



Revista de la Facultad de Ingeniería Química





Directorio

M. Phil. Alfredo F. J. Dájer Abimerhi
Rector

Dr. José de Jesús Williams.
Director General de Desarrollo Académico

Dr. Rodolfo Canto Saenz
Coordinador General de Extensión

Facultad de Ingeniería Química

Dra. Marcela Zamudio Maya
Director

M. en C. Francisco Javier Herrera Rodríguez
Secretario Administrativo

M. en C. María Dalmira Rodríguez Martín
Secretaria Académica

Dr. Cristian Carrera Figueiras
Jefe de la Unidad de Posgrado e Investigación

Consejo Editorial

Dr. Luis Antonio Chel Guerrero
Editor Técnico

Dr. David Betancur Ancona

Dr. Arturo Castellanos Ruelas

Dra. Maira Segura Campos

M. en C. Gabriel Rosado Rubio

Dra. Silvina Drago

Dr. Rolando González

Edición y Diseño Gráfico

QI. Miriam Chan Pavón, M. en C.
LDGP. Luis Enrique Flores Rivero



Premio
Nacional
de Tecnología
2 0 0 2

HARINA DE MAÍZ PARA TORTILLAS: EFECTOS DE LA DUREZA DEL ENDOSPERMO Y DE LAS VARIABLES DE EXTRUSIÓN. 3

Avance de Investigación

*Darío Haller; Rolando J. González; Silvina R. Drago;
Roberto L. Torres; Dardo M. De Greef.*

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES PEPTIDICAS DE HIDROLIZADOS PROTEÍNICOS DE FRIJOL LIMA (*Phaseolus lunatus*). 11

Avance de Investigación

Bojórquez-Balam, E.G.; Ruiz-Ruiz, J.C.; Segura-Campos, M.R.; Betancur-Ancona, D.A.; Chel-Guerrero, L.A.

TEXTURIZADO DE SOYA INCORPORADO CON HIDROLIZADO PROTEÍNICOS DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.) ENDURECIDO: EVALUACIÓN FÍSICA Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA. 19

Avance de investigación

*Valdivia-Ramírez, E.; Ruiz-Ruiz, J.C.; Betancur-Ancona, D.A.;
Chel-Guerrero, L.A.*

ACTIVIDAD ANTITROMBÓTICA Y ANTICARIOGÉNICA DE HIDROLIZADOS PROTEÍNICOS DE FRIJOL LIMA (*Phaseolus lunatus*). 25

Avance de investigación

*Córdova-Lizama, A.J.; Ruiz-Ruiz, J.C.; Segura-Campos, M.R.;
Betancur-Ancona, D.A.; Chel-Guerrero, L.A.*

POTENCIAL PRODUCTIVO PARA EL CULTIVO DE CHÍA (*Salvia hispanica* L.) EN MÉXICO Y CALIDAD DEL ACEITE EXTRAÍDO. 32

Avance de investigación

*Ramírez- Jaramillo, G.1, Rosado-Rubio, G2., Castellanos-Ruelas, A2.,
Chel-Guerrero, L2.*

INSTRUCCIONES A LOS AUTORES 37

La Revista de la Facultad de Ingeniería Química es una publicación semestral relacionada con la Ingeniería Química, la Química Industrial, la Ingeniería Industrial Logística, los Alimentos y la Administración de la Tecnología, vinculada con su enseñanza, investigación y aplicación en el sector productivo. Número 52. Todo material impreso puede reproducirse mencionando la fuente. Los artículos firmados expresan la opinión del autor y no necesariamente el de la dependencia. La correspondencia dirigirla a: Facultad de Ingeniería Química. Periférico Nte. Km. 33.5, Tablaje Catastral 13615, Col. Chuburná de Hidalgo Inn, Mérida, Yuc., Méx. C. P. 97203. Tels.+52 (999) 946-09-56, 946-09-93. Responsable de Edición: QI. Miriam Chan Pavón, M. en C. Correo electrónico: revista@fiq.uady.mx ISSN 0188-5006.

HARINA DE MAÍZ PARA TORTILLAS: EFECTOS DE LA DUREZA DEL ENDOSPERMO Y DE LAS VARIABLES DE EXTRUSIÓN

Darío Haller; Rolando J. González; Silvina R. Drago;
Roberto L. Torres; Dardo M. De Greef.

RESUMEN

Dos tipos de maíz, con distinta dureza de endospermo fueron utilizados para analizar el efecto de la extrusión sobre las propiedades fisicoquímicas de la harina extrudida y su aptitud para hacer tortillas. La extrusión se llevó a cabo con un extrusor Brabender monotornillo y la metodología de respuesta fue utilizada para analizar los efectos de la humedad de la harina (rango: 27-35%) y la temperatura de extrusión (rango: 114-150°C) sobre el almidón dañado, la absorción de agua, la solubilidad en agua, la consistencia de retrogradación amilográfica y también sobre los atributos sensoriales de la tortilla obtenida con la harina extrudida.

El efecto de la dureza del endospermo fue significativo y el uso de maíz de endospermo blando es recomendado. Las condiciones de extrusión más adecuadas serían aquellas que permiten alcanzar grados de cocción intermedios, los cuales pueden ser obtenidos en las siguientes condiciones de temperatura y humedad de la harina a extrudir: 114°C-27%, 132°C-27%, 132°C-31%, y 150°C-35%.

Palabras claves: tortilla, maíz, extrusión, propiedades fisicoquímicas

INTRODUCCIÓN

La “nixtamalización” del maíz es un proceso utilizado para producir muchos alimentos tales como tamales y atoles, incluyendo el más popular de ellos que es la Tortilla de maíz (1), cuyo consumo está muy difundido en México y países de Centroamérica, transformándose en un negocio considerable, en países como EEUU, donde la colectividad mexicana y centroamericana es numerosa (2). Las tortillas de maíz son producidas tradicionalmente a partir de una masa húmeda formada a partir de granos enteros nixtamalizados y molidos, o a partir de harinas que se obtienen por secado y molienda posterior de la masa húmeda tradicional (3). Estas harinas se conocen como harina de maíz nixtamalizado o simplemente harina nixtamalizada y han ganado gran popularidad (4,5). La cocción por extrusión ha sido ya introducida para elaborar la harina precocida para preparar tortilla (6,7). Las ventajas que brinda la cocción por extrusión son bien conocidas (8).

Existen diferentes tipos de maíz y aunque tradicionalmente se usa maíz blanco duro, también pueden ser utilizados otros tipos (3).

La dureza del endospermo del maíz es una característica que afecta no sólo a las condiciones del proceso de molienda, sino también a las de cocción (9,10). El efecto de la dureza de endospermo de maíz, ya sea en la producción de masa húmeda como en la producción de harinas nixtamalizadas, ha sido poco estudiada. El efecto de la dureza del endospermo sobre el grado de cocción en agua ha sido estudiada por González *et al.* (11), quienes concluyeron que durante la cocción en agua, la harina de maíz proveniente de un endospermo más duro era más resistente al hinchamiento y solubilización que la correspondiente a un endospermo más blando. Por el contrario, Robutti *et al.* (10) mostraron que sémolas de endospermos más duros fueron menos resistentes a la cocción por extrusión y expandieron más que aquellas correspondientes a endospermos más blandos.

En la cocción por extrusión, el grado de cocción involucra no sólo la pérdida de la estructura cristalina del almidón sino también la destrucción parcial o total de la estructura granular. La intensidad de estas transformaciones dependerá de las condiciones de extrusión (8, 12) y afectará a las propiedades finales del producto (8, 13). Estas transformaciones pueden ser evaluadas a través de distintas características, tales como almidón dañado o susceptibilidad enzimática (α -amilasa), absorción de agua, solubilidad en agua, respuesta amilográfica, calorimetría diferencial de barrido, difracción de rayos X, microscopía electrónica de barrido a bajo vacío, etc.

En relación al proceso de cocción por extrusión, la solubilidad es la propiedad que permite interpretar con mayor claridad los cambios producidos cuando el grado de cocción alcanzado es suficientemente alto, esto es, cuando la destrucción de la estructura granular es grande y no se observa la presencia de gránulos con estructura cristalina. En cambio, la absorción de agua, el almidón dañado y la respuesta amilográfica son más adecuados en los casos en que el grado de cocción es relativamente bajo, esto es, cuando

la destrucción de la estructura granular es baja y todavía se observa estructura nativa (8, 12).

Los objetivos de este trabajo, fueron por un lado, obtener harinas precocidas de maíz por extrusión, aptas para elaborar tortillas y por el otro, analizar el efecto de la dureza del endospermo de maíz, y de las condiciones de extrusión, sobre las características de la harina y de su aptitud para elaborar tortilla.

MATERIALES y METODOS

Tipos de maíz y obtención de la sémola para extrudir. Se seleccionaron dos muestras comerciales de maíz: colorado semidentado (Dekalb 764) y amarillo dentado (Pioneer 30R76). La caracterización de los 2 tipos de maíz se realizó mediante la evaluación de la dureza del endospermo. Para tal fin, se determinaron 2 parámetros: el Peso hectolítrico (Ph) y dureza de endospermo (a través de la relación grueso/fino (G/F)), en los laboratorios del INTA Pergamino-Argentina (10). Los valores de Ph, G/F y composición química (en base seca) de ambas muestras se observan en la Tabla 1. De acuerdo a los valores de G/F, Pioneer 30R76 corresponde a un endospermo blando del tipo dentado, mientras que Dekalb 764 corresponde a un endospermo duro del tipo colorado (10). Ambas muestras fueron molidas de manera de obtener una distribución de tamaño de partículas similar para ambos tipos de maíz y una granulometría comprendida entre 1,190 y 0,210 mm. Para tal fin, se empleó un molino de muelas estriadas marca Buhler (Alemania) y se utilizó un diagrama de molienda que asegura una producción mínima de partículas finas (<0,210 mm).

Tabla 1. Valores de dureza de endospermo (relación grueso/fino (G/F)), peso hectolítrico (Ph) y composición química (en base seca) de ambas muestras767

Muestra de Maíz	G/F	Ph Kg/100L	Proteína (%) N x 6.25	Cenizas (%)	Lípidos (%)
Dekalb 764	4.3	78	8.32	1.02	3.2
Pioneer 30R76	2.6	76.2	7.20	0.92	3.5

Condiciones de Extrusión: La extrusión se llevó a cabo con un extrusor Brabender 10 DN, con control de temperatura en el cañón y en la boquilla y registro del momento torsor (torque). Se utilizó: un tornillo con relación de compresión 3:1, una boquilla cilíndrica de 3 mm de diámetro y 20 mm de longitud; la velocidad del tornillo fue 150 rpm. La concentración de Ca(OH)₂ en la sémola a extrudir se fijó en 0.15%. Este nivel se adoptó teniendo en cuenta lo sugerido por varios auto-

res (14, 15, 16). Para analizar el efecto de la temperatura de extrusión (T) y de la humedad de la harina (H), se adoptó un diseño factorial 3², con un triplicado del punto central, resultando 11 muestras para cada tipo de maíz. Los niveles de las variables fueron: H % (27; 31; 35) y T °C (114; 132; 150). El agregado de Ca(OH)₂ se realizó dispersándolo en la cantidad de agua necesaria para cada nivel de humectación, y mezclándolo con la sémola en un mezclador planetario marca Brabender tipo P600 (Alemania). Las muestras humectadas se dejaron reposar una hora, previo a cada experiencia de extrusión. Para cada muestra se obtuvieron los valores de caudal másico (g/min) y “torque” en unidades Brabender (UB). El caudal másico fue referido a la humedad de alimentación y se calculó el consumo específico de energía mecánica (CEEM) en J/g, utilizando la siguiente fórmula: CEEM (J/g)= 0.0616 x Torque (UB) x rpm / caudal másico (g/min) (8, 12).

Preparación de la harina extrudida: Las muestras extrudidas fueron secadas en estufa a 50 °C hasta alcanzar una humedad entre 9 y 11% y luego molidas con molino de muelas ya mencionado, utilizando un diagrama de molienda que permitió obtener la harina con una granulometría similar a la harina comercial “Maseca” (México), la cual era la siguiente: 8% entre 567 y 421 µm, 625 entre 421 y 210 µm, 265 entre 210 y 149 µm y 4% menor a 149µm.

Elaboración y evaluación de tortillas: La harina fue hidratada hasta lograr la consistencia de la masa adecuada para ser laminada y rodada. Para ello, se hicieron pruebas con distintos grados de hidratación de masa y para cada grado de hidratación se determinó la consistencia de manera empírica, utilizando un penetrómetro con geometría de cono, siguiendo el procedimiento desarrollado por Sánchez *et al.* (17). Para ello, se pesaron 120 g de harina y se agregó la cantidad de agua necesaria para cada nivel de hidratación. Luego de un amasado a mano de 5 minutos, se dejó reposar por 20 minutos, dentro de una bolsa de polietileno. Se fraccionó la masa en trozos de 35 g y con cada uno de ellos se formaron “bollos” manualmente. Cada uno de esos 3 bollos fueron luego “aplastados”, utilizando el tradicional “doble plato” o “tortilladora”. Se formó de esta manera un disco de un espesor de 2.6 +/- 0.2 mm. Para evitar que la masa se adhiera a las superficies de metal de la “tortilladora” y para que pueda ser fácilmente despegada, se utilizó un film de polietileno en ambas superficies. El disco de masa así formado se dejó reposar durante 5 minutos, cubriéndolo con un film de polietileno. Se procedió a la cocción utilizando una plancha de acero de 3 mm de espesor, calefaccionada eléctricamente. Se aplicó un potencial de 100 volts y se midió la temperatura mediante una termocupla ubicada en el centro de la plancha. Cuando la temperatura de la plancha alcanzó los 360 °C, se colocó el disco

sobre ella y se lo dejó durante 30 segundos. Luego se dio vuelta con la ayuda de una espátula, dejándolo 35 segundos más para finalmente volver a darlo vuelta hasta lograr el “inflado”. La tortilla, se la dejó reposar durante 5 min, y se procedió al rolado, utilizando una barra cilíndrica de madera de 2.0 cm de diámetro. En esta operación se analizó el comportamiento de la masa, evaluando las fisuras y grietas (18). La evaluación de la aptitud de una harina para elaborar tortillas, se realizó mediante un sistema de puntaje involucrando a 2 de los atributos más importantes: el inflado y el rolado (18). Para el inflado, se utilizó una escala de 1 a 4, correspondiendo el valor 1 a un inflado menor al 25% de la superficie de la tortilla, mientras que el puntaje 4 correspondió a un área del 75 al 100 %. Por su parte, para el rolado se utilizó una escala de 1 a 5, correspondiendo el valor 1 a la aparición de grietas en una longitud del 75 al 100% de la tortilla, mientras que un valor de puntaje 4 correspondió a la aparición de grietas en una longitud inferior al 25%, y el valor 5 a la ausencia de grietas. Para obtener el puntaje total de cada muestra, se procedió de la siguiente manera: con cada masa preparada, se obtuvieron 3 tortillas, y la sumatoria del puntaje de las 3 tortillas (incluyendo los 2 atributos), se tomó como puntaje total de cada muestra. Es decir, que el rango de puntaje total (inflado más rolado de 3 tortillas por muestra de masa preparada), estuvo comprendido entre 6 y 27. El puntaje promedio para cada muestra de harina, se obtuvo calculando el valor medio del puntaje total obtenido para 3 preparaciones de masa.

Evaluación de las características fisicoquímicas de las muestras extrudidas: Las muestras extrudidas se molieron en un molino Ciclotec (UD Corporation; Colorado USA), con malla de 1 mm y se evaluaron las siguientes propiedades, según las metodologías de referencia: almidón dañado (AACC 76-30 A y AACC 80-60 (19)), absorción de agua (20), solubilidad en agua y

como respuesta amilográfica se tomó la consistencia de retrogradación (en unidades Brabender) (8, 12).

Todas las determinaciones de las propiedades fisicoquímicas se realizaron por triplicado.

Observación microscópica: las muestras molidas fueron observadas microscópicamente utilizando un microscopio Leitz (Alemania) con luz polarizada para determinar la presencia de gránulos de almidón con la estructura nativa (gránulos con la “cruz de malta”). Debido a la alta variabilidad en la proporción de partículas conteniendo gránulos de almidón con la cruz de malta (GAN), en cada muestra la cuantificación se realizó asignando un puntaje según una escala de 1 a 4:

- 1 muestra con más del 75% de GAN
- 2 muestra conteniendo entre 75 y 50% de GAN
- 3 muestra conteniendo entre 50 y 25% de GAN
- 4 muestra conteniendo menos del 25% de GAN

RESULTADOS

En la Tabla 2 se presentan los valores de todas las respuestas evaluadas: el CEEM, las propiedades fisicoquímicas de la harina extrudida y el puntaje de las tortillas elaboradas, correspondientes a ambos tipos de maíz. También se incluyen los resultados correspondientes a la muestra comercial “Maseca”. En la Tabla 3 se muestran los resultados del ANOVA para el grado de significación (valor p) de los términos del modelo de segundo orden (superficie respuesta) correspondientes a cada una de esas respuestas.

Las figuras 1 y 2 muestran las superficies de respuestas correspondientes al CEMM y al AD para ambos tipos de maíz.

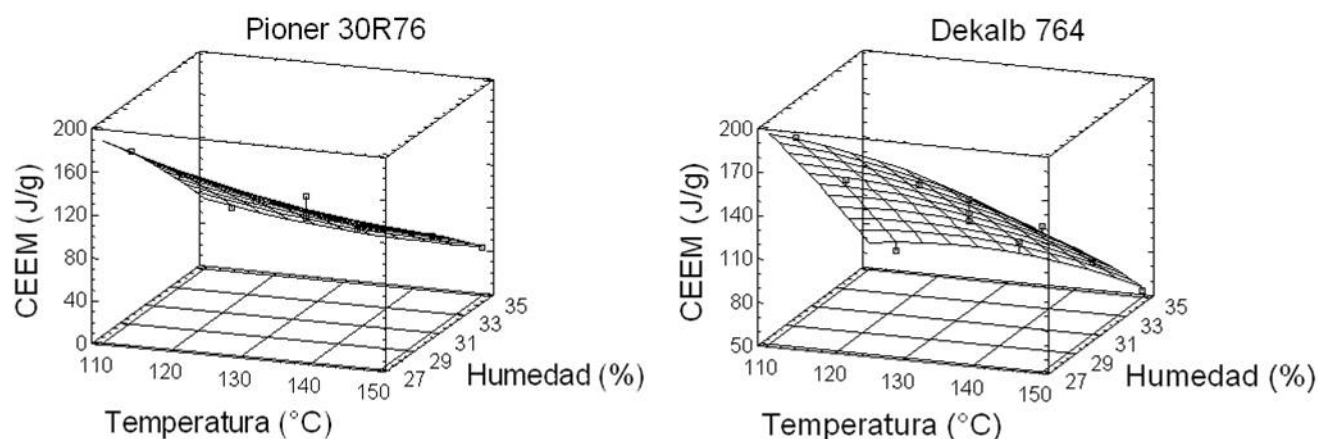


Figura 1. Superficie respuesta correspondiente al CEEM, para Pioneer 30R76 y Dekalb 767

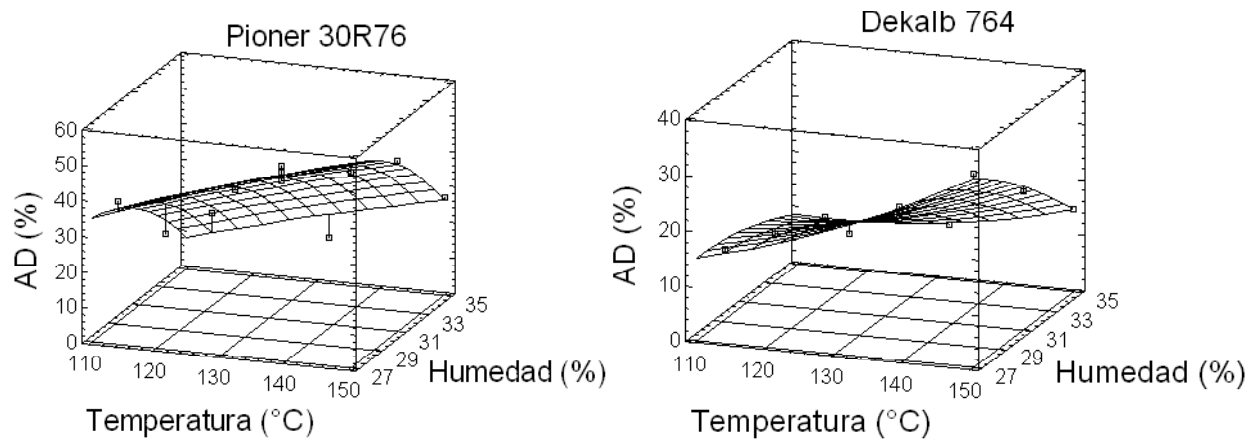


Figura 2. Superficie de Respuesta correspondiente a almidón dañado (AD), para Pioneer 30R76 y Dekalb 764

Tabla 2. Valores de Consumo específico de energía mecánica (CEEM), % Almidón Dañado (AD), Absorción de Agua (AA), Solubilidad (Sol %), Retrogradación (R), Observación Microscópica y Puntaje, correspondientes a ambos tipos de maíz: Pioneer 30R76 (P) y Dekalb 764 (D). Se incluyen los valores para la muestra comercial "Maseca".

