



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO  
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ



# INFORME TÉCNICO DE RESIDENCIA PROFESIONAL

INGENIERÍA BIOQUÍMICA

“SOBREVIVENCIA DE *L. plantarum* EN PAN  
VEGANO ADICIONADO CON *Crotalaria longirostrata*”

PRESENTA

AMELIA ITZEL BUSTOS ESTRADA

ASESORA

M.C. MARIA CRISTINA VENTURA CANSECO

PERÍODO DE REALIZACIÓN  
ENERO-JUNIO 2017

## RESUMEN

En los últimos años los alimentos funcionales con microorganismos probióticos han recibido mucha importancia, ya que el consumo tiene efectos benéficos a la salud humana, siempre y cuando los probióticos resistan en una cantidad adecuada y viable durante el proceso de digestión.

Las hojas de Chipilín son usadas por su alto contenido de nutrientes, así como el uso medicinal que se le ha dado desde hace mucho tiempo. Se cuantificó el contenido de fenoles y flavonoides y se evaluó la actividad antioxidante, de lo cual se obtuvo  $9.407 \pm 0.005$  mg eq AG/ g,  $19.909 \pm 0.014$  mg eq Quer/ g y  $11.030 \pm 0.009$  mg eq AA/g respectivamente. Comparado con otros datos reportados, nuestros valores se presentan en menor cantidad. Los polvos obtenidos se agregaron a la formulación de los panes los cuales se adicionaron con harina vegetal al 0,3 y 5%, y se monitorearon al tiempo 0 y 5 días después del horneado

En el presente estudio se evaluó la sobrevivencia de *L. plantarum* en productos de panificación adicionados con harina de Chipilín, calculando el porcentaje de sobrevivencia después del proceso de secado por aspersión y después del horneado del pan. Para ello se cultivó *L. plantarum* en un reactor de tanque agitado a 300 rpm, 36°C, pH 6 (controlado mediante la adición de NaOH 5 M), con aireación de 0.25 vvm durante 8 Horas, y se secó por aspersión con leche de soya-maltodextrina a un flujo continuo de 9 ml/min y una temperatura interna de 160°C. La sobrevivencia de la bacteria después del secado fue de 94-100%, pero no hubo sobrevivencia después del horneado. A su vez, se realizaron análisis proximales para conocer el contenido de humedad, cenizas y proteínas.

## Contenido

RESUMEN.....	2
<b>LISTA DE TABLAS</b> .....	5
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	6
INTRODUCCIÓN.....	7
DESCRIPCIÓN DE LA EMPRESA.....	8
JUSTIFICACIÓN.....	8
OBJETIVOS .....	10
OBJETIVO GENERAL.....	10
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	10
<b>10. MARCO TEÓRICO</b> .....	11
10.1. Alimento. ....	11
10.1.1 Alimento funcional. ....	12
10.1.2 Alimento vegano.....	15
10.2 Pan.....	15
10.2.1 Pan funcional. ....	16
10.2.2 Pan vegano. ....	17
10.3 Probiótico.....	17
10.3.1 Probióticos en alimentos. ....	19
10.3.1.1 Propiedades benéficas de los Alimentos Funcionales Probióticos.....	19
10.3.2. Probióticos micro encapsulados.....	21
10.3.2.1 Lactobacillus plantarum. ....	22
10.3.2.2 <i>Lactobacillus plantarum</i> KY131967.....	23
10.4 Género <i>Crotalaria</i> .....	24
10.4.1 <i>Crotalaria longirostrata</i> . ....	25
10.4.2 Descripción taxonómica. ....	26
10.4.3 Descripción botánica. ....	26
10.4.4 Usos e importancia. ....	26
10.5 Metabolitos. ....	27
10.5.1 Metabolitos secundarios. ....	27
10.5.1.1 Fenoles.....	30
10.5.1.2 Flavonoides.....	31
10.5.1.3 Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos. ....	32
11. Análisis proximales.....	35

11.1 Humedad.....	35
11.1.1 Métodos de secado.....	36
11.1.1.1 Método por secado de estufa.....	37
11.1.1.2 Método por secado en estufa de vacío.....	38
11.1.1.3 Método de secado en termobalanza.....	38
11.1.1.4 Método de destilación azeotrópica.....	39
11.1.1.5 Método de Karl Fischer.....	39
11.2 Cenizas.....	40
11.3 Nitrógeno total.....	41
11.4 Proteínas.....	43
12. METODOLOGÍA.....	44
12.1. Preparación de harinas vegetales.....	44
12.2 Cultivo de <i>Lactobacillus plantarum</i> KY131967 (Gutiérrez-Sarmiento, 2016).....	45
12.2.1 Cultivo en matraz.....	45
12.2.2 Cultivo en Biorreactor.....	45
12.2.3 Cosecha de la biomasa.....	45
12.3 Preparación de los agentes encapsulantes (Robles-Flores, 2015).....	45
12.3.1 Leche de soya.....	46
12.3.2 Maltodextrina al 35%.....	46
12.3.3 Goma arábiga al 7.5%.....	46
12.4 Preparación de la emulsión.....	46
12.5 Secado por aspersión.....	47
12.6 Viabilidad del <i>Lactobacillus plantarum</i> KY131967.....	47
12.7 Productos de panificación.....	48
12.8 Diseño experimental.....	48
12.9 Análisis proximal de los productos de panificación.....	49
12.9.1 Humedad.....	49
12.9.2 Cenizas.....	49
12.9.3 Nitrógeno total.....	49
12.10 Evaluación de antioxidantes, fenoles totales y flavonoides en la harina vegetal y en los productos de panificación.....	50
12.10.1 Obtención del extracto de harina vegetal.....	51
12.10.2 Obtención del extracto de pan (Chlopicka et al, 2012).....	51
12.10.3 Evaluación de Actividad antioxidante por el método de DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate).....	52

12.10.4 Determinación del contenido de Fenoles totales (método colorimétrico de Folin-Ciocalteu).....	52
12.10.5 Determinación del contenido de flavonoides totales (método colorimétrico del Cloruro de Aluminio).....	53
12.11 Sobrevivencia de <i>Lactobacillus plantarum</i> KY131967 en los productos de panificación.....	53
13. Resultados y discusiones.....	54
13.1 Rendimiento de harina vegetal.....	54
13.2 Rendimiento de <i>L. plantarum</i> KY131967 en fermentador.....	54
13.3 Viabilidad de <i>L. plantarum</i> KY131967 en encapsulado.....	54
13.4 Productos de panificación.....	55
13.9 Análisis proximales.....	56
13.10 Contenido de Fenoles, flavonoides y Actividad antioxidante.....	57
13.11 Sobrevivencia de <i>Lactobacillus plantarum</i> .....	62
14. CONCLUSIÓN.....	63
15. BIBLIOGRAFÍA.....	64
16. ANEXOS.....	70

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Tipos de alimentos funcionales.....	14
<b>Tabla 2.</b> Factores para la conversión de los valores de nitrógeno en proteínas.....	44
<b>Tabla 3.</b> Sobrevivencia de <i>L. plantarum</i> KY131967 al encapsulado.....	55
<b>Tabla 4.</b> Formulación para los productos de panificación para los distintos porcentajes de adición de harina vegetal.....	55
<b>Tabla 5.</b> Análisis proximales de los productos de panificación adicionados con harina vegetal al 0,3 y 5%.....	56
<b>Tabla 6.</b> Barrido espectral de diferentes concentraciones de ácido ascórbico con DPPH 0.3 mM.....	58
<b>Tabla 7.</b> Contenido de fenoles, flavonoides y actividad antioxidante cuantificados del extracto de harina de Chipilín.....	59
<b>Tabla 8.</b> Contenido de fenoles, flavonoides y actividad antioxidante en los productos de panificación adicionado al 0, 3 y 5% con harina vegetal, evaluado para los tiempos 0 y 5 días después del horneado.....	61
<b>Tabla 9.</b> Sobrevivencia de <i>L. plantarum</i> en el pan después del horneado.....	62

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la principales rutas de biosíntesis de metabolitos secundarios y sus interrelaciones con el metabolismo primario (Taiz & Zeiger, 2006). .....	29
Figura 2. Grupo fenol. ....	30
Figura 3. Estructura de un flavonoide .....	31
Figura 4. Clasificación de flavonoides. ....	32
Figura 5. Curva patrón de ácido gálico .....	57
Figura 6. Curva patrón de quercetina. ....	57
Figura 7. Barrido espectral de DPPH 0.03 mM en metanol. La absorbancia fue leída a 545 nm. ....	58
Figura 8. Curva patrón de ácido ascórbico. Absorbancia leída a 545 nm. ....	59

## INTRODUCCIÓN

En la actualidad, el concepto de nutrición ha evolucionado notablemente gracias a la investigación constante en ciertas áreas de interés. Las prioridades ya no se encuentran centradas en las carencias nutricionales, cara biológica de la pobreza; 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 y las empresas que los producen presentan una rápida expansión mundial.

Las bacterias probióticas utilizadas en alimentos deben ser capaces de sobrevivir al paso por el aparato digestivo y proliferar en el intestino. Son bacterias gram positivas y se utilizan fundamentalmente dos géneros: *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Se las conoce como BAL, por su capacidad de convertir los hidratos de carbono en ácido láctico y pueden ser homofermentativas o heterofermentativas. Las tres especies más utilizadas y estudiadas son: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* y *Bifidobacterium spp.*

La planta de Chipilín, es una leguminosa que se cultiva en los jardines, huertos y campos, se usa principalmente en la preparación de alimentos, sus hojas son utilizadas como ingredientes en diversos platillos tradicionales y el resto de la planta no es aprovechada, debido a que la comunidad carece de información de los beneficios que esta planta puede ofrecer para la conservación de otros cultivos, así como de los compuestos activos que produce.

## DESCRIPCIÓN DE LA EMPRESA

El proyecto se desarrolló en el laboratorio de Investigación ubicado en el edificio D, en el laboratorio de Microbiología ubicado en el Polo Tecnológico, en el laboratorio de Biotecnología Vegetal ubicado en el edificio T, todos ellos dentro de las instalaciones del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, ubicado en carretera Panamericana km 1080, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.

## JUSTIFICACIÓN

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".

Las dietas vegetarianas se asocian a una serie de ventajas, como a una menor concentración de grasas totales, de grasas saturadas y de colesterol y a una mayor concentración de fibra, magnesio, potasio, ácido fólico y antioxidantes. Consecuentemente, las ventajas de una dieta vegetariana para la salud incluyen la prevención de ciertas enfermedades, como las enfermedades cardíacas, la diabetes y algunos cánceres (Lightowler et al., 1998).

La proporción de estadounidenses que siguen una dieta vegetariana se ha incrementado sustancialmente en los últimos 15 años de aproximadamente 300.000 a 500.000 personas en 1997 a entre 2,5 y 6 millones en 2012. El aumento sustancial observado durante los últimos años en el número de personas que siguen una dieta vegetariana estricta, en algunos lugares puede indicar que para una parte de la población nos estamos acercando a un punto de transición histórica al veganismo impulsado por una mayor conciencia sobre el maltrato animal, la acumulación de la investigación demostrando el beneficios de salud de una dieta vegana, y un aumento sustancial en la disponibilidad de sustitutos de la carne y los productos lácteos (Stanton, 2011).



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 (Lightowler, H., et al, 1998). 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* (encapsulado) como probiótico, se adicionará hoja de chipilín (*Crotalaria longirostrata*) 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.

La especie vegetal chipilín (*Crotalaria longirostrata*), posee atributos nutricionales y es culturalmente aceptable en la alimentación mexicana, por otra parte la bacteria *Lactobacillus plantarum* es una cepa autóctona aislada de una bebida autóctona fermentada del sureste de México, estudiada por integrantes de la línea de investigación "Ingeniería de procesos biotecnológicos y alimentarios", con demostradas características probióticas (*in vitro* e *in vivo*) y resistencia térmica bajo ciertas condiciones de secado (Alcántara-Hernández et al., 2010, González, 2013, Ramírez, 2015, Culej, 2015).

