de un promedio de 97% por lo tanto la técnica de encapsulado utilizada es óptima para obtener una buena sobrevivencia.

7.4.- PRODUCTOS DE PANIFICACIÓN.

Tabla 6.- Formulación de los panes.

Ingredientes del pan	cantidad	
Sal	15 g	15 g
Aceite	50.33 ml	50.33 ml
Leche	166.6 ml	166.6 ml
Mejorante	20 g	20 g
Levadura	30 g	30 g
Salvado	20 g	20 g
Harina de malta	20 g	20 g
Agua	125 ml	125 ml
Harina de trigo	450 g	450 g
BAL	50 g	50 g
Harina vegetal	15 gr (3%)	25 gr (5%)
Masa cruda	907 g	899 g
Pan	822.9 g	839.6 g

7.5.- ANALISIS PROXIMALES.

Tabla 7.- Contenido de los análisis proximales.

ANALISIS PROXIMALES						
PAN	0%		3%		5%	
Tiempo (días)	t0	t5	t0	t5	t0	t5
Humedad (%)	24.31±0.18a	23.14±0.15a	24.79±0.18a	22.03±0.15a	21.25±0.23a	24.96±0.12a
Cenizas (%)	5±4.58E-14a	5±4.58E-14a	5±4.58E-14a	5±4.58E-14a	5±4.58E-14a	5±4.58E-14a
Proteína (%)	7.25±0.070a	7.175±0.10a	8.39±0.056b	8.33±0.028b	9.28±0.123c	9.56±0.08c

Método: 95.0 porcentaje LSD

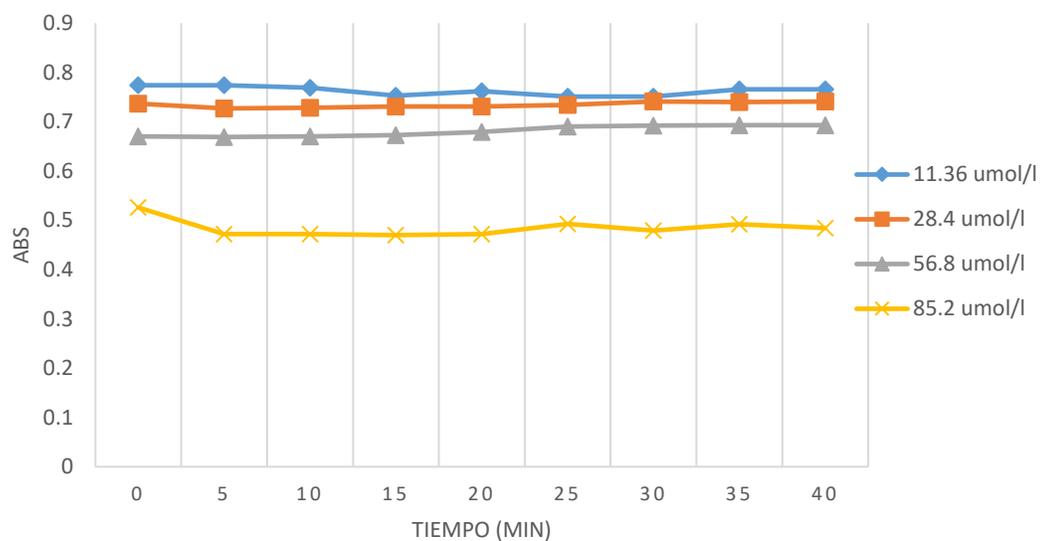
Para el caso de la harina de chaya se han reportado diferentes contenidos de proteína, tales como; Zouza en 1950 reporta 8.25% de proteína, mientras que garza en 1984 reporta 26.68% de proteínas, por otra parte Pérez en 1948 reporta solamente 5.7% de proteína. Esto se debe a que las plantas en cuestión se desarrollaron bajo diferentes condiciones, lo que afecta la producción de estos compuestos. Por lo que el contenido de proteína para la chaya en este trabajo se encuentra dentro los valores reportados.

Como se puede observar en la tabla 7 hay una diferencia estadística significativa en el contenido de proteína entre los panes de acuerdo al porcentaje de harina agregada pero comparando con valores reportados de panes elaborados con harina de trigo reportan 9.4% de proteínas (21) lo cual nos indica que el contenido de proteína que aporta la chaya no es bueno, puesto no ejerce un efecto favorable, ya que panes sin ningún agregado posee el mismo contenido de proteínas. Para el contenido cenizas se reportan valores de entre 3% a 6%, que comparando con lo obtenido se encuentra dentro de los valores normales.

7.6.- CONTENIDO DE FENOLES, FLAVONOIDES Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.

7.6.1.- Barrido de DPPH

Grafica 1.- Barrido de espectral de DPPHA a diferentes concentraciones de ácido ascórbico.



7.6.2.- Barrido de ácido ascórbico.