Muestra T - H	CEEM (J/g)		AD %		AA ml/g		Sol %		R (UB)		Obs. Micro		Puntaje	
	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P
114°C-27 %	195	180	17	40,0	2,7	4,5	7,2	6,5	107 0	950	1	3	21,3	25,7
114°C-31 %	140	125	13	21,0	2,4	3,1	6,1	5,1	108 0	123 5	1	1	20,3	23,3
114°C-35 %	65	60	9	16,4	2,0	1,9	5,2	4,0	100 0	148 0	1	1	7,3	10,3
132°C-27 %	170	145	22	46,9	3,0	5,5	8,8	7,8	100 5	110 0	2	3	20,7	24,3
132°C-31 %	135	115	20	41,6	2,9	5,0	8,0	7,3	117 0	105 0	1	3	20	24,3
132°C-31 %	120	95	19	39,1	2,8	4,7	7,6	7,0	120 0	108 0	1	3	19,3	25,3
132°C-31 %	125	100	18	43,4	2,7	5,2	7,2	7,6	107 0	102 0	1	3	19,3	26,7
132°C-35 %	80	50	10	12,9	2,2	2,2	5,0	4,3	117 5	159 0	1	1	18,3	10
150°C-27 %	150	130	35	55,0	3,5	2,8	12,0	10,5	785	700	3	4	19	17,7
150°C-31 %	100	90	25	48	3,2	7,0	10	9,3	104 0	750	2	2	22,3	19,3
150°C-35 %	55	45	15	27,5	2,5	4,0	6,0	5,5	855	135 0	1	2	19,3	21,3
MASECA	-	-	29,6		3,9		6,7		1380		2		27	

DISCUSIÓN

a) Respuestas relacionadas con la operación de extrusión y las propiedades fisicoquímicas de la harina extrudida

Efectos sobre el CEEM: En la Tabla 2 se observa que Dekalb presenta mayores valores de CEEM que Pioneer, lo cual sugiere una relación directa entre la dureza del

endospermo del maíz y el grado de fricción generado en el extrusor. Estos resultados están en aparente contradicción con los obtenidos por Robutti *et al.* (2002) (10), quienes encontraron una correlación inversa entre la dureza del endospermo y el CEEM, trabajando con sé-mola de maíz descascarado y desgerminado, extrudiendo a 15% de humedad y de manera autógena. Esta aparente contradicción puede atribuirse a dos factores: 1) en

nuestro caso, la harina proviene de grano de maíz entero (con germen) y 2) las condiciones de extrusión, que en nuestro caso fueron mucho menos severas, ya que a alta humedad, corresponden bajos grados de cocción. Esto sugiere que en condiciones que producen bajos grados de cocción, el CEEM estaría directamente relacionado con la dureza de las partículas de endospermo, mientras que en las que producen altos grados de cocción, el CEEM es afectado no sólo por la dureza de las partículas sino además por el grado de cocción alcanzado dentro del extrusor, el cual determina la viscosidad del fluido en la zona final del tornillo (8, 10). Por otra parte, todas las muestras presentaron gránulos con la cruz de malta (ver más adelante), mientras que en las condiciones utilizadas por Robutti *et al.* (10) no se observó estructura granular, lo cual confirma lo expresado acerca de las diferencias en el grado de cocción alcanzado en cada caso. En la Figura 1, se observa que el CEEM está en relación inversa tanto con la temperatura (T) como con el % de humedad (H). Esto se explica teniendo en cuenta que el nivel de fricción dentro del extrusor disminuye con el aumento de ambas variables. Para ambos tipos de maíz, sólo los efectos lineales de la temperatura y la humedad fueron significativos ($p < 0.05$) (Tabla 3) y las superficies correspondientes se asemejan a una forma plana, aunque la pequeña curvatura que se observa con Dekalb, se atribuye a la pequeña significación de los términos cuadráticos. La falta de ajuste no fue significativa para ambos casos por lo que los modelos obtenidos para el CEEM fueron adecuados.

Efecto sobre el Almidón Dañado (AD): Los valores de almidón dañado correspondientes a la muestra Pioneer, fueron mayores que los de la muestra Dekalb (Tabla 2). Esto indica que para las mismas condiciones, la muestra con endospermo más blando presentó un mayor grado de cocción. El valor obtenido de AD para Maseca está en un nivel intermedio tanto para Pioneer como para Dekalb. Para ambos tipos de maíz, el AD se relaciona directamente con T, mientras que la relación con H es inversa. Estos resultados están directamente vinculados con el

efecto que provocan la humedad y la temperatura, sobre el grado de cocción de la masa que está siendo extrudada. Es decir, un aumento de H produce una disminución en el grado de fricción (efecto mecánico), mientras que un aumento de T provoca un incremento del grado de cocción (efecto térmico). Estas tendencias ya han sido observadas en otros trabajos para extrusión de sémola de maíz (12). Los resultados del ANOVA indican que para la muestra Pioneer 30R76, sólo los términos lineales (T y H) fueron significativos ($p < 0.5$), aunque el grado de significación del término HxH no es despreciable ($p < 0.0595$), lo cual, justifica la curvatura que se observa en la superficie obtenida (Figura 2). En el caso de la muestra Dekalb, sólo los términos lineales y el término de interacción TxH fueron significativos ($p < 0.05$), lo cual provoca un efecto de torsión de la superficie (Figura 2). Los modelos obtenidos para ambos tipos de maíz pueden ser considerados adecuados, ya que la falta de ajuste no fue significativa.

Efecto sobre la Solubilidad en Agua: Se observaron las mismas tendencias ya mencionadas para el AD, referidos a los efectos de T y H. Es decir, la solubilidad aumentó tanto con el aumento de T como con la disminución de H. Sin embargo, contrariamente a lo que ocurrió con el AD, para las mismas condiciones los valores de solubilidad de Pioneer, fueron inferiores que los de Dekalb. Esta diferencia puede atribuirse al hecho que, en los niveles de H y T seleccionados para este conjunto de experiencias, el grado de cocción de la fracción amilácea estaría controlado fundamentalmente por el proceso hidrotérmico, más que al termomecánico (el cual predomina a bajos niveles de H y que se verifica en condiciones de alto grado de cocción, como en el caso de productos expandidos). Sin embargo, la influencia de la dureza del endospermo en el grado de fricción, se traduce en un aumento de la solubilidad, lo cual es compatible con el mayor valor de CEEM obtenido para la muestra de endospermo más duro (Dekalb), ya discutido anteriormente. Estos resultados sugieren que para las condiciones seleccionadas, la solubilidad no es un buen indicador del grado de cocción.

Tabla 2. Grado de significación (valor p) de cada uno de los términos del modelo de segundo orden (superficie respuesta) correspondientes a Consumo específico de energía mecánica (CEEM), % Almidón Dañado (AD), Absorción de Agua (AA), Solubilidad (Sol), Retrogradación (R) y Puntaje, para ambos tipos de maíz: Pioneer 30R76 (P) y Dekalb 764 (D).

Fuente de Variación	CEEM		AD		AA		Sol		Retro		Puntaje	
	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P
T	0,0367	0,0593	0,0046	0,0098	0,0133	0,0199	0,0105	0,0057	0,1062	0,0071	0,0071	0,7671
H	0,0035	0,0071	0,0037	0,0038	0,0095	0,0168	0,0068	0,0044	0,4152	0,0019	0,0038	0,0126
TXT	0,2471	0,5054	0,1285	0,6516	0,5940	0,2546	0,1467	0,3084	0,0977	0,0163	0,1334	0,2786
TXH	0,1490	0,2347	0,0267	0,4618	0,2724	0,0171	0,0377	0,0531	0,4119	0,1835	0,0032	0,0157
HXH	0,6229	0,5441	0,1521	0,0595	0,1251	0,0117	0,1521	0,0416	0,1525	0,0082	0,0108	0,0201
Falta de ajuste	0,4673	0,9693	0,3135	0,0749	0,7724	0,0263	0,5495	0,2180	0,3929	0,0516	0,0215	0,0752

El grado de significación de cada uno de los términos del modelo para la solubilidad correspondiente a Pioneer, en general guarda una relación con los correspondientes a almidón dañado, aunque se debe destacar el efecto significativo de HxH y un efecto no despreciable del término de interacción TxH. En el caso de la muestra Dekalb, se observaron las mismas tendencias y grados de significación ya discutidas para AD. El valor de solubilidad obtenido para “Maseca”, está en un nivel intermedio tanto para Pioneer como para Dekalb. Cabe destacar que Billeb de Sinibaldi y Bressani (2001) (21), mostraron valores de solubilidad comprendidos entre 3,22% y 4,72%, trabajando con muestras de harinas nixtamalizadas correspondientes a maíces de endospermos duros (obtenidas por secado y molienda de la masa húmeda derivada del proceso tradicional de nixtamalización). Estos valores en general son menores a los obtenidos por nosotros, lo cual es coherente con el efecto mecánico que produce la extrusión.

Efecto sobre Absorción de Agua (AA): Para esta propiedad en general se observaron similares tendencias que las ya mencionadas para almidón dañado, es decir, la AA aumentó tanto con el aumento de T como con la disminución de H, excepto para Pioneer a alta temperatura.

La Tabla 3 muestra que sólo para Dekalb la falta de ajuste no fue significativa, siendo significativos los términos lineales: H y T. El valor de AA obtenido para “Maseca”, estuvo en un nivel intermedio respecto a los de Pioneer, mientras que todos los valores correspondientes a Dekalb fueron inferiores al de “Maseca”.

Efecto sobre la Consistencia de Retrogradación a 50°C (R): Para esta propiedad, todos los términos del polinomio, obtenidos para Pioneer, excepto TxH, fueron significativos. Mientras que los correspondientes a Dekalb, ninguno de los términos fue significativo. Esto indica que el modelo de regresión de segundo orden no es aplicable para Dekalb, sugiriendo la existencia de efectos correspondientes a otros factores no identificados. Comparando el valor de R obtenido para Maseca se observó algo similar a lo ocurrido para la AA, es decir que estuvo en un nivel intermedio para Pioneer mientras que todos los valores correspondientes a Dekalb fueron inferiores al de Maseca. Para Pioneer se observó una relación inversa entre R y AD ($R = -18,342 \cdot AD + 1780,8$; $r^2 = 0,8712$). Esta tendencia ha sido observada para cocción de sémola de maíz descascarada y degerminada (8) donde los valores de retrogradación correspondientes a harina de maíz extrudida, se relaciona inversamente con el grado de cocción

Observación Microscópica: En la Tabla 2, se observa que prácticamente ninguna de las muestras mostró ausencia total de gránulos de almidón con la cruz de malta. La muestra Dekalb presenta mayor proporción de gránulos con la cruz de malta que las correspondientes a las de Pioneer. Estos resultados se corresponden con los valores de AD y AA, los cuales indican que el grado de cocción

alcanzado por la muestra Pioneer es mayor que el correspondiente a la muestra Dekalb.

Relación entre las respuestas vinculadas a las propiedades fisicoquímicas. A los efectos de analizar las relaciones entre las respuestas, se tomó al AD como la propiedad de referencia (teniendo en cuenta que es el indicador de grado de cocción con mayor rango de variación entre las muestras) y se obtuvieron las siguientes correlaciones:

Para maíz Pioneer 30R76:

$$\text{Sol} = 0,1376 \text{ AD} + 1,9131 \quad r = 0,9544$$

$$\text{AA} = 0,1264 \text{ AD} + 0,1385 \quad r = 0,9517$$

$$\text{Retro} = -18,649 \text{ AD} + 1779,3 \quad r = 0,9303$$

Para maíz Dekalb 764:

$$\text{Sol} = 0,2842 \text{ AD} + 2,3101 \quad r = 0,9886$$

$$\text{AA} = 0,058 \text{ AD} + 1,6485 \quad r = 0,9751$$

$$\text{Retro} = -8,2995 \text{ AD} + 1194,1 \quad r = 0,4717$$

Para ambos tipos de maíz, tanto la absorción de agua, como la solubilidad están directamente relacionadas con el AD, mientras que la Retrogradación presenta una tendencia inversa. Se destaca además que para las muestras de Pioneer los valores de r son altos, mientras que para las muestras Dekalb la alta correlación con AD, sólo se observa para AA y Solubilidad.

b) Aptitud de las muestras para elaborar tortillas.

En primer lugar se debe destacar que los mayores valores de puntaje se alcanzaron con la muestra “Maseca”. No obstante, la muestra Pioneer, presenta buenos valores para algunas de las condiciones de extrusión.

Los resultados correspondientes a la evaluación de la aptitud para elaborar tortillas (datos no mostrados), indicaron lo siguiente: el valor de Penetración correspondiente a “Maseca” fue intermedio respecto a los valores de Pioneer, mientras que siempre fue menor respecto a los valores de Dekalb. Por su parte, el valor de humedad óptima de masa correspondiente a Maseca”, fue intermedio respecto a los valores de Pioneer, mientras que siempre fue mayor respecto a los valores de Dekalb. Esto indica que todas las muestras correspondientes a Dekalb resultaron ser más blandas que las muestras de Maseca, aún cuando poseen una menor humedad de masa, lo cual está directamente vinculado a los menores valores de AA que presentan las muestras de Dekalb con respecto a “Maseca”.

Considerando que los valores del puntaje, están comprendidos entre 6 y 27 y que para una tortilla aceptable, los valores mínimos para inflado y rolo deben ser 3 y 4 respectivamente, se puede establecer que aquellos valores de puntaje mayores a 21 ($3 \times 3 + 4 \times 3 = 21$), corresponderían a tortillas aceptables. Teniendo en cuenta estas consideraciones, se observa en la Tabla 2 que con el maíz más duro no se obtuvieron tortillas con puntaje aceptable, excepto para 150°C-35 %H. Mientras que con el maíz más blando, en la mayoría de los casos se obtuvieron puntajes aceptables y para algunas condiciones (132°C-31%H y 114°C-27%H), los valores fueron cerca-

nos a los de "Maseca". Sólo para 4 de las 11 condiciones experimentales la muestra Pioneer dio puntaje menores a 21 (114°C-35%H; 132°C-35%H; 150°C-27%H, y 150°C-321%H).

Los resultados de ANOVA para el grado de significación de los términos del modelo correspondiente a Puntaje de la muestra Pioneer, indicaron que todos los términos fueron significativos excepto para T y TxT, y que la falta de ajuste no fue significativa, lo que le daría validez al modelo. Para el caso de la muestra Dekalb, se observa que si bien la mayoría de los términos fueron significativos, la falta de ajuste también lo es, por lo tanto, el modelo no sería adecuado.

c) Relación entre el Puntaje y el grado de cocción

Se observa claramente que los mayores puntajes se obtienen para valores intermedios de los indicadores de grado de cocción (AA, AD). Estos resultados permiten concluir que es posible obtener harinas precocidas por extrusión aptas para elaborar tortillas, siempre que se seleccionen condiciones adecuadas para alcanzar grados de cocción intermedios, los cuales se corresponden a valores de AA entre 3 y 5,5 y valores de AD entre 20 y 50.

CONCLUSIONES

El grado de cocción es menor para el maíz con endospermo más duro

Los mayores puntajes se obtienen con el maíz más blando y para algunas condiciones estos son cercanos al de "Maseca", mientras que con el maíz más duro se observa que en la mayoría de los casos no se obtuvieron tortillas con puntaje aceptable.

Las condiciones de extrusión más adecuadas fueron aquellas que permitieron alcanzar grados de cocción intermedios, los cuales pueden ser obtenidos en las siguientes condiciones: 114°C-27%H, 132°C-27%h, 132°C-31%h, y 150°C-35%H.

AGRADECIMIENTOS

A Adriana Bonaldo por su cooperación en trabajos de laboratorio. A la ANPCyT (Proy. PICT 1105) y UNL CAI+D 2009, PI 54/259, por el financiamiento otorgado.

REFERENCIAS

1-Mondragón M, Bello-Pérez LA, Agama E, Melo A, Betancur-Ancona D, Peña JL. Effect of nixtamalization on the modification of the crystalline structure of maize starch. *Carbohydrate Polymers*. 2004;55:411-8.

2-Campus-Baypoli ON, Rosas-Burgos EC, Torres-Chávez PI, Ramírez-Wong, B. Physicochemical changes of starch during maize tortilla production. *Starch*. 1999;5:173-7.

3-Arámbula-Villa G, Gutiérrez-Árias E and Mo-

reno-Martínez E. Thermal Properties of maize masa and tortillas with different components from maize grains, and additives. *J Food Eng*. 2007;80:55-60.

4-Bello-Pérez LA, Osorio-Díaz P, Agama-Acevedo E, Núñez-Santiago C, Paredes-López O. Propiedades químicas, fisicoquímicas y reológicas de masas y harinas de maíz nixtamalizado. *Agrociencia*. 2002;36:319-328.

5-Núñez-Santiago MC, Santoyo E, Bello-Pérez LA, Santoyo-Gutierrez S. Rheological evaluation of non-newtonian Mexican nixtamalised maize and dry processed masa flours. *J Food Eng*. 2003;60: 55-6.

6-Martínez-Flores HE, Martínez-Bustos F, Figueroa CJD, González-Hernández J. Studies and biological assays in corn tortillas made from fresh masa prepared by extrusion and nixtamalization processes. *J Food Sci*. 2002; 67:1196-9.

7-Martínez-Flores HE, Martínez-Bustos F, Figueroa CJD, González-Hernández J. Tortillas from extruded masa as related to corn genotype and milling process. *J Food Sci*. 1998; 63: 130-3.

8-González R, Torres R y De Greef D. Extrusión-cocción de cereales. *SBCTA*. 2002; 36:104-115.

9-Rooney LLW and Serna-Saldívar SO. Food uses of whole corn and dry-milled fractions, In: Watson S.A. & Ramstad P.E. (Eds.), *Corn Chemistry and Technology*, S.P. Minnesota, U.S.A. American Association of Cereal Chemistry, Inc. 1987. Cap. 13, pp 359-429.

10-Robutti J, Borrás F, González R, Torres R, De Greef D. Endosperm Properties and extrusion cooking behavior of maize cultivars. *LWT Food Sci Tech*. 2002; 35:663-9.

11-González RJ, Torres R, De Greef D, Bonaldo A, Robutti J, Borrás F. Efecto de la dureza del endospermo del maíz sobre las propiedades de hidratación y cocción. *Arch Latinoam Nutr*. 2005;55:354-360.

12-Gonzalez RJ, De Greef DM, Torres RL, Gordo NA. Efectos de algunas variables de extrusión sobre la harina de maíz. *Arch Latinoam Nutr*. 1987;37: 578-591.

13-Biliaderis CG. Differential scanning calorimetry in food research: A Review. *Food Chem*. 1983;10:239-265.

14-Zazueta C, Ramos G, Fernández-Muñoz JL, Rodríguez ME, Acevedo-Hernández G, Press RC. A radioisotopic study of the entry of Calcium ion into the maize kernel during nixtamalization. *Cereal Chem*. 2002;79:500-3.

15-Fernández-Muñoz JL, Rodríguez ME, Pless RC, Martínez-Flores HE, Leal M, Martínez JL, Baños L. Changes in nixtamalized corn flour dependent on post-cooking steeping time. *Cereal Chem*. 2002;79:162-6.

16-Rodríguez ME, Yáñez-Limón M, Alvarado-Gil JJ, Vargas H, Sánchez-Sinencio F, Figueroa JDC, et al. Influence on the structural changes during alkaline cooking on the thermal, rheological and dielectric properties of corn tortillas. *Cereal Chem*. 1996;73:593-600

17-Sánchez HD, Osella CA, De La Torre MA. Optimization of gluten-free bread prepared from cornstarch, rice flour, and Cassava Starch. *J Food Sci.* 2002;67:416-9

18-Arámbula VG, Barón Ávila L, González-Hernández J. Efecto del tiempo de cocimiento y reposo del grano de maíz (*Zea mays* L.) nixtamalizado, sobre las características fisicoquímicas, reológicas, estructurales y texturales del grano, masa y tortillas de maíz. *Arch Latinoam Nutr.* 2001;51:187-194.

19-AACC. American Association of Cereal Chemists. Approved Methods of the AACC. Methods, 76-30 A, 80-60. The Association: St. Paul, MN. 1994.

20-González RJ, Remondetto GE, Coutas R, Santiago LG, Bonaldo AG. Efectos de variables del proceso en planta piloto sobre algunas propiedades de aislados proteicos de soja. *CyTA.* 1995;35: 77-91

21-Billeb de Sinibaldi AC y Bressani R. Características de cocción por Nixtamalización de once variedades de maíz. *Arch. Latinoam. Nutr.* 2001;51:86-94.

“ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES PEPTÍDICAS DE HIDROLIZADOS PROTEÍNICOS DE FRIJOL LIMA (*PHASEOLUS LUNATUS*)”

Bojórquez-Balam, E.G.; Ruiz-Ruiz, J.C.; Segura-Campos, M.R.;
Betancur-Ancona, D.A.; Chel-Guerrero, L.A.

RESUMEN

Se empleó un sistema enzimático secuencial constituido por las enzimas pepsina y pancreatina, para hidrolizar un concentrado proteínico de frijol lima (*Phaseolus lunatus*). Las condiciones de hidrólisis fueron: temperatura 37 °C, relación enzima/sustrato 1:10, pH 2 para pepsina y pH 7.5 para pancreatina, el tiempo total de reacción fue de 10 min (5 min para cada enzima), la concentración de sustrato fue del 4%. El hidrolizado obtenido presentó un porcentaje de grado de hidrólisis de 5.5%, quedando clasificado como hidrolizado limitado (< 10%). El hidrolizado fue ultrafiltrado empleando una membrana con un corte de peso molecular de 10 kDa, obteniéndose dos fracciones, una > 10 kDa y una < 10 kDa. Se evaluó la actividad antimicrobiana del hidrolizado y de las fracciones peptídicas contra los microorganismos *Staphylococcus aureus* (Gram positivo) y *Shigella flexneri* (Gram negativo), empleando los métodos espectrofotométrico y de dilución en agar. La mayor actividad antimicrobiana fue generada por la fracción < 10 kDa. La fracción peptídica < 10 kDa presentó valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) de 392.1 µg/mL y 993.2 µg/mL contra *S. aureus* y *S. flexneri*, respectivamente. Los resultados permiten establecer que la hidrólisis enzimática in vitro, puede ser empleada para la generación de péptidos con actividad antimicrobiana a partir de concentrados proteínicos de *P. lunatus*. Las fracciones peptídicas de los hidrolizados limitados de *P. lunatus* presentan potencial para ser empleadas como aditivos con actividad antimicrobiana en la formulación de alimentos.

Palabras clave: Hidrolizados, fracciones peptídicas, *Phaseolus lunatus*, actividad antimicrobiana.