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Evaluar las características funcionales de pan vegano adicionado con *L. plantarum* encapsulado, y suplementado con harinas de hojas de chipilín (*Crotalaria longirostrata*)

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar la sobrevivencia de *L. plantarum* en el pan vegano después del horneado y durante el almacenamiento.
- Evaluar las características bromatológicas y microbiológicas del pan vegano después del horneado y durante el almacenamiento.
- Evaluar el contenido de fenoles totales en el pan vegano después del horneado y durante el almacenamiento.

## 10. MARCO TEÓRICO

### 10.1. Alimento.

Un alimento es un producto natural o elaborado, formado por elementos llamados nutrientes, como proteínas, carbohidratos, grasas, vitaminas, minerales y agua. Los alimentos proporcionan la energía y los nutrientes necesarios para llevar a cabo las funciones corporales, mantener una buena salud y realizar las actividades cotidianas (FAO, 2001).

El Codex Alimentarius define alimento como toda sustancia, elaborada, semielaborada o bruta, que se destina al consumo humano, incluyendo las bebidas, el chicle y cualesquiera otras sustancias que se utilicen en la fabricación, preparación o tratamiento de los alimentos. Los alimentos están formados en su mayor parte por compuestos bioquímicos comestibles que derivan principalmente de fuentes vivas, tales como plantas y animales. La sal y el agua son los únicos procedentes de naturaleza inorgánica que se incluyen en la alimentación.

Todos los alimentos están constituidos por los siguientes elementos en distintas proporciones: agua, hidratos de carbono, proteínas, lípidos (grasas), vitaminas, minerales, pigmentos, saborizantes y compuestos bioactivos. Estos componentes están dispuestos de formas distintas en los alimentos, para darles su estructura, textura, sabor, color (pigmentos) y valor nutritivo. La composición general de los alimentos y la forma en que sus componentes se organizan, le otorgan sus características particulares.

El agua es el principal componente de la mayoría de los alimentos y forma parte de la composición de prácticamente la totalidad de los mismos. Los principales componentes sólidos son: hidratos de carbono, proteínas, lípidos y sus correspondientes derivados.

Los alimentos suelen clasificarse según su origen en orgánicos e inorgánicos. Los alimentos orgánicos son los de origen animal (carne, pescado, leche, queso, huevos) y origen vegetal (vegetales, granos, frutas, cereales); y los alimentos inorgánicos provienen de origen mineral (agua, sales minerales).

Según su composición química, los alimentos se dividen en grasos o lípidos (mantequilla, aceite, manteca, tocino), carbohidratos o glúcidos (miel, azúcar, almidón, pan, pasta), proteínas (carne, pescado, huevos, leche) y vitaminas (huevos, aves, granos, nueces).

Existe otra clasificación de los alimentos según su función en el organismo, tenemos los alimentos energéticos, son los que aportan la energía necesaria para las funciones vitales; los alimentos reguladores, son los que controlan muchas de las funciones vitales; y los alimentos reparadores, son los que proporcionan los materiales necesarios para el crecimiento o la sustitución de materiales perdidos.

Cabe resaltar que a pesar que las grasas, aceites y azúcares son medios de cocción y saborizantes o condimentos, que proveen energía y ciertas sustancias nutritivas importantes; se ha demostrado que su uso excesivo es nocivo para la salud y conduce a una serie de trastornos como la obesidad, diabetes, arterioesclerosis y sus complicaciones; por ello se recomienda usarlos en cantidades moderadas.

#### 10.1.1 Alimento funcional.

Consideramos alimentos funcionales aquellos que además de sus propiedades nutritivas básicas, tienen un efecto beneficioso adicional sobre nuestra salud.

Algunas características de los alimentos funcionales son:

- Tienen una presentación similar a la de un alimento convencional.
- Se consumen como parte de una dieta normal.
- Tienen propiedades beneficiosas para la salud o reducen el riesgo de desarrollar enfermedades crónicas.

Pueden tratarse de alimentos naturales o alimentos que han sido manipulados para añadirles o quitarles algún componente. Entre los ejemplos

de alimentos funcionales podemos mencionar los que están enriquecidos con vitaminas y minerales, como los cereales o los lácteos. Otros tienen modificado algunos de sus componentes, como los ácidos grasos, la fibra o su contenido en ácidos grasos omega 3.

La base de la nutrición, es una alimentación completa y variada, que nos aporte los nutrientes necesarios para el buen funcionamiento del organismo. Los alimentos funcionales, complementan la función nutritiva y ayudan a la prevención de ciertas enfermedades.

Existen muchas enfermedades crónicas íntimamente relacionadas con la nutrición, como es el caso de la obesidad y numerosas enfermedades cardiovasculares, que pueden atribuirse a hábitos alimentarios inadecuados.

Ejemplos de alimentos funcionales:

- Probióticos: contienen bacterias vivas que tienen efectos en el intestino: ayudan a la rehidratación (sobre todo en niños y ancianos), proporcionan antibióticos naturales que parecen reducir la intensidad de las diarreas, y algunas hipótesis afirman que podrían mejorar la respuesta inmune del organismo.
- Prebióticos: favorecen el desarrollo de determinadas bacterias beneficiosas presentes naturalmente en nuestro intestino. Los prebióticos pueden producir en el intestino ácidos grasos de cadena corta, que ayudan al funcionamiento del sistema digestivo y a la prevención de enfermedades, pudiendo incluso disminuir el riesgo de cáncer.
- Fibra dietética: se trata de materia vegetal que resiste a la digestión y absorción por el aparato digestivo. La fibra está naturalmente presente en vegetales, legumbres, frutas y cereales. Su consumo se asocia a diversos efectos beneficiosos sobre la salud: favorece el tránsito intestinal, menor riesgo de desarrollar enfermedades coronarias, disminución del colesterol en sangre o efecto protector frente al cáncer.

- Ácidos grasos omega 3: presentes en aceites de pescado, se han estudiado por su papel en la prevención de enfermedades como el cáncer de mama o enfermedades cardiovasculares.

En la tabla 1 se pueden apreciar los tipos de alimentos funcionales.

**Tabla 1.**Tipos de alimentos funcionales

<b>Ingredientes funcionales</b>	<b>Efecto</b>	<b>Ejemplos</b>
<b>Prebióticos</b>	Mejoran la función intestinal.	Lactobacilos y bifidobacteris.
<b>Probióticos</b>	Favorecen el crecimiento de las bacterias intestinales beneficiosas.	Fructo-oligosacaridos (Cereales integrales).
<b>Vitaminas</b>	Reducen el riesgo de enfermedades cardiovasculares y osteoporosis.	Vitamina B6, B12, ácido fólico, Vitamina D y vitamina K.
<b>Minerales</b>	Reducen el riesgo de osteoporosis y fortalecen el sistema inmune.	Calcio, magnesio y zinc (productos lácteos).
<b>Antioxidantes</b>	Reducen el riesgo de enfermedades cardiovasculares y el desarrollo de tumores.	Vitamina C y E, carotenos, flavonoides y polifenoles (zumos y refrescos).
<b>Ácidos grasos</b>	Reducen el riesgo de enfermedades cardiovasculares y el desarrollo de tumores. Reduce los síntomas de la menopausia.	Ácidos grasos Omega 3 (lácteos, huevo). Ácido Linoleico conjugado (CLA) (Lácteos).
<b>Fitoquímicos</b>	Reducen los niveles de colesterol y los síntomas de la menopausia.	Fitoesteroles, isoflavonas y lignina (Margarinas y lácteos).

Fuente: Fundación vivo sano 2016

### 10.1.2 Alimento vegano.

Se le denomina alimento vegano aquel que no proviene de origen animal. La dieta vegana se basa en una gran cantidad de granos, frutas, verduras y frijoles. Todas las comidas veganas son bajas en grasa y contienen poco o ningún colesterol, además, son ricas en fibra.

### 10.2 Pan.

El pan constituye la base de la alimentación desde hace 7000 u 8000 años (Bourgeois y Larpent, 1995). Al principio era una pasta plana, no fermentada, elaborada con una masa de granos machacados groseramente y cocida, muy probablemente sobre piedras planas calientes.

El pan es un alimento que evolucionó y acompañó al hombre a lo largo de la historia. Es así como el proceso de molienda también se fue modificando y modernizando, siguiendo el desarrollo del hombre, sus hábitos y su industria. La composición del pan, a base de hidratos de carbono, proteínas y otros elementos, lo convierten en un alimento clave para nutrir a una persona. Al ser digeridos y metabolizados por el organismo, los hidratos de carbono nos proporcionan la energía necesaria para la transformación de los alimentos que comemos y el resto de funciones orgánicas, así como el mantenimiento del tono físico y mental.

Son extensas y variadas las clases de pan, algunas de ellas son:

- Pan Blanco: El pan blanco es una moda funesta que introdujeron los franceses tras la Guerra de la Independencia. Antiguamente los molinos tamizaban los cereales con tamices metálicos, que permitían el paso de muchos granos, pero los galos introdujeron un tamiz de tela de seda, muy fino, que sólo dejaba pasar el gluten y el almidón y separaba los productos más nutritivos del pan.
- El Pan de Cereales: El pan de cereales está compuesto por harina de centeno y harina de otros cereales, como maíz o soja. Este pan suele

estar decorado con semillas, pipas, copos de avena, ajonjolí u otros ingredientes, para hacerlo más vistoso y enriquecer su sabor.

- El Pan Integral: Está elaborado con harina integral. Aprovechando la riqueza de este tipo de pan en magnesio y fibras, se utiliza como laxante en personas con problemas de estreñimiento. Dentro del pan integral hay muchas variedades, como el pan integral con miel y naranja procedente de Galicia, el pan integral con avena, el pan integral con miel, uvas pasas, almendras y nueces. Lo más apropiado para la dieta es, dice Alomar, consumir pan moreno, porque el grano de trigo contiene todos los aminoácidos esenciales, las proteínas, grasas y minerales necesarios para la vida, y habría que añadirle lino, rico en lisina.

Actualmente, cuando se efectúa la molienda del trigo en la fabricación industrial del pan integral, la mayoría de fabricantes sólo usan la harina y el salvado del grano, pero no la tercerilla y el germen de trigo, que tienen un tiempo de caducidad corto. Sin la tercerilla se pierde una parte importante de las vitaminas y proteínas del pan y, si se retira el germen de trigo, las vitaminas A, B, D y E, además de diversas proteínas, minerales y lípidos.

### 10.2.1 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 59 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 (Ronayne et al, 2009). Varios estudios muestran el uso de fuentes de fibra dietética en panes (Almazán 1945). 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; estos efectos metabólicos dependerían de las propiedades de hidratación, intercambio catiónico y tamaño de la partícula (Anderson 1994, Jenkins 2000).

#### 10.2.2 Pan vegano.

Ya que la dieta vegana está basada en consumir alimentos de origen vegetal, un pan se considera vegano si en su elaboración se incluyen ingredientes a base de cereales.

#### 10.3 Probiótico.

El término probiótico es una palabra relativamente nueva que significa "a favor de la vida" y actualmente se utiliza para designar las bacterias que tienen efectos beneficiosos para los seres humanos y los animales. La observación original de la función positiva desempeñada por algunas bacterias se atribuye a Eli Metchnikoff, ruso galardonado con el premio Nobel por sus trabajos en el Instituto Pasteur a comienzos del siglo pasado, que afirmó que la dependencia de los microbios intestinales con respecto a los alimentos hace posible adoptar medidas para modificar la flora de nuestro organismo y sustituir los microbios nocivos por microbios útiles.

La palabra probiótico no se acuñó hasta 1960, para designar las sustancias producidas por microorganismos que promovían el crecimiento de otros microorganismos (Lilly y Stillwell, 1965). Fuller (1989), con objeto de recalcar el carácter microbiano de los probióticos, definió de nuevo el término como "un suplemento dietético a base de microbios vivos que afecta beneficiosamente al animal huésped mejorando su equilibrio intestinal". Havenaar y Huis in 't Veld (1992) propusieron una definición muy similar: "un monocultivo o cultivo mixto

viable de bacterias que, cuando se aplica a animales o seres humanos, afecta beneficiosamente al huésped mejorando las propiedades de la flora autóctona". Una definición más reciente, aunque probablemente no será la última, es la siguiente: " microorganismos vivos que, cuando se consumen en cantidades apropiadas, confieren al huésped efectos saludables " (Guarner y Schaafsma, 1998).