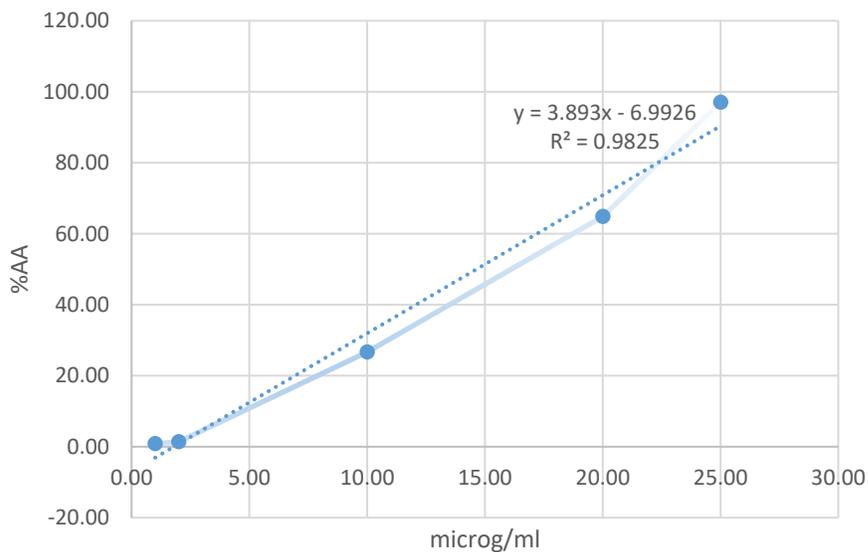
Tabla 8.- Barrido espectral para encontrar las concentraciones óptimas para la realización de la curva estándar.

Ácido ascórbico [µg/ml]	Control positivo	Control negativo	Promedio abs	AA%
0.2	0.009	0.736	0.727	2.514
0.5	0.009	0.736	0.728	2.310
1	0.013	0.736	0.743	0.815
2	0.011	0.736	0.737	1.427
5	0.011	0.736	0.717	4.144
10	0.010	0.736	0.550	26.698
15	0.009	0.736	0.412	45.380
20	0.009	0.736	0.241	64.878
25	0.010	0.736	0.032	97.011
30	0.010	0.736	0.025	97.962
35	0.010	0.736	0.026	97.826
40	0.010	0.736	0.024	98.166

7.6.3.- Curvas de calibración.

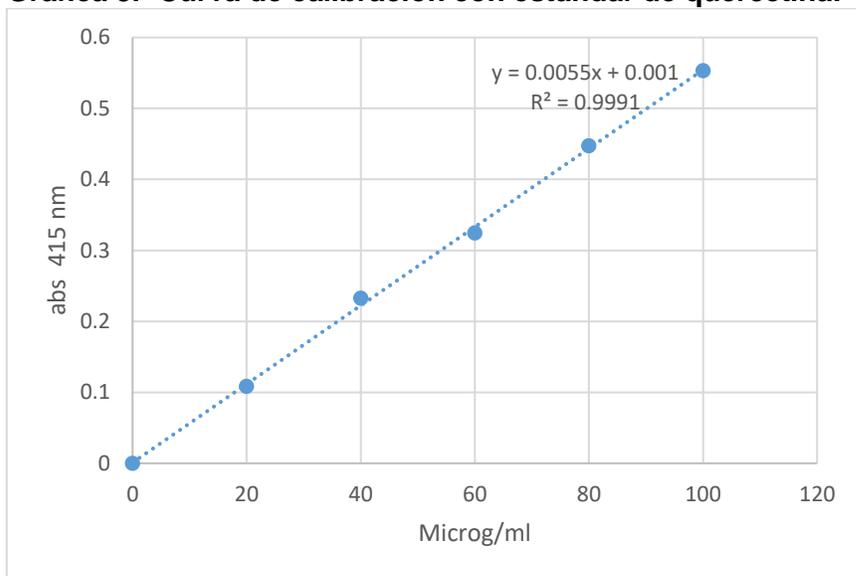
7.6.3.1.- Curva de actividad antioxidante.

Grafica 2.- Curva de calibración con estándar de ácido ascórbico.



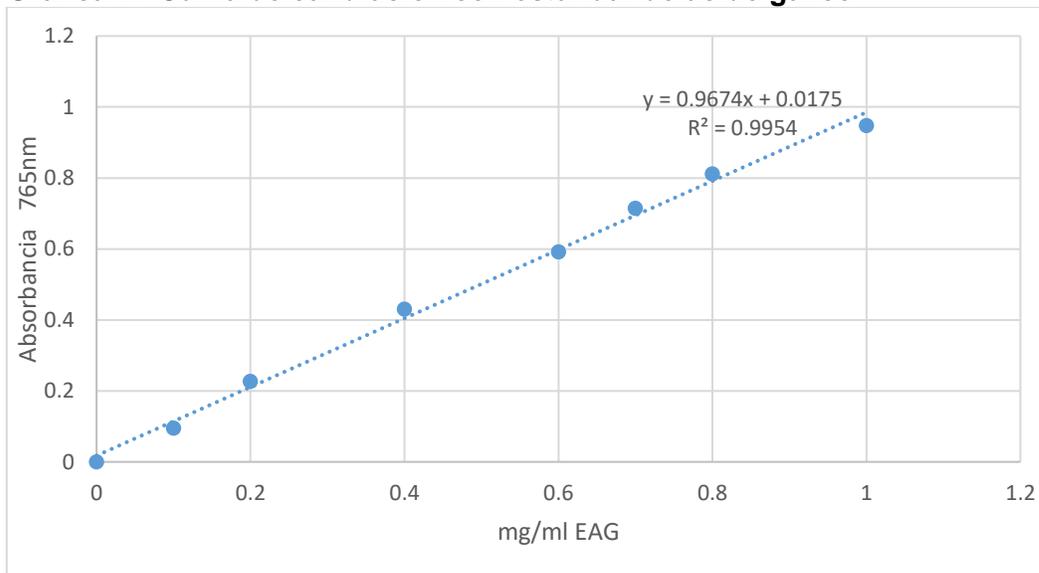
7.6.3.2.- Curva de flavonoides.

Grafica 3.- Curva de calibración con estándar de quercetina.



7.6.3.3.- Curva de fenoles.

Grafica 4.- Curva de calibración con estándar de ácido gálico



7.6.4.- Contenido de fenoles y flavonoides.

