

Descomposición y Tecnologías de Conservación de Pescado: Empleo de Inhibidores Enzimáticos de Leguminosas para el Control de la Actividad Proteolítica de Enzimas Endógenas y Exógenas

Ana Lilia Bastida-Murrieta¹, María Isabel Neria-González¹ y Hugo Minor-Pérez¹.



Acerca de los autores...

¹Laboratorio de Microbiología de Alimentos, División de Ingeniería Química y Bioquímica, Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec



Resumen

Las proteasas es el nombre genérico de las enzimas que hidrolizan las proteínas. Se encuentran en el subgrupo E. C. 3. 4. 11-99 X de la clasificación de enzimas (Shu-Guo y Guo-Jiang, 2005). En la tecnología de alimentos, la proteólisis es empleadas para modificar propiedades funcionales y nutricionales de los mismos, pero en algunos casos, esta proteólisis puede provocar el deterioro del alimento. En general, los productos de origen acuático tienen un acelerado proceso de descomposición una vez que se ha realizado su captura, debido a diversos factores, como la actividad enzimática endógena (como enzimas de origen gástrico) o exógena (producto de la actividad metabólica de microorganismos de descomposición o patógenos) que pueden provocar la pérdida de estructura, forma y firmeza, además de la liberación de aminoácidos precursores de aminos biogénicas (Pearson y Young, 1989). Algunos estudios sugieren el empleo de inhibidores de proteasas de leguminosas y otras semillas como las oleaginosas y pseudocereales como reguladores biológicos de la actividad proteolítica. García-Carreño y Hernández-Cortés (2000) indican que los inhibidores enzimáticos son cualquier sustancia que reduce la velocidad de una reacción catalizada por una enzima. En este artículo, se expondrá información teórica sobre la descomposición de alimentos de origen marino y su posible control con inhibidores de leguminosas y otros vegetales.

Abstrac

Proteases is the generic name for enzymes that hydrolyze proteins. They are classified in the subgroup E. C. 3. 4. 11-99 X of the classification of enzymes

(Shu-Guo and Guo-Jiang, 2005). In food technology, proteolysis is used to modify functional and nutritional properties of food, but in some cases, this proteolysis can cause food spoilage. In general, products of aquatic origin have an accelerated decomposition process after their capture, due to various factors such as the endogenous enzymatic activity (such as enzymes of gastric origin) or exogenous (product of the activity Metabolic microorganisms of decay or pathogens) that can cause the loss of structure, shape and firmness, in addition to the release of amino acids precursors of biogenic amines (Pearson and Young, 1989). Some studies suggest the use of legume protease inhibitors and other seeds such as oleaginous and pseudocereal as biological regulators of proteolytic activity. García-Carreño and Hernández-Cortés (2000) indicate that enzyme inhibitors are any substance that reduces the rate of an enzyme-catalyzed reaction. In this article, will present general information on legume inhibitors and their effect on the enzymatic biological control, due to their potential of application in foods from the sea.



Introducción

En los animales se encuentra un gran número de enzimas distribuidas en diversos compartimientos celulares con funciones biológicas muy específicas; entre estas estructuras celulares destacan los lisosomas, que existen como parte de la célula muscular. Los músculos están integrados por un conjunto de fibras unidas a través de tejido conectivo, que a su vez está constituido por colágeno y elastina (Badui, 1990). Estas estructuras sufren diversos cambios durante los procesos de captura y post-captura.

Algunos productos del mar como el pescado o el calamar, pueden dar origen a diversas sustancias producto de la actividad metabólica de bacterias, como las aminas biogénicas (García, 2007), que diversos autores indican son tóxicas.

El calamar es un recurso pesquero de gran importancia, debido a que es un producto barato que se produce en grandes cantidades en las costas de México. Pero en ocasiones es subutilizado, debido a que no se aprovechan todos los componentes del mismo. El desarrollo de tecnologías innovadoras para aprovechar estos recursos marinos permitiría obtener mayores ganancias económicas en el país.

Las partes del calamar que no son utilizadas van desde un 40% a 60% del animal. Esta variación se debe, como se mencionó previamente, a que se desechan partes como por ejemplo cabeza, tentáculos, etcétera, debido a su rápida descomposición. Las enzimas endógenas se activan en cuanto el producto es extraído del mar. Se agregan además, las enzimas que actúan sobre éste una vez que el molusco está fuera de su hábitat (Moreno-Martínez *et al.*, 2012).