La OMS define a los probióticos como organismos vivos que administrados en cantidades adecuadas ejercen un efecto beneficioso sobre la salud del hospedador. Para que las bacterias puedan considerarse como probióticos es necesario que cumplan las siguientes características (Arribas et al, 2008):

- Ser de origen humano ya que las cepas aisladas de seres humanos sanos presentan mayor facilidad para colonizar el intestino humano y probablemente no sean patógenas, habiéndose utilizado para definir esta característica el acrónimo inglés "GRAS" ("generally recognized as safe)
- Deben poseer tolerancia a las condiciones ambientales, ya que los microorganismos probióticos han de llegar viables al lugar de acción.

De estas definiciones se desprende la principal característica que deben cumplir los probióticos: deben utilizarse microorganismos vivos en cantidades adecuadas para obtener los efectos deseados.

Como 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.

Se las conoce como BAL, por su capacidad de convertir los hidratos de carbono en ácido láctico y pueden ser homofermentativas o heterofermentativas. Las tres especies más utilizadas y estudiadas son: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* y *Bifidobacterium spp.*

### 10.3.1 Probióticos en alimentos.

El agregado de bacterias probióticas para la elaboración de alimentos funcionales depende, por un lado, del sinergismo que debe establecerse entre estos cultivos y los iniciadores de la fermentación (fermentos, cultivos iniciadores) que permite obtener un producto fermentado con excelentes propiedades sensoriales, y por el otro lado, de los factores extrínsecos que afectan o condicionan la viabilidad de las cepas funcionales. Cabe mencionar que uno de los requisitos principales de este tipo de alimentos es que los microorganismos probióticos permanezcan viables y activos en el alimento y durante el pasaje gastrointestinal para garantizar así su potencial efecto benéfico en el huésped.

Los factores extrínsecos más importantes que afectan la viabilidad y sobrevivencia de las células probióticas son:

- pH (derivado del proceso de fermentación)
- Oxígeno disuelto (especialmente para bifidobacterias)
- Interacciones antagónicas entre especies
- Composición química del medio de cultivo
- Concentración final de azúcares (aumento de la presión osmótica)
- Prácticas de inoculación (momento adecuado para el agregado del cultivo probiótico)
- Temperatura y duración de la fermentación
- Condiciones de almacenamiento del producto

#### 10.3.1.1 Propiedades benéficas de los Alimentos Funcionales Probióticos.

- Intolerancia a la lactosa: El efecto probiótico se debería a una menor concentración de lactosa en el producto debido a la fermentación láctica y a que el probiótico tiene capacidad enzimática a través de un aumento en la actividad de la B-galactosidasa para suplir la deficiencia de lactasa del huésped.

- Efecto Inmunomodulador: Las BAL en los alimentos funcionales deben ser capaces de inducir una inmunoestimulación a nivel de las mucosas y garantizar la ausencia de efectos colaterales tales como la translocación microbiana y la alteración de la permeabilidad intestinal debido a una respuesta inflamatoria exacerbada.
- Efecto gastro-protector: Diversos estudios pusieron en evidencia la efectividad de algunas especies del género *Lactobacillus* contra *H. pylori* entre las cuales podemos mencionar a *L. gasseri* OLL 2716, *L. acidophilus* DDS-1J, *L. casei* cepa *Shirota* y *L. casei* DN 114001. Una posible explicación del efecto antagónico sería que la inducción de prostaglandinas endógenas en respuesta a la producción de elevadas cantidades de ácido láctico en el estómago u otros mecanismos aún no descritos, actuarían como mecanismos de defensa con efecto protector de la mucosa gástrica.
- Actividad antagónica contra rotavirus: Algunas bacterias probióticas han demostrado ser benéficas en el tratamiento de diarrea aguda asociada a rotavirus, tales como *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *L. casei* y *Saccharomyces boulardii*, que disminuyeron significativamente el tiempo de duración de la misma.
- Prevención de reacciones alérgicas: Existe una relación directa entre la función del tejido linfoide asociado al intestino y la respuesta alérgica. Uno de los mecanismos primarios involucrados en este proceso podría ser la supresión celular activa responsable de los eventos proinflamatorios en el intestino, a través de la secreción de citoquinas supresoras. Los probióticos actúan reduciendo la inflamación intestinal, corrigen el desbalance de los linfocitos y estimulan a las citoquinas de los linfocitos Th1.
- Regulación del tránsito intestinal: Ciertas bifidobacterias probióticas (entre ellas *Bifidobacterium animalis* DN 173010) promueven la

producción de ácido acético y otros ácidos orgánicos que estimulan la peristalsis y regulan el tránsito intestinal.

### 10.3.2. Probióticos micro encapsulados.

La diversidad de productos con probióticos es escasa ya que al ser microorganismos, requieren de situaciones muy específicas para que permanezcan en condiciones de reproducirse y proliferar en el intestino de quien los consume para brindarle beneficios a su salud. Es importante mencionar que la escasa resistencia de los microorganismos a los procesos tecnológicos y a diferentes condiciones ambientales como el pH, el oxígeno o la temperatura, además, pueden ser destruidos durante la digestión, principalmente por el ambiente ácido del estómago y del intestino. La bilis y las enzimas digestivas pueden también alterar diversas estructuras y funciones de los probióticos, disminuyendo su viabilidad. Esto es relevante porque los probióticos, deben llegar en buenas condiciones al intestino grueso o colon, donde realizan las funciones que benefician a su hospedero.

Por todo esto, es necesario que los microorganismos se introduzcan protegidos por una barrera física que evite su exposición a las condiciones adversas del entorno. Para ello, recurrimos a las técnicas de micro encapsulación, que consisten en el recubrimiento de pequeñas cantidades de un determinado compuesto mediante un material protector que es generalmente de naturaleza polimérica.

La microencapsulación protege a los materiales encapsulados de factores como el calor y la humedad, permitiendo mantener su estabilidad y viabilidad, también se ha utilizado para mejorar el sabor y la estabilidad de medicamentos y como barrera contra malos olores y sabores. Ayuda, además, a que los materiales frágiles resistan las condiciones de procesamiento y empaque mejorando sabor, aroma, estabilidad, valor nutritivo y apariencia. En el caso de fármacos cuya liberación se lleve a cabo en el estómago o en el intestino, permite una máxima absorción de los compuestos con un mínimo de reacciones adversas. Además la microencapsulación protege a los probióticos

de los bacteriófagos y de los ambientes adversos, como la congelación y las soluciones gástricas, y facilita la manufacturación de productos fermentados, ya que, proporciona unas condiciones más constantes.

Los probióticos microencapsulados pueden aplicarse en helados, embutidos, quesos, rellenos de galletas e incluso en productos de panificación, aunque en este último caso es necesario que la protección sea suficiente para soportar la temperaturas de horneado o bien que se adicionen en etapas posteriores con cubiertas extras como películas para asegurar su viabilidad.

La selección del método de encapsulación estará en función del tamaño medio de la partícula requerida, de las propiedades físicas del agente encapsulante, de la sustancia a encapsular, de las aplicaciones del material encapsulado propuesto, del mecanismo de liberación deseado y del coste.

#### 10.3.2.1 *Lactobacillus plantarum*.

*Lactobacillus plantarum* es una bacteria Grampositiva no patógena que existe naturalmente en la saliva humana y el tracto gastrointestinal. Es el género más grade del grupo de bacterias ácido lácticas. Es uno de los probióticos más versátiles que se encuentra en el material vegetal y el tracto gastrointestinal de los animales, incluyendo los seres humanos. Se utiliza en la fermentación de alimentos como encurtidos y pan de masa fermentadas y es una opción más saludable en la conservación de alimentos.

La morfología de los lactobacilos es variable, desde bacilos largos, rectos o ligeramente curvados, hasta cocobacilos. Su longitud y curvatura depende de la edad del cultivo, la composición del medio y la tensión de oxígeno. La división celular de los lactobacilos tiene lugar en un solo plano, mientras que la tendencia a formar cadenas varía entre las distintas especies e, incluso, entre las distintas cepas, dependiendo de la fase de desarrollo y del pH.

*Lactobacillus plantarum* ha demostrado ser altamente resistente a la mayoría de los antibióticos. Cuando una colonia sana de *Lactobacillus plantarum* vive

en los intestinos, evita la sobreproducción de la levadura y elimina problemas comunes derivados del uso de antibióticos (Taylor & Michel, 2007). Junto con la promoción de la salud digestiva normal, *Lactobacillus plantarum* ha demostrado ser un tratamiento eficaz para el síndrome de los agentes patógenos pues evita que las bacterias dañinas se adhieran a la mucosa y compite por los nutrientes contra ellas, por lo que permite preservar nutrientes, vitaminas y antioxidantes. También ha demostrado la rara habilidad de producir L.lisina, un aminoácido beneficioso (Manzano & Estupiñan, 2001).

#### 10.3.2.2 *Lactobacillus plantarum* KY131967.

*Lactobacillus plantarum* KY131967 es una bacteria ácido láctica que fue aislada de una bebida autóctona del estado de Chiapas (Alcántara-Hernández et al., 2010). Este microorganismo ha sido evaluado *in vitro* (a nivel matraz) evidenciando interesantes atributos de importancia probiótica como una alta densidad poblacional ( $4.69 \times 10^9$  UFC/ml), tiempo de duplicación corto ( $1.16 \pm 0.10$  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 microaerofílicas, reportando una densidad poblacional de  $6.03 \times 10^{10}$  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 ( $2.66 \times 10^6$  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  $1 \times 10^{10}$  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 aspersion, 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 aw 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%.

#### 10.4 Género *Crotalaria*.

Las especies del género *Crotalaria* tienen considerable valor como forraje y para ensilaje, como abono verde, como fuente de fibras, como cobertura del suelo en el control de la erosión y como ornamentales (Bernal 1986); algunas especies constituyen importantes plantas productoras de fibras para la industria de la celulosa (White et al. 1965; Cunningham et al. 1978). El género *Crotalaria* presenta una amplia tolerancia de condiciones climáticas y edáficas, limitada por aridez y frío en extremo. Muchas especies de *Crotalaria* tienen un sabor amargo en el estado verde y pueden ser aludidas por el ganado, *C. lanceolata*, *C. pallida* y *C. spectabilis* hacen parte de este grupo. Algunos experimentos con *Crotalaria* molida y *Medicago sativa* (alfalfa) para la producción de leche, han mostrado que *Crotalaria* es una planta de considerable valor alimenticio comparable con la alfalfa (McKee et a., 1931).

La fotoquímica de este género ha permitido identificar un buen número de metabolitos secundarios, entre los que se encuentran aminas, flavonoides, cumarinas, lectinas (Wink y Mohamed, 2003) y alcaloides de tipo



quinolizidínicos y pirrolidizidínicos; los últimos son tóxicos para los mamíferos (Steglich et al, 1997; Asres et al, 2004).

La información sobre toxicidad ha sido resumida por Miller (1967); mientras que hay considerable literatura sobre los efectos tóxicos en animales, incluyendo aves, que ingieren forraje verde y heno de *Crotalaria*, hay un número relativamente pequeño de especies cuyas semillas han sido realmente comprobadas como tóxicas.

*Crotalaria juncea* es reconocida por contener bajos niveles de alcaloides pirrolidizidínicos, como junceina y tricodesmina; se ha demostrado que al someter al ganado a su consumo por un periodo de dos meses, no se producen cambios patológicos, lo que sugiere que *C. juncea* contiene una cantidad de alcaloides suficientemente bajas como para utilizar esta planta en alimentación animal.

Las semillas de *C. micans*, por el contrario, son empleadas como alimento de aves de corral. De acuerdo con Jones & Earle (1966), las semillas de *Crotalaria* contienen 24 a 41% de proteína. El análisis de los constituyentes de las semillas (Miller, 1967) indican que contienen gran cantidad de gomas solubles en agua, mucilagos y proteínas. En general, las especies del género tienen valor económico como ornamentales; es importante mencionar en este aspecto a *Crotalaria agatiflora*, *C. micans*, *C. paulina* y *C. spectabilis*.