Tabla 9.- Valores obtenidos para fenoles y flavonoides en panes y en harina de chaya.

Fenoles (mg Eq AG/ g PS)						
Harina de chaya	9.714±0.021(mg Eq AG/ g HS)					
Porcentaje en panes	0%		3%		5%	
tiempo	t0	t5	t0	t5	t0	t5
Valor obtenido	1.742±0.078a	1.571a±0.003a	1.571a±0.184a	1.440a±0.301a	2.081b±0.375b	2.074b±0.330b
Valor esperado	-	-	0.2354	0.2272	0.3673	0.3847
Flavonoides (mg Eq Quer/ g PS)						
Harina de chaya	14.955±0.004 (mg Eq Quer/ g HS)					
Porcentaje en panes	0%		3%		5%	
tiempo	t0	t5	t0	t5	t0	t5
Valor obtenido	0.2901±0.175a	0.356±0.166a	0.607±0.113b	0.674±0.056b	0.855±0.111c	0.947±0.129c
Valor esperado	-	-	0.3865	0.3731	0.6030	0.6318

Método: 95.0 porcentaje LSD

Se han reportado un contenido de fenoles del 5.7 mg Eq AG/ gr y flavonoides de 0.33 mg Eq Cat/g (24) para la planta de chaya, que comparado con lo obtenido en este trabajo supera los valores reportados, la diferencia en el contenido de metabolitos se puede deber a diferentes factores a la que la planta fue sometida o bajo las condiciones en que se desarrolló tales como, clima, tipo de suelo, estación del año; así como también la especie y la parte de la planta usada en la extracción, entre otros de los factores que afectan son las técnicas empleadas y las condiciones de estas y el tratamiento que se le dio a la planta (secado, almacenamiento, etc.) (85, 107).

Para panes con harinas de amaranto se reportan valores de 2.61mg AG/g en relación de 30g /100g para fenoles y en el caso de flavonoides se reporta 34.9 ug cat/g en relación 30g /100g (22), y al igual que otros estudios al compararlos con los valores obtenidos en este trabajo, estos los superan por mucho. Con el análisis estadístico se logró determinar que el 5% de agregado de harina de chaya al pan es el único que tiene diferencia entre los otros dos tratamientos, siendo esto favorable para el pan.

7.6.5.- Actividad antioxidante

Tabla 10.- Actividad antioxidante para los panes 0%, 3%, y 5% en el tiempo 0 y 5 (días).

Actividad antioxidante (mg Eq AA/ g PS)		
Tiempo (días)	t0	t5
Pan 0%	1.8a	0.65a
Pan 3%	2.5b	2.65b
Pan 5%	2.71b	2.53b

Método: 95.0 porcentaje LSD

El contenido de actividad antioxidante encontrado en la harina de chaya fue de 0.27 mg Eq AA/ g harina seca, que de acuerdo con lo reportado por Joanna Chlopicka et al. en 2011 cuyos valores fueron de 2.4 mg Eq AA/g de harina de chaya, nos indica que nuestra planta posee una baja actividad antioxidante. Para los panes la actividad antioxidante aumenta considerablemente y se puede observar en la tabla 10 que el pan sin haber agregado harina de chaya posee un mayor contenido de equivalentes de ácido ascórbico, esto se debe a la naturaleza de los ingredientes usados en la elaboración del pan, como por ejemplo para la harina de trigo junto con la levadura han demostrado tener una alta actividad antioxidante, en la misma tabla podemos observar que al agregar la harina de chaya existe un aumento en la concentración de equivalentes de ácido ascórbico lo que hace que tenga mayor actividad antioxidante, superando así a panes formulados con harina de trigo y también panes con harina de quínoa y amaranto reportado por Joanna Chlopicka et al. en 2011.

7.7.- SOBREVIVENCIA.

Tabla 11.- Sobrevivencia de *L. plantarum* después del horneado.

Pan con harina de chaya	UFC/g en el polvo	UFC/g en la masa de pan	Sobrevivencia
0%	8.433×10^9	-----	-----
3%	5.000×10^9	2.73×10^9	86%
5%	5.066×10^9	8×10^8	81%

En la tabla 11 se puede observar que la sobrevivencia de Bal en el polvo y el en la masa cruda fue de 86% y 81% respectivamente, pero después del horneado del pan no se obtiene ninguna sobrevivencia.

De acuerdo a otros estudios realizados por M. SEYEDAIN-ARDABILI *et al* en 2016 donde analiza bollos de hamburguesa y pan blanco bajo las condiciones de horneado de 180°C durante 20 min para los dos tipos de panes, muestra un sobrevivencia de 99.8%, usando alginato y quitosano como agentes encapsulantes, sin mostrar ninguna diferencia sobre la sobrevivencia entre estos dos.

Las condiciones de horneado pan el pan de chaya y los panes estudiados por SEYEDAIN son muy semejantes, por lo que la pérdida total de la sobrevivencia en los panes de chaya se le atribuye a la naturaleza de los agentes encapsulantes, puesto que los materiales usados para la encapsulación deben tener diferentes requisitos para considerarse un encapsulante, como características físicas, puesto que deben soportar tratamientos mecánicos y térmicos, así como también la porosidad del material para retener el concentrado celular (110).

7.8.- CONCLUSIONES.