Introducción

Los agentes antimicrobianos han tenido gran relevancia desde hace más de 50 años en la industria alimentaria, donde han sido utilizados como aditivos tanto en alimentos procesados como en empaques, para evitar la generación de infecciones o intoxicaciones. Algunos ejemplos de estos son los derivados de los ácidos orgánicos, como los sorbatos, los propionatos y los benzoatos (Rodríguez y Schöbitz, 2009). Sin embargo, el uso irracional de estos compuestos ha generado una crisis de salud pública debido a la aparición de cepas resistentes a algunos antibióticos y antimicrobianos considerados como de mayor efectividad (Gutiérrez y Orduz, 2003). Por otra parte, la adición de agentes antimicrobianos a los alimentos debe de ser controlada, puesto que en concentraciones excesivas pueden ser tóxicas y/o modificar la estructura química de los diversos productos a los que es agregado (Zamudio et al, 2007; Davidson y Harrison, 2002). Esta situación ha dado lugar a una justificada alarma y generado gran interés en el estudio y desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos, como una alternativa a esta problemática se ha desarrollado una nueva generación de agentes antimicrobianos. En este sentido, los péptidos con actividad biológica tienen la capacidad de ejercer efectos específicos a nivel fisiológico en el organismo, como por ejemplo aquellos que presentan actividad antimicrobiana. Estas secuencias aminoácidas son moléculas efectoras claves en la inmunidad innata, con tamaños que oscilan entre 2 hasta 200 aminoácidos (Rivas et al., 2006). Diversos estudios han reportado que mediante la hidrólisis controlada in vitro de proteínas alimentarias es posible generar este tipo de péptidos. Se han aislado péptidos antimicrobianos principalmente a partir de hidrolizados enzimáticos limitados, de proteínas de origen animal como la leche, el huevo y algunas especies marinas de peces. Recientemente se han aislado de hidrolizados limitados, con grados de hidrólisis menor al 10%, de proteínas de origen vegetal como la soya y el maíz (Dubin et al., 2005). México posee una amplia diversidad de recursos con potencial para la obtención y aislamiento de compuestos fisiológicamente activos conocidos como nutraceuticos. Tales compuestos tienen aplicación en el desarrollo de alimentos de tipo funcional, como es el caso de los péptidos con actividad biológica (Lajolo, 2002). Entre los recursos vegetales empleados para la alimentación, destacan las leguminosas debido a que son la principal forma de obtención de proteínas de estratos socioeconómicos que tienen limitado acceso a proteínas de origen animal, debido a su alto costo de producción y comercialización (SAGARPA, 2000). En Yucatán sobresale el frijol lima (*Phaseolus lunatus*), debido a que presentan un alto contenido de proteína (29%) (Bartholomai et al, 2000). Sin embargo el frijol lima es un cultivo no tecnificado, es decir que su producción depende de las condiciones climáticas, por lo que se le puede considerar una fuente de proteína subutilizada (Betancur-Ancona et al., 2004). Tomando en consideración lo anterior, la leguminosa *Phaseolus lunatus* puede plantearse como una opción para la

obtención de productos con un alto contenido de proteína, como los concentrados proteínicos, a partir de los cuales se podrían generar vía modificación enzimática *in vivo*, péptidos con actividad biológica, con potencial para ser empleados como ingredientes nutracéuticos o como aditivos en el desarrollo de sistemas alimentarios.

Materiales

Se emplearon granos de *Phaseolus lunatus* provenientes de la cosecha 2012 del estado de Yucatán. Todos los reactivos fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Para la hidrólisis se empleó pepsina y pancreatina de mucosa gástrica e intestinal porcina adquirida de Sigma-Aldrich (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA).

Métodos

Obtención de la harina de *P. lunatus*

Los granos se limpiaron y se seleccionaron los que no presentaron ningún tipo de daño físico para triturarlos en un molino Cemotec (Tecator Sweden), seguidamente se molieron con un molino Cyclotec 1093 (Tecator Sweden). La harina se tamizó a través de mallas tamaño 80 y 100 hasta obtener una harina con partículas menores a 0.149 mm.

Obtención del concentrado proteínico de *P. lunatus*

Se empleó el método reportado por Betancur *et al.* (2004). A una dispersión de harina:agua (relación 1:6 p/v) se le ajustó el pH a 11. La dispersión se agitó por 1 h a 400 rpm, se filtró a través de tamices de malla 80 y 100 para eliminar la fibra. El residuo sólido se lavó cinco veces con agua destilada (1:3, p/v), recuperando y mezclando el agua de lavado con la suspensión. Se dejó reposar por 1 h para precipitar el almidón. El sobrenadante (proteína) se decantó y se ajustó el pH a 4.5 (PI), la solución se centrifugó a 4500 rpm por 30 min. El precipitado se secó a -47°C y 13×10^{-3} mbar en una liofilizadora.

Composición proximal de la harina y el concentrado proteínico de *P. lunatus*

Se emplearon los métodos de la AOAC (1997): Humedad (Método 925.09) secado a 105°C hasta peso constante. Cenizas (Método 923.03), residuo inorgánico resultante de la incineración a 550°C . Grasa cruda (Método 920.39), lípidos libres extraídos con hexano. Proteína cruda (Método 954.01), por el método Kjeldahl, usando 6.25 como factor de conversión de nitrógeno a proteína. Fibra cruda (Método 962.09), residuo orgánico combustible e insoluble que se obtiene después de que la muestra fue sometida a una digestión ácida y alcalina. Extracto libre de nitrógeno (ELN), se calculó por diferencia.

Hidrólisis del concentrado proteínico

La hidrólisis se efectuó empleando las enzimas pepsina y pancreatina, y el sistema enzimático secuencial pepsina-pancreatina. La hidrólisis se realizó de acuerdo a la metodología propuesta por Megías *et al.* (2004), la digestión con pepsina se realizó durante 10 min, usando una

concentración de sustrato del 4%, una relación enzima/sustrato 1/10, a una temperatura de 37°C y un pH de 2. La digestión con pancreatina fue durante 10 min, usando una concentración de sustrato del 4%, una relación enzima/sustrato 1/10, y la temperatura de 37°C a un pH de 7.5. La hidrólisis con el sistema enzimático secuencial pepsina-pancreatina, se llevó a cabo de acuerdo con el método propuesto por Vioque *et al.* (2004). El tiempo de total reacción fue de 10 min, la primera digestión se efectuó con pepsina hasta la mitad del tiempo (5 min) usando una concentración de sustrato del 4%, una relación enzima/sustrato 1/10, a una temperatura de 37°C y un pH de 2. La segunda digestión se realizó añadiendo enzima pancreatina, a la misma temperatura, relación enzima/sustrato y tiempo, modificando el pH a 7.5. La hidrólisis se efectuó en un vaso de precipitado de 2000 mL colocado en un baño de agua, la agitación se efectuó con agitador mecánico (Cafrao RZ-1) a 300 rpm, se empleó un termómetro para controlar la temperatura y un electrodo para ajustar el pH. Se empleó como sustrato una solución de proteína al 4% (p/v), preparada disolviendo 56.72 g de concentrado proteínico de frijol lima (b.s.) en 1 L de agua destilada. La hidrólisis se detuvo colocando las muestras en un baño de agua a 80°C durante 20 min, finalmente se centrifugaron a $10,000 \times g$ por 20 min usando una centrifuga Beckman, la porción soluble se conservó en congelación.

Determinación del grado de hidrólisis

El porcentaje del grado de hidrólisis (%GH) se determinó con la técnica propuesta por Nielsen *et al.* (2001). Inicialmente, se preparó una solución de L-serina en agua destilada (1.004 mg/mL) para obtener una curva de calibración. Las absorbancias fueron empleadas para hallar los equivalentes de aminos liberados por la hidrólisis. Se utilizó la ecuación de la recta de calibración y se aplicó la siguiente fórmula: $\%GH = (h/htot) \times 100$. Donde:

h = concentración de grupos aminos libres expresada como meq/g de proteína.

$htot$ = número total de enlaces peptídicos presentes en las proteínas de *P. lunatus*. 4.9.

Separación de las fracciones peptídicas por ultrafiltración

La porción soluble del hidrolizado fue ultrafiltrada empleando la metodología propuesta por Cho *et al.* (2004). Se obtuvieron dos fracciones utilizando una membrana con un corte de peso molecular de 10 kDa. Colectando de manera separada el retenido y el permeado. Las fracciones se denominaron como: > 10 kDa y < 10 kDa.

Determinación cuantitativa de proteína

Al hidrolizado y a las fracciones obtenidas por ultrafiltración se les determinó el contenido de proteína mediante el método de Lowry *et al.* (1951).

Actividad antimicrobiana

Determinación espectrofotométrica de la inhibición del crecimiento bacteriano

Los cultivos de *S. aureus* y *S. flexneri* fueron ajustados a una concentración de 1×10^6 ufc/mL de acuerdo a la escala de McFarland, utilizando caldo nutritivo. Se determinó la actividad antimicrobiana del hidrolizado y sus fracciones empleando el método propuesto por Christman (2010). Se colocaron 1.5 mL del caldo inoculado en tubos de ensayo, se prepararon soluciones del hidrolizado y sus fracciones a 100, 50 y 2% con agua destilada estéril y se adicionaron 1.5 mL de estas soluciones a los tubos de ensayo con caldo inoculado, se agitaron en vortex durante 5 s. La absorbancia se determinó a una longitud de onda de 625 nm a los tiempos de 0, 2, 4, 8, 12 y 24 h.

Inhibición del crecimiento bacteriano por el método de dilución en agar

Se empleó el método de dilución en agar reportado por Vaca-Ruiz *et al.*, (2009), se prepararon cajas Petri con agar Muller-Hinton y se adicionó la cantidad requerida de las muestras a evaluar, hasta lograr proporciones de 50 y 25%. El control positivo fue nisina a una concentración de 20 mg/mL, un péptido antimicrobiano reconocido como seguro por la FDA y el control negativo agua destilada estéril. Posteriormente se realizó una siembra masiva con 10 μ L de los microorganismos *S. aureus* y *S. flexneri* a una concentración de 1×10^6 ufc/mL. Se dejaron incubar durante 24 h a 37 °C.

Mínima Concentración Inhibitoria

Se empleó la metodología propuesta por Vaca-Ruiz *et al.*, (2009), utilizando microplacas de 96 pocillos los cuales fueron llenados de acuerdo al esquema presentado en la figura 1.

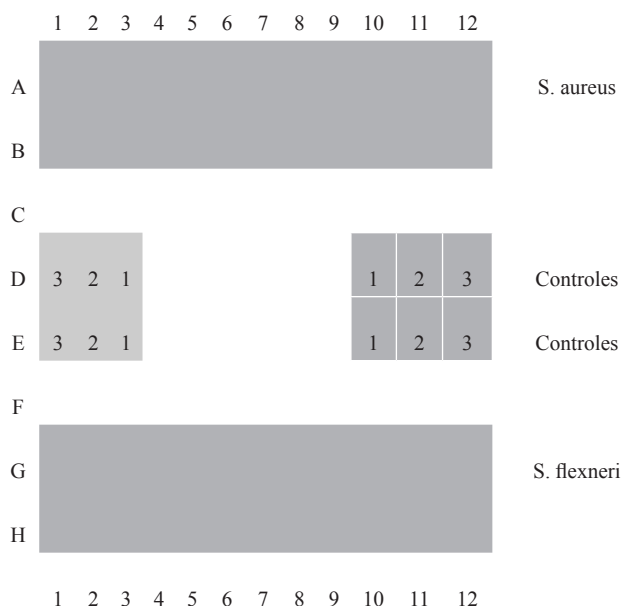


Figura 1. Esquema de llenado de los pocillos de la microplaca (Vaca-Ruiz *et al.*, 2009).

A los pocillos marcados con el número 1, se adicionaron 100 μ L de caldo nutritivo inoculado con la bacteria a evaluar a una concentración de 1×10^6 ufc/mL. A los pozos marcados con el número 2 se agregaron 100 μ L del caldo nutritivo inoculado con la bacteria a evaluar y 100 μ L de nisina a una concentración de 20 mg/mL (control -). A los pozos marcados con el número 3 se añadieron 100 μ L del caldo nutritivo inoculado con la bacteria a evaluar y 100 μ L de agua destilada estéril (control +). Se agregaron 150 μ L de caldo nutritivo inoculado con la bacteria a evaluar en cada uno de los pocillos de las filas A y B para *S. aureus*, y G y H para *S. flexneri*. Después se adicionaron 50 μ L de muestra en las siguientes concentraciones: 100, 96, 90, 86, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 y 10%. Las microplacas se incubaron a 37 °C por 24 h. Finalmente se preparó una solución de cloruro de trifeniltetrazolio al 2% en agua destilada estéril y se adicionaron 100 μ L a cada pocillo de prueba. Una coloración roja indicó la presencia de células viables.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos de la caracterización proximal de la harina y el concentrado proteínico de *P. lunatus*, de la hidrólisis del concentrado proteínico y de la actividad antimicrobiana, fueron evaluados mediante análisis de varianza de una vía y comparación de medias (LSD) para establecer diferencias entre tratamientos. Se empleó el paquete computacional Statgraphics Plus Versión 5.1 de acuerdo a métodos señalados por Montgomery (2003).

Resultados y discusión

Composición proximal de la harina y concentrado proteínico de *P. lunatus*

La composición proximal de la harina y el concentrado proteínico de frijol lima se presenta en el cuadro 1. En cuanto a la humedad, el concentrado presentó un mayor contenido comparado con la harina, debido a que en la etapa final de la obtención de la harina se calienta a 60 °C antes de tamizar, reduciéndose así el contenido de humedad. El contenido de proteína cruda de la harina (19.6%) fue similar al 21.7% para *Phaseolus vulgaris* (Ruiz *et al.*, 2012). El contenido de proteína del concentrado fue de 67.5%, valor semejante al reportado por Tello *et al.*, (2010), de 67.3% para un concentrado de *P. lunatus* y al obtenido por Ruiz *et al.* (2012), en concentrados de *P. vulgaris* (67.7%).

Cuadro 1. Composición proximal de la harina y el concentrado proteínico de *P. lunatus* (% B.S.).

Componente (%)	Harina	Concentrado proteínico
Humedad	4.75 ^a	5.18 ^a
Cenizas	2.70 ^a	4.62 ^b
Proteína	19.60 ^a	67.52 ^b
Fibra	2.38 ^b	0.57 ^a
Grasa	1.06 ^a	2.92 ^b
ELN	74.26 ^b	24.35 ^a

Letras diferentes en la misma fila indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

El contenido de grasa (2.92%) en el concentrado fue similar (3.12%) al reportado por Tello *et al.* (2010) y mayor (0.68%) al exhibido por Betancur *et al.* (2004). El incremento de grasa cruda en el concentrado proteínico, pudo deberse a que durante la extracción alcalina de la proteína (pH 11) se saponifican las grasas de carácter polar, precipitando con la proteína al modificar el punto isoeléctrico (pH 4.5), tal como lo observaron Chel *et al.* (2002), en concentrados de *Canavalia ensiformis* y *Phaseolus lunatus*. Los contenidos de fibra cruda y ELN disminuyeron, en un 75.7% y 67.2%, respectivamente, esto se debió a que el proceso de obtención del concentrado incluye etapas específicas de separación de estos componentes. Lo anterior resulta conveniente ya que de acuerdo con Ruiz *et al.* (2012), los componentes no proteicos como lípidos, fibra, hidratos de carbono y componentes menores como sustancias minerales afectan la calidad final del concentrado.

Hidrólisis del concentrado proteínico de *P. lunatus*

Los porcentajes de grado de hidrólisis de los hidrolizados obtenidos con pepsina, pancreatina y pepsina-pancreatina se presentan en la figura 2. El grado de hidrólisis osciló entre 5.5% y 8.3%, por lo que se puede considerar a los hidrolizados como limitados, con un grado de hidrólisis menor al 10%.

La diferencia en el grado de hidrólisis, se debe a que las enzimas empleadas presentan diferente actividad catalítica. Pepsina es la principal enzima gástrica que degrada las proteínas en el estómago durante la digestión, tiene actividad endopeptidasa, hidrolizando preferentemente por el extremo C-terminal de los residuos aromáticos fenilalanina, tirosina y triptófano. Su acción rompe las largas cadenas de polipéptidos en cadenas más cortas, es decir

que mediante su acción se producen algunos aminoácidos libres pero la mayoría de los productos son oligopéptidos. Por otra parte, la pancreatina incluye proteasas como tripsina, quimotripsina, elastasa y carboxipeptidasas, así como las enzimas amilasa y lipasa pancreática y nucleasas (componentes del fluido pancreático). Tripsina, quimotripsina y elastasa son serinoproteasas, con actividad de endopeptidasas ya que hidrolizan enlaces internos de los péptidos. La hidrólisis con pancreatina resulta en una mezcla de pequeños oligopéptidos (60-70%) y aminoácidos libres (30-40%), que son absorbidos a lo largo del intestino delgado (Sewald y Jakubke, 2002). Si bien el uso secuencial de proteasas con diferente o igual actividad catalítica permite la obtención de hidrolizados proteínicos con altos grados de hidrólisis, en el caso del sistema secuencial pepsina-pancreatina, el corto tiempo de reacción no permitió la generación de un mayor grado de hidrólisis. De acuerdo con Christman (2010), a menor grado de hidrólisis suele obtenerse mayor actividad antimicrobiana, ya que se generan péptidos de mayor peso molecular. Considerando lo anterior se seleccionó el hidrolizado obtenido con pepsina, ya que presentó el menor grado de hidrólisis (5.5%).

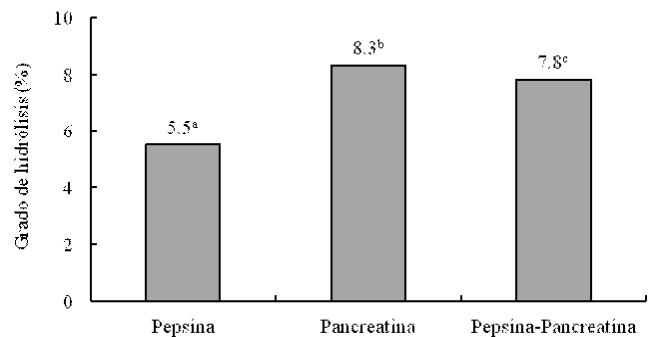


Figura 2. Porcentaje de grado de hidrólisis de los hidrolizados proteínicos de *P. lunatus* obtenidos con pepsina, pancreatina y pepsina-pancreatina. Letras diferentes en la misma serie indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

Separación de las fracciones peptídicas por ultrafiltración.

El hidrolizado fue fraccionado de acuerdo a su peso molecular utilizando la ultrafiltración, generándose dos fracciones una mayor 10 kDa (> 10 kDa), una menor a 10 kDa (< 10 kDa). Se determinó el contenido de proteína, observándose que disminuyó de manera proporcional al peso molecular de las fracciones, la mayor cantidad de proteína se observó en el hidrolizado y la menor en la fracción de < 10 kDa (Figura 3). La ultrafiltración se empleó debido a que los péptidos con actividad antimicrobiana generalmente presentan un peso molecular cercano a 10 kDa (Rivillas y Soriano, 2006).

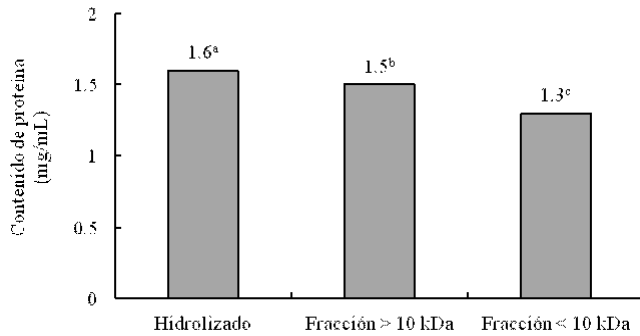


Figura 3. Contenido de proteína del hidrolizado de *P. lunatus* y sus fracciones peptídicas. Letras diferentes en la misma serie indican diferencias estadística significativa ($p < 0.05$).

Actividad antimicrobiana

Determinación espectrofotométrica de la inhibición del crecimiento bacteriano

Se determinó el efecto del hidrolizado y sus fracciones en el crecimiento de los microorganismos evaluados, Como se observa en la figura 4, el hidrolizado disminuyó el crecimiento de ambos microorganismos, ya que las absorbancias obtenidas a lo largo de la determinación fueron menores a las del control negativo (crecimiento normal). Los mejores resultados en cuanto a la inhibición del crecimiento se obtuvieron a las concentraciones de 25% y 50%, cuyos patrones de inhibición fueron iguales o menores al del control positivo (inhibición con nisina). Para las fracciones > 10 kDa y < 10 kDa se obtuvo un comportamiento semejante al que presentó el hidrolizado, las mayores inhibiciones del crecimiento se obtuvieron a las concentraciones de 25% y 50% (Figura 4). Resultados semejantes fueron obtenidos por Christman (2010) para proteínas de caseína hidrolizadas con pepsina, en donde los resultados más favorables se obtuvieron a concentraciones de 30 y 50% de estos hidrolizados frente a *E. coli* O177:H7. De igual manera Ayob *et al.* (2009) comprobaron que al aplicar la ultrafiltración se obtienen fracciones peptídicas con mayor actividad antimicrobiana como ocurrió con los hidrolizados de palma contra el *Bacillus cereus*. El comportamiento semejante del hidrolizado y sus fracciones, en cuanto a la inhibición del crecimiento bacteriano, probablemente se debió a la presencia de péptidos con actividad antimicrobiana, generados durante la hidrólisis. No obstante, en el hidrolizado y en la fracción > 10 kDa, podrían haber otros componentes como proteínas sin hidrolizar y carbohidratos, que actuarían como fuente de alimento para los microorganismos. Con base a esto se considera que la mejor alternativa para obtener PAM es la fracción < 10 kDa a las concentraciones de 25% y 50%, pues tiene mayor pureza y esto implicaría una menor inversión para aislar los péptidos.

Inhibición del crecimiento bacteriano por el método de dilución en agar

Se evaluó la actividad antimicrobiana de la fracción de < 10 kDa a dos concentraciones 25 y 50%. Como control negativo se empleó nisina a una concentración de 20 mg/mL y como control positivo agua destilada estéril. A la concentración de 25% la fracción de < 10 kDa redujo de forma limitada el crecimiento de *S. aureus* y no tuvo ningún efecto sobre *S. flexneri*, observándose un crecimiento masivo (Figura 5). Por el contrario a la concentración de 50%, la fracción inhibió el crecimiento de ambos microorganismos. De acuerdo con Denisson *et al.* (2005), el efecto antimicrobiano de un hidrolizado o una fracción peptídica se debe a las características de los péptidos presentes, tales como secuencia aminoacídica, hidrofobicidad y carga neta. Otro factor que también influye es la composición de la membrana celular del microorganismo, ya que esta no es la misma para las bacterias Gram positivas (como *S. aureus*) y las Gram negativas (como *S. flexneri*).