#### 10.4.1 *Crotalaria longirostrata*.

El chipilín (*Crotalaria longirostrata*) es una leguminosa tropical domesticada desde la época prehispánica (Hernández y León 1994) manteniendo las características antropocéntricas reportadas para otras plantas del país (Vieyra et al 2002). Se encuentra constituido por 550 a 600 especies a nivel mundial, de las cuales 89 están reportadas para América; en Venezuela hubo un primer reporte de 8 especies según Knuth (1928), en 1945 Pittier et al. reportaron 10, luego Matos (1959) indicó 15.

#### 10.4.2 Descripción taxonómica.

Pertenece a la familia *Fabeceae*, es originaria de Centroamérica y es considerada a nivel mundial como una de las 16 especies más importantes de hojas comestibles (Arias et al., 2003). Es apreciado por sus hojas y brotes, diversos análisis químicos indican que el follaje es rico en calcio, hierro, tiamina, riboflavina, niacina y ácido ascórbico. (Morton, 1994). Es conocida con diversos nombres según la región donde se cultive como: chipilín de zope, chincín de zapote, chipilín de caballo, chop, tcap-in. (Stanley y Steyermark, 1946; Cáceres 1996).

#### 10.4.3 Descripción botánica.

La planta de chipilín es perenne y la planta alcanza hasta 5 pies de altura (1,5 metros), con atractivas hojas verdes comestibles y flores amarillas. Es considerado un quelite, palabra del vocablo náhuatl *quilitl* que significa verdura tierna comestible. En comparación con otras hierbas de este grupo (como la hoja santa o los romeritos) cuenta con un olor característico muy penetrante. Su sabor es dominante, como el caso del epazote, por lo cual resulta difícil de aceptar por el paladar de algunas personas. Su consumo reduce el estrés; ayuda al crecimiento, la reparación de tejidos y la producción de hormonas, enzimas y anticuerpos. Es importante en la recuperación de pacientes con anemia y es una rica fuente de proteína vegetal.

#### 10.4.4 Usos e importancia.

Para la medicina tradicional, los usos que tiene esta planta son de mucha ayuda, ya que el cocimiento de las hojas se ha utilizado por vía oral para el tratamiento de blenorragia, insomnio y reumatismo. Por vía tópica, el cocimiento de tallos y frutos se usa para lavados. El zumo de la planta cruda se aplica como cataplasma y emplastos para la curación de heridas en corto

tiempo. La decocción de la raíz se usa para tratar pacientes con alcoholismo e insomnio. A las hojas se le atribuyen propiedades hipnóticas, mineralizante, narcótica, purgante y vomitiva (Cáceres, 1996).

## 10.5 Metabolitos.

El metabolismo en los organismos vivos, es un gran grupo de reacciones bioquímicas catalizadas y reguladas por enzimas que producen energía en forma de ATP, producen sustancias necesarias para el crecimiento y el desarrollo de tejidos, y ayudan al organismo a sobrevivir en circunstancias diferentes.

Los compuestos producidos en el metabolismo se llaman metabolitos, estos pueden ser primarios o secundarios, dependiendo del origen biosintético y función bioquímica de dichos compuestos. Los primarios son los esenciales para todas las formas de vida, estos compuestos incluyen los carbohidratos, grasas, proteínas y ácidos nucleicos que son necesarios para crear y mantener la vida. Por lo general están involucrados en la regulación de la energía de los organismos con el crecimiento y desarrollo de los tejidos.

### 10.5.1 Metabolitos secundarios.

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) 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 (Fig.1). (Taiz & Zeiger, 2006).

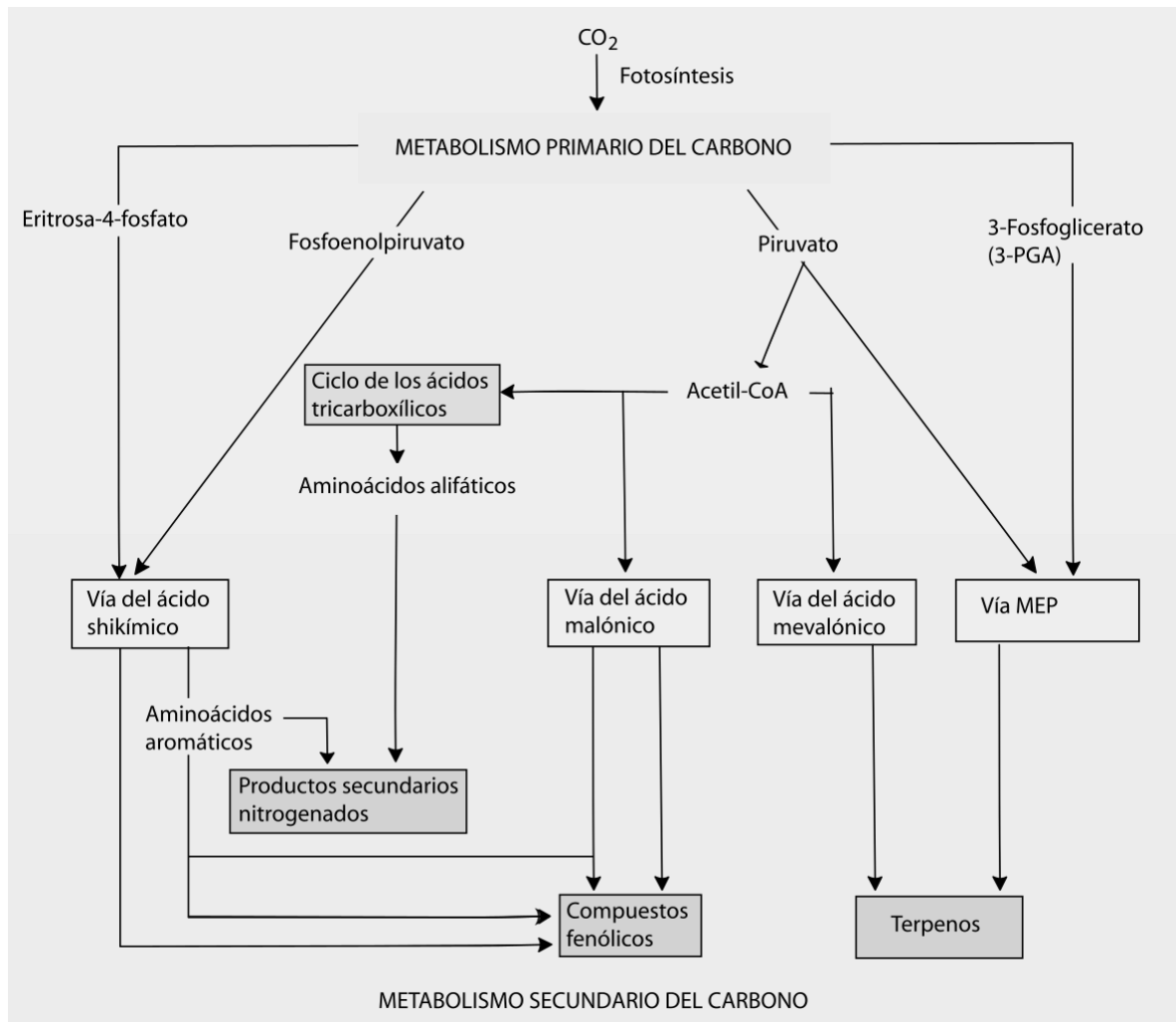


Figura 1. Esquema de las principales rutas de biosíntesis de metabolitos secundarios y sus interrelaciones con el metabolismo primario (Taiz & Zeiger, 2006).

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.
- Compuestos nitrogenados.
- Compuestos fenólicos

Los flavonoides son pertenecientes a un grupo de los compuestos fenólicos, que se clasifican como flavonoles flavononas, flavonas, flavonoles y las

isoflavonas de acuerdo con las posiciones de los sustitutos presentes en la molécula. Estos compuestos se encuentran propagados en la fotosíntesis de las células vegetales, se pueden hallar en frutas, verduras, nueces, semillas, tallos y flores, así como en té, el vino, el propóleo y la miel. La función de los flavonoides en las flores es proporcionar colores atractivos para polinizadores de plantas. En las hojas, estos compuestos tienen la función de promover la supervivencia fisiológica de la planta, que lo protege de los hongos patógenos y la radiación UV-B. Además, es tan implicados en la fotosensibilización, transferencia de energía, las acciones de las hormonas de crecimiento de plantas, el control de la respiración y la determinación de la fotosíntesis, la morfogénesis y el sexo.

#### 10.5.1.1 Fenoles.

Las plantas producen una gran variedad de productos secundarios que contienen un grupo fenol, un grupo funcional hidroxilo en un anillo aromático (Fig.2):

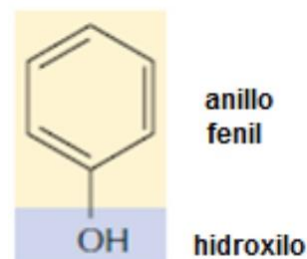


Figura 2. Grupo fenol.

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 glicósidos 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:

- Fenoles y Ácidos fenólicos simples
- Flavonoides

#### 10.5.1.2 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 (Fig.3).

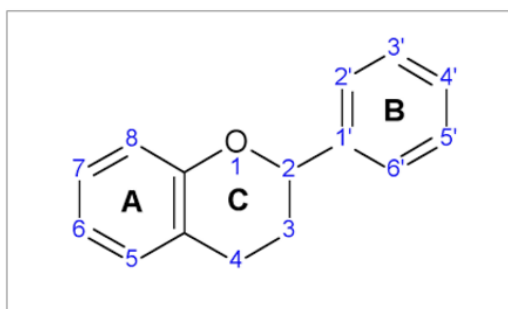


Figura 3. Estructura de un flavonoide

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, flavonas y antocianidinas (Fig. 4).

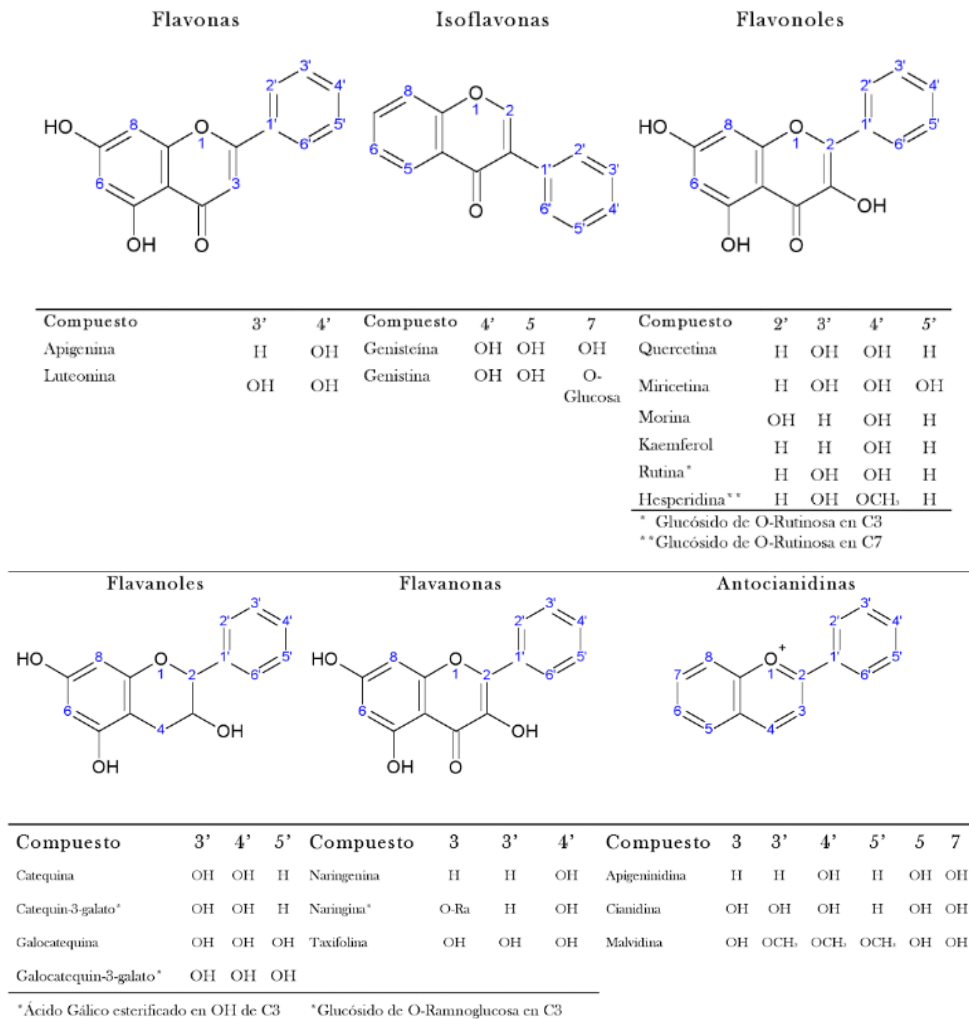


Figura 4. Clasificación de flavonoides.