De acuerdo a los datos obtenidos en el caso de contenido de cenizas y humedad se encuentran dentro lo reportado por otros autores. Por otra parte el contenido de proteínas se encuentra una diferencia estadística significativa entre los panes de 0%, 3% y 5%, tomando en cuenta esto, la planta de chaya para los porcentajes de harina agregada de 3% y 5% está mejorando el contenido de proteínas con respecto al pan de 0%, pero de acuerdo a lo reportado con otros panes blancos o integrales, el contenido de proteínas de estos varían de un rango de entre 10% a 20% como lo reporta Chagman en 2010, por lo que para el pan blanco al agregarle harina de chaya en los porcentajes usados en este proyecto si ejerce un efecto favorable respecto al contenido de proteínas, pero en comparación con otros panes posee un contenido bajo de proteína, para el contenido de fenoles y flavonoides se supera los valores reportados por Joanna chlopicka y colaboradores en 2011, en panes adicionados con diferentes harinas, por lo que la planta de *C. aconitifolius* es rica en su contenido fitoquímico, así como también los panes poseen una gran actividad antioxidante al agregarle harina de chaya. En la evaluación microbiológica, no se obtuvo ninguna sobrevivencia de *L. plantarum* en los panes después del horneado. En conclusión el pan vegano adicionado con *C. aconitifolius* es una fuente rica en nutrientes y tiene un alto contenido de fenoles, flavonoides y actividad antioxidante los cuales tienen efectos beneficiosos en la salud del consumidor; todo esto hace que la dieta del individuo pueda ser complementada, por el pan adicionado con chaya, por lo que se considera un alimento funcional, mas no se considera un alimento probiótico, puesto que el microorganismo en cuestión no sobrevivió al proceso de cocción.

7.9.- RECOMENDACIONES

- Cultivar a la planta bajo condiciones controladas de crecimiento.
- Probar con otros encapsulantes más resistentes al proceso de cocción.
- Estandarizar de manera meticulosa la elaboración del pan.

7.10- COMPETENCIAS DESARROLLADAS Y/O APLICADAS

- **Análisis de problemas**
- **Análisis numérico**
- **Capacidad crítica**
- **Creatividad**
- **Compromiso**
- **Tolerancia al estrés**
- **Trabajo en equipo**
- **Planeación y organización**

8.- ANEXOS.

A. Preparación del indicador Shiro Tashiro:

Pesar 0.2 gr de rojo de metilo y disolver en 60 ml de etanol y aforar 100 ml con agua.

Pesar 0.2 gr de azul de metileno y disolver en 60 ml de etanol y aforar 100 ml con agua.

Hacer una solución con relación 2:1 rojo de metilo y azul de metileno.

B. El rendimiento de las harinas se calculó con la siguiente ecuación. Siendo 5.52 la masa inicial y como masa final 1.8 (kg).

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{masa inicial} - \text{masa final}}{\text{masa inicial}} \times 100$$

C. Para la obtención del porcentaje de proteínas el factor que se afectó al contenido de nitrógeno fue de 6.25.

D. Fenoles. Los mg eq AG/ g de harina

Se calculó de la siguiente manera:

Promedio de las absorbancias: 0.109

Ecuación de la recta de la curva patrón: $y = 0.9674x + 0.0175$

Mg eq AG/ ml= $(0.109-0.0175)/0.9674=0.094 \times 10$ (dilución)

Mg eq AG/ ml= 0.941×10 (mililitros de metanol usados para la elaboración del extracto)

Mg eq Ag/ gr=9.407

Flavonoides. Mg eq Quer/ g de harina.

Promedio de abs: 0.220

Ecuación de la recta de la curva patrón: $y = 0.0055x + 0.001$

$\mu\text{g eq Quer/ ml} = (0.220-0.001)/0.0055 = 39.818 \times 50$ (dilución)

$\mu\text{g eq Quer/ ml} = 1190.909 \times 10$ (mililitros de metanol usados para la elaboración del extracto)

mg eq Quer/ g=19.909

Actividad Antioxidante. Mg eq AA/ gr de harina.

Se realizó la dilución de 1:50 para el extracto de harina de chaya obteniendo un %AA= 78.89

Ecuación de la recta de la curva patrón: $y = 3.893x - 6.9926$

$\mu\text{g eq AA/ ml} = (78.89 + 6.9926)/3.893 = 22.061 * 50$ (dilución)

$\mu\text{g eq AA/ ml} = 1103.05 * 10$ (mililitros de metanol usados para la elaboración del extracto)

$\text{mg eq AA/ g} = 11.0306$

C. Para el cálculo del contenido de fenoles, flavonoides y actividad antioxidante, se realizó de la manera anterior, respetando sus absorbancias promedio y %AA respectivas.

9.- BIBLIOGRAFIA.

1. Almazán AM. Effect of cassava flour variety and concentration on bread loaf quality. *Cereal Chem* 1990; 67: 97-9.
2. Alcántara-Hernández, R. J., Rodríguez-Álvarez, J. A., Valenzuela-Encinas, C., Gutiérrez-Miceli, F. A., Castañón-González, H., Marsch, R., Ayora-Talavera, T. & Dendooven, L. (2010). The bacterial community in 'taberna' a traditional beverage of Southern Mexico. *Letters in applied microbiology*. 51(5), 558-563.
3. AOAC. 2005. Official methods of analysis of AOAC International. 18 ed. Virginia -The United States
4. Adaramoye OA, Aluko A. Methanolic extract of *Cnidioscolus aconitifolius* attenuates renal dysfunction induced by chronic ethanol administration in Wistar rats. *Alcohol and Alcoholism*. 2011; 46(1): 4-9.
5. AURAND, L.W., Woods, A.E., Wells, M.R. Food Composition and Analysis. An AVI Book, New York. 1987
6. Altamirano-Fortoul R, Moreno-Terrazas R, Quezada-Gallo A, Rosell CM (2012). Viability of some probiotic coatings in bread and its effect on the crust mechanical properties. *Food Hydrocoll.*, 29 (1): 166-74.
7. Aguirre, M. and Collins, M.D. (1993). Lactic acid bacteria and human clinical infection, *J. Appl. Bacteriol.* 75: 95-107.
8. Arias L, Contreras J, Losada H, Grande D, Soriano R, Vieyra J, Cortes J and Rivera J 2002. Chemical composition and in vitro digestibility of common vegetables utilised in urban dairy systems of the east of Mexico City. *Livestock Research for Rural Development* In press
9. Archibald, F. and Fridovich, I. (1981b). Manganese, superoxide dismutase, and oxygen tolerance in some lactic acid bacteria. *J. Bacteriol.* 146: 928-936.
10. Ashwell M. Conceptos sobre Alimentos Funcionales. ILSI Europe Concise Monograph Series, ILSI Press 2005.
11. Axelsson, L. **Lactic acid bacteria: classification and physiology**. In: Salminen, S.; Von Wright, A.; Ouwehand, A. (Ed). *Lactic Acid Bacteria*. New York: Marcel Dekker, 2004. p.61-66.
12. Bautista Justo Mayela, Barron Martines Araceli, Barron Martinez Carmen, Camarena Aguilar Ernesto, Alanis GUzman Ma. Guadalupe.(2003). *Propiedades Funcionales*