Mínima Concentración Inhibitoria

En la figura 6 se muestran los resultados de la determinación de la mínima concentración inhibitoria de la fracción de < 10 kDa, empleando cloruro de trifeniltetrazolio como indicador de la viabilidad de las células bacterianas. Las zonas de color rojo son indicativo de que las células bacterianas se encontraban viables y no fueron afectadas por la concentración de la fracción de < 10 kDa.

La mínima concentración inhibitoria de la fracción de < 10 kDa para *S. aureus* fue del 20%, correspondiente a una concentración de proteína de 392.04 µg/mL. En tanto que la mínima concentración inhibitoria de la fracción de < 10 kDa para *S. flexneri* fue del 80%, correspondiente a una concentración de proteína de 993.17 µg/mL. La mínima concentración inhibitoria que presentó la fracción de < 10 kDa del hidrolizado de *P. lunatus*, fue menor a la reportada por Ayob *et al.* (2009) de 2400 µg/mL contra *Bacillus cereus*, para una fracción de < 10 kDa obtenida a partir de la hidrólisis con pepsina del residuo proteínico de la palma *Elaeis guineensis*.

Conclusiones

El concentrado proteínico de *P. lunatus* fue adecuado para generar hidrolizados limitados vía hidrólisis enzimática *in vitro*, empleando las enzimas pepsina y pancreatina, y el sistema enzimático secuencial pepsina-pancreatina. El menor grado de hidrólisis se obtuvo con pepsina (5.5%). La porción soluble del hidrolizado se fraccionó empleando una celda de ultrafiltración, generando dos fracciones una > 10 kDa y una < 10 kDa. El hidrolizado y las fracciones peptídicas, presentaron actividad antimicrobiana contra *S. aureus* y *S. flexneri*. La

mayor actividad antimicrobiana la presentó la fracción < 10 kDa con una mínima concentración inhibitoria de 392.04 $\mu\text{g/mL}$ contra *S. aureus* y 993.17 $\mu\text{g/mL}$ contra *S. flexneri*. Los resultados permiten plantear el potencial uso de los hidrolizados y las fracciones peptídicas de *P. lunatus* para la obtención de péptidos antimicrobianos, los cuales pueden emplearse como aditivos de origen natural, los cuales presentan la ventaja de no desarrollar mecanismos de inmunidad en los microorganismos.

Agradecimientos

Al CONACYT por su apoyo al proyecto de ciencia básica titulado "Bioactividad y propiedades fisicoquímicas de sistemas hidrocoloides mixtos integrados por proteínas hidrolizadas de frijol lima (*Phaseolus lunatus*) y goma modificada de flamboyán (*Delonix regia*)" con número de convenio 106605.

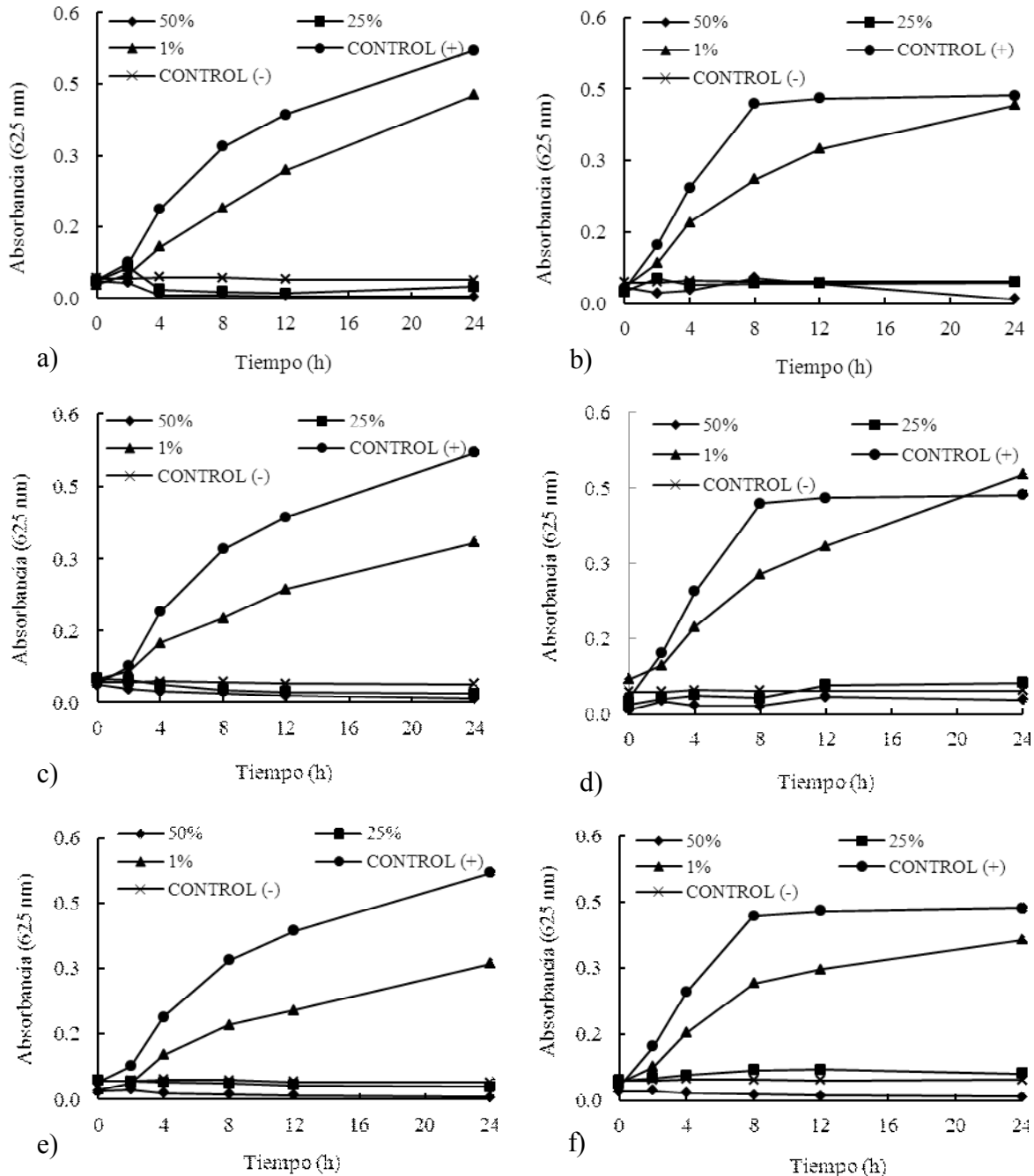


Figura 4. Determinación espectrofotométrica de la Inhibición del crecimiento bacteriano. Efecto del hidrolizado de *P. lunatus* sobre a) *S. aureus* y b) *S. flexneri*, de la fracción > 10 kDa sobre c) *S. aureus* y d) *S. flexneri*, y de la fracción < 10 kDa sobre e) *S. aureus* y f) *S. flexneri*, a diferentes concentraciones 1, 25 y 50%. Control negativo (agua destilada estéril) y control positivo (nisina 20 mg/mL).

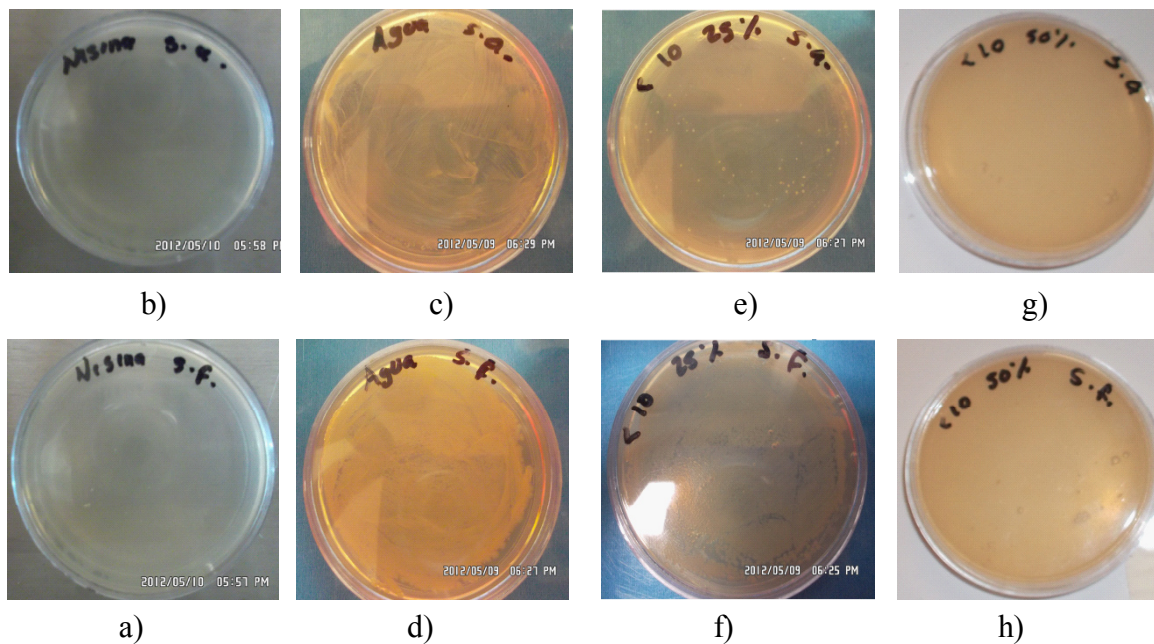


Figura 5. Inhibición del crecimiento bacteriano por el método de dilución en agar. a) Control negativo *S. aureus*, b) Control negativo *S. flexneri*, c) Control positivo *S. aureus*, d) Control positivo *S. flexneri*, e) Fracción < 10 KDa (25%) contra *S. aureus*, f) Fracción < 10 KDa (25%) contra *S. flexneri*, g) Fracción < 10 KDa (50%) contra *S. aureus*, h) Fracción < 10 KDa (50%) contra *S. flexneri*.

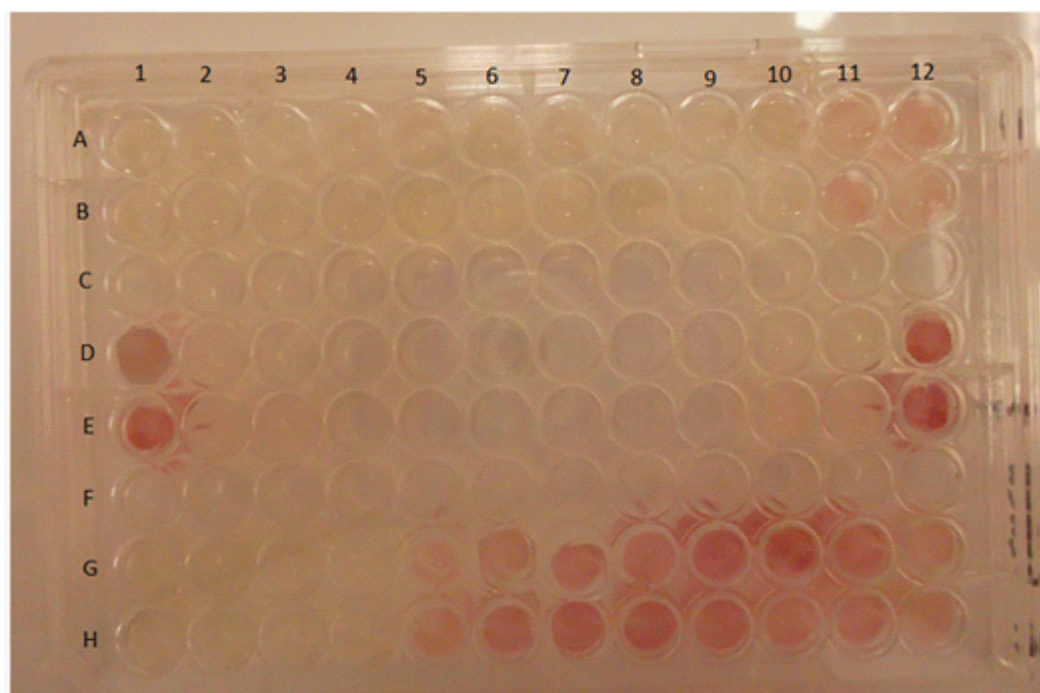


Figura 6. Determinación de la mínima concentración inhibitoria de la fracción de < 10 KDa, capaz de inhibir el crecimiento de *S. aureus* y *S. flexneri*. Las columnas 1 a 12 corresponden a las concentraciones de la fracción < 10 KDa de: 100, 96, 90, 86, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 y 10%. Filas A y B inhibición de *S. aureus*, filas G y H inhibición de *S. flexneri*. Los pozos 1D, 12D, 1E y 12E (control positivo), los pozos 2D, 11D, 2E y 11E (control negativo).

Referencias

- AOAC. (1997). Official Methods of analysis. Association of official analytical chemists, 15th ed. William Horwitz Editor. Washington, D.C., USA.
- Bartholomai, G.B., Tosi, E., González, R. (2000). Caracterización de compuestos nutritivos, no nutritivos y calidad proteica. 1ª ed. Programa iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED).
- Benítez, R., Ibarz, A., Pagan, J. (2008). Hidrolizados de proteína: procesados y aplicaciones. Acta bioquímica Clínica Latinoamericana, 42(2): 227-236.
- Betancur-Ancona, D., Gallegos-Tintoré, S., Chel-Guerrero, L. (2004). Wet-fractionation of *Phaseolus lunatus* seeds: partial characterization of starch and protein. Journal of the Science of Food and Agriculture, 84(10): 1193-1201.
- Chel, L., Pérez, V., Betancur, D. Dávila, G. (2002). Functional Properties of Flours and Protein Isolates from *Phaseolus lunatus* and *Canavalia ensiformis* seeds. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 50(3):584-591.
- Christman, J. (2010). Antimicrobial activity of casein hidrolizates against *Listeria monocytogene* and *Escherichia coli* O157:H7. Master's thesis, University of Tennessee, 2010. pp 42-62.
- Denisson, S., Wallace, J., Harris, F., Phoenix, D. (2005). Amphiphilic α -helical antimicrobial peptides and their structure/function relationships. Protein and Peptide Letters, 12(1): 31-39.
- Dubin, A., Mak, P., Dubin, G., Rzychon, M., Stec, J., Wladyka, B., Maziarka, K., Chmiel, D. (2005). New generation of peptide antibiotics. Acta Biochimica Polonica, 52(3): 633-638.
- Lajolo, F.M. (2002). Functional foods: Latin American perspectives. British Journal of Nutrition, 88(2):S145-S150.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, L., Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. Journal of Biology Chemistry, 193:267-275.
- Megías, C., Yust, M., Pedroche, J., Lquari, H., Girón-Calle, J., Alaiz, M., Millán, F., Vioque, J. (2004). Purification of an ACE inhibitory peptide after hydrolysis of sunflower (*Helianthus annuus* L.) protein isolates. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52: 1928-1932.
- Montgomery, D. (2005). Diseño y análisis de experimentos. 2ª ed., México, Limusa Willey. pp 100-102.
- Rivas, B., Sada, E., Hernández R., Tsutsumi, V. (2006). Péptidos antimicrobianos en la inmunidad innata de las enfermedades infecciosas. Salud Pública de México, 48: 62-71.
- Rivillas, L. and Soriano, M. (2006). Antimicrobial peptides from plants as mechanism of defense. Actual Biology, 28(85): 155-169.
- Ruiz-Ruiz, J.C., Dávila-Ortíz, G., Chel-Guerrero, L.A., Betancur-Ancona, D.A. (2012). Wet fractionation of hard-to-cook bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds and characterization of protein, starch and fibre fractions. Food Bioprocess and Technology, 5:1531-1540.
- SAGARPA. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación de México (2000). Situación actual y perspectiva de la producción de frijol en México, 1990-2000.
- Tello, R., Ruiz, J., Chel, L. & Betancur, D. (2010). Funcionalidad biológica de jugo de naranja incorporado con hidrolizado proteínicos de frijol lima (*Phaseolus lunatus*). En: Utilización de recursos naturales tropicales para el desarrollo de alimentos. Ed. UADY, Mérida, Yucatán, México. pp. 233-238.
- Vaca-Ruiz, M.L., Silva, P.G., Laciari, A.L. (2009). Comparison of microplate, agar drop and well diffusion plate methods for evaluating hemolytic activity of *Listeria monocytogenes*. African Journal of Microbiology Research, 3(6): 319-324.
- Vioque, J., Megías, C., Yust, M.M., Pedroche, J., Lquari, H., Girón-Calle, J., Alaiz, M., Millán, F. (2004). Purification of an ACE Inhibitory Peptide alters Hydrolysis of Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Protein Isolates. Journal of Agricultural and Food Chemistry, (52): 1928-1932.

“TEXTURIZADO DE SOYA INCORPORADO CON HIDROLIZADO PROTEÍNICÓ DE FRIJOL (*PHASEOLUS VULGARIS* L.) ENDURECIDO: EVALUACIÓN FÍSICA Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA”

Valdivia-Ramírez, E.; Ruiz-Ruiz, J.C.; Betancur-Ancona, D.A.; Chel-Guerrero, L.A.

RESUMEN

Se evaluaron las características físicas y la actividad inhibitoria de la Enzima Convertidora de Angiotensina-I (ECA-I) de texturizados de soya incorporados con hidrolizados de frijol endurecido. Se incorporó un 5% de hidrolizado de *P. vulgaris* endurecido a harina desgrasada de soya para obtener productos texturizados por extrusión. Las condiciones de extrusión fueron: contenido de humedad de la harina (35%), temperatura del extrusor (180 °C) y velocidad 200 rpm. En cuanto a la caracterización física, el producto presentó un índice de absorción de agua de 2.7 g de agua/g de texturizado, porcentajes de sólidos solubles e insolubles de 4.9 y 1.1, respectivamente; una fuerza máxima de ruptura por compresión de 262.9 kgf, una densidad de 1.11. Los parámetros del producto obtenido fueron semejantes a los que presentan productos comerciales, lo cual indica que la incorporación de hidrolizado no afecta las características físicas del producto. El texturizado incorporado con 5% de hidrolizado presentó un porcentaje de inhibición de la ECA-I de 80.1%, superior al que presentó un producto control sin incorporar de 58.7%, lo anterior indica que el proceso de extrusión no afecta la actividad biológica. Los resultados permiten establecer el potencial de la extrusión para incorporar ingredientes con potencial nutracéutico a productos alimenticios, los cuales presentan adecuadas características físicas y mantiene su actividad biológica.

Palabras clave: Texturizados, hidrolizados, frijol endurecido, actividad biológica.

Introducción

La alimentación tiene un papel preponderante en la prevención de diversos padecimientos crónicos degenerativos, este factor es el que potencia el desarrollo de alimentos funcionales, los cuales tienen la capacidad de ejercer un efecto benéfico en las funciones fisiológicas del organismo. En Latinoamérica esto ha despertado el interés del estudio de alimentos tradicionalmente incluidos en la dieta como fuente de alimentos o ingredientes para alimentos funcionales (Lajolo, 2002). En este sentido, el frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) es uno de los cultivos más importantes de México, siendo la principal fuente de proteína para los estratos de la población que tienen limitado acceso a las proteínas de origen animal (SAGARPA, 2000). El almacenamiento a temperatura superior a 25 °C y humedad relativa por arriba de 65% induce el endurecimiento del grano, causando un considerable aumento del tiempo requerido para la suavización durante la cocción y el deterioro de las características sensoriales del grano cocido. Sin embargo, el impacto más relevante es sobre la calidad nutricional ya que disminuye la digestibilidad de la proteína y la disponibilidad de aminoácidos esenciales (Kigel, 1999). Una forma de aprovechar la proteína del frijol endurecido es mediante la obtención de concentrados y asilados proteínicos (Morales de León et al., 2007). La modificación de la proteína, mediante el empleo de proteasas, podría contribuir al desarrollo de nuevos productos con mejores características nutricionales o funcionales comparadas con la proteína original (Panyam y Kilara, 1996). Durante la proteólisis pueden generarse fragmentos denominados péptidos, los cuales tienen la capacidad de regular procesos fisiológicos, ejerciendo su efecto a nivel local en el tracto digestivo o bien en diversos órganos una vez que han ingresado en el sistema circulatorio (Iwaniak y Minkiewicz, 2007). El efecto antihipertensivo mediado por la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina-I (ECA-I), enzima clave en la regulación de la presión por la modulación del sistema renina-angiotensina es uno de los mecanismos más estudiados de los péptidos, ya que se ha demostrado que su inhibición provoca un descenso en la presión arterial en humanos (Wang y González de Mejía, 2005). La extrusión es un proceso tecnológico por el cual diversos biopolímeros o ingredientes alimenticios son mezclados, transformados y termoformados en un sistema de baja humedad, a temperaturas elevadas y presiones altas, durante un corto tiempo, utilizando fuerzas de cizallamiento generadas por un tornillo sin fin. La extrusión permite texturizar proteínas, gelatinizar almidones, preparar alimentos infantiles, etc. Si bien la extrusión puede causar pérdidas en el valor nutritivo, como la oxidación de lípidos o la destrucción térmica de vitaminas, diversos reportes indican que el deterioro no es mayor al causado por otros procesos de elaboración de alimentos (Riaz, 2002). El objetivo del presente trabajo fue evaluar las características físicas y la actividad inhibitoria de la ECA-I de texturizados de soya incorporados con hidrolizado proteínico de frijol endurecido.

Materiales

Se emplearon granos de *Phaseolus vulgaris*, los cuales habían desarrollado endurecimiento debido a un prolongado almacenamiento bajo condiciones no controladas de temperatura y humedad relativa. Se empleó harina de soya desgrasada, la cual fue adquirida en una comercializadora de granos de la ciudad de Mérida, Yucatán. Las enzimas y los reactivos fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA).

Métodos

Obtención de la harina de *Phaseolus vulgaris* endurecido

Inicialmente se utilizó un molino mecánico de discos (Grinding Mill Modelo 4E, U.S.A.) para triturar los granos y separar por fricción el pericarpio, después el material se pasó por cribas de orificios de 4.76 y 2.38 mm de diámetro, el material retenido en las cribas se procesó en un lecho fluidizado. Se repitió el ciclo dos veces, finalmente se realizó una molienda con un molino Cyclotec 1093 (Tecator Sweden) para disponer de una harina con tamaño de partícula de 0.246 mm (malla 60).