A los flavonoles y flavonas 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-glicósidos, 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 (Neira, 2009).

### 10.5.1.3 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 oxigénicas reactivas (ROS por sus siglas en inglés).

Las especies oxigénicas 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 (Mosquera & Niño, 2005).

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 (Holguin, 2010).

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 (Neira, 2009).

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 glicosílicos: 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 glicósilo: las gliconas son antioxidantes más potentes que sus correspondientes glicósidos. 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.

## 11. Análisis proximales.

El propósito principal de un análisis proximal es determinar, en un alimento, el contenido de humedad, grasa, proteína y cenizas. Estos procedimientos químicos revelan también el valor nutritivo de un producto y como puede ser combinado de la mejor forma con otras materias primas para alcanzar el nivel deseado de los distintos componentes de una dieta. Es también un excelente procedimiento para realizar control de calidad y determinar si los productos terminados alcanzan los estándares establecidos por los productores y consumidores.

Se aplican en primer lugar a los materiales que se usan para formular una dieta como fuente de proteína o de energía, y a alimentos terminados, como un control para verificar que cumplan con las especificaciones o requerimientos establecidos durante la formulación.

El sistema proximal para el análisis ordinario de los piensos se diseñó a mediados del siglo XIX en la estación experimental de Weende, en Alemania (Henneberg y Stohmann, 1860, 1864). Se creó para obtener una clasificación muy amplia y con un nivel máximo de los componentes de alimentos.

### 11.1 Humedad.

Los valores del agua siguen siendo un componente esencial de las bases de datos de composición de alimentos, porque el contenido de agua es uno de los elementos más variables, especialmente en los alimentos vegetales. Esta variabilidad afecta a la composición del alimento considerado en conjunto.

Los métodos se basan en la medición directa o indirecta del agua eliminada del alimento, los cambios en las propiedades físicas que varían sistemáticamente con el contenido de agua o la medición de la reactividad química del agua.

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. (Hart, 1991).

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

- a) El comprador de materias primas no desea adquirir agua en exceso.
- b) El agua, si está presente por encima de ciertos niveles, facilita el desarrollo de los microorganismos.
- c) Para la mantequilla, margarina, leche en polvo y queso está señalado el máximo legal.
- d) Los materiales pulverulentos se aglomeran en presencia de agua, por ejemplo azúcar y sal.
- e) La humedad de trigo debe ajustarse adecuadamente para facilitar la molienda.
- f) La cantidad de agua presente puede afectar la textura.
- g) 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.

#### 11.1.1 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 (Kirk et al, 1996).

#### 11.1.1.1 Método por secado de estufa.

La determinación de secado en estufa se basa en la pérdida de peso de la muestra por evaporación del agua. Para esto se requiere que la muestra sea térmicamente estable y que no contenga una cantidad significativa de compuestos volátiles. El principio operacional del método de determinación de humedad utilizando estufa y balanza analítica, incluye la preparación de la muestra, pesado, secado, enfriado y pesado nuevamente de la muestra. (Nollet, 1996).

Notas sobre las determinaciones de humedad en estufa.

- Los productos con un elevado contenido en azúcares y las carnes con un contenido alto de grasa deben deshidratarse en estufa de vacío a temperaturas que no excedan de 70°C.
- Los métodos de deshidratación en estufa son inadecuados para productos, como las especias, ricas en sustancias volátiles distintas del agua.
- La eliminación del agua de una muestra requiere que la presión parcial de agua en la fase de vapor sea inferior a la que alcanza en la muestra; de ahí que sea necesario cierto movimiento del aire; en una estufa de aire se logra abriendo parcialmente la ventilación y en las estufas de vacío dando entrada a una lenta corriente de aire seco.
- La temperatura no es igual en los distintos puntos de la estufa, de ahí la conveniencia de colocar el bulbo del termómetro en las proximidades de la muestra. Las variaciones pueden alcanzar hasta más de tres grados en los tipos antiguos, en los que el aire se mueve por convección. Las estufas más modernas de este tipo están equipadas con eficaces sistemas, que la temperatura no varía un grado en las distintas zonas.
- Muchos productos son, tras su deshidratación, bastante higroscópicos; es preciso por ello colocar la tapa de manera que ajuste tanto como sea

posible inmediatamente después de abrir la estufa y es necesario también pesar la cápsula tan pronto como alcance la temperatura ambiente; para esto puede precisarse hasta una hora si se utiliza un desecador de vidrio.

- La reacción de pardeamiento que se produce por interacción entre los aminoácidos y los azúcares reductores libera agua durante la deshidratación y se acelera a temperaturas elevadas. Los alimentos ricos en proteínas y azúcares reductores deben, por ello, desecarse con precaución, de preferencia en una estufa de vacío a 60°C. (Hart, 1991)

#### 11.1.1.2 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 (Nollet, 1996).

#### 11.1.1.3 Método de secado en termobalanza.

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 (Nollet, 1996).

#### 11.1.1.4 Método de destilación azeotrópica.

El método se basa en la destilación simultánea del agua con un líquido inmisible en proporciones constantes. El agua es destilada en un líquido inmisible de alto punto de ebullición, como son tolueno y xileno. El agua destilada y condensada se recolecta en una trampa Bidwell para medir el volumen (Nollet, 1996).

#### 11.1.1.5 Método de Karl Fischer.

Es el único método químico comúnmente usado para la determinación de agua en alimentos que precisamente se basa en su reactivo. Este reactivo fue descubierto en 1936 y consta de yodo, dióxido de azufre, una amina (originalmente se empleaba piridina sin embargo por cuestiones de seguridad y toxicidad se está reemplazando por imidazol) en un alcohol (ejemplo metanol).

Inicialmente, el dióxido de azufre reacciona con el metanol para formar el éster el cual es neutralizado por la base. El éster es oxidado por el yodo a metil sulfato en una reacción que involucra al agua.

Habitualmente se utiliza un exceso de dióxido de azufre, piridina y metanol de manera que la fuerza del reactivo venga determinada por la concentración de yodo. Este reactivo es un poderoso deshidratante, por lo que tanto la muestra como el reactivo deben protegerse contra la humedad del aire, cualquiera que sea la técnica usada. Se hace por titulación y estas pueden ser visuales o potenciométricas. En su forma más simple el mismo reactivo funciona como indicadores. La disolución muestra mantiene un color amarillo canario mientras haya agua, que cambia luego a amarillo cromato y después a pardo en el momento del vire. En su forma más simple el método potenciométrico consta de una fuente de corriente directa, un reóstato, un galvanómetro o microamperímetro y electrodos de platino, dos cosas son necesarias para la determinación: una diferencia de potencial que nos dé una corriente y el contacto del titulante con el analito. (Hart, 1991) Este método se aplica a alimentos con bajo contenido de humedad por ejemplo frutas y vegetales

deshidratados, aceite y café tostado, no es recomendable para alimentos con alto contenido de humedad. (James, 1999)

## 11.2 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. (Kirk et al, 1996) 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. (Hart, 1991)

Notas:

- a) Los productos que contienen mucha agua se secan primero sobre un plato eléctrico caliente o al baño María.
- b) La consideración principal es que el producto no desprenda humos.
- c) En general, la temperatura adecuada de la mufla son 500°C. Sin embargo, los cloruros, pueden volatilizarse a esta temperatura.
- d) Las cenizas se utilizan muchas veces para la determinación de constituyentes individuales, por ejemplo cloruros, fosfatos, calcio y hierro. (Kirk et al, 1996)



Para la determinación de cenizas se siguen principalmente 2 métodos, en seco y vía húmeda.

- 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. Antología de Fundamentos 8 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. (Nollet, 1996)
- Determinación de cenizas en húmedo. La determinación húmeda se basa en la descomposición de la materia orgánica en medio ácido por lo que la materia inorgánica puede ser determinada por gravimetría de las sales que precipiten, y también por algún otro método analítico para las sales que permanezcan en disolución acuosa o ácida. Para la determinación húmeda se dan cenizas alcalinas, ácidas y neutras y esto se basa en el tipo de anión o catión ya sea metálico o complejo de tal forma hay minerales como tartratos, citratos que producirán cenizas con un carácter alcalino. Es necesario tomar en cuenta que también un índice de alcalinidad de cenizas es muestra del contenido de carbonatos en disolución acuosa

### 11.3 Nitrógeno total.

El examen de Lakin (1978) sigue conteniendo una exposición exhaustiva del análisis del nitrógeno y los componentes nitrogenados. Los métodos han sido sometidos también a breve examen por Sullivan (1993), al ocuparse de los métodos oficiales de la AOAC, Chang (1998) y Southgate (1999).

El sistema proximal, en el que se miden las «proteínas» como el nitrógeno total multiplicado por un factor específico, sigue siendo el predominante en los estudios sobre la composición de alimentos. Los valores más citados

para las «proteínas» en las bases de datos de composición de alimentos se derivan en realidad de los valores del nitrógeno total o el nitrógeno orgánico total. En la mayoría de los casos, el nitrógeno total se mide utilizando alguna versión del método de Kjeldahl (1883), el cual mide el nitrógeno orgánico total. En este método se digiere la materia orgánica con ácido sulfúrico concentrado caliente. Para elevar el punto de ebullición del ácido se le añade una «mezcla catalizadora», que normalmente contiene un verdadero agente catalítico (mercurio, cobre o selenio) junto con sulfato de potasio. Todo el nitrógeno orgánico se convierte en amoníaco, que se suele medir mediante titulación o, en ocasiones más raras, mediante colorimetría.

En el método original se utilizaba una porción analítica relativamente grande (1 g-2 g), pero esto exige grandes cantidades de ácido. Es mucho más habitual el uso de métodos «microKjeldahl», puesto que producen una cantidad reducida de humos ácidos y también necesitan menos ácido y mezcla catalizadora. Las consideraciones ambientales ejercen una presión considerable para que se garantice la eliminación inocua del mercurio, y especialmente para que se reduzca al mínimo la utilización de ácido. Los micrométodos pueden automatizarse en varios niveles. La automatización de las fases de destilación y titulación funciona bien, pero en el caso de la digestión ha resultado bastante difícil.

El método de Dumas mide el nitrógeno total como gas nitrógeno después de la combustión completa del alimento. La comparación de los resultados obtenidos con los que se consiguen utilizando el método de Kjeldahl demuestra que están bastante de acuerdo (King-Brink y Sebranek, 1993). El método se ha automatizado con éxito y, aunque los instrumentos son caros, es posible aplicarlo a un número elevado de muestras con notable precisión. En el equipo se utilizan porciones analíticas muy pequeñas y es esencial que la porción analítica esté muy bien dividida. También se puede utilizar la NIR para medir el nitrógeno en algunos alimentos, aunque se requiere un gran número de muestras de calibración.