- y Valor Nutritivo de Panes Integrales con Chía y Linaza. Instituto de Ciencias Agrícolas, Universidad de Guanajuato. Facultad de Biología, Universidad Autónoma de Nuevo León.
13. Barthelmebs, L., Divies, C., and Cavin, J-F. (2000). Knockout of the p-coumarate decarboxylase gene from *Lactobacillus plantarum* reveals the existence of two other inducible enzymatic activities involved in phenolic acid metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3368-3375.
 14. Barrera, A.M.; M I F , Díaz y A.L.D., Ramos. 1981. La chaya. Instituto Nacional de Investigaciones sobre los Recursos Bióticos. Boletín Informativo.
 15. Beyer, H. & Walter, G., 1987. Manual de química orgánica. Barcelona: Reverté.
 16. Bourgeois, C. M.; Larpent, J. P. 1995. Microbiología Alimentaria II: Fermentaciones Alimentarias. Ed. Acribia, Zaragoza
 17. Cáceres, a., 1996. Plantas de uso medicinal en Guatemala. Edición Universitaria. Universidad de San Carlos de Guatemala. 135-136
 18. Calderon Rubio Maylena. Determinacion de la capacidad antioxidante total y concentración de fenoles totales en *S.americanum* sometida al proceso de escaldado, deshidratado y almacenamiento. Guatemala 2011
 19. Carmona, D. A., 2009. Caracterización físico-químico y sensorial de nabiza y grelo (*Brassica rapa L.*). Santiago de Compostela: Univ Santiago de Compostela.
 20. Calaveras, J (2000) *Nuevo tratado de panificación y bollería*. España: Mundi Prensa pp 25-29, 38, 125-139.
 21. Chagman G.P. (2010). Sustitucion parcial de harina de trigo *Triticum aestivum L.* por harina de kiwicha *Amaranthus caudatus L.* usando el método directo y esponja y masa, en la elaboración de pan. *Revista de la sociedad química de Perú*. Vol 76, No. 4. Lima, Perú.
 22. Chlopicka Joanna, Pawel Pasko a, Shela Gorinstein, Aneta Jedryas, Pawel Zagrodzki. (2011). Total phenolic and total flavonoid content, antioxidant activity and sensory evaluation of pseudocereal breads.
 23. Culej, G. A. (2015). Sistema neural para la predicción de la microencapsulación mediante secado por aspersión de *Lactobacillus plantarum*. Tesis de Maestría en ciencias en Ingeniería Bioquímica. Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez
 24. Dulce M. Aguilar., Michael A. Grusak (2015). Evaluation of Minerals, Phytochemical Compounds and Antioxidant Activity, Central American, and African Green Leafy Vegetables. *Plant Foods Hum Nutr* (2015). 70:357-364. USA

25. De Landa, D. (1982). *Relación de las Cosas de Yucatán*. México: Editorial Purrua S.A.
26. Eom HJ, Seo DM and Han NS. Selection of psychrotrophic *Leuconostoc* spp. producing highly active dextransucrase from lactate fermented vegetables. *Int J Food Microbiol* 2007; 117: 6167.
27. FAO/OMS. (2001). Probiotics in food: health and nutritional properties and guidelines for evaluation. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization (FAO/WHO).
28. Fernandez (2003). *Nutricion y dietética*. Universidad de León. España.
29. Fillion, L. & Henry, C.J.K. (1998). Nutrient losses and gain during frying. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 2, 157 – 168.
30. Fukumoto, I. R. & Mazza, G. 2000. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *Journal of agriculture and food chemistry*. Vol 48 Pp: 3597-3604.
31. Fuller, R. 1989, Probiotics in man and animals.: *J.Appl.Bacteriol.*, v. 66, p. 365-378.
32. Frey R. Ellis. *Veganism, Clinical finding and Investigations*. The American Journal of Clinical Nutrition. Vol. 23, No. 3. 1970. Pp. 249-255. USA.
33. Galdámez, N. (1996). *Utilización del follaje en producción alimentadas a base de rastrojo de maíz (Zea mays)* La Fragua, Zacapa. Tesis Ingeniero Agrónomo, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía. Guatemala.
34. García, A. Á. & Carril, E. P.-U., 2009. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología)*, 2(3), pp. 119-145.
35. Garza, R.M. 1990. *Análisis químico de partes vegetativas de Brassica campestris L. var. silvestre, y estudio preliminar para la obtención y caracterización de un concentrado proteínico*. Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León. 49.
36. Gardner NJ, Savard T, Obermeier P, Caldwell G and Champagne CP. Selection and characterization of mixed starter cultures for lactic acid fermentation of carrot, cabbage, beet and onion vegetable mixtures. *Int J Food Microbiol* 2001; 64: 261-275
37. González, Jorge. (2013). *Evaluación in vitro del potencial probióticos de bacterias ácido lácticas aisladas de una bebida fermentada autóctona de Chiapas*. Tesis de Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica. Chiapas, México.