Estas enzimas, reducen la calidad de los productos frescos y de alimentos como los geles tipo surimi. El efecto Modori es un fenómeno característico de los geles de pescado, que induce una disminución de sus propiedades

mecánicas cuando los geles se obtienen a una temperatura de entre 50°C y 60°C. La causa de este fenómeno son las proteasas endógenas que varían de acuerdo con las especies de pescado (Sánchez *et al.*, 1998).

1. Consumo de productos del mar en México

Sin duda alguna, se considera a la industria pesquera como una de las fuentes de productividad que han impulsado al desarrollo del país. La industria ofrece diversas áreas de oportunidad de desarrollo y las investigaciones ofrecen opciones para un mayor aprovechamiento de las materias primas en las diferentes etapas de esta cadena alimentaria.

México tiene enormes litorales, numerosos cuerpos de agua-tierra y una de las cocinas más extensas y variadas del mundo. Sin embargo, los productos del mar y acuícolas, y en particular productos como el calamar, no tienen una presencia frecuente en la dieta del mexicano.

El bajo consumo de productos pesqueros en el país está relacionado con factores como los hábitos alimenticios, el poco o nulo conocimiento sobre las características nutricionales de los pescados o mariscos (motivado principalmente por la falta de promoción) y la fácil contaminación y desconfianza para consumirlos, la estacionalidad en el consumo de productos de origen marino (que se concentra principalmente en época de cuaresma y fin de año), y el estrato socioeconómico (García, 2007).

2. Descomposición de productos marinos

Los productos del mar, en general, son alimentos que se descomponen fácilmente. Tan pronto como el pescado es capturado, empieza su descomposición. Se inician reacciones químicas en sus tejidos y comienzan a multiplicarse los microorganismos de la putrefacción. Se deteriora el olor, el gusto y el aspecto, haciéndolos desagradables, hasta hacerse incomedibles y en algunos casos nocivos a la salud humana (Rodríguez, 2011).

El pescado es proclive a sufrir deterioro microbiano y bioquímico. Los cambios que tienen lugar en los tejidos de los peces después de la captura dependen significativamente de los factores que afectan la concentración de sustratos y metabolitos en los tejidos de los peces vivos, por ejemplo la actividad de las enzimas endógenas, la contaminación microbiana, así como factores externos, por ejemplo las condiciones de la captura. (Águeda, 2006).

Los cambios bioquímicos que tienen lugar post-mortem afectan los principales componentes químicos de los tejidos que provocan diversas alteraciones estructurales, *e.g.* la desintegración de micro-morfología muscular. La degradación de los diferentes componentes de la piel y músculos conduce al gradual envejecimiento y deterioro de pescados y mariscos (Sikorski, 1990).

3. Métodos de conservación de productos marinos

Todas las especies de productos marinos, si se enfrían debidamente, se mantienen frescas durante más tiempo, en comparación con aquellas que no se someten a ningún método de conservación. Por consiguiente, el uso de tecnologías de enfriamiento, posibilita un aumento efectivo de la duración de los productos de pesca y permite aumentar las capturas.

3.1 Refrigeración en hielo

Para la conservación del pescado fresco, desde su captura hasta su exhibición y consumo, debe ser acondicionado en las bodegas de los barcos pesqueros con hielo molido o hielo en escamas (Figura 1). Esta condición hace que el pescado se enfríe, pero no se congele. Una vez en tierra, se los dispone en cajones o en envases, distribuyendo el hielo por debajo y por encima. Cuando el pescado llega a la pescadería se almacena en cámaras de frío, pero sin congelarlo (Dávalos *et al.*, 2005).

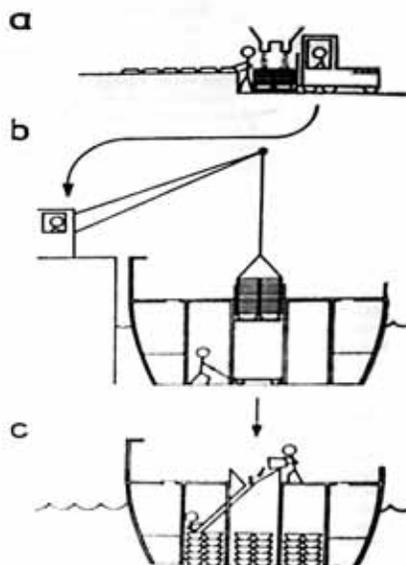


Figura 1

Sistema mecanizado de congelación del pescado en cajones. (a) Estación donde se llenan de hielo los cajones; (b) Grúa ubicada en el borde del muelle; (c) Bodega para el pescado (Zdzislaw, 1994).