Acondicionamiento de la harina de soya

El tamaño de partícula de la harina de soya desgrasada se ajustó moliéndola en un molino de martillos Thomas-Willey (Laboratory Mill Model 4, U.S.A.) y tamizándola por una malla tamaño 40, para obtener un tamaño de partícula de 0.42 mm, empleando un tamiz (Ro-Tap model E Test Sieve Shaker, U.S.A.).

Obtención del concentrado proteínico de *Phaseolus vulgaris* endurecido

Se empleó el método reportado por Betancur *et al.*, (2004). La harina se dispersó en agua destilada en una relación 1:6 p/v y se ajustó el pH a 11 con NaOH 1.0 N. La dispersión se agitó por 1 h a 400 rpm, posteriormente la suspensión se filtró a través de tamices de malla 80 y 100 para eliminar la fibra. El residuo sólido se lavó cinco ocasiones con agua destilada (1:3, p/v), recuperando y mezclando el agua de lavado con el sobrenadante de la suspensión inicial. Se dejó reposar a temperatura ambiente por 1 h para precipitar el almidón. El sobrenadante rico en proteína se decantó. El pH del sobrenadante se ajustó con HCl 1.0 N a su punto isoeléctrico (4.5), la solución se centrifugó a 4500 rpm por 30 min, eliminando el sobrenadante. El precipitado se secó a -47°C y 13×10^{-3} mbar en una liofilizadora.

Composición proximal

La composición proximal de la harina de *P. vulgaris* endurecido, de la harina de soya desgrasada, del concentrado proteínico de *P. vulgaris* endurecido y su hidrolizado, así como la de los texturizados, se determinó con los métodos de la AOAC (1997): Humedad (Método 925.09) secado en estufa a 105°C hasta peso constante. Cenizas (Método 923.03), residuo inorgánico resultante de la incineración a 550°C hasta la pérdida total de materia or-

gánica. Grasa cruda (Método 920.39), lípidos libres extraídos con hexano en un sistema Soxhlet. Proteína cruda (Método 954.01), por el método Kjeldahl, por digestión ácida de la muestra y destilación alcalina, usando 6.25 como factor de conversión de nitrógeno a proteína. Fibra cruda (Método 962.09), residuo orgánico combustible e insoluble que se obtiene después de que la muestra fue sometida a una digestión ácida y luego alcalina. Extracto libre de nitrógeno (ELN), se calculó por diferencia.

Hidrólisis enzimática del concentrado proteínico del *Phaseolus vulgaris* endurecido

Se llevó a cabo de acuerdo al método propuesto por Vioque *et al.* (2004). El tiempo de total reacción fue de 90 min. La primera digestión se efectuó con pepsina hasta la mitad del tiempo (45 min) usando una concentración de sustrato del 4%, una relación enzima/sustrato 1:10% v/v a una temperatura de 37°C y un pH de 2. La segunda digestión se realizó añadiendo pancreatina a la misma temperatura, relación enzima/sustrato y tiempo, modificando el pH hasta 7.5. La hidrólisis se efectuó en un vaso de precipitado de 2000 mL colocado en un baño de agua, la agitación se efectuó con agitador mecánico (Caframo RZ-1) a 300 rpm, se empleó un termómetro para controlar la temperatura y un electrodo para ajustar el pH. Se empleó como sustrato una solución de proteína al 4% (p/v). La hidrólisis se detuvo colocando la muestra en un baño de agua a 80°C por 20 min, finalmente se centrifugó a $10,000 \times g$ por 20 min usando una centrifuga (Beckman con rotor JA-14, U.S.A.) la porción soluble se congeló para secarla a -47°C y 13×10^{-3} mbar en un liofilizador (Labconco, U.S.A.) para después determinar el grado de hidrólisis.

Determinación del grado de hidrólisis

El porcentaje del grado de hidrólisis (%GH) se determinó con la técnica de Ortofenilaldehído (OPA) propuesta por Nielsen y col. (2001). Inicialmente, se preparó una solución de L-serina en agua destilada (1.004 mg/mL). De dicha solución se tomaron 150 μL y se añadieron 1500 μL de agua desionizada para preparar una solución estándar de serina 1:10. Se realizó una curva de calibración, empleando como testigo diferentes volúmenes en μL obtenidos de la dilución 1:10 de la solución del aminoácido L-serina y 1.5 mL del reactivo OPA. Las absorbancias fueron empleadas para hallar los equivalentes de aminos liberados por la hidrólisis. Se utilizó la ecuación de la recta de calibración de L-serina y se aplicó la siguiente fórmula: $\%GH = (h/htot) \times 100$. Donde:

h = concentración de grupos aminos libres expresada como meq/g de proteína.

$htot$ = número total de enlaces peptídicos de las proteínas de *P. vulgaris* endurecido.

Obtención del texturizado de soya incorporado con hidrolizado proteínico.

Para la obtención del texturizado de soya se incorporó hidrolizado proteínico de *P. vulgaris* endurecido a un nivel del 5% (p/p), se obtuvo también un producto control

con 0% de incorporación. El hidrolizado fue diluido en el agua empleada para ajustar la humedad de la harina de soya, el agua se agregó hasta alcanzar 35% de contenido de humedad, se dejó homogenizar la harina en un procesador (Kitchen Aid, U.S.A.) por 10 min, finalmente se refrigeró la harina a una temperatura de 4 °C por 30 min. La extrusión se llevó a cabo en un extrusor (Prism Usalab 16, U.S.A.) con tornillos gemelos (40 cm), con cuatro zonas de calentamiento, sensores de temperatura y presión, y una boquilla de acero inoxidable con orificio de 2 mm. Las condiciones del proceso fueron: temperatura 180 °C y velocidad de los tornillos de 200 rpm. Los productos se recolectaron en charolas de aluminio y se llevaron a secado por convección en una estufa (Fisher Scientific Isotemp model 825F, U.S.A.) a 60 °C por 12 horas. Concluido el secado los productos se dejaron enfriar y se almacenaron en bolsas de polietileno dentro de un desecador hasta efectuar la caracterización física, la evaluación de la actividad biológica y la evaluación sensorial.

Caracterización física de los texturizados.

Absorción de agua (AA). Se empleó el método de la AACC 88.04 (1995). Se cocieron 10 g de producto en agua destilada, se drenó el agua con un tamiz de malla 40, los texturizados se secaron a 105 °C por 12 h. Para calcular la AA se empleó la ecuación: AA (g agua / g sólidos) = (Pmh - Pms) / Pms

Donde Pmh = peso de la muestra luego de la cocción y Pms = peso de la muestra seca.

Sólidos solubles totales (SST) y sólidos insolubles totales (SIT). Se empleó el método de la AACC 88.04 (1995). El líquido drenado de la prueba de AA se transfirió a tubos que se centrifugaron a 2000 x g por 15 min. El sobrenadante y el sedimento se secaron por 24 h a 105 °C. Para calcular las pérdidas de los sólidos se utilizarán las siguientes fórmulas:

$$\text{SST (g sól. sol. / 100 g)} = (\text{SS} / \text{Mbs}) \times 100$$

Donde SS es el peso del sobrenadante seco y Mbs el peso de muestra original en base seca.

$$\text{SIT (g sól. ins. / 100g)} = (\text{SDS} / \text{Mbs}) \times 100$$

Donde, SDS es el peso del sedimento seco y Mbs el peso de muestra original en base seca.

Fuerza máxima de ruptura por compresión (FMRC). Se determinó de acuerdo al método de Ruiz *et al.* (2008), 20 g de extrudidos se cortaron trozos de 40 mm y se colocaron en la celda Kramer, se empleó una máquina universal Instron (modelo 4411, U.S.A.) con una celda de carga de 50 kgf, comprimiendo a una velocidad de 10 mm/min.

Actividad antihipertensiva del hidrolizado y los productos texturizados

Se empleó el método de Hayakari y col. (1978), en el cual la ECA hidroliza el HHL (Hipuril-L-histidil-L-leucina) hasta ácido hipúrico e His-Leu. Se preparó una mezcla de amortiguadores de pH de fosfato de potasio 40 mM y

de cloruro de sodio 300 mM (pH 8.3) y un amortiguador de fosfato de potasio 0.2 M (pH 8.3). Se utilizó una solución de HHL al 0.3% (p/v) en mezcla de amortiguadores. Se preparó una solución estándar de ECA-I (1.8 U/mL) disolviendo la enzima en 1.0 mL de agua desionizada, de esta solución se tomó una alícuota para obtener una solución de 100 mU/mL. El porcentaje de actividad inhibitoria de la ECA-I se determinó con la siguiente ecuación: %Act = (A-B)/(A-C) x 100

Donde A es la absorbancia en presencia de muestra y ECA-I, B la absorbancia del control y C la absorbancia del blanco.

Análisis estadístico

Los resultados fueron procesados utilizando medidas de tendencia central (media) y dispersión (desviación estándar). Los datos obtenidos de la caracterización física y de la actividad biológica de los texturizados fueron evaluados mediante análisis de varianza de una vía y comparación de medias (LSD) para establecer diferencias entre tratamientos (Montgomery, 2003). Se empleó el paquete computacional Statgraphics Plus Versión 5.1.

Resultados y discusiones

Composición proximal

La composición proximal de la harina de *P. vulgaris endurecido*, del concentrado proteínico de *P. vulgaris endurecido* y su hidrolizado, así como de la harina desgrasada de soya y de los productos texturizados, se presenta en el cuadro 1. En cuanto al *P. vulgaris endurecido*, la harina presenta un mayor contenido de humedad comparado con el concentrado y el hidrolizado, debido a que en la etapa final de la obtención tanto del concentrado como del hidrolizado, estos se liofilizan, reduciéndose así el contenido de humedad. La harina desgrasada de soya y los texturizados control e incorporado con 5% de hidrolizado no presentaron diferencia significativa (p 0.05) en cuanto al contenido de humedad.

El contenido de proteína cruda de la harina (21.7%) fue menor comparado con el concentrado (73.1%) y el hidrolizado (56.2%). En el caso del concentrado, su obtención incluye etapas en las que se reduce el contenido del resto de los componentes proximales, esto con el fin de obtener un máximo rendimiento de proteína. El contenido de proteína del hidrolizado se reduce en comparación con el concentrado, debido a que durante su obtención se incluye una etapa de centrifugado que conserva únicamente la proteína soluble. En cuanto a la composición proximal de la harina de soya desgrasada y los texturizados, no se presentaron variaciones significativas a excepción del contenido de proteína cruda, el cual se incrementó en el texturizado incorporado con hidrolizado, debido a que este contiene un alto contenido de proteína cruda. El resto de los componentes proximales no se modifica, ya que la extrusión solo modifica físicamente el alimento.

Cuadro 1. Composición proximal de la harina de *P. vulgaris* endurecido (HPV), del concentrado proteínico de *P. vulgaris* endurecido (CPV), del hidrolizado proteínico de *P. vulgaris* endurecido (HIPV), de la harina de soya desgrasada (HSD) y los texturizados control (TC) y con 5% de hidrolizado (T5).

Componente	HPV	CPV	HIPV	HDS	TC	T5
Humedad	8.9 ^c	2.7 ^a	2.5 ^a	7.2 ^b	7.1 ^b	7.1 ^b
Proteína cruda	21.7 ^a	73.1 ^d	56.2 ^c	34.1 ^b	34.5 ^b	35.2 ^b
Grasa cruda	4.4 ^c	2.8 ^b	0.8 ^a	1.2 ^a	1.1 ^a	1.1 ^a
Fibra cruda	4.1 ^b	1.3 ^a	1.1 ^a	7.2 ^c	7.1 ^c	7.2 ^c
Cenizas	4.5 ^d	2.5 ^b	0.5 ^a	6.1 ^c	5.9 ^c	5.8 ^c
ELN	65.3 ^d	20.3 ^a	41.4 ^b	51.4 ^c	51.4 ^c	50.7 ^c

Letras diferentes en la misma fila indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

Hidrólisis enzimática del concentrado proteínico del *Phaseolus vulgaris* endurecido

El porcentaje de grado de hidrólisis (%GH) obtenido con el sistema enzimático secuencial pepsina-pancreatina fue de 23.61%, este grado de hidrólisis se considera extensivo ya que es superior a 10%. El grado de hidrólisis fue mayor a los reportados por Qi y col. (1997), de 11 y 17% al hidrolizar durante 60 y 180 min un aislado proteínico de soya con la enzima pancreatina. En general, el uso de una sola enzima no permite la obtención de hidrolizados proteicos extensivos en un periodo de tiempo razonable. Por el contrario, el uso secuencial de proteasas con diferente o igual actividad catalítica permite generar hidrolizados proteicos con altos grados de hidrólisis, como el obtenido en el presente estudio. Los hidrolizados presentan mejores características nutrimentales y de funcionalidad tecnológica comparada con el material de origen. Lo anterior facilita su incorporación a productos alimenticios, de uso médico o cosmético, de acuerdo con Korhonen y Pihlanto (2003), la modificación enzimática también puede generar compuestos con actividad biológica como los péptidos, que tienen la capacidad de regular procesos fisiológicos en el organismo. Por lo anterior, el hidrolizado de frijol endurecido, podría ser una alternativa viable para la obtención de péptidos con actividad biológica inhibitoria de la ECA.

Caracterización física de los texturizados.

Los parámetros físicos evaluados en el texturizado control, en el texturizado incorporado con 5% de hidrolizado de *P. vulgaris* endurecido y en un producto comercial se presentan en el cuadro 2.

Cuadro 2. Absorción de agua, sólidos solubles totales, sólidos insolubles totales y fuerza máxima de ruptura por compresión del texturizado control (TC), del texturizado incorporado con 5% de hidrolizado y del producto comercial (C).

Muestras	AA (g H ₂ O/g texturizado)	SST (%)	SIT (%)	FMRC (kgf)
TC	3.4 ^b	4.8 ^a	1.1 ^b	257.8 ^a
T5	2.7 ^a	4.9 ^a	1.1 ^b	262.9 ^b
C	3.7 ^b	4.7 ^a	1.1 ^b	253.2 ^a

Letras diferentes en la misma fila indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

Absorción de agua (AA).

Los valores de absorción de agua oscilaron entre 2.7 y 3.7 g de agua/g de texturizado, valores semejantes al reportado por Arrollo *et al.* (2006), de 3 g de agua/g de texturizado para un producto texturizado de soya, cuyas condiciones de extrusión fueron 30% de contenido de humedad, velocidad de 75 rpm y temperatura 150 °C. El producto comercial y el texturizado control presentaron una mayor absorción de agua en comparación con el texturizado incorporado con 5% de hidrolizado. Por lo general se espera que un producto texturizado presente bajos valores de absorción de agua, ya que esto permite que el producto conserve su integridad estructural durante un proceso térmico. (Rueda *et al.*, 2003). La absorción de agua esta relacionada con la temperatura empleada en el proceso de extrusión, de acuerdo con Mercier y Feillet (1975), temperaturas menores a 150 °C, pueden generar texturizados frágiles, que se desintegran durante los procesos térmicos. TC y T5 se obtuvieron a una misma temperatura (180 °C), sin embargo T5 presentó una menor absorción de agua. Lo anterior indica que T5 presentó una mayor texturización debido a su contenido de proteína hidrolizada, que facilita la re-orientación de las proteínas vegetales de estructura globular a estructura fibrilar.

Sólidos solubles totales (SST) y sólidos insolubles totales (SIT).

En cuanto al contenido de SST, los valores presentados por TC, T5 y C no presentaron diferencia significativa ($p < 0.05$). De acuerdo con Rueda *et al.* (2004), los productos texturizados de soya presentan bajos valores de SST, ya que durante la extrusión el contenido de humedad de la materia prima disminuye, haciendo que los principales componentes como almidón, proteína, fibra y lípidos, interaccionen entre si formando complejos. De esta forma solo quedan libres algunos componentes minoritarios como hidratos de carbono pequeños, pequeñas porciones de proteína soluble y minerales, que interaccionan con el agua, solubilizándose durante la determinación. El contenido de SIT fue mayor en el T5 en comparación con

TC y C. Los SIT están constituidos principalmente por residuos fibrosos, el mayor contenido de sólidos insolubles en T5 pudo deberse a que este texturizado contiene proteína hidrolizada que forma interacciones con las proteínas de la soya, reduciéndose así las interacciones proteína-fibra, de esta forma los componentes fibrosos precipitan durante la determinación de los SIT, incrementando su contenido.

Fuerza máxima de ruptura por compresión (FMRC).

El texturizado incorporado con hidrolizado presentó el mayor valor de FMRC (Cuadro 2), en comparación con el texturizado control y el producto comercial. De acuerdo con Cummings et al., (1972). Durante la extrusión las proteínas son reformadas en estructuras continuas similares a las fibras, lo que aumenta la cohesividad y el desarrollo de una textura esponjosa, dándole al producto integridad estructural. El texturizado incorporado con hidrolizado tiene un mayor contenido de proteína, lo cual probablemente incrementó la formación de estructuras fibrilares, proporcionándole al producto mayor integridad y dureza (Figura 1).



Figura 1. Texturizado de harina desgrasada de soya incorporado con 5% (p/p) de hidrolizado proteínico de *P. vulgaris* endurecido.

Actividad antihipertensiva del hidrolizado y los productos texturizados.

En la Figura 2 se presentan los resultados de la evaluación de la actividad inhibitoria de la Enzima Convertidora de Angiotensina-I (ECA) del hidrolizado proteínico de *P. vulgaris* y los texturizados comercial, control e incorporado con hidrolizado de *P. vulgaris*. Las determinaciones hechas a los productos texturizados, se realizaron después de someterlos a cocción, ya que es la forma en la que se consumen de manera cotidiana. El porcentaje de inhibición de la ECA-I osciló entre 30.2% (HPV) y 80.1% (T5). De acuerdo con Iwaniak y Minkiewicz

(2007), cuando se modifica enzimáticamente una proteína se generan fragmentos pequeños (péptidos), los cuales presentan actividad biológica. Lo anterior explicaría la actividad inhibitoria de la ECA-I del hidrolizado.

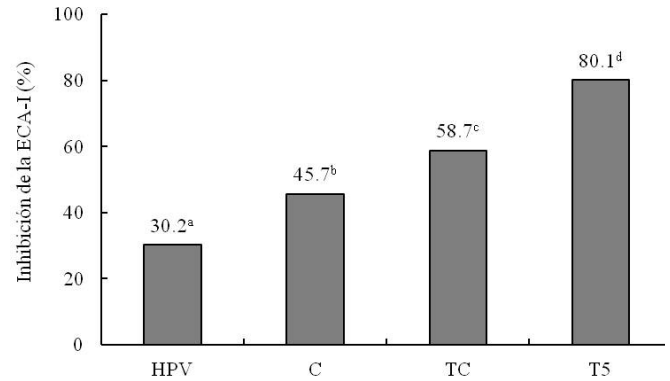


Figura 2. Porcentaje de inhibición de la ECA-I del producto comercial (C), el hidrolizado proteínico de *P. vulgaris* endurecido HPV, los texturizados control (TC) e incorporado con 5% de hidrolizado (T5). Letras diferentes en la misma serie indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

En el caso de los productos texturizados, tanto el producto comercial como el control presentan actividad inhibitoria de la ECA-I. De acuerdo con Riaz (2002), las condiciones de extrusión pueden causar la desnaturalización parcial de la proteína, así como rupturas de tipo hidrolítico debido a los esfuerzos mecánicos y a la presión que generan los tronillos del extrusor, así como a la temperatura del proceso. Lo anterior explicaría la actividad biológica que presentaron los productos que no fueron incorporados con hidrolizado. El producto incorporado con 5% de hidrolizado presentó el mayor porcentaje de inhibición (80.1%), lo que indica que durante el proceso de extrusión no solo se genera actividad biológica, sino que se mantiene la del hidrolizado.

Conclusiones

La modificación enzimática del concentrado proteínico de *P. vulgaris* endurecido puede emplearse para la obtención de fracciones peptídicas con actividad inhibitoria de la Enzima Convertidora de Angiotensina-I. Incorporando dicho hidrolizado en un 5% (p/p) a harina desgrasada de soya, se obtuvo un producto texturizados por extrusión, que presentó un índice de absorción de agua de 2.7 g de agua/g de texturizado, porcentajes de sólidos solubles e insolubles de 2.7% y 1.1%, respectivamente y una fuerza máxima de ruptura por compresión de 262.9 kgf. Los parámetros evaluados en el producto obtenido fueron semejantes a los que presentan productos comerciales, lo cual indica que la incorporación de hidrolizado no afectó las características físicas del producto. El texturizado presentó un porcentaje de inhibición de la ECA-I de 80%, superior al que presentó un producto control sin

incorporar de 58% y al que presentó el hidrolizado de 30.2%, lo anterior indica que el proceso de extrusión no solo no afectó la actividad biológica, sino que también la genero al causar la desnaturalización parcial y la ruptura de las proteínas de la harina desgrasada de soya. Los resultados permiten establecer el potencial del proceso de extrusión para incorporar ingredientes con potencial nutracéutico a productos alimenticios, sin modificar sus características físicas, además de no afectar la actividad biológica. De esta forma podrían generarse alimentos de tipo funcional.

Agradecimientos

Al CONACYT por su apoyo al proyecto de ciencia básica titulado "Bioactividad y propiedades fisicoquímicas de sistemas hidrocoloides mixtos integrados por proteínas hidrolizadas de frijol lima (*Phaseolus lunatus*) y goma modificada de flamboyán (*Delonix regia*)" con número de convenio 106605.

Referencias.