38. Gutiérrez S., W., Tovilla C., M. L. y Ventura C., L. M. C. (2015). Evaluación de factores extrínsecos sobre el crecimiento de *Lactobacillus plantarum* y su producción de ácido láctico en un reactor de tanque agitado. Congreso internacional de investigación de academiaJournals. ISSN 1946-5351.
39. Guarner F, Schaafsma GJ (1998): Probiotics. *Int J Food Microbiol*, 39: 237-238.
40. Hart MJ, et al. (1991) Identification of the human platelet GTPase activating protein for the CDC42Hs protein. *J Biol Chem* 266(31):20840-8
41. Hernández J E and León J (Editors) 1994 Neglected crops: 1492 from a different perspective. FAO Plant Production and Protection Series No 26
42. Herrera, E.P. (1998). Efecto antioxidante de la hoja de chaya (*Cnidocolus ssp*) en alimentos. Tesis Ingeniero en Ciencias Agronómicas, Universidad del Valle de Guatemala, Facultad de Ciencias y Humanidades. Guatemala
43. Holguin, C. U., 2010. Análisis fitoquímico de las hojas de pentacalia corymbosa y p.nitida (asterales: asteráceae) y evaluación de su actividad antioxidante. Bogotá: PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA.
44. Jimoh, F.O., Babalola, S.A & Yakubu, M.T. (2009). Assessment of the antioxidant potential of *Cnidocolus chayamansa*. *Journal pharmaceutical Biology*, 42, 903 – 909.
45. Johansson, M.-L., Molin, G., Jeppsson, B., Nobaek, S., Ahrné, S., and Bengmark, S. (1993). Administration of different *Lactobacillus* strains in fermented oatmeal soup: In vivo colonization of human intestinal mucosa and effect on the indigenous flora. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 15-20.
46. Jones, Q. & F.R. Earle. 1966. Chemical analysis of seeds II. Oil and protein content of 759 species. *Economi Bot.* 20 (2): 127-155.
47. Kandler, O. and Weiss, N. (1986). Regular, nonsporing Gram-positive rods. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Sneath, H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. and Holt, J. Eds., Williams & Wilkins, Baltimore, vol. 2, pp. 1208-1234.
48. Kirk R.S., Sawyer, R y Egan H. "Composición y Análisis de Alimentos de Pearson". Segunda edición. Editorial CECSA. México 1996
49. Kleerebezem, M., Boekhorst, J., van Kranenburg, R., Molenaar, D., Kuipers, O.P., Leer, R., Turchini, R., Peters, S.A., Sandbrink, H.M., Fiers, M.W.E.J., Stiekema, W., Lankhorst, R.M.K., Bron, P.A., Hoffer, S.M., Groot, M.N.N., Kerkhoven, R., de Vries, M., Ursing, B.,

- de Vos, W.M. and Siezen, R.J. (2003). Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100: 1990-1995.
50. Knuth, R. 1928. *Initia Florae Venezuelensis*. pp. 382-383
51. Krasaekoopt W, Bhandari B, Deeth H, Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Journal* 13, 3-13. 2003
52. Kono, Y. and Fridovich, I. (1983b). Functional significance of manganese catalase in *Lactobacillus plantarum*. *J. Bacteriol.* 155: 742-746.
53. Kuti, J. & Konuro, H. (2004). Antioxidant capacity and phenolic content in leaf extracts of tree spinach (*Cnidoscolus spp.*). *Agricultural and Food Chemistry*, 52, 117 – 121.
54. Kuti, J. & Torres, E. (1996). Potential nutritional and health benefits of tree Spinach. *National Academy of Science*, 2, 516 – 520.
55. Lightowler, Helen; Davies, Jill; Long, Alan. (1998). A vegan food guide vegans: a posible approach. *Nutrition & Food Science*, Volumen 98, Número 1
56. Liyana-Pathirana CM, Shahidi F (2006) Importance of insolublebound phenolics to antioxidant properties of wheat. *J Agric Food Chem* 54(4):1256–1264
57. Lilly DM, Stillwell RH (1965): Probiotics: Growth promoting factors produced by microorganisms. *Science*, 147 : 747-748.
58. Manach C, Scalbert A, Remesy C, et al.: Polyphenols: Food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2004, 79(5):727-747.
59. Martínez GM, Jiménez RJ, Cruz DR, Juárez AE, García R, Cervantes A, Mejía HR. Los géneros de la familia Euphorbiaceae en México. *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Botánica*.2002; 73(2):155-281.
60. Martínez-flórez, s. González-gallego, j. Culebras, jm. Tuñón, mj. 2002 Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición hospitalaria*. XVII PP 271- 278.
61. Manzano, C., & Estupiñán, D. (2001). *Lactobacillus plantarum* y su reducción del intestino irritable. *American Journal of Clinical Nutrition*
62. Manso MA, Léonil J, Piot M and Gagnaire V. Isolation and characterisation of a *Lactobacillus helveticus* ITG LH1 peptidaserich subproteome.
63. Makarova K, Slesarev A, Wolf Y, Sorokin A, Mirkin B, Koonin E, Pavlov A, Pavlova N, Karamychev V, Polouchine N, Shakhova V, Grigoriev I, Lou Y, Rohksar D, Lucas S, Huang K, Goodstein DM, Hawkins T, Plengvidhya V, Welker D, Hughes J, Goh Y, Benson A, Baldwin K, Lee JH, DíazMuñiz I, Dosti B, Smeianov V, Wechter W,