3.2 Congelación

La industria de la alimentación ha desarrollado cada vez más las tecnologías de congelación para una gran variedad de alimentos: frutas, verduras, carnes, pescados, entre otros. El fundamento de la congelación es someter a los alimentos a temperaturas iguales (la temperatura se mantendrá uniforme de acuerdo con las exigencias y tolerancias permitidas para cada producto) o inferiores a las necesarias de mantenimiento, para congelar la mayor parte posible del agua que contienen. Prácticamente no se pierden vitaminas ni minerales, debido a que la congelación no afecta ni a las proteínas ni a los minerales que contienen (Casp, 2003).

3.3 Refrigeración con mezcla de hielo

La mezcla de agua y hielo, por lo general en la proporción inicial 1:2 en volumen, alcanza una temperatura aproximada de -1.5°C . En esta agua de mar enfriada (AME), el paso de calor desde el pescado al medio frío se realiza por convección. Así, la intensidad de enfriamiento es mayor que en el hielo. Durante la operación de enfriado debe añadirse hielo y sal a la mezcla, para compensar la pérdida de hielo por fusión y mantener la concentración salina alrededor del 3%. Se debe evitar la acumulación de hielo en la superficie y la existencia de una gran diferencia térmica entre las porciones superior e inferior del contenedor. El AME también se utiliza para refrigerar y mantener las capturas a bordo en contenedores dotados de aislamiento. La eficacia

del sistema depende de la calidad de aislamiento, la duración del viaje, la temperatura ambiente y la frecuencia con la que se agregue hielo (Zdzislaw, 1994).

3.4 Enfriamiento con agua de mar refrigerada

Beneficios semejantes a los conseguidos con el AME, pueden lograrse utilizando agua de mar refrigerada (AMR) o salmuera, para el enfriamiento rápido de las capturas a bordo o para enfriarlas (Figura 2) (Zdzislaw, 1994).

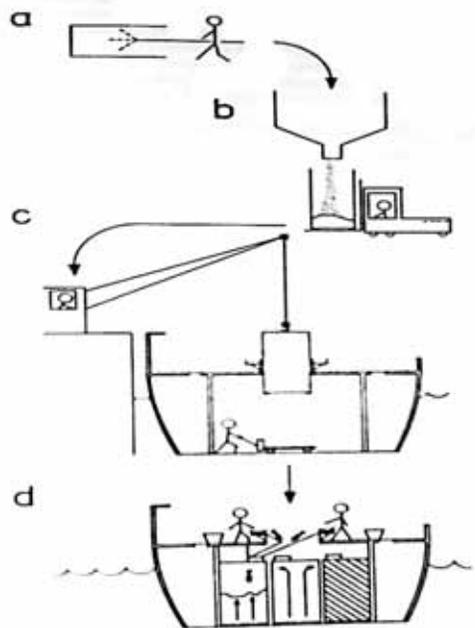


Figura 2

Sistema de contenedores para el enfriamiento del pescado con agua de mar refrigerada (a) estación de lavado; (b) relleno con hielo; (c) grúa en el borde del muelle; (d) bodega para el pescado (Zdzislaw, 1994).

3.5 Conservas de pescado

Se conocen como pescados enlatados y son envasados en recipientes herméticamente cerrados, sometidos a un tratamiento térmico suficiente para proteger su conservación y seguridad durante un almacenamiento prolongado a temperatura ambiente. Este método de conservación se aplica por lo general a pescados grasos, especialmente sardinas y túnidos, y mariscos, principalmente mejillones, berberechos, navajas y cefalópodos (calamar entre otros). El proceso industrial no altera la composición nutricional del alimento, por lo que mantiene todas sus vitaminas y minerales intactos. Al no darle la luz al contenido de la lata, los nutrientes fotosensibles (vitaminas A, K y ácidos fólicos) no se pierden con el tiempo (Rodríguez, 2007).

4. Leguminosas

Las semillas de leguminosas son el segundo grupo de alimentos en importancia para humanos y animales después de los cereales, y son de dos a tres veces más ricas en proteína que éstos (Espinoza, 2011).

La mayoría de las semillas de leguminosas son usadas principalmente para consumo humano, aun cuando algunas son producidas para la alimentación animal, como es el caso de los lupinos. Otras son cultivadas con fines industriales, como la soya, usada principalmente para la extracción del



aceite, y cuya harina es empleada en la alimentación animal. Además de las semillas secas, en algunas regiones se utilizan los granos tiernos y los ejotes, así como las hojas, ya sea para consumo humano o como forraje (Olmedillo *et al.*, 2010). Además, algunas leguminosas tienen inhibidores de proteasas que pueden utilizarse para regular la actividad enzimática de alimentos como los pescados.