#### 11.4 Proteínas.

Desde la introducción del sistema proximal de análisis, los valores de las «proteínas brutas» se han calculado multiplicando el nitrógeno total (N) por un determinado factor. Este factor era al principio 6,25, tomando como base la hipótesis de que las proteínas contenían un 16 por ciento de N. Desde hace bastante tiempo se sabe que las proteínas de origen vegetal (y la gelatina) contienen más N, por lo que se requiere un factor más bajo. Jones, Munsey y Walker (1942) midieron el contenido de nitrógeno de una amplia gama de proteínas aisladas y propusieron una serie de factores específicos para distintas categorías de alimentos. Estos factores, que se enumeran en la Tabla 2, se han adoptado de manera generalizada y se utilizaron en el examen de las necesidades de proteínas de la FAO/OMS (1973). Varios autores han criticado el uso de estos factores tradicionales para los distintos alimentos (por ejemplo, Tkachuk, 1969). En Heidelbaugh et al (1975) se evaluaron tres métodos diferentes de cálculo (aplicación del factor de 6,25, aplicación de factores tradicionales y suma de los datos de los aminoácidos) y se encontraron variaciones de hasta un 40 por ciento. Sosulski e Imafidon (1990) obtuvieron un factor medio de 5,68 basándose en el estudio de los datos de los aminoácidos y recomendaron el uso de un factor de 5,70 para alimentos mixtos.

**Tabla 2.** Factores para la conversión de los valores de nitrógeno en proteínas

<b>Producto alimenticio</b>	<b>Factor</b>
<b>Productos animales</b>	
Carne y pescado	5.55
Gelatina	6.38
Leche y productos lácteos	6.40
Leche humana	6.37
Huevos	6.25
<b>Productos vegetales</b>	
Trigo entero	5.83
Arroz y harina de arroz	5.95
Centeno y harina de centeno	5.83
Cebada y harina de cebada	5.83
Avena	5.83
Mijo	6.31
Maíz	6.25
Frijoles	6.25
Soja	5.71
Nueces	
Almendras	5.18
Otras	5.30

\*Cuando no se indica ningún factor específico, se debe utilizar el de 6.25 hasta que se haya determinado uno más apropiado.

Fuente: FAO/OMS 1973

## 12. METODOLOGÍA.

### 12.1. Preparación de harinas vegetales.

Las hojas de chipilín (*Crotalaria longirostrata*) fueron 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. 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.

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

### 12.2.1 Cultivo en matraz.

Se inoculó el contenido de 2 tubos de ensaye que contenían 10 ml cada uno de *Lactobacillus plantarum* KY131967 en un matraz Erlenmeyer de 500 ml con 205 ml de caldo MRS (marca Difco). El matraz se incubó durante 8 h a 110 rpm en una agitadora THERMO SCIENTIFIC modelo MAXQ 2000 a temperatura ambiente (25-30 °C).

### 12.2.2 Cultivo en Biorreactor.

El caldo microbiano del cultivo anterior fue inoculado 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.

### 12.2.3 Cosecha de la biomasa.

Al término del cultivo la biomasa producida en el fermentador fue cosechada por medio de centrifugación a 4000 rpm por 20 min a 4°C, empleando una ultracentrífuga marca EPPENDORF modelo 5810 R.

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

### 12.3.1 Leche de soya.

La leche de soya se obtuvo de una proporción 7 L de agua por 1 kg de frijol de soya marca CEREPAK, el cual previamente se hidrato con agua purificada cubriendo el nivel del frijol durante un tiempo de 12 h, al término de este tiempo el líquido fue drenado. Los granos fueron licuados y posteriormente se filtraron 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/pulg<sup>2</sup> durante 10 min.

### 12.3.2 Maltodextrina al 35%.

Se preparó la maltodextrina marca INAMALT al 35% en agua, al mezclarlos se evitó la formación de grumos, la mezcla se dejó reposar durante 15 h a temperatura ambiente 27-28°C. Posteriormente la goma se depositó a un matraz para esterilizar a 15 lb/pulg<sup>2</sup> por 15 min.

### 12.3.3 Goma arábica al 7.5%.

Se preparó la goma arábica marca HYCEL al 7.5% en agua, al mezclarlos se evitó la formación de grumos, la mezcla se dejó hidratar durante 15 h a temperatura ambiente 27-28°C. Posteriormente la goma se depositó a un matraz para esterilizar a 15 lb/pulg<sup>2</sup> por 15 min.

## 12.4 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.

## 12.5 Secado por aspersión.

La emulsión resultante se alimentó a un secador por aspersión 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 pesaron y se conservaron en bolsas metálicas herméticas selladas al vacío, empleando una selladora TOR REY Modelo, se almacenó a 4°C, hasta su empleo.

## 12.6 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 10E-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 de 10 ml con medio 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 realizaron diluciones seriadas según fue lo requerido.

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 aspersión se determinó mediante la siguiente ecuación.

$$\text{Sobrevivencia \%} = \frac{\log N}{\log N_i} \times 100 \text{ Ec... (1)}$$

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

### 12.7 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 malta, 2.09% salvado de trigo y 2.09% de mejorante. Los ingredientes fueron mezclados en una batidora marca HAMILTON BEACH. Se dejó reposar la masa obtenida a temperatura ambiente (28- 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 Chipilín (*Crotalaria longirostrata*), además de la carga microbiana de probiótico microencapsulado a una concentración de alrededor de  $4 \times 10^6$  UFC/g de producto final. Las unidades experimentales se almacenaron individualmente en empaques plásticos cerrados, 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).

### 12.8 Diseño experimental.

Se utilizó un diseño experimental factorial completamente al azar con tres repeticiones. Los factores a estudiar fueron: porcentaje de sustitución de la harina en la mezcla (0, 3 y 5%) y la adición del microorganismo microencapsulado. Todos los resultados fueron analizados mediante un análisis de varianza con un nivel de probabilidad de 0.05. El monitoreo se realizó terminado el horneado, a los 5 días y 10 días de almacenamiento.



## 12.9 Análisis proximal de los productos de panificación.

Los productos de panificación formulados con harina de trigo adicionados con *L. plantarum* KY131967 y suplementados con harina de Chipilín se analizaron en base a los métodos establecidos por la Association of Oficial Analytical Chemists (AOAC, 1999). Humedad en base al método (925.10; AOAC), cenizas (923.03; AOAC), grasas (920.39; AOAC), fibra dietética total (62.09; AOAC) y nitrógeno total por el método Kjeldahl (3.3.1 y 4.3.1 de la AOAC).

### 12.9.1 Humedad.

Se determinó la humedad a 3 gr de muestra en la termobalanza marca OHAUS modelo MB1, a una temperatura de 60°C.

### 12.9.2 Cenizas.

Se pesaron en crisoles 4 gr de cada muestra previamente secada y pulverizada en un mortero. Se precalcinaron un parrilla hasta que las muestras obtuvieran un color negro. Enseguida los crisoles se pasaron a un horno marca COLE-PALMER a 550 °C y se dejaron durante 2 horas. Pasado ese tiempo se preenfriaron 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:

$$\%cenizas\ totales = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \times 100 \quad \text{Ec...}(2)$$

### 12.9.3 Nitrógeno total.

#### ➤ Digestión.

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<sub>4</sub>), 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 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.

➤ Destilación

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, previamente preparado.

➤ Titulación

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:

$$\% \text{ Nitrógeno} = \frac{\text{ml de HCl} \times N \times 0.014 \times 100}{\text{muestra en gramos}} \quad \text{Ec... (3)}$$

$$\% \text{ Proteínas} = \% \text{ Nitrógeno} \times \text{Factor} \quad \text{Ec... (4)}$$

## 12.10 Evaluación de antioxidantes, fenoles totales y flavonoides en la harina vegetal y en los productos de panificación

Estas evaluaciones se realizaron a las unidades experimentales después del horneado, a los 5 y 10 días después del almacenamiento. Los panes se

sometieron a extracción de acuerdo a para su posterior cuantificación de metabolitos secundarios y evaluación de actividad antioxidante.

#### 12.10.1 Obtención del extracto de harina vegetal.

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 (sonicador marca COLE-PARMER modelo 08855-00) por 2 horas a una temperatura de 10 °C, y posteriormente se centrifugo a 3000 rpm durante 10 min a 4 °C. Se almaceno a -18°C cubriéndolos de la luz hasta su uso.

#### 12.10.2 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 EPPENDORF modelo 5810 R. Luego el sobrenadante fue almacenado a -18 °C hasta su empleo.

12.10.3 Evaluación de Actividad antioxidante por el método de DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate).

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 algunas modificaciones.

Se preparó en un frasco ámbar una solución madre de ácido ascórbico [1 m/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 540 nm en un espectrofotómetro marca COLE PALMER UV-2100.

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

$$AA\% = 100 - \frac{(\text{Abs muestra} - \text{Abs blanco}) * 100}{\text{Abs control}} \quad \text{Ec... (5)}$$

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.

12.10.4 Determinación del contenido de Fenoles totales (método colorimétrico de Folin-Ciocalteu).

La concentración de fenoles totales se determinó por el método escrito por Singleton (1999) con algunas modificaciones, utilizando ácido gálico como referencia.

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 eq. ácido gálico/g harina de chipilín).

#### 12.10.5 Determinación del contenido de flavonoides totales (método colorimétrico del Cloruro de Aluminio).

A 0.5 ml de muestra diluida se agregaron 1.5 ml de etanol, 0.1 ml de  $\text{AlCl}_3$  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 flavonas y flavonoles 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.

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

#### 12.11 Sobrevivencia de *Lactobacillus plantarum* KY131967 en los productos de panificación.

Para evaluar 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, se realizaron diluciones seriadas y siembra en placa con agar MRS según se requirió.

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, mediante la siguiente ecuación.

$$\text{Sobrevivencia \%} = \frac{\log N}{\log N_i} \times 100 \quad \text{Ec... (6)}$$

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.

### 13. Resultados y discusiones.

#### 13.1 Rendimiento de harina vegetal.

De 9.9 Kg de hojas frescas de Chipilín se obtuvieron 1.8 Kg de harina, obteniéndose así un rendimiento del 18.18 %

#### 13.2 Rendimiento de *L. plantarum* KY131967 en fermentador.

El volumen de caldo cosechado fue de 2.054 L. Se caldo en tubos Falcon de 50 ml, obteniendo un total de 48 tubos con 40 ml cada uno. Se centrifugaron, y se obtuvo un volumen de paquete celular aproximadamente de 5-8 ml.

#### 13.3 Viabilidad de *L. plantarum* KY131967 en encapsulado.

En la tabla 3 se puede observar una sobrevivencia entre el 94-100%. Estos datos obtenidos demuestran que esta bacteria ácido láctica tuvo una resistencia ante el estrés sometido por el secado y a la refrigeración en donde se mantuvo almacenada. Por otro lado, Ramírez (2017) evaluó la viabilidad de las microcápsulas obtenidas utilizando leche de soya-maltodextrina y obtuvo una sobrevivencia de 85-95%, por lo que la composición de la emulsión, el proceso de secado y el almacenamiento no afectaron en la sobrevivencia de la bacteria microencapsulada.

**Tabla 3.** Sobrevivencia de *L. plantarum* KY131967 al encapsulado.

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

#### 13.4 Productos de panificación.

Se sustituyeron 15 y 25 g de harina de trigo por harina de Chipilín para la formulación de los panes al 3 y 5% respectivamente, de harina vegetal (Tabla 4).

**Tabla 4.** Formulación para los productos de panificación para los distintos porcentajes de adición de harina vegetal.

Formulación (g)	0%	3%	5%
Sal	15	15	15
Aceite	45.8	45.8	45.8
Leche de almendra	216.658	216.658	216.658
Mejorante	20	20	20
Levadura	30	30	30
Salvado	20	20	20
Harina de malta	20	20	20
Agua	125	125	125
Harina de trigo	450	435	425
BAL encapsulada	50	50	50
Harina vegetal	0	15	25
<b>Masa g</b>	$\Sigma 992.46$	$\Sigma 977.46$	$\Sigma 967.46$
<b>Pan g</b>	<b>853</b>	<b>869.3</b>	<b>852</b>

Durante su almacenamiento (4°C), se pudo observar que los panes al tiempo seis presentaban contaminación por lo que no se procedió a realizarles sus respectivos análisis.

### 13.9 Análisis proximales.

Los análisis proximales se realizaron por duplicado para cada porcentaje y tiempo respectivo. Los resultados que se obtuvieron fueron los contenidos en la tabla 5.