- AACC. 1995. Approved Methods of the American Association of Cereal Chemistry (9th ed). American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN, USA.
- AOAC. (1997). Official Methods of analysis. Association of official analytical chemists, 15th ed. William Horwitz Editor. Washington, D.C., USA.
- Arroyo-Maya, I., Contreras-Tinoco, C.E., Meza-Márquez, O.G. (2006). Desarrollo de productos texturizados para personas de la tercera edad. Tesis de Doctorado. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional.
- Betancur-Ancona, D., Gallegos-Tintoré, S., Chel-Guerrero, L. (2004). Wet-fractionation of *Phaseolus lunatus* seeds: partial characterization of starch and protein. Journal of the Science of Food and Agriculture, 84(10):1193-1201.
- Cummings, D.B., Stanley, J.M., Deman, J.M. (1972). Textural properties and ultrastructure on an extruded soybean product. Ins. Can. Tech. Alim. 5: 124-128.
- Hayakari, M., Kondo, Y., Izumi, H. (1978). A Rapid and Simple Spectrophotometric Assay of Angiotensin-Converting Enzyme. Analytical Biochemistry, 84:361-369.
- Iwaniak, A. and Minkiewicz, P. (2007). Proteins as the source of physiologically and functionally active peptides. Acta Scientiarum. Polonorum Technologia Alimentaria, 6(3):5-15.
- Kigel, J. (1999). Culinary and nutritional quality of *Phaseolus vulgaris* L. seeds as affected by environmental factors. Biotechnology, Agronomy, Society and Environment. 3:205-209.
- Korhonen, H. and Pihlanto, A. (2003). Food-derived bioactive peptides-opportunities for designing future foods. Current Pharmaceutical Design, 9(16):1297-1308.
- Lajolo, F.M. (2002). Functional foods: Latin American perspectives. British Journal of Nutrition, 88(2):S145-S150.
- Mercier, C., and Feillet, P. (1975). Modification of carbohydrate components by extrusion cooking of cereal products. Cereal Chemistry, 52:283-297.
- Montgomery, D. (2003). Diseño y análisis de experimentos. Grupo Editorial Iberoamericana. México, D.F. pp. 14-27.
- Morales de León, J.C., Vásquez, M.N., Torres, N., Gil, Z.L., Bressani, R. (2007). Preparation and characterization of protein isolate from fresh and hardened beans (*Phaseolus vulgaris* L.). Journal of Food Science, 72(2):96-102.
- Nielsen, P., Petersen, D., Dammann, C. (2001). Improved method for determine food protein degree of hydrolysis. Journal of Food Science, 66:642-648.
- Panyam, D. and Kilara, A. (1996). Enhancing the functionality of food proteins by enzymatic modification. Trends in Food Science and Technology, 7:120-125.
- Riaz, M.N. 2002. Extruders in food applications. CRC Press. USA.
- Rueda, J., Kil-Chang, Y., Martínez-Bustos, F. (2004). Functional characteristics of texturized defatted soy flour. Agrociencia, 38:63-73.
- SAGARPA. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación de México (2000). Situación actual y perspectiva de la producción de frijol en México, 1990-2000.
- Vioque, J., Megías, C., Yust, M.M., Pedroche, J., Lquari, H., Girón-Calle, J., Alaiz, M., Millán, F. (2004). Purification of an ACE Inhibitory Peptide alters Hydrolysis of Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Protein Isolates. Journal of Agricultural and Food Chemistry, (52):1928-1932.
- Wang, W. and González de Mejía, E. (2005). A new frontier in soy bioactive peptides that may prevent age-related chronic diseases. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 4:63-78.

ACTIVIDAD ANTITROMBÓTICA Y ANTICARIOGÉNICA DE HIDROLIZADOS PROTEÍNICOS DE FRIJOL LIMA (*PHASEOLUS LUNATUS*)

Córdova-Lizama, A.J.; Ruiz-Ruiz, J.C.; Segura-Campos, M.R.; Betancur-Ancona, D.A.; Chel-Guerrero, L.A.

RESUMEN

Se evaluó de la actividad antitrombótica y anticariogénica de hidrolizados de *Phaseolus lunatus*. El concentrado proteínico de *P. lunatus* se hidrolizó con pepsina, obteniéndose un grado de hidrólisis de 12.4%. Para la actividad antitrombótica, se obtuvieron porcentajes de reducción de la agregación plaquetaria de 2, 4, 30, 88 y 100% con concentraciones de muestra de 0.53, 1.3, 2.5, 4.4 mg/mL, respectivamente. En cuanto a la actividad anticariogénica, el hidrolizado redujo la desmineralización del calcio y del fósforo presentes en una matriz de hidroxiapatita en 50.0% y 55.8%, respectivamente. Se obtuvieron hidrolizados modificados químicamente empleando una mezcla de fosfatos de sodio (mono y dibásico) y usando pirofosfato de sodio. El hidrolizado modificado con la mezcla de fosfatos redujo en un 68.2% y 72.0% la desmineralización del calcio y el fósforo, respectivamente; mientras que el hidrolizado modificado con pirofosfato redujo la desmineralización del calcio y fósforo, en un 77.3% y 77.0%, respectivamente. Por lo anterior los hidrolizados de *Phaseolus lunatus*, podrían ser utilizados como ingredientes nutraceuticos en el desarrollo de alimentos funcionales o como productos farmacéuticos.

Palabras clave: Hidrolizados, *Phaseolus lunatus*, antitrombótica, anticariogénica.

Introducción

Actualmente los problemas de salud en México, como las enfermedades cardiovasculares (trombosis) y bucales (caries), afectan a un elevado porcentaje de la población. Las enfermedades isquémicas del corazón, donde se incluyen la trombosis arterial y venosa, son la primera causa de muerte a nivel nacional (NAAIS, 2005). En lo que respecta a los problemas bucales, el porcentaje de personas con caries en el país es muy elevado. Datos de la Encuesta Nacional de Caries 1997-2001, indican que entre el 85 y 95% de la población infantil y juvenil presenta uno o varios órganos dentarios afectados por los procesos cariosos (Canseco, 2001). Muchos de los medicamentos contra estas problemáticas, son de origen sintético y con precios elevados, por lo que recientemente se han venido estudiando otras alternativas de origen natural que puedan reducir sus costos y posibles efectos secundarios. Estudios recientes, como los realizados por Warner *et al.*, (2001), Cai *et al.*, (2003) y Aimutis *et al.*, (2004), han demostrado que péptidos presentes en la leche y en el suero lácteo, presentan actividad antitrombótica y anticariogénica, estas secuencias aminoácidas se liberan durante la hidrólisis *in vitro* de las proteínas. Las proteínas son ampliamente utilizadas en la formulación y procesamiento de alimentos como ingredientes, por su importancia nutrimental, sensorial y aplicación tecnológica. Debido a lo anterior y a la creciente búsqueda de los consumidores por alimentos e ingredientes funcionales, es necesario proveer productos que satisfagan estas necesidades y que aporten un valor agregado a la salud por medio de compuestos que potencialicen o agreguen diversas propiedades a los nuevos alimentos, ya sean de carácter funcional, nutrimental o bioactivo. Como las proteínas animales, tradicionalmente empleadas por su gran valor nutritivo y propiedades funcionales, son difíciles de adquirir debido a su elevado costo de producción, ha sido necesario buscar alternativas de menor costo, de fuentes regionales y con la viabilidad de reducir los riesgos de enfermedades crónicas, siendo las proteínas vegetales la mejor alternativa. En este contexto, destacan las leguminosas, como lo es *Phaseolus lunatus*, la cual se cultiva en el sureste mexicano. Considerando lo anterior, el objetivo del presente estudio fue evaluar la actividad biológica antitrombótica y anticariogénica de hidrolizados proteínicos de frijol lima, así como la factibilidad de incrementar su actividad biológica mediante su modificación química.

Materiales

Se emplearon granos de *Phaseolus lunatus* provenientes de la cosecha 2012 del estado de Yucatán. Todos los reactivos fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Para la hidrólisis se empleo pepsina de mucosa gástrica porcina adquirida de Sigma-Aldrich (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA).

Métodos

Obtención de la harina del frijol lima

Los granos se limpiaron y se seleccionaron los que no presentaron ningún tipo de daño físico para triturarlos en un molino Cemotec (Tecator Sweden), seguidamente se molieron con un molino Cyclotec 1093 (Tecator Sweden). La harina se tamizó a través de mallas tamaño 80 y 100 hasta obtener una harina con partículas menores a 0.149 mm.

Obtención del concentrado proteínico del frijol lima

Se empleó el método reportado por Betancur *et al.* (2004). A una dispersión de harina:agua (relación 1:6 p/v) se le ajustó el pH a 11. La dispersión se agitó por 1 h a 400 rpm, se filtró a través de tamices de malla 80 y 100 para eliminar la fibra. El residuo sólido se lavó cinco veces con agua destilada (1:3, p/v), recuperando y mezclando el agua de lavado con la suspensión. Se dejó reposar por 1 h para precipitar el almidón. El sobrenadante (proteína) se decantó y se ajustó el pH a 4.5 (PI), la solución se centrifugó a 4500 rpm por 30 min. El precipitado se secó a -47°C y 13×10^{-3} mbar en una liofilizadora.

Composición proximal de la harina y el concentrado proteínico del frijol lima

Se emplearon los métodos de la AOAC (1997): Humedad (Método 925.09) secado a 105°C hasta peso constante. Cenizas (Método 923.03), residuo inorgánico resultante de la incineración a 550°C . Grasa cruda (Método 920.39), lípidos libres extraídos con hexano. Proteína cruda (Método 954.01), por el método Kjeldahl, usando 6.25 como factor de conversión de nitrógeno a proteína. Fibra cruda (Método 962.09), residuo orgánico combustible e insoluble que se obtiene después de que la muestra fue sometida a una digestión ácida y alcalina. Extracto libre de nitrógeno (ELN), se calculó por diferencia.

Hidrólisis del concentrado proteínico

Se empleó el método de Vioque *et al.* (2004) para efectuar la hidrólisis con pepsina. El tiempo de reacción fue de 10 min, la concentración de sustrato de 4%, la relación enzima/sustrato 1/10, la temperatura de 37°C y el pH de 2. La reacción se efectuó en un vaso de precipitado de 2000 mL colocado en un baño de agua, el volumen de la suspensión fue de 1 L. La agitación se efectuó a 300 rpm, se empleó un termómetro para controlar la temperatura y un electrodo para ajustar el pH. La hidrólisis se detuvo colocando la muestra en un baño a 80°C por 20 min, se centrifugó a $10,000 \times g$ por 20 min, la porción soluble se conservó en congelación (Pedroche *et al.*, 2002).

Determinación del grado de hidrólisis

El porcentaje del grado de hidrólisis (%GH) se determinó con la técnica propuesta por Nielsen *et al.* (2001). Inicialmente, se preparó una solución de L-serina en agua destilada (1.004 mg/mL), de la solución se tomaron 150

μL y se añadieron 1500 μL de agua desionizada para obtener una solución de serina 1:10. Se obtuvo una curva de calibración del aminoácido L-serina. Las absorbancias fueron empleadas para hallar los equivalentes de aminos liberados por la hidrólisis. Se utilizó la ecuación de la recta de calibración de L-serina y se aplicó la siguiente fórmula: $\%GH = (h/htot) \times 100$. Donde:

h = concentración de grupos aminos libres expresada como meq/g de proteína.

$htot$ = número total de enlaces peptídicos presentes en las proteínas de *P. lunatus*. 4.9.

Determinación de actividades biológicas *in vitro*

Actividad antitrombótica

La agregación plaquetaria se determinó según el método de Miyashita *et al.* (1999). Se empleó sangre humana fresca proporcionada por voluntarios. La sangre colectada, se colocó de inmediato en tubos Vacutainer® (4.5 mL) con citrato de sodio para evitar la coagulación. Luego se centrifugaron a 1000 rpm durante 15 min dando lugar al plasma rico en plaquetas (PRP) como sobrenadante. La fase residual se centrifugó de nuevo pero a 3500 rpm durante otros 15 min, para obtener el plasma pobre en plaquetas (PPP). Posteriormente al PRP se le realizó un ajuste de plaquetas a $300 \times 10^3/\mu\text{L}$ para obtener un plasma con concentración estándar (PA) empleando un citómetro hemático marca Symex modelo KX-21, para determinar el número de plaquetas presentes en el PRP y cuál será el volumen requerido para preparar el plasma ajustado (PA). Para esto se utilizó la fórmula $V1C1 = V2C2$, donde:

V1: volumen de PRP

C1: concentración de plaquetas iniciales (después de centrifugar a 1000 rpm/15 min)

V2: es el volumen final que se requiere del PA a 300 000 plaquetas/ μL

C2: es la concentración de plaquetas en el plasma ajustado, 300 000 plaquetas/ μL .

Actividad anticariogénica

Se realizó siguiendo la metodología descrita por Warner *et al.*, (2001), que consiste en una determinación *in vitro* usando hidroxiapatita (HA) simulando el esmalte dental. Consistió en hacer una suspensión de HA (2 mg/ml) en un buffer 0.1 M de Tris-HCl (pH = 7). También se empleó buffer de acetato de sodio 0.4 M (pH = 4.2) para representar los ácidos orgánicos presentes en la boca. Se prepararon suspensiones de las muestras con agua destilada a una concentración de 0.8 mg/mL. El sobrenadante fue utilizado para medir los niveles de calcio y fosforo disueltos en por acción del buffer de acetato de sodio. Para la determinación de fósforo se siguió la metodología descrita en las normas NMX-AA-029-SCFI-2001 y NMX-Y-100-SCFI-2004; mientras que para el calcio, se utilizó el método 944.03 de la AOAC, (1997).

Modificación química del hidrolizado proteínico

La fosforilación se realizó de acuerdo a lo propuesto por Sitohy *et al.*, (2000), quienes emplean fosfato monosódico y disódico; y a lo reportado por Hayashi *et al.*, (2008), quienes emplean un buffer de pirofosfato. Para la fosforilación con fosfatos, se diluyeron 30.0 g de fosfato monosódico y 16.0 g de fosfato disódico en 100 mL de agua destilada a 35 °C, ajustando el pH a 6. Posteriormente, 10 g de hidrolizado se disolvieron en 80 mL de la solución de fosfatos agitando por 10 min. La dispersión se filtró, el precipitado obtenido se recolectó y fue secado a 60 °C por 1 h. El precipitado se calentó por 3 h a 85 °C en un horno de vacío a 800 mbar. El producto se disolvió en 50 mL de metanol al 50%. Esta mezcla se agitó durante 30 min y el producto nuevamente se filtró, lavando el precipitado con 20 ml de etanol absoluto. Se preparó una solución al 10% en agua con el precipitado y se dializó 24 h en agua destilada. El hidrolizado fosforilado se recuperó mediante secado por liofilización a -47°C y 13 X 10⁻³ mbar. Para la fosforilación del hidrolizado con pirofosfato, se empleó una solución buffer de pirofosfato de sodio 0.1 M a pH 4. Se preparó una solución al 2% del hidrolizado con el buffer, se agitó por 10 min, posteriormente la solución se congeló y secó a -47°C y 13 X 10⁻³ mbar en una liofilizadora. El residuo seco se activó calentando por convección a 85 °C por 2 días. Una vez activado, se eliminaron los fosfatos libres mediante diálisis. La mezcla dializada fue secada por liofilización.

Determinación de fósforo

La determinación del contenido de fósforo del hidrolizado de *Phaseolus lunatus* (HPL), el hidrolizado fosforilado con fosfatos (HPL-F) y del hidrolizado fosforilado con pirofosfato (HPL-P), así como en la evaluación de la actividad anticariogénica, se realizó siguiendo la metodología de las normas mexicanas NMX-AA-029-SCFI-2001 y NMX-Y-100-SCFI-2004.

Determinación de calcio

Para la cuantificación de calcio se utilizó el método 944.03 de la AOAC, (1997). Basado en la precipitación del calcio a pH 4 como oxalato y su posterior disolución en ácido sulfúrico liberando ácido oxálico el cual se titula con una solución de permanganato de potasio.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos de la caracterización proximal de la harina y el concentrado proteínico del frijol lima, de la hidrólisis del concentrado proteínico, de la modificación del hidrolizado y de las bioactividades, fueron evaluados mediante análisis de varianza de una vía y comparación de medias (LSD) para establecer diferencias entre tratamientos. Se empleó el paquete computacional Statgraphics Plus Versión 5.1 de acuerdo a métodos señalados por Montgomery (2003).

Resultados y discusión

Composición proximal de la harina y concentrado proteínico de frijol lima

La composición proximal de la harina y el concentrado proteínico de frijol lima se presenta en el cuadro 1. En cuanto a la humedad, el concentrado presentó un mayor contenido comparado con la harina, debido a que en la etapa final de la obtención de la harina se calienta a 60 °C antes de tamizar, reduciéndose así el contenido de humedad. El contenido de proteína cruda de la harina (19.6%) fue similar al 21.7% para *Phaseolus vulgaris* (Ruiz *et al.*, 2012). El contenido de proteína del concentrado fue de 67.5%, valor semejante al reportado por Tello *et al.*, (2010), de 67.3% para un concentrado de *P. lunatus* y al obtenido por Ruiz *et al.* (2012), en concentrados de *P. vulgaris* (67.7%).

Cuadro 1. Composición proximal de la harina y el concentrado proteínico del frijol lima (% B.S.).

Componente (%)	Harina	Concentrado proteínico
Humedad	4.75 ^a	5.18 ^a
Cenizas	2.70 ^a	4.62 ^b
Proteína	19.60 ^a	67.52 ^b
Fibra	2.38 ^b	0.57 ^a
Grasa	1.06 ^a	2.92 ^b
ELN	74.26 ^b	24.35 ^a

Letras diferentes en la misma fila indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

El contenido de grasa (2.92%) en el concentrado fue similar (3.12%) al reportado por Tello *et al.* (2010) y mayor (0.68%) al exhibido por Betancur *et al.* (2004). El incremento de grasa cruda en el concentrado proteínico, pudo deberse a que durante la extracción alcalina de la proteína (pH 11) se saponifican las grasas de carácter polar, precipitando con la proteína al modificar el punto isoelectrico (pH 4.5), tal como lo observaron Chel *et al.* (2002), en concentrados de *Canavalia ensiformis* y *Phaseolus lunatus*. Los contenidos de fibra cruda y ELN disminuyeron, en un 75.7% y 67.2%, respectivamente, esto se debió a que el proceso de obtención del concentrado incluye etapas específicas de separación de estos componentes. Lo anterior resulta conveniente ya que de acuerdo con Ruiz *et al.* (2012), los componentes no proteicos como lípidos, fibra, hidratos de carbono y componentes menores como sustancias minerales afectan la calidad final del concentrado.

hidrólisis del concentrado proteínico de frijol lima y grado de hidrólisis

El concentrado proteínico de frijol lima, al ser sometido a un tratamiento hidrolítico con pepsina en una relación E:S de 1:10 a pH 2, 37 °C y un tiempo total de hidrólisis de 10 min, presentó un GH de 12.4%, quedando clasificado como hidrolizado extensivo (> 10%). Este tipo de hidrolizados se utilizan en nutrición clínica y son una tendencia prometedora en el campo de los alimentos funcionales, debido a la presencia de péptidos con actividad biológica, los cuales pueden actuar sobre diversos procesos fisiológicos del organismo.

Actividad antitrombótica

La determinación de la actividad antitrombótica, se basa en la capacidad que tiene la sangre para formar coágulos o trombos, principalmente por el agrupamiento de las plaquetas en el plasma sanguíneo. Esta agregación, puede ser inducida por la adición de agentes agregantes o agonistas que provocan la activación de las plaquetas, su adhesión y la formación de agregados. Los resultados expresados como porcentaje de reducción de la agregación plaquetaria (RAP), a diferentes concentraciones de hidrolizado, se presentan en la figura 1.

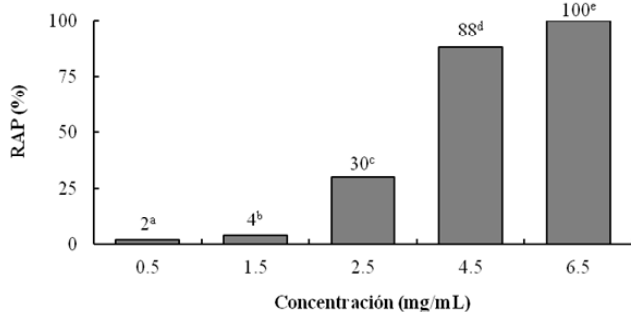


Figura 1. Reducción de la agregación plaquetaria (RAP) del hidrolizado de *Phaseolus lunatus*.

El tratamiento enzimático favoreció la bioactividad, ya que los valores incluso alcanzan 100% de RAP con la concentración de 6.5 mg/mL. Sin embargo, este valor pudo deberse a la saturación del plasma con concentración estándar (PA), evitando así el paso del haz de luz, independientemente de si se forma agregación, dado que se emplea un método óptico (Miyashita *et al.*, 1999). Debido a lo anterior, se tomó como valor de referencia el RAP obtenido con 4.5 mg/mL (88% RAP), valor superior a los reportados por Chim, (2011), para hidrolizados de pepino de mar empleando los sistemas enzimáticos: Alcalasa-Flavorzima® (79.5% RAP) y pepsina-pancreatina (72% RAP), ambos a una concentración de 50 mg/mL. La elevada bioactividad del HPL pudo deberse a la presencia de péptidos que tengan el segmento Ar-

gGlyAsp en su secuencia, se ha demostrado que la Arg participa en la unión entre el fibrinógeno y la GPIIb/IIIa. El grupo guanidino de la cadena lateral de la Arg (catión) interacciona mediante un enlace iónico con la estructura del grupo carboxilo del Asp presente en el complejo GPIIb/IIIa, impidiendo el enlace del fibrinógeno con sus receptores (figura 2). En la figura 2 se esquematizan otros mecanismos que generan efecto antiagregante.

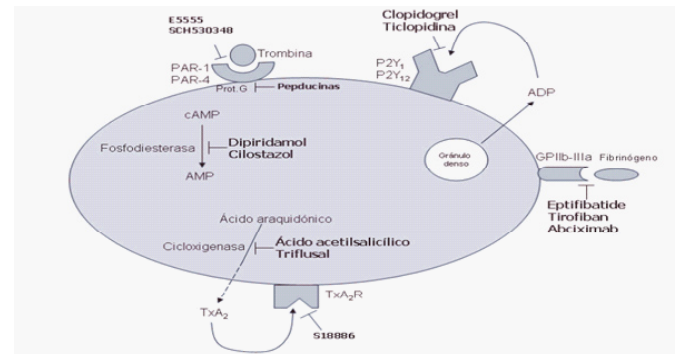


Figura 2. Representación esquemática de los mecanismos de acción de los fármacos antiagregantes en uso. Se muestran las enzimas (ciclooxigenasa y fosfodiesterasa) y receptores (P2Y1, P2Y12; GPIIb-IIIa; PAR1, PAR4) inhibidos por los antiagregantes. Fuente: Palomo *et al.*, 2009.