- Barabote R, Lorca G, Altermann E, Barrangou R, Ganesan B, Xie Y, Rawsthorne H, Tamir D, Parker C, Breidt F, Broadbent J, Hutkins R, O'Sullivan D, Steele J, Unlu G, Saier M, Klaenhammer T, Richardson P, Kozyavkin S, Weimer B and Mills D. Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 1561115616.
64. Mitsuoka, "Recent trends in research on intestinal flora," *Bifidobacteria Microflora*, vol. 1, pp. 3–24, 1982.
65. Mosquera, O. M. & Niño, J., 2005. Estandarización del método de captura de radicales libres para la evaluación de la actividad antioxidante de extractos vegetales. *Scientia et Technica*, pp. 231-234.
66. Molina Cruz, A. (1998). La chaya una hoja muy nutritiva que muy pocos aprovechan. *Revista Agricultura*, 2, 47 – 52.
67. Muñoz De Chávez, M.A., J.A. Chávez, J.A. Roldan, E. Ledesma, F. Mendoza, S.L. Pérezgil, Hernández Y A.G. Chaparro, 1996. Tablas de Valor Nutritivo de los Alimentos de Mayor Consumo en México. Editorial Paz México, México, D.F., México.
68. Mombelli B, Gismondo MR. The use of probiotics in medical practice. *Int. Antimicrob Agents* 2000;16(4):531-6.
69. Montoya, G. (2005). Las maravillas de la "chaya" medicinal. *Revista el Agro*, 21, 22 – 24.
70. Mubarak, A. E. (2001). Chemical, nutritional and sensory properties of bread supplemented with lupin seed (*Lupinus albus*) products. *Najrimg*, 45(4), 241-215.
71. McVaugh, R. 1944. "The Genus *Cnidocolus*: Generic Limits and Intrageneric Groups." *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 71(5):457–74.
72. M. SEYEDAIN-ARDABILI *et al*: Synbiotic Bread with Encapsulated Probiotics, *Food Technol. Biotechnol.* 54 (1) 52-59 (2016)
73. Neira, J. I., 2009. Diseño de ingredientes antioxidantes de origen natural y su aplicación en la estabilización de productos derivados de la pesca. Santiago de Compostela: Universidad de Santiago de Compostela.
74. NIELSEN S. (ed); *Food Analysis Second Edition*; An Aspen Publication, Gaithersburg, Maryland. 1998.
75. Noll, Leo M. L.; *Handbook of food analysis*; M. Dekker, New York 1996.

76. Oboh, G. (2006). Tropical green leafy vegetables prevent garlic-induced hepatotoxicity in the rat. *Journal of Medicine Food*, 9, 545 – 551.
77. Osawa, R., Kuroiso, K., Goto, S., and Shimzu, A. (2000). Isolation of tannin-degrading lactobacilli from humans and fermented foods, *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 3093-3097.
78. Ohigashi, H y Murakami, A. (2008). *Food factors for cancer prevention*. Tokio: Springer-Verlag.
79. Padio VT, Krzysatof N, Waliszewski KN, Robledo G. Los probióticos y su futuro. *Arch Latinoam Nutr*1994;46(81):6-10.
80. Palos-Suárez G. (2005). Evaluación del té de chaya (*Cnidocolus chayamansa*) en un modelo experimental de diabetes en ratas. *Revista Tecnología Avanzada*, 2, 35 - 40.
81. Palma, C. (2008, Mayo 22). Investigadores estudian a la chaya, el manjar de los mayas. *El periódico*, p 42-43.
82. Penna FJ. Diarrea y probióticos. Simposio sobre utilidad de los probióticos en el manejo de las diarreas. *RevEnfer Infec Ped* 1998; XI (6):182.
83. PEARSON. D; Técnicas de laboratorio para el análisis de alimentos; Acribia, S.A. Zaragoza (España) 1993.
84. Peregrin W. (1983). Chaya (*Cnidocolus aconitifolius*) A potential new vegetable crop for Brunei Topical Pest Management. 29:39-41.
85. Pinelo M, Manzocco M, Nunez M & Nicoli M. (2004). Solvent effect on quercetin antioxidant capacity. *Food Chemistry*, 88:201-207.
86. Pittier, H., T. Lasser, Z. Luces de Febres & V. Badillo. 1945. Catálogo de la Flora Venezolana. Tomo I. Tercera Conferencia Interamericana de Agricultura. Comité Organizador. Vargas, Caracas
87. Quezada, T., Acero, G., Fuentos, J., Martínez, R., González, M. y Guzmán, S. (2006). Características morfológicas de las hojas de chaya (*Cnidocolus* ssp.) colectadas en 13 estados de la república. *Revista Salud Pública y Nutrición*, 16, p 45.
88. Ramirez T., A. (2015). Evaluación in vivo de las características probióticas de *Lactobacillus plantarum* aislada de una bebida autóctona. Tesis de Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica. Chiapas, México.