**Tabla 5.** Análisis proximales de los productos de panificación adicionados con harina vegetal al 0,3 y 5%.

PAN	0%		3%		5%	
	t 0	t 5	t 0	t 5	t 0	t 5
<b>Humedad (g/100g)</b>	23.88a	26.58a	26.08a	26.31a	24.19a	27.65a
<b>Cenizas</b>	5±0.001a	5±0.002a	5±0.001a	5±0.001a	5±0.003a	5±0.001a
<b>Proteína</b>	7.75±0.078a	7.50±0.069a	8.37±0.058b	8.69±0.049b	9.19±0.070b	9.37±0.065b

El contenido de humedad para los panes fue inferior al 27.7%. El porcentaje de cenizas se mantuvo en 5%. No se encuentra una diferencia estadística significativa para humedad y cenizas. Castañeda (2000) reporta un contenido de cenizas de 3-6% por lo que lo obtenido se encuentra dentro de lo reportado.

Silveira y Salas (2015), analizaron la composición de pan elaborado con harina de trigo y obtuvieron un contenido de humedad de 37.2%. Considerando que la humedad es un factor de calidad en la conservación de los alimentos, y comparando lo reportado en otras investigaciones, se observa que los panes veganos contienen un menos contenido de humedad, lo cual nos da a conocer que nuestro pan tiene una mejor estabilidad.

En la tabla 5 se observa que hay una diferencia estadística significativa para el contenido de proteínas. Comparando con lo reportado por Bautista et al, (2003) obtuvieron 12.45±0.44 (g/100). Por otro lado, Silveira y Salas (2015) reportan 12.1±0.09 gr de proteínas en pan integral.

Estudios del INICAP sobre la composición de alimentos para Centroamérica y Panamá, indica que el Chipilín contiene 7.6 gr de proteína. Muñoz et al, (1996)



reportan que las hojas de Chipilín aportan 7 gr de proteínas, lo cual nos indica que la harina vegetal no está aportando un contenido de proteínas extra a los panes, ya que el contenido de proteína de los panes sin adición de harina vegetal se encuentran por debajo de los valores reportados para panes integrales.

### 13.10 Contenido de Fenoles, flavonoides y Actividad antioxidante.

Las curvas de calibración obtenida para las técnicas de fenoles y flavonoides se presentan en las figuras 5 y 6 respectivamente.

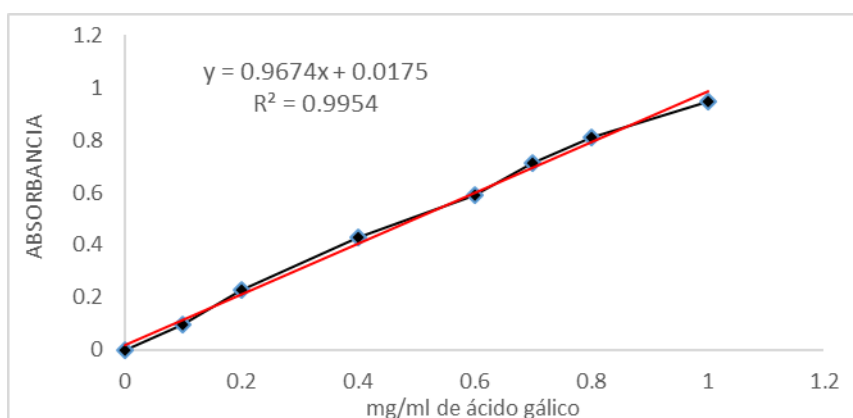


Figura 5. Curva patrón de ácido gálico

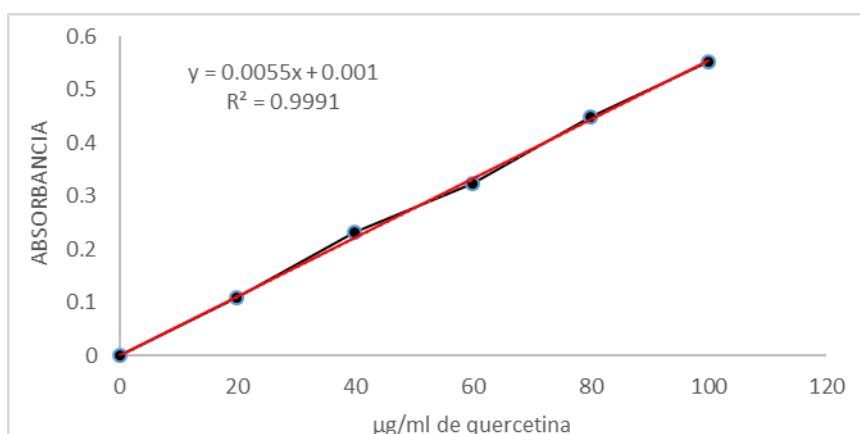


Figura 6. Curva patrón de quercetina

Se realizó un barrido espectral de DPPH 300 µM en metanol (figura 7). De una solución madre ácido ascórbico de [1 mg/ml] se prepararon soluciones con 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 UV 2100, a una longitud de onda de 545 nm.

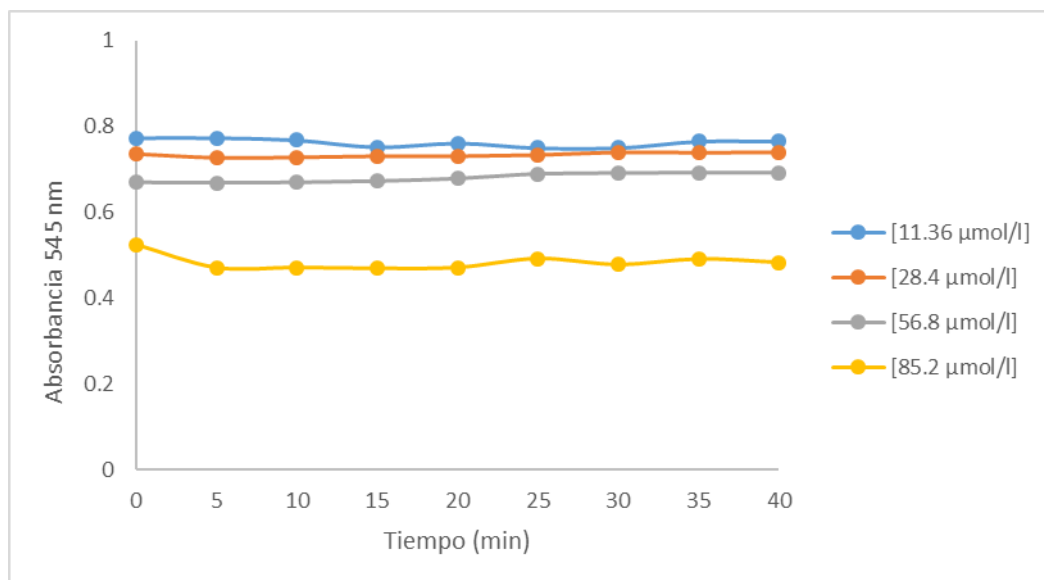


Figura 7. Barrido espectral de DPPH 0.03 mM en metanol. La absorbancia fue leída a 545 nm.

Se realizó un barrido a diferentes concentraciones de ácido ascórbico con el fin de conocer los valores óptimos para realizar la curva patrón (Tabla 6).

**Tabla 6.** Barrido espectral de diferentes concentraciones de ácido ascórbico con DPPH 0.3 mM.

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

Con lo anterior se decidió trabajar con las siguientes concentraciones de ácido ascórbico para la formación de la curva patrón: 1, 2, 10, 20, 25  $\mu\text{g/ml}$  (Figura 8)

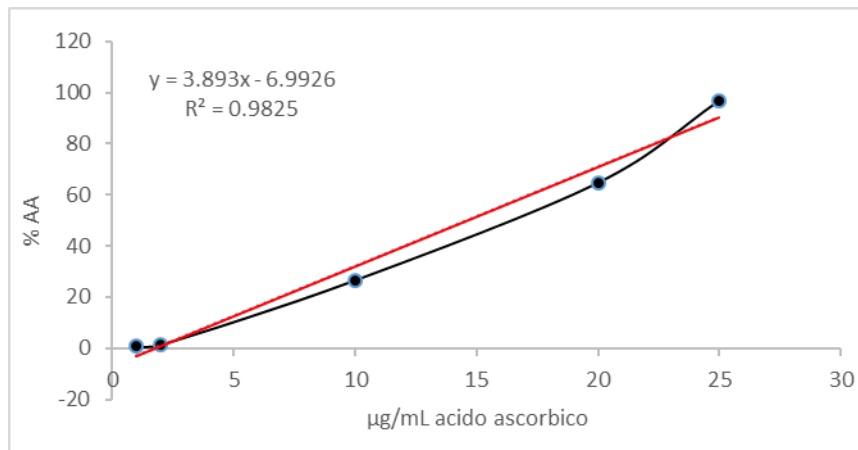


Figura 8. Curva patrón de ácido ascórbico. Absorbancia leída a 545 nm.

Los resultados (Tabla 7) muestran lo contenido en la harina de Chipilín. Los extractos fueron previamente diluidos en proporciones de 1:10 y 1:50 para fenoles y flavonoides respectivamente, para obtener lecturas de absorbancia dentro de las curvas de calibración.

**Tabla 7.** Contenido de fenoles, flavonoides y actividad antioxidante cuantificados del extracto de harina de Chipilín

Extracto de harina de Chipilín	
*Fenoles	9.407±0.005
**Flavonoides	19.909±0.014
***Actividad antioxidante	11.030±0.009

\*Los resultados se expresan como mg eq AG/ gr Harina.

\*\*Los resultados se expresan mg eq QUER/ gr Harina.

\*\*\*Los resultados se expresan mg eq AA/ gr Harina.

Villareal et al, (2015) reportan un contenido de fenoles para Chipilín de 92.98±0.64 mg eq AG/ gr, por otro lado Calderón (2011) reporta 21.4 mg eq AG/ gr. Comparando lo obtenido en esta investigación, el contenido de fenoles es bajo. Esta diferencia se puede deber a las condiciones físicas en las que se sometió la planta durante el horneado y los análisis realizados en esta investigación.

Pinelo et al (2004) y Ugusman et al (2012), mencionan que pueden haber diferencias en las concentraciones de metabolitos secundarios debido a las condiciones a las que fue sometida la planta como clima, tipo de suelo,

estación del año, así como también la especie y la parte de la planta usada para realizar el extracto vegetal.

Los resultados (Tabla 8) muestran que existe una diferencia significativa entre los tres porcentajes de pan, para el contenido de fenoles y flavonoides. Chlopicka et al (2011), reportaron que para pan de harina de trigo (30%) 2.65 mg eq AG/ gr y 33.9 mg eq Quer/g para fenoles y flavonoides respectivamente. Con la proporción de harina de Chipilín al 5%, que fue sustituida por harina de trigo, se observa que el valor obtenido para fenoles es muy parecido a lo reportado por Chlopicka et al.

**Tabla 8.** Contenido de fenoles, flavonoides y actividad antioxidante en los productos de panificación adicionado al 0, 3 y 5% con harina vegetal, evaluado para los tiempos 0 y 5 días después del horneado.

<b>CONTENIDO DE FENOLES</b> (mg eq AG/ g PS)						
	Pan 0%		Pan 3%		Pan 5%	
	t 0	t 5	t 0	t 5	t 0	t 5
Valor obtenido	1.722±0.078a	1.571±0.000a	2.081±0.232b	2.305±0.249b	2.591±0.341c	2.633±0.269c
Valor esperado			0.2198	0.2201	0.3641	0.3819

<b>CONTENIDO DE FLAVONOIDES</b> (mg eq Quer/ g PS)						
	Pan 0%		Pan 3%		Pan 5%	
	t 0	t 5	t 0	t 5	t 0	t 5
Valor obtenido	0.301±0.175a	0.202±0.049a	0.765±0.106b	0.860±0.285b	1.010±0.062c	0.981±0.166c
Valor esperado			0.4639	0.4659	0.7705	0.8083

<b>EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE</b> (mg eq AA/ g PS)						
	Pan 0%		Pan 3%		Pan 5%	
	t 0	t 5	t 0	t 5	t 0	t 5
Valor obtenido	1.851±0.05	0.657±0.01	1.621±0.004	1.077±0.004	2.233±0.01	1.125±0.01
Valor esperado			0.2570	0.2581	0.4268	0.4478

### 13.11 Sobrevivencia de *Lactobacillus plantarum*

Estos datos (Tabla 9) demuestran que el microorganismo no resistió después del horneado, ya que en la masa había una sobrevivencia del 81-86%. Se han reportado estudios en los que este microorganismo sobrevive después del horneado, usando como agentes encapsulantes alginato y quitosano, obteniendo una sobrevivencia del 99.8% (Seyedain-Ardabili et al, 2016). Esto indica que los agentes encapsulantes aquí utilizados, no son lo suficientemente aptos para proveerle a la bacteria una protección de la exposición a altas temperaturas.