El HPL también podría ejercer su acción antiagregante mediante la inhibición de receptores de ADP (PYI₁₂ y PYI₁) y tromboxano (TXA₂R), o inclusive inhibiendo la acción de enzimas que promueven la agregación plaquetaria (fosfodiesterasa y ciclooxigenasa). Esto se puede especular debido a que existen medicamentos de naturaleza peptídica como el eptifibatide y las pepducinas, los cuales se emplean para evitar la formación de trombos (Palomo *et al.*, 2009).

Hidrolizados proteínicos fosforilados

La fosforilación incrementó el contenido de fósforo en los hidrolizados (Figura 3). En el hidrolizado fosforilado con fosfatos, la cantidad de fósforo se incrementó 2.5 veces en tanto que en el hidrolizado modificado con pirofosfato el contenido se incrementó 2 veces.

De acuerdo con Dávila *et al.* (2003), el contenido de fósforo en la mayoría de las leguminosas oscila entre 0.301% y 0.586%. El contenido de fósforo en el hidrolizado fue menor al reportado por dichos autores (0.174%), la disminución de fósforo pudo deberse tanto al proceso de fraccionamiento húmedo de la harina que incluye una etapa de precipitación de almidón, como a la hidrólisis que incluye etapas de centrifugación y descarte del precipitado. El contenido de fósforo en los hidrolizados modificados fue superior al reportado por Enomoto *et al.* (2009), quienes fosforilaron clara de huevo con pirofosfato, logrando incrementar el contenido de fósforo de 0.09% a 0.6% su contenido aumentó hasta un total de 0.60% y al reportado por Hayashi *et al.* (2008), quienes

modificaron ovotransferrina con pirofosfato, logrando un contenido de fósforo de 0.66%.

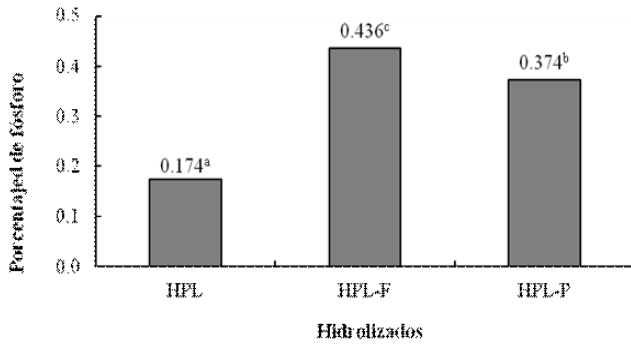


Figura 3. Porcentaje de fósforo del hidrolizado de *Phaseolus vulgaris* (HPL) y de los hidrolizados modificados con fosfatos (HPL-F) y con pirofosfato (HPL-P). ^{a,b}Letras diferentes en la misma serie denotan diferencia significativa ($p < 0.05$).

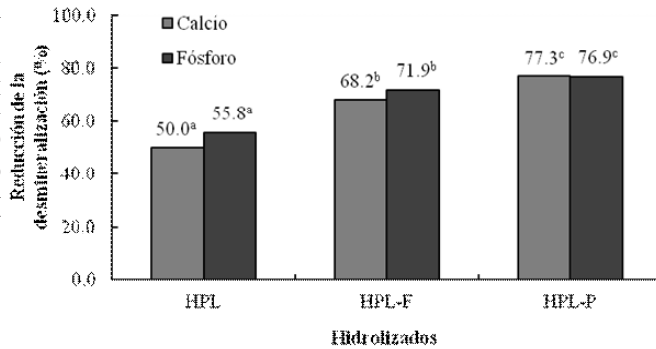
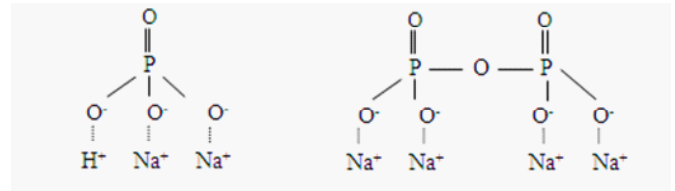


Figura 4. Reducción de la desmineralización de calcio y fósforo de la matriz de hidroxiapatita, en presencia del hidrolizado de *Phaseolus lunatus* (HPL) y los hidrolizados modificados con fosfatos (HPL-F) y pirofosfato (HPL-P). ^{a,b}Letras diferentes en la misma serie indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

Warner *et al.*, (2001), reporta reducción de la desmineralización para calcio de 80.2%, 44.0% y 48.5% para caseinofosfopéptidos, suero lácteo de la elaboración de queso cottage y de suero lácteo ácido, respectivamente. Por otro lado, también presenta porcentajes de inhibición para el fósforo de 81.8%, 18.2% y 39.4% para las mismas especies. Lo anterior revela un elevado potencial de los hidrolizados fosforilados para minimizar la desmineralización del esmalte dental por acción de los ácidos, pues el HPL-F alcanzó valores de inhibición para calcio y fósforo del 68.2% y 71.9%, respectivamente, mientras que el HPL-P redujo la disociación del calcio en un 77.3% y del fósforo en 76.9%. Valores similares a los reportados por Wamer *et al.* (2001) para caseinofosfopéptidos, los cuales ya han sido incorporados a productos como gomas de mascar y pastas dentales, como auxiliares en control y prevención de caries (Aimutis, 2004; Reynolds *et al.*, 2003; Reynolds *et al.*, 1997). Aun cuando el HPL-P presentó una menor cantidad de fósforo (0.374%) que

el HPL-F (0.436%), logró tener el mejor porcentaje de protección (Figura 4). Esta mayor capacidad para neutralizar los ácidos posiblemente se debió a la estructura que presenta el pirofosfato, pues dicho compuesto cuando se enlaza mediante enlaces monoéster, a los aminoácidos serina, tirosina y/o treonina, expone más grupos (-ONa) susceptibles a neutralizar los grupos ácidos, que la mezcla de fosfatos (Figura 5).



Fosfato dibásico de sodio

Pirofosfato tetrasódico

Figura 5. Estructura de las especies químicas utilizadas en la fosforilación de los hidrolizados.

También es de considerar la capacidad anticariogénica que pudiera tener los hidrolizados proteínicos de frijol lima debido a sus contenidos, no solo de fósforo, sino de aminoácidos como prolina e histidina, ya que se ha reportado que péptidos excretados por las glándulas salivales (parótida, submaxilar y sublingual) ricos en estos minerales, ejercen un efecto eficaz contra bacterias responsables de la caries como *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus sp* y *Porphyromonas gingivalis* (Ayad *et al.*, 2000; Geetha *et al.*, 2005; Groenink *et al.*, 2003).

Conclusiones

La hidrólisis enzimática del concentrado proteínico del frijol lima con pepsina, generó un grado de hidrólisis de 12.4%, esto permite clasificarlo como hidrolizado de tipo extensivo. Para la actividad antitrombótica del hidrolizado, se obtuvieron valores de disminución de la agregación plaquetaria de 2, 4, 30, 88 y 100% con concentraciones de muestra de 0.53, 1.29, 2.45, 4.46 y 6.15 mg/mL, respectivamente. La fosforilación con fosfatos de sodio incrementó 2.5 veces el contenido de fósforo y con pirofosfato de sodio 2 veces, en comparación con el hidrolizado proteínico sin modificar. Se evaluó el potencial de los hidrolizados para disminuir la desmineralización del calcio y fósforo presentes en la hidroxiapatita. La mayor reducción de la desmineralización se logró con el hidrolizado modificado con pirofosfato, reduciendo la disociación de calcio en un 77.3% y de fósforo en 76.9%. La modificación enzimática del concentrado proteínico de *Phaseolus lunatus*, generó secuencias peptídicas con actividad antitrombótica y anticariogénica. La fosforilación del hidrolizado incrementó la actividad anticariogénica. Los resultados obtenidos permiten plantear el potencial uso de los hidrolizados de *Phaseolus lunatus*

como ingredientes nutraceuticos para el desarrollo de alimentos funcionales o como productos con aplicación farmacéutica.

Referencias

Aimutis, W. (2004). Bioactive Properties of Milk Proteins with Particular Focus on Anticariogenesis. Food technical development center. American Society for Nutritional Sciences.

AOAC. (1997). Official Methods of analysis. Association of official analytical chemists, 15th ed. William Horwitz Editor. Washington, D.C., USA.

Ayad, M., Van, B.C., Minaguchi, K., Raubertas, R., Bedi, G., Billings, R., Bowen, W. & Tabak, L. (2000). The association of basic proline-rich peptides from human parotid gland secretions with caries experience. *Journal of Dental Research*, 79(4):976-982.

Betancur, D., Gallegos, S., Chel, L. (2004). Wet-fractionation of Phaseolus lunatus seeds: partial characterization of starch and protein. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84:1193-1201.

Cai, F., Shen, P., Morgan, M.V., Reynolds, EC. (2003). Remineralization of enamel subsurface lesions in situ by sugar-free lozenges containing casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate. *Australian Dental Journal*, 48(4): 240-243.

Canseco, J. (2001). Caries dental. La enfermedad oculta. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México: Federico Gómez*, 58.

Chel, L., Pérez, V., Betancur, D. Dávila, G. (2002). Functional Properties of Flours and Protein Isolates from Phaseolus lunatus and Canavalia ensiformis seeds. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50(3):584-591.

Chim, Y. (2011). Obtención de hidrolizados enzimáticos de pepino de mar (*Isostichopus badiotus*) y evaluación de su bioactividad. Facultad de Ingeniería Química, UADY. Tesis de maestría.

Dávila, M.A., Sangronis, E., Granito, M. (2003). Leguminosas germinadas o fermentadas: alimentos o ingredientes de alimentos funcionales. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 53(4):348-354.

Enomoto, H., Nagae, S., Hiyashi, Y., Can-Peng, L., Ibrahim, H., Sugimoto, Y. & Aoki, T. (2009). Improvement of functional properties of egg white protein through glycation and phosphorylation by dry-heating. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 22(4):591-597.

Geetha, C., Venkatesh, L., Bingle, L., Bingle, C., Gorr, S. (2005). Design and validation of anti-inflammatory peptides from human parotid secretory protein. *Journal of Dental Research*, 84(2):149-153.

Groenink, J., Ruissen, A., Lowies, D., Hof, W., Veerman, E. & Nieuw, A. (2003). Degradation of antimicrobial histatin-variant peptides in *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans*. *Journal of Dental Research*, 82(9): 753-757.

search, 82(9): 753-757.

Hayashi, Y., Can-Peng, Li., Enomoto, H., Ibrahim, H., Sugimoto, Y. & Aoki, T. (2008). Improvement of functional properties of ovotransferrin by phosphorylation through dry-heating in the presence of pyrophosphate. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 21(4):596-602.

Miyashita M, Akamatsu M, Ueno H, Nakagawa Y, Nishimura K, Hayashi Y, Sato Y, Ueno T. (1999). Structure activity relationships of RGD mimetics as fibrinogen-receptor antagonists. *Bioscience, Biotechnology, Biochemistry*, 63:1684-1690.

Montgomery, D. (2003). Diseño y análisis de experimentos. Grupo Editorial Iberoamericana. México, D.F. pp. 14-27.

NAAIS. Núcleo de Acopio y Análisis de Información en Salud. (2005). Distribución geográfica y la salud de los mexicanos 2000 y 2005.

Nielsen, M.P., Petersen, D. & Dambmann, C. (2001). Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. *Journal of Food Science*, 66(5):642-646.

NMX-AA-029-SCFI-2001. Análisis de aguas. Determinación de fósforo total en aguas naturales, residuales y residuales tratadas. Metodología de prueba.

NMX-Y-100-SCFI-2004. Determinación de fósforo en alimentos terminados e ingredientes para animales.

Palomo, I., Torres, C., Moore-Carrasco, R. & Rodrigo, M. (2008). Mecanismos de acción de los principales antiagregantes plaquetarios. *Revista Latinoamericana de Actualidades Biomédicas*, 2(3):1-6.

Reynolds, E., Cai, F., Shen, P & Walker, G. (1997). Remineralization of enamel subsurface lesions by casein phosphopeptides-stabilized calcium phosphate solutions. *Journal of Dental Research*. 76 (9): 1587-1595.

Reynolds, E., Cai, F., Shen, P & Walker, G. (2003). Retention in plaque and remineralization of enamel lesions by various forms of calcium in mouthrinse or sugar-free chewing gum. *Journal of Dental Research*. 82(3):206-211.

Ruiz-Ruiz, J.C., Dávila-Ortiz, G., Chel-Guerrero, L.A., Betancur-Ancona, D.A. (2012). Wet fractionation of hard-to-cook bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds and characterization of protein, starch and fibre fractions. *Food Bioprocess and Technology*, 5:1531-1540.

Sitohy, M., Labib, S., El-Saadany, S. & Ramadan, Z. (2000). Optimizing the conditions for starch dry phosphorylation with sodium mono- and dihydrogen orthophosphate under heat and vacuum. *Starch-Stärke*, 52(4):95-100.

Tello, R., Ruiz, J., Chel, L. & Betancur, D. (2010). Funcionalidad biológica de jugo de naranja incorporado con hidrolizado proteínicos de frijol lima (*Phaseolus lunatus*). En: Utilización de recursos naturales tropicales

para el desarrollo de alimentos. Ed. UADY, Mérida, Yucatán, México. pp. 233-238.

Vioque, J., Megías, C., Yust, M.M., Pedroche, J., Lquari, H., Girón-Calle, J., Alaiz, M., Millán, F. (2004). Purification of an ACE Inhibitory Peptide alters Hydrolysis of Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Protein Isolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52:1928-1932.

Warner, E. A., Kanekanian, A. D. & Andrews, A. T. (2001). Bioactivity of milk proteins: anticariogenicity of whey proteins. *Trends in Food Science and Technology*, 9: 328–335.

POTENCIAL PRODUCTIVO PARA EL CULTIVO DE CHÍA (*SALVIA HISPANICA* L.) EN MÉXICO Y CALIDAD DEL ACEITE EXTRAÍDO.

Ramírez Jaramillo G.¹; Rosado Rubio J. G.²; Castellanos Ruelas A.F.²; Chel Guerrero L. A.²

Resumen

La Chia (*Salvia hispanica* L.) posee una amplia distribución y elevado valor nutritivo; ha tenido un uso ancestral, pero su cultivo ha decaído en tiempos recientes. Con la finalidad de revalorizarla, está siendo objeto de diversos estudios tanto a nivel local como internacional. Por lo anterior, el propósito de este trabajo fue conocer las áreas de su potencial productivo en México, con énfasis en el estado de Yucatán y el perfil de ácidos grasos poliinsaturados de la semilla de chía, producida en un estado de la República Mexicana, sometida a diversos procesos térmicos previos a la extracción. Se realizó un mapeo a nivel nacional de acuerdo con los requerimientos de calidad del suelo, agua y temperatura y con la ayuda de un programa informático se detectaron las zonas de mayor a menor potencial productivo. Asimismo, a semillas del estado de Chiapas se les sometió a varios tratamientos con diferentes potencias de horno de microondas, para ayudar a la extracción del aceite y se les determinó la composición en ácidos grasos. Los resultados mostraron la existencia de 2'512,359 ha con potencial alto y 3'659,089 ha con mediano. En Yucatán se identificaron zonas pequeñas, primordialmente en los municipios del oriente, en los límites del sur con el estado de Quintana Roo y del suroeste limitando con Campeche, así como en la zona centro. Por otra parte se observó que la suma de los contenidos de ácidos linoléico y linolénico alcanzó niveles cercanos a un 80%. Esta proporción fue mayor que la obtenida en aceites de reconocida calidad como los de girasol, maíz, soya o algodón.

Introducción

La chía (*Salvia hispanica* L.) es una especie vegetal que formó parte esencial de la cultura mesoamericana. Por su amplia distribución geográfica y porque la conocían y utilizaban diferentes grupos étnicos desde tiempos prehispánicos, su cultivo se extendió desde los periodos más antiguos de la domesticación de especies vegetales. Actualmente en México, se conserva como cultivo marginal; su semilla se utiliza en la elaboración de bebidas refrescantes y nutritivas, y su aceite en la preparación de lacas artesanales y pinturas.

En los últimos años la literatura internacional señala que las semillas de chía se han revalorizado como insumos en la alimentación humana por su elevado contenido en ácido α -linolénico así como por el beneficio para la salud que implica el consumo del ácido graso ω -3 que contiene (Ayerza y Coates, 2007); Vuksan et al., 2007; Robbins, 2008). Pocos esfuerzos se han llevado a cabo en México para conocer la composición de los ácidos grasos de las semillas nacionales.

La chía también presenta la posibilidad de aprovecharse en forma integral ya que se ha demostrado la calidad en la composición de su semilla considerando sus componentes de mucilago (Ciau, 2007), fibra y proteínas (Vázquez et al., 2007). Es por falta de información que en la actualidad, muchos mexicanos desconocen su cultivo y sus propiedades nutraceuticas.

No obstante lo anterior en México en 2010 se cultivaba solo 2,329 hectáreas. Los únicos estados que reportaron cifras oficiales, bajo condiciones de temporal, fueron Jalisco y Puebla (Cuadro 1).

Cuadro 1. Municipios con mayor extensión de cultivo de chía en México. Parámetros productivos y precios de venta.

Municipio	Superficie sembrada (ha)	Rendimiento (t/ha)	Precio de venta (\$/ t)
Acatic, Jal.	1800	1.30	19500
Zapotlanejo, Jal	400	1.25	19800
Cuquío, Jal.	99	0.50	20000
Atzitzihuacán, Pue.	80	0.80	30000

Fuente: SIAP-SAGARPA. 2010.

La reducida superficie de cultivo puede atribuirse a la falta de promoción, bajos rendimientos y precios históricamente poco atractivos. En algunas regiones como Puebla se produce con tecnologías ancestrales.

¹ Campo Experimental Mococho-CIRSE-INIFAP. Km. 16 carretera Mérida-Motul. Yuc.

² Facultad de Ingeniería Química-Universidad Autónoma de Yucatán. Periférico Norte, Km. 33.5, Tablaje Catastral 13615, Col. Chuburná de Hidalgo Inn, C.P. 97203, Mérida, Yucatán, México. e-mail: rrubio@uady.mx

Los rendimientos observados en el Cuadro 1, son comparables a los reportados en la República de Argentina de 0.80 t/ha (INTA, 2012). En 2010 la tendencia del precio del mercado mejoró notablemente, haciendo muy rentable este cultivo.

El incremento en la demanda en el mercado internacional con un mejoramiento de los precios de venta y la poca disponibilidad de materia prima, plantea la necesidad de aumentar la superficie del cultivo por parte de las autoridades gubernamentales, empresarios particulares y del sector social. Ante la relevancia que adquiere el cultivo de la chíá, es necesario caracterizar el medio físico y los factores naturales del país, para localizar las áreas de cultivo más adecuadas para su producción bajo condiciones de temporal. La selección de especies con potencial agroecológico para una región implica ventajas en el manejo del cultivo, ya que producir una especie fuera de su ambiente óptimo encarece las tecnologías de producción o bien simplemente reduce el rendimiento por la presencia de condiciones de estrés ambiental (Ruíz et al., 1999). Las principales causas de estrés son, las variaciones extremas de factores tales como altas o bajas temperaturas y sequía o exceso de humedad.

Con base en lo anteriormente planteado se llevaron a cabo dos estudios tendientes a conocer las áreas de su potencial productivo en México, con énfasis en el estado de Yucatán y el perfil de ácidos grasos poliinsaturados de la semilla de chíá nacional sometida a diversos procesos térmicos previos a la extracción.

Materiales y Métodos

Diagnóstico del potencial productivo de la chíá.

Se calcularon resultados en tres estratos: 1) áreas potencial alto 2) Áreas con potencial mediano 3) áreas no aptas o con potencial inferior al mediano.

Ante la falta de información sobre los requerimientos agroecológicos de la chíá, se consideró el Reporte Preliminar de los Requerimientos de los cultivos de FAO (ECOCROP, 1993), el cual integra información bibliográfica de más de 2000 especies vegetales, asumiendo que el cultivo requería de las siguientes condiciones agroclimáticas.

Altitud. El óptimo se localiza desde los 400 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m.) hasta los 2,500 m.s.n.m. y los subóptimos desde los 200 hasta los 400 m.s.n.m. y las no aptas las menores de 200 y las mayores de los 2,500 m.s.n.m.

Temperatura. La chíá es una especie de las zonas templadas y tropicales, su centro de origen se menciona el área montañosa de México y de Guatemala. El óptimo de la temperatura media anual está entre los 20 a 30 °C, los subóptimos entre los 15 a 20 °C y 30 a 35 °C, no aptas las menores de 15 °C y las mayores de 35 °C.

Precipitación. La Chíá se considera un cultivo tolerante a la sequía y puede ser un cultivo alternativo para las regiones que presentan bajas precipitaciones medias anuales. El óptimo de precipitación media anual se considera

entre 500 a 1,000 milímetros, el subóptimo de 300 a 500 y 1,000 a 1,500, los no aptos las menores de 300 y las mayores de 1,500 mm.

Suelo. La chíá se adapta a diferentes tipos de suelo de las zonas templada y tropical. No resiste inundaciones y requiere suelos aireados y bien drenados, por ello desarrolla adecuadamente en suelos arenoso-limoso y arcillo-limoso, los cuales presentan un buen drenaje (Ayerza y Wayne, 2006); prospera en un amplio rango de pH, desde un poco menos de 7.5 a menos de 5 en suelos ácidos. Referente a la textura del suelo, desde luego parece que los del tipo migajón limoso suaves son los mejores, si la planta encuentra posibilidades de obtener humedad suficiente, con un manto freático renovable. Las arcillas y los migajones arcillosos, si son ricos en materia orgánica, es posible que también puedan utilizarse en este cultivo.

Integración de los Requerimientos Agroecológicos. Partiendo de la información revisada (INIFAP, 1993; Ramírez, 1995; Ramírez et al., 2006), se especificaron las condiciones para el cultivo en sus diferentes escenarios (Cuadro 2).

Cuadro 2. Requerimientos Agroecológicos del Cultivo de Chíá de Temporal en México.