89. Rice-Evans, C. Miller, N. Paganga, G. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free radical biology and medicina*. Vol XX, 7. Pp 936-956
90. Ross-Ibarra J, Molina-Cruz A (2002) The ethnobotany of chaya (*Cnidoscolus aconitifolius* ssp. *aconitifolius* Breckon): a nutritious Maya vegetable. *Econ Bot* 56(4):350–365
91. Rosas-Hernández, C. Maldonado-Garfía, M.A.C. Centeno-Rodríguez, Ma. R. Abraham-Juárez y A. Cerón-García. Efecto en la capacidad antioxidante, fenoles y flavonoides totales del pan bolillo parcialmente sustituido con harina de fibra de mango. División de Ciencias de la Vida, Universidad de Guanajuato Campus Irapuato-Salamanca
92. Rodríguez, I. (2010, Febrero 5). *Proyecto Recuperara Plantas Comestibles que los Ticos olvidaron. Nacion.com., p 21.*
93. Reyes, S. y Flores, J. (1999). Registro de plantas tóxicas para ganado en el estado de Veracruz México. *Revista Científica de América latina y el Caribe*, 30, 79 – 94.
94. Sarmiento-Franco, L., Sandoval, C., Quijano, R & Reyes, R. (2003). Effect of Age of Regrowth on chemical composition of chaya (*Cnidoscolus aconitifolius*) leave. *Journal of the Sciences of Food and Agriculture*, 83, 609 - 612.
95. Saier MH, Mansour JNM . Probiotics and Prebiotics in Human Health. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2005; 10:22-25.
96. Saxelin, M., Chuang, N.H., Chassy, B., Rautelin, H., Makela, P.H., Salminen, S., and Gorbach, S.L. (1996). Lactobacilli and bacteremia in southern Finland, 1989-1992. *Clin. Infect. Dis.* 22: 564-566.
97. Schiffin EJ, Brassart D, Servin AL, Rochat F, Donnet-Hughes A. Immune modulation of blood leukocytes in humans by lactic acid bacteria: criteria for strain selection. *J Dairy Sci* Aug. 1997;66(2):515S-20S.
98. Silveira Coelho M., Salas Mellado M. Effects of substituting (*Salvia hispánica* L.) flour or sedes for wheat flour on the quality of the bread. *Food Science and Technology*. University of Rio Grande, Brazil. 2011

99. Singleton, V. L., Orthofer, R. & Lamuela-Raventós, R. M., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, Volumen 299, pp. 152-178.
100. Scalbert A, Williamson G (2000) Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *Journal of Nutrition* 130:2073S-2085S.
101. Stanley, P.C., Steryermark, J. A., 1946. *Flora de Guatemala*. Chicago US, Chicago Natural History Museum, *Fieldiana Botany*. 24 (5): 195-196.
102. Stanton, A. (2011). Vegan “soul food” for the holidays. *Vegetarian Journal*. Vol 30. No.
103. Steglich, W., Fungmann, B., Lang-Fugmann, S., 1997. *Römpp Lexikon, Naturstoffe*. Georg Thieme, Stuttgart, New York.
104. Salminen, S., Wright, A., Morelli, L., Marteau, P., Brassart, D., deVos W. M., Fonden, R., Saxelin, M., Collins, K., Mogensen, G., Birkeland, S-E., Mattila-Sandholm T. (1998). Demonstration of safety of probiotics, a review. *International Journal of Food Microbiology* 44 93–106.
105. Taiz, L. & Zeiger, E., 2006. *Fisiología vegetal*. Tercera ed. Castellón de la Plana: Publicacions de la Universitat Jaume I.
106. Taylor, J., & Mitchell, D. (2007). *La maravilla de los probióticos*. New York: St Martin Press.
107. Ugusman A, Zakaria Z, Kien C, Mohd N & Abdullah Z. (2012). Flavonoids of piper sarmentosum and its cyto-protective effect against oxidative stress. *EXCLI JOURNAL*. Vol.11: 705-714.
108. Vieyra J, Losada H, Bennet R, Santos P, Grande D, Rivera J and Soriano R 2002 Conservation of biodiversity and soil by the alternative use of the maguey *Agave salmiana* Otto ex Salm.-Dyck as a multipurpose resource in the southeast hills of Mexico City. *Economic Botany*. In press.
109. Valadez-Villarreal, López-Hernández. Hernández-Becerra J. y Ochoa-Flores. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LAS HOJAS DE CHAYA, *Cnidioscolus chayamansa* MC. VAUGH Y CHIPILIN, *Crotalaria maypurensis* H.B.K. DEL ESTADO DE TABASCO.
110. V. A. Nedović, B. Obradović, I. Leskošek- Ćukalović, and G. Vunjak Novaković, “Immobilized yeast bioreactor systems for brewing-recent achievements,” in *Focus on Biotechnology*, P.Thonart and M. Hofman, Eds., vol. 4 of *Engineering and Manufacturing for Biotechnology*, pp. 277–292, Kluwer Academic, Dodrecht, The Netherlands, 2001.

111. Vidal Carou, M. (2008). Alimentos funcionales. Algunas reflexiones en torno a us necesidad, seguridad y eficacia ya cómo declarar sus efectos sobre salud. *Humanitas. Humanidades médicas* (24), 1-27.
112. Webster, G. L. 1975. "Conspectus of a New Classification of the Euphorbiaceae." *Taxon* 24(5/6):593–601.
113. White, G. A. & J. R. Haun. 1965. Growing *Crotalaria Juncea*, a multu-purpose legume, for paper pulp. *Economic Bot.* 19: 175-183.
114. Wink, M.m Mohamed, G.I.A, 2003. Evolution of chemical defense traits in the leguminosae: mapping of distribution patterns of scondary metabolites on a molecular phylogeny inferred from nucleotide sequences of the rbcl gene. *System. Ecol.* 31:897-917.
115. Zouza, N.N. 1950. Plantas alimenticias y plantas de condimento que viven en Yucatán. Instituto Agrícola Henequero, Mérida, México. 101-104.