**Tabla 9.** Sobrevivencia de *L. plantarum* en el pan después del horneado.

Ufc/g encapsulado	Ufc/ g masa	% Sobrevivencia en el pan horneado
$8.433 \times 10^9$	(No cuantificado)	0
$5 \times 10^9$	$2.73 \times 10^9$	0
$5.066 \times 10^9$	$8 \times 10^8$	0

## 14. CONCLUSIÓN

En los panes adicionados con 5% de harina vegetal se encuentra el mayor contenido de metabolitos secundarios, y contenido de proteínas por lo que la adición de esta harina si mejora la composición de los panes de 0%.

Aunque los panes que solo contienen harina de trigo no contienen la misma cantidad de fenoles, flavonoides y actividad antioxidante que otros panes integrales no significa que son valores negativos, ya que Hernández et al (2017) reportaron un contenido de fenoles y flavonoides de 18 mg eq AG/gr y 45 mg eq Quer/g respectivamente, lo que a simple vista son valores que sobrepasan a lo obtenido en esta investigación. Al igual que el contenido de proteínas, Bautista et al (2017) reportan 21% de proteína en panes elaborados con harina de trigo, es decir, obtienen mayor contenido de proteínas que en nuestros panes; con esto se confirma que estos contenidos van a variar según la naturaleza de la harina de trigo, así como también la proporción de los gramos agregados en la composición de la masa.

Aunque estos panes no se consideran probióticos debido a la nula sobrevivencia de *L. plantarum* en el horneado, se concluye que estos panes si son fuente de nutrientes adicionados con un contenido de fenoles y actividad antioxidante.

Como recomendación para futuras investigaciones, sugiero que las plantas con las que se realizaran las harinas, provengan de una cosecha de la cual se sepa bajo qué condiciones creció, el tipo de tierra en el que se plantó, etc., para que así se pueda comparar lo ahora obtenido.

## 15. BIBLIOGRAFÍA

1. 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.
2. Almazán AM. Effect of cassava flour variety and concentration on bread loaf quality. *Cereal Chem* 1990; 67: 97-9.
3. 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.
4. Anderson J, Smith B, Gustafson J. Health benefits and practical aspects of high fiber diets. *Am J Clin Nutr* 1994; 59: 12425-75. 11.
5. 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
6. Arribas B, Rodriguez M.E, Camuesco D, Zarzuelo A, Gálvez J. Aplicaciones terapéuticas de los probióticos. *Ars Pharm* 2008; 49
7. Asres, K., Sporer, F., Wink, M., 2004. Patterns of pyrrolidizidine alkaloids in 12 ethiopian *Crotalaria* species. *Biochem. System. Ecol.* 32:915-930.
8. 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.
9. Bautista Justo Mayela, Castrto Alfaro Alejandra, Camarena Aguilar Ernesto, Wrobel Katarzyna, Wrobel Kazimierz, Alaniz Guzman Guadalupe, Gamiño Sierra Zeferino, Da Mota Zanella Victor. 2007. *Desarrollo de pan integral con soya, chía, linaza y ácido fólico como alimento funcional para la mujer*. Universidad Autónoma de Nuevo León, México.



10. BERNAL, H.Y. 1986. Crotalaria. En: P. Pinto & P.M. Ruiz (eds.). Flora de Colombia, 4: 1-118. Bogotá: Instituto de Ciencias Naturales / Museo de Historia Natural.
11. Beyer, H. & Walter, G., 1987. Manual de química orgánica. Barcelona: Reverté.
12. Bourgeois, C. M.; Larpent, J. P. 1995. Microbiología Alimentaria II: Fermentaciones Alimentarias. Ed. Acribia, Zaragoza
13. Cáceres, a., 1996. Plantas de uso medicinal en Guatemala. Edición Universitaria. Universidad de San Carlos de Guatemala. 135-136
14. Calderon Rubio Maylena. Determinación de la capacidad antioxidante total y concentración de fenoles totales en *S. americanum* sometida al proceso de escaldado, deshidratado y almacenamiento. Guatemala 2011
15. Carmona, D. A., 2009. Caracterización físico-químico y sensorial de nabiza y grelo (*Brassica rapa* L.). Santiago de Compostela: Univ Santiago de Compostela.
16. 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.
17. Culej, G. A. (2015). Sistema neural para la predicción de la microencapsulación mediante secado por aspersion de *Lactobacillus plantarum*. Tesis de Maestría en ciencias en Ingeniería Bioquímica. Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez
18. Cunningham, R. L., T. F. Clark & M.O. bagby. 1978. *Crotalaria juncea*, Annual source of papermaking fiber. Tappi 61 (2): 37-39.
19. FAO/OMS. (2001). Probiotics in food: health and nutritional properties and guidelines for evaluatio. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization (FAO/WHO).
20. 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.

21. Fuller, R. 1989, Probiotics in man and animals.: J.Appl.Bacteriol., v. 66, p. 365-378.
22. García, A. Á. & Carril, E. P.-U., 2009. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología)*, 2(3), pp. 119-145.
23. 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.
24. Granito M, Guerra M. Uso del germen desgrasado de maíz en harinas compuestas para panificación. *Arch Latinoam Nutr* 1995; 45: 322-8
25. 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.
26. Guarner F, Schaafsma GJ (1998): Probiotics. *Int J Food Microbiol*, 39: 237-238.
27. Hart MJ, et al. (1991) Identification of the human platelet GTPase activating protein for the CDC42Hs protein. *J Biol Chem* 266(31):20840-8
28. Havenaar R, Huis in't Veld JHJ (1992): Probiotics: A general view. In: Wood BJB: *The Lactic Acid Bacteria*, Vol. 1: *The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease*, Chapman & Hall, New York, NY: 209–224.
29. Henneberg, W., and F. Stohman (1860,1864). *Beiträge zur Begründung einer rationellen Fütterung der Wiederkäuer*. 2 vol. Schwetschke and Son, Braunschweig.
30. Hernández J E and León J (Editors) 1994 *Neglected crops: 1492 from a different perspective*. FAO Plant Production and Protection Series No 26.
31. 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
32. 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.

33. Instituto de nutrición para Centroamérica y Panamá. (Gua). 1960. Tabla de composición de alimentos. Guatemala. INCAP p6.
34. JAMES C.S., Analytical Chemistry of Foods. Second Edition, ASPEN Publishers. New York 1999.
35. Jenkins DJ, Kendall WC, Vuksan W. Viscous fibers, health claims and strategies to reduce cardiovascular disease risk. Am J Clin Nutr 2000; 71: 401-12].
36. Jones, Q. & F.R. Earle. 1966. Chemical analysis of seeds II. Oil and protein content of 759 species. Economi Bot. 20 (2): 127-155.
37. Kirk R.S., Sawyer, R y Egan H. "Composición y Análisis de Alimentos de Pearson". Segunda edición. Editorial CECSA. México 1996
38. Knuth, R. 1928. Initia Florae Venezuelensis. pp. 382-383
39. Krasaekoopt W, Bhandari B, Deeth H, Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. International Journal 13, 3-13. 2003
40. Lightowler, Helen; Davies, Jill; Long, Alan. (1998). A vegan food guide vegans: a posible approach. Nutrition & Food Science, Volumen 98, Número 1
41. Lilly DM, Stillwell RH (1965): Probiotics: Growth promoting factors produced by microorganisms. Science, 147: 747-748.
42. López, M. S.-P., 2008. Biosensores Amperometricos de tirosinasa para la determinación de compuestos fenólicos en medios acuosos y no acuosos. Madrid: UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID.
43. Martínez-Flórez, s. González-gallego, j. Culebras, jm. Tuñón, mj. 2002 Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. Nutrición hospitalaria. XVII PP 271- 278.
44. Matos, F. 1959. El género Crotalaria en Venezuela. Mem. Ci. Nat. La Salle 19 (54): 213-238
45. Mckee, r. & c.r. enlow 1931. «Crotalaria, a new legume for the South». U.S.D.A. Circular 137. Washington, DC
46. Miller, r.h. 1967. «Crotalaria seed morphology, anatomy and identification». Tech. Bull. U.S.D.A. 1373: 1-73

47. Manzano, C., & Estupiñán, D. (2001). Lactobacillus plantarum y su reducción del intestino irritable. American Journal of Clinical Nutrition
48. 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.
49. 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.
50. 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.
51. Noll, Leo M. L.; Handbook of food analysis; M. Dekker, New York 1996.
52. Pinelo M, Manzocco M, Nunez M & Nicoli M. (2004). Solvent effect on quercetin antioxidant capacity. Food Chemistry, 88:201-207.
53. 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
54. 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.
55. 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
56. Ronayne P, Brites C, Ferrero C, Arocha M, León AE. Capítulo 6: Efecto de los tratamientos tecnológicos sobre la calidad nutricional y saludable de panes y productos de panadería, en "Aspectos nutricionales y saludables de los productos de panificación", CYTED, Lutz M, León, A, editores. Universidad de Valparaíso Editorial, Chile, 2009, 124 - 50.]
57. Silveira Coelho M., Salas Mellado M. Effects of substituting (Salvia hispánica L.) flour or seeds for wheat flour on the quality of the bread. Food Science and Technology. University of Rio Grande, Brazil. 2011

58. 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.
59. Stanley, P.C., Steryermark, J. A., 1946. *Flora de Guatemala*. Chicago US, Chicago Natural History Museum, *Fieldiana Botany*. 24 (5): 195-196.
60. Stanton, A. (2011). Vegan “soul food” for the holidays. *Vegetarian Journal*. Vol 30. No.
61. Steglich, W., Fungmann, B., Lang-Fugmann, S., 1997. *Römpp Lexikon, Naturstoffe*. Georg Thieme, Stuttgart, New York.
62. Taiz, L. & Zeiger, E., 2006. *Fisiología vegetal*. Tercera ed. Castellón de la Plana: Publicacions de la Universitat Jaume I.
63. Taylor, J., & Mitchell, D. (2007). *La maravilla de los probióticos*. New York: St Martin Press.
64. 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.
65. 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.
66. Valadez-Villarreal, López-Hernández. Hernández-Becerra J. y Ochoa-Flores. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LAS HOJAS DE CHAYA, *Cnidocolus chayamansa* MC. VAUGH Y CHIPILIN, *Crotalaria maypurensis* H.B.K. DEL ESTADO DE TABASCO.
67. White, G. A. & J. R. Haun. 1965. Growing *Crotalaria Juncea*, a multipurpose legume, for paper pulp. *Economic Bot.* 19: 175-183.
68. Wink, M.m Mohamed, G.I.A, 2003. Evolution of chemical defense traits in the leguminosae: mapping of distribution patterns of scodary metabolites on a molecular phylogeny inferred from nucleotide sequences of the rbcL gene. *System. Ecol.* 31:897-917.

## 16. 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 9.9 la masa inicial y como masa final 1.8 (kg).

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{masa}_i - (\text{masa}_i - \text{masa}_f)}{\text{masa}_i} \times 100$$

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 =  $(0.109 - 0.0175) / 0.9674 = 0.094 * 10$  (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 =  $(0.220 - 0.001) / 0.0055 = 39.818 * 50$  (dilución)

$\mu\text{g}$  eq Quer/ ml =  $1190.909 * 10$  (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 Chipilín 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)

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.