Criterio	Potencial alto	Potencial mediano	No Apta
Clima (García 1988)	C y Aw	Am y B	D, E y H
Temperatura Media Anual °C	18-26	16-18 26-28	< de 16 > de 28
Altitud msnm	1,000 – 2,000	0 - 1000	Mayor de 2000
Precipitación Media Anual mm	800 a 1,800	600 a 800 1,800 a 2,000	< de 600 > de 2,000
Suelo	Fluvisol, Acrisol, Luvisoles, Nitisoles, Histosoles, Xerosoles, Regosol, Planosol, Andosol, Castañozem	Cambisoles	Gleysoles, Vertisoles, Rendzinas, Leptosoles, Solonchaks
Drenaje	Medio a bueno	Medio	Deficiente

Determinación de las Zonas Potenciales o Regionalización. Para procesar y analizar la información se utilizó el software Arc/View versión 3.3., que representa datos georreferenciados, analiza las características y patrones de distribución de esos datos y genera informes con los resultados de dichos análisis (ESRI, 1996).

Determinación de la calidad nutricional del aceite de chía.

La chía utilizada en este experimento fue obtenida en establecimientos del estado de Yucatán, habiendo sido su procedencia el estado de Chiapas. Se utilizó el aceite obtenido mediante el proceso de extracción tradicional con hexano; previamente se le aplicaron siete tratamientos de preparación a la semilla exponiéndola a la radiación de un horno de microondas (Rosado et al., 2012). El aceite se analizó mediante la técnica de cromatografía de gases, utilizando un detector de ionización de flama.

A los resultados obtenidos se les calculó su promedio y desviación estándar (Montgomery, 2010).

Resultados y discusión

Potencial productivo de la chía.

Se detectaron 2'512,359 ha con potencial alto; la superficie de potencial mediano fueron 3'659,089 ha (Cuadro 3). Las de potencial alto en México se distribuyen principalmente en los estados del Pacífico como son: Nayarit, Jalisco, Michoacán, Guerrero, Oaxaca, Chiapas; no obstante existen algunas áreas importantes en la región Centro como son Estado de México, Morelos, Puebla, Hidalgo y en la región del Golfo de México, en el estado de Veracruz.

Cuadro 3. Superficies por estado con potencial óptimo y subóptimo para el cultivo de Chía de Temporal en la Republica Mexicana.

Estado	Potencial alto	Potencial mediano	Total
Veracruz	125,000	731,627	
Jalisco	502,471	256,066	758,537
Michoacán	251,236	329,228	580,464
Nayarit	125,617	365,809	491,426
Guerrero	150,741	292,647	443,388
Sinaloa	25,123	365,809	390,932
Chiapas	100,494	256,066	356,560
Morelos	200,988	109,742	310,730
Oaxaca	110,000	182,904	292,904
Estado de México	125,600	109,742	235,342
Puebla	125,002	73,161	198,163
Otros	670,087	585,288	1,255,375
Total	2, 512 359	3, 658 089	6,170,448

En la Figura 1 se presenta la misma información de manera gráfica, haciéndose mas objetiva la apreciación de las zonas potencial alto y mediano.

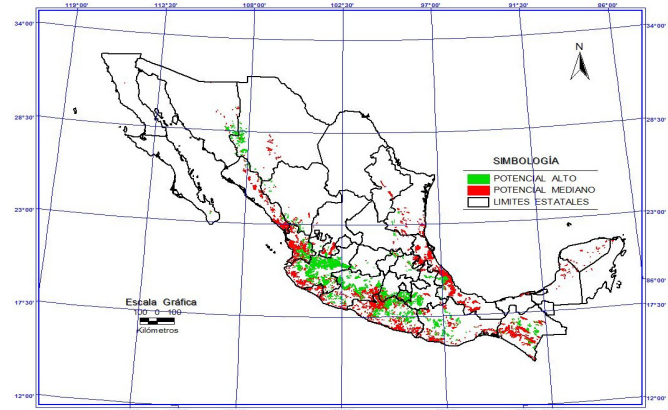


Figura 1. Distribución de las zonas potenciales para el cultivo de Chía en México.

Los terrenos que resultaron clasificados fuera del potencial alto, pueden mejorar su potencial al dárseles manejo encaminado a superar las limitaciones a la producción que impongan algunos factores ambientales.

Para el caso de Yucatán se identificaron zonas pequeñas, primordialmente: en los municipios del oriente, otras en los límites del sur con el estado de Quintana Roo y del suroeste limitando con Campeche. También se observan áreas susceptibles en el centro del estado. Los municipios involucrados son:

Oriente: Tizimin, Calotmul, Temozón, Valladolid, Chemax.

Sur: Peto, Tzucacab.

Sureste: Muna, Santa Elena, Oxkutzcab.

Centro: Tinum, Sudzal, Suma.

El diagnóstico del potencial productivo está enfocado a cultivos de temporal, por lo que es posible que con disponibilidad de riego, un área diagnosticada con un potencial subóptimo o no apto, puede mejorar su nivel productivo.

La cartografía de potencial productivo de especies vegetales posee una resolución de 360 x 360 m, mediante la cual se pueden representar áreas con un mínimo de superficie de 12.96 ha, pudiendo existir áreas potenciales inferiores que no resultaron plasmadas en el mapa.

El diagnóstico considera áreas con potencial de uso de la tierra, descartando sólo cuerpos de agua, suelos litosoles y áreas con problemas de fases químicas, de acuerdo a mapas de INEGI (1974) escala 1:1'000,000. Por ésta razón es posible que la superficie de las áreas potenciales esté sobrestimada.

Calidad nutricional del aceite

En el Cuadro 4 se aprecia que en todos los casos el ácido linoléico (18:2 ω 6) y el ácido linolénico (18:3 ω -3) se encuentran en mayor cantidad porcentual, conservando la relación con los demás ácidos grasos mayoritarios del aceite de chía. La comparación de estos ácidos con relación al análisis del perfil de lípidos de semillas chía testigo, muestra que el ácido linoléico se encuentra en mayor proporción (\approx 65% vs \approx 60%) pero tienen menor porcentaje del ácido linolénico (\approx 19.4% vs \approx 21.6%). Esta composición es similar a la reportada por Ayerza (2011), quién trabajo con muestras de Ecuador y Argentina.

Cuadro 4. Contenido de ácidos grasos promedio en muestras de chía de origen nacional sometidas a diferentes procesos de extracción con varios niveles de potencia (Mega Wats) sobre la composición del aceite.

Muestra	Ácido graso (% de la grasa)				
	16:0	18:0	18:1 ω 9	18:2 ω 6	18:3 ω 3
Tratada	7.8	2.4	9.3	21.6	58.9
(Desv. Est.)	0.5	0.7	0.5	0.2	1.2
Testigo (sin tratamiento)	7.1	2.1	6.3	19.4	65.2
(Desv. Est.)	0.3	0.2	0.3	0.1	0.9

Se observó que la suma de los contenidos de ácidos linoléico y linolénico alcanzó niveles cercanos a un 80%. Esta proporción es mucho mayor que la obtenida en aceites de reconocida calidad como los de girasol, maíz, soya o algodón, cuyo contenido oscila solamente entre el 65% - 55%.

La riqueza en ácidos grasos poliinsaturados puede ser conferida a productos pecuarios, como el huevo. Mediante el suministro de chía a gallinas de postura, se ha podido incrementar el contenido de ácidos poliinsaturados a ese producto y de esta manera mejorar su valor nutricional para los consumidores (Salazar et al., 2010).

Conclusiones

Las zonas más apropiadas para producir chía de temporal se localizan en los estados del centro, occidente y algunos del sur del país principalmente en las partes altas de Jalisco, Nayarit, Michoacán, Morelos, Puebla, Estado de México, Guerrero, Oaxaca y Chiapas, además de Veracruz en la zona del Golfo. En cuanto al estado de Yucatán, dispone de zonas pequeñas localizadas primordialmente en el oriente y en el sur colindando con los estados de Campeche y Quintana Roo, así como en el centro. La calidad nutricional del aceite de chía producida en el estado de Chiapas es similar a la encontrada en otros países. Su composición en ácidos grasos fue elevada en po-

liinsaturados, por lo que tiene un mejor valor nutricional comparado con otros aceites de reconocida calidad como los de maíz y soya.

Agradecimientos.

Estos trabajos forman parte del proyecto “Caracterización, valorización y funcionalidad de subproductos de chía (*Salvia hispanica* L.) para su aplicación en tecnología de alimentos”, parcialmente financiado y ejecutado por las partes involucradas en Argentina (TECSE de la Facultad de Ingeniería (UNCPBA), el CIDCA (CONICET – UNLP), y México (UADY, IPN y CONACyT). Asimismo, se agradece el apoyo otorgado por la Dra. Mabel Tomas para la determinación de ácidos grasos.

Literatura citada

- Ayerza, R. (2011). The seed's oil content and fatty acid composition of chia (*Salvia hispanica* L.) var. Iztac 1, grown under six tropical ecosystems conditions. *Interciencia*, 36 (8), 620-624.
- Ayerza, R. and Coates, W. (2007). Effect of dietary alpha-linolenic fatty acid derived from chía when fed as ground seed, whole seed and oil on lipid content and fatty acid composition of rat plasma. *Annals of Nutrition and Metabolism*. 51: 27-34.
- Ayerza, R. y Wayne, C. (2006). Redescubriendo un alimento olvidado de los aztecas chía. Buenos Aires, Argentina. Ed. Nuevo Extremo
- Ciau, S.A. (2007). Caracterización fisicoquímica del aceite y la goma obtenidas de las semillas de chía (*Salvia hispanica* L.). Tesis de maestría. Facultad de Ingeniería Química, UADY.
- E.S.R.I. (1996). (Environmental Systems Research Institute). Automation of Map Generalization. The Cutting-Edge Technology. ESRI. USA.
- F.A.O. (1993). (Food and Agriculture Organization). Ecocrop, Requerimientos ecológicos de las especies vegetales, base de datos. Roma, Italia.
- García, E. 1988. Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köppen, UNAM. México, D. F.
- INIFAP. (1993). Determinación del Potencial Productivo de Especies Vegetales por Distrito de Desarrollo Rural en Yucatán, SARH – INIFAP. Mérida, Yuc.
- INTA (2012). (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria). Chía, una alternativa productiva en auge. República Argentina, [en línea]. Disponible en: <http://intainforma.inta.gov.ar/?p=11751>. 2 de Julio de 2012. [2012, 14 de septiembre].
- Montgomery, C. D. (2010). Diseño y analisis de experimentos. Editorial Limusa Wiley. Segunda edición. pp 21 - 54
- Ramírez, J. G. (1995). Áreas con Potencial para el Cultivo de Palma Aceitera en Campeche. INIFAP – Campo Experimental Edzná. Publicación especial.

Ramírez, J. G., Góngora, G. S., Pérez, M. L., Chel, G. L., González, E. T., Tun, S. J., Escalante, R. E., Ledón, V. J., Castillo, A. J. (2006). Estudio Estratégico de la Cadena Agroindustrial Chile Habanero. CD interactivo. INIFAP - ENPRODAY. Campo Experimental Mocochoá. Mocochoá, Yucatán.

Rosado-Rubio, G., Betancur-Ancona, D., Chel-Guerrero, L., Ixtaina, V.Y., Tomás, M.C., Nolasco, S.M. (2012). Efecto del pretratamiento de semillas de chía con microondas (MW) sobre el rendimiento y la composición del aceite extraído. V Congreso Internacional de Ciencia y tecnología de los Alimentos, 2012. 14-16 de noviembre. Córdoba, Argentina.

Ruiz C., Medina, J. A., G., González, I. J., Ortiz, C., Flores, H. E., Martínez R. A. y Byerly K. F. (1999). Requerimientos agroecológicos de cultivos. Libro Técnico Núm. 3. INIFAP-CIRPAC. Ed. Conexión Gráfica. Guadalajara, Jalisco, México México. 362 p.

Robbins, W. (2008) Domestic chía seed in HIV patients refractory to pharmacologic therapy and ω -3 supplementation alone -a retrospective analysis. AIDS 2008. XVII International AIDS Conference. Abstract N° CDB0466.

Salazar, V. M., Rosado, R.J.G., Chel, G.A, Betancur, A.D.A., Castellanos, R.A.F. (2010). Composición en ácido graso alfa linolénico (ω 3) en huevo y carne de aves empleando chia (*Salvia hispánica* L.) en el alimento. En: Utilización de recursos naturales tropicales para el desarrollo de alimentos. Betancur ADA, Chel GLA y Castellanos RAF, Eds. Universidad Autónoma de Yucatán. Pp. 260-271.

SIAP-SAGARPA. (2010). (Sistema de Información Agropecuaria). Documento de Consulta. México, D. F.

Vázquez, O. A., Rosado, R. J.G., Chel, G. L. A., Betancur, A. D. (2009). Physicochemical properties of a fibrous fraction from chia. (*Salvia hispánica* L). Food Science and Technology. 42:168-173.

Vuksan, V., Whitham, D., Sievenpiper, J. L., Jenkins, A. L., Rogovik, A. L., Bazinet R. P., Vidgen, E., Hanna, A. (2007). Supplementation of conventional therapy with the novel grain salba (*Salvia hispánica* L.) improves major and emerging cardiovascular. Diabetes Care. 30(11), 2804-2810.

INSTRUCCIONES A LOS AUTORES

La Revista de la FIQ es una revista multidisciplinaria de difusión científica y tecnológica que considera para publicación trabajos originales y revisiones en cualquier área de la ciencia o la tecnología. Los ARTÍCULOS describen un estudio completo y definitivo. Una NOTA un proyecto completo, pero más corto, que se refiere a hallazgos originales o importantes modificaciones de técnicas ya descritas. Un ENSAYO trata aspectos relacionados con la ciencia pero no está basado en resultados experimentales originales. Una REVISION es un artículo que comenta la literatura más reciente sobre un tema especializado. La sección AVANCES DE INVESTIGACIÓN esta dirigida a comunicaciones cortas de resultados que requieran una publicación rápida. Las secciones EDITORIAL y OPINION están abiertas a toda la comunidad científica.

Los trabajos deberán ser enviados a Periférico Nte. Km 33.5, Tablaje Catastral 13615, Col. Chuburna de Hidalgo Inn, C.P. 97203. Mérida, Yucatán México, Facultad de Ingeniería Química o al correo electrónico revista@fiq.uady.mx. La aceptación de los trabajos esta basada en el contenido técnico-científico y sobre la presentación del material de acuerdo a las normas editoriales de la revista. Se aceptarán trabajos escritos en español. Todos los artículos deben tener un resumen.

Someter un trabajo a publicación implica que el mismo no ha sido publicado ni ha sido enviado en revistas de impacto similar. Se publican preferentemente artículos inéditos; sin embargo podrán ser considerados también, los artículos que hayan sido presentados en congresos, seminarios, o convenciones, siempre y cuando cumplan con los lineamientos. Los autores deben enviar una copia del texto aceptado y corregido en formato electrónico con su correspondiente medio de almacenamiento y una copia impresa indicando el lugar exacto de los Cuadros y Figuras.

Los trabajos que se publican en la Revista de la FIQ deberán contener los componentes que a continuación se indican, empezando cada uno de ellos en página aparte: Página del título, Resumen en español, Texto, Agradecimientos, Literatura citada, Cuadros y Figuras

PÁGINA DEL TÍTULO. Debe contener a) el título del trabajo, que debe ser conciso pero informativo; b) nombre(s) y apellidos de cada autor, acompañados de su afiliación institucional; c) nombre del departamento o departamentos y la institución o instituciones a los que se debe atribuir el trabajo; d) declaraciones de descargo de responsabilidades, si las hay; e) nombre y dirección del autor y correo electrónico a quien deben dirigirse las solicitudes de separatas, y f) origen del apoyo recibido en forma de subvenciones, equipo y otros.

RESUMEN EN ESPAÑOL. Los artículos de difusión científica y notas de investigación deberán incluir un resumen que no pase de 250 palabras. Se indicarán los propósitos del estudio o investigación; los procedimientos básicos y la metodología empleada; los resultados más importantes encontrados, y de ser posible, su significación estadística y las conclusiones principales. A continuación del resumen, en punto y aparte, agregue debidamente rotuladas, de 3 a 10 palabras o frases cortas clave que ayuden a los indicadores a clasificar el trabajo, las cuales se publicarán junto con el resumen.

TEXTO. Las tres categorías de trabajos que se publican en la revista de la FIQ consisten en lo siguiente:

a) **ARTÍCULOS CIENTÍFICOS.** Deben ser informes de trabajos originales derivados de resultados parciales o finales de investigaciones. El texto del Artículo científico se divide en secciones que llevan estos encabezados:

Introducción

Materiales y Métodos

Resultados y discusión

Conclusiones o implicaciones

En los artículos que así lo requieran puede ser necesario agregar subtítulos dentro de estas divisiones a fin de hacer más claro el contenido, sobre todo en las secciones de Resultados y Discusión, las cuales pueden presentarse como una sola sección.

b) **NOTAS DE INVESTIGACIÓN.** Deben ser breves, pueden consistir en modificaciones a técnicas, informes de casos de interés especial, preliminares de trabajos o estudios en desarrollo; así como resultados de investigación que a juicio de los editores deban así ser publicados. El texto contendrá la misma información del método experimental señalado en el inciso a), pero su redacción será corrida del principio al final del trabajo; esto no quiere decir que sólo se supriman los subtítulos, sino que se redacte en forma continua y coherente.

c) **REVISIONES BIBLIOGRÁFICAS.** Consisten en el tratamiento y exposición de un tema o tópico relevante, actual e importante. Su finalidad es la de resumir, analizar y discutir, así como poner a disposición del lector información ya publicada sobre un tema específico. El texto se divide en: Introducción, (las secciones que correspondan al desarrollo del tema en cuestión) y Discusión.

AGRADECIMIENTOS. Siempre que corresponda, se deben especificar las colaboraciones que necesitan ser reconocidas, tales como a) la ayuda técnica recibida; b) el agradecimiento por el apoyo financiero y material, especificando la índole del mismo; c) las relaciones financieras que pudieran suscitar un conflicto de intereses. Las per

sonas que colaboraron pueden ser citadas por su nombre, añadiendo su función o tipo de colaboración; por ejemplo: “Asesor científico”, “revisión crítica de la propuesta para el estudio”, “recolección de datos”, etc.

LITERATURA CITADA. Las referencias a trabajos publicados deberán ser indicadas en el lugar apropiado en el texto, empleando el apellido del autor (es) y el año de publicación. Sólo utilice dos apellidos como máximo. En caso de existir más de dos autores, utilice el apellido del primer autor seguido de la abreviación et al. Liste las referencias en riguroso orden alfabético por autor al final del texto y antes de las ilustraciones. Los títulos abreviados de las revistas periódicas deberán seguir el formato usado en el Chemical Abstracts.

Para algunos ejemplos de referenciación solicitar la presentación electrónica a la siguiente dirección electrónica revista@fiq.uady.mx.

CUADROS, GRÁFICAS E ILUSTRACIONES. Es preferible que sean pocos, concisos, contando con los datos necesarios para que sean autosuficientes, que se entiendan por sí mismos sin necesidad de leer el texto. Se presentarán uno en cada hoja. Para las notas al pie se deberán utilizar los símbolos convencionales.

VERSIÓN FINAL. Es el documento en el cual los autores ya integraron las correcciones y modificaciones indicadas por el Comité Revisor. Se deberá entregar un solo original en hojas blancas, así como en un medio de almacenamiento. Los trabajos deberán ser elaborados con el procesador de texto de su preferencia en formato rtf. Las gráficas y figuras se deberán entregar como imagen en formato tiff por separado con una resolución mínima de 150 dpi.

Los trabajos no aceptados para su publicación se regresarán al autor, con un anexo en el que se explicarán los motivos por los que se rechaza o las modificaciones que deberán hacerse para ser reevaluados.

UNIDADES. Deberán ser expresadas de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana: NOM-008-SCFI-2002.

Cualquier otra abreviatura se pondrá entre paréntesis inmediatamente después de la(s) palabra(s) completa(s).

Los nombres científicos y otras locuciones latinas se deben escribir en cursivas.

Algunos Ejemplos Formato de Referencias:

Libro

Autor/editor (año de publicación). Título del libro (edición) (volumen). Lugar de publicación: editor o casa publicadora.

Ejemplo: Selltiz, C., Jahoda, M., Deutsch, M. y Cook, S. W. (1976). Métodos de investigación en las relaciones sociales (8a. ed.). Madrid: Rialp.

Artículo o capítulo dentro de un libro editado

Autor/editor (año de publicación). Título del artículo o capítulo. En Título de la obra (números de páginas) (edición) (volumen). Lugar de publicación: editor o casa publicadora.

Ejemplo: Hernández, R., Fernández, C. y Baptista, P. (1998). Recolección de los datos. En Metodología de la investigación (pp. 233-339). México: McGraw-Hill.

Artículo en un libro de congreso:

Marsh, S. (1994). Optimism and pesimism in trust. En Iberamia 94. IV Congreso de Inteligencia Artificial (Comp.)(pp. 286-297). Caracas: McGraw-Hill.

Artículo de revista científica

Autor (año de publicación). Título del artículo. Título de la revista, volumen (número de la edición), números de páginas.

Ejemplo: Parra, R. E. y González, A. (1994). Magnetismo en aleaciones metálicas diluidas. CIENCIA, 3(2), 67-74.

Documentos electrónicos, bases de datos y programas de computadoras

Autor/responsable (fecha de publicación). Título (edición), [tipo de medio]. Lugar de publicación: editor. Disponible en: especifique la vía [fecha de acceso].

Ejemplo: Hernández, M. E. (1998). Parque Nacional Canaima, [en línea]. Caracas: Universidad Central de Venezuela. Disponible en: <http://cenamb.rect.ucv.ve/siamaz/dicciona/canaima/canaima2.htm> [2000, 3 de junio].

El editor en jefe revisará los trabajos recibidos y aquellos trabajos que no cumplan con el formato solicitado no serán enviados a revisión de texto hasta que no cumplan con el mismo. El comité editorial revisará el contenido del trabajo y determinará la aceptación del mismo de acuerdo con los lineamientos de la revista. Cuando así lo requieran se solicitarán modificaciones a la forma de la presentación y se harán sugerencias al fondo del contenido. Los autores revisarán estas sugerencias y en caso de considerar que son pertinentes, harán las correcciones necesarias y enviarán el trabajo corregido. en caso de considerar que las sugerencias no son pertinentes, los autores enviarán por escrito los comentarios y la justificación por la cual no consideran hacer las correcciones y quedará a juicio del comité editorial la aceptación del trabajo. el contenido de los trabajos es responsabilidad de los autores.