5. Enzimas

Se trata de un grupo muy especial de proteínas globulares que cumplen la función de biocatalizadores, lo que

significa que su presencia requiere de muy poca energía para que se lleve a cabo una determinada reacción química, que puede ser de síntesis, hidrólisis o transformación, y aunque participa en la reacción, no se consume ni se agota. Su importancia en la naturaleza es tal, que prácticamente todas las reacciones bioquímicas que ocurren en los sistemas biológicos son mediadas por éstas.

Las enzimas están compuestas no solamente por aminoácidos, sino también tienen partes no proteicas (grupo proteico) que se conocen como cofactores, por ejemplo un metal o alguna vitamina. Cabe destacar que para que una enzima sea activa, debe tener en su conformación nativa la presencia de su cofactor. Si no lo tiene o bien se encuentra deformada a causa de la exposición a un pH o concentración salina diferente a la habitual, o por la exposición a un calentamiento moderado, su actividad disminuye, y puede incluso ser nula (Mendoza y Clavo, 2010).

5.1 Enzimas endógenas de los alimentos

Todos los productos alimenticios contienen un gran número de enzimas, que en los tejidos animal y vegetal solo actúan cuando el orden celular así lo requiere; sin embargo, si estos tejidos se rompen, las enzimas se liberan de los compartimientos en los que se encuentran y se ponen en contacto directo con el sustrato correspondiente, lo que hace que la reacción se lleve a cabo más fácilmente. Dentro de una célula existen diversos organelos que desempeñan funciones biológicas muy características, y cuyas enzimas se encuentran generalmente unidas a las membranas correspondientes; tal es el caso de la mitocondria, los lisosomas, etc. Por ejemplo, en los lisosomas del músculo se localizan las hidrolasas, que actúan mejor en condiciones ácidas, entre las que destacan las captasinas; los lisosomas liberan sus enzimas por rompimiento de las membranas celulares cuando se someten a temperaturas bajas, con la consecuente liberación de enzimas.

5.2 Efecto de la temperatura en la actividad enzimática

La actividad enzimática depende entre otros aspectos de la conformación estructural; cualquier condición que afecte su estructura nativa y la desnaturalice, hará que su actividad se pierda. Entre esos factores está la temperatura, el pH, etcétera.

Al igual que cualquier reacción, el aumento de temperatura hace que ocurra más rápidamente: si se aumenta la temperatura en 10°C, la velocidad de reacción se duplica. Sin embargo, para el caso de las enzimas, la velocidad máxima de reacción ocurre alrededor de los 37°C de temperatura y tras rebasarla disminuye, a causa de la desnaturalización (que comienza a partir de los 40°C a 45° C). Además, cada enzima tiene una temperatura de reacción óptima, por encima y por debajo de la cual se reduce su poder catalítico. Si el aumento de temperatura es drástico, por encima de los 60°C, la desnaturalización suele ser irreversible, en tanto que con cambios moderados suele ser reversible, recuperando el poder catalítico al descender la temperatura a niveles óptimos. Cuando un alimento se encuentra almacenado en congelación, la temperatura estará muy lejos del valor óptimo, aunque debido a que las enzimas requieren poca energía para llevar a cabo una reacción, no se detienen. Un obstáculo al que se enfrentan las reacciones enzimáticas a -18°C es la transferencia de masa, lo que dificulta que la enzima entre en contacto con el sustrato, obstáculo que por cierto desaparece durante la descongelación (Mendoza y Clavo, 2010).

5.3 Efecto del pH

Otro factor crucial para la actividad enzimática, es el pH. Cada enzima tiene un valor de pH óptimo, es decir, en el cual tiene su máximo poder catalítico. Al igual que ocurre respecto a la temperatura, por encima y por debajo de este, su actividad disminuye. Una de las principales razones por las que los pescados y mariscos se descomponen con más facilidad en comparación con la carne de res, se debe a su pH. Mientras que los productos del mar tienen valores cercanos a su pH = 6.3, la carne alcanza valores de alrededor de pH= 5.6. Esto significa que las condiciones son óptimas para el crecimiento microbiano en el pescado, cuyo metabolismo depende las reacciones enzimáticas (Mendoza y Clavo, 2010).

5.4 Inhibidores enzimáticos

Las enzimas son proteínas con actividad catalítica. Al ser proteínas, se ven afectadas por las mismas condiciones que una proteína común, como son los cambios de pH, temperatura, concentración, fuerza iónica, etcétera. Algunas enzimas son capaces de generar cambios endógenos en el organismo, que se reflejan en los alimentos (ejemplo: intervención de las enzimas como cambio deseable en la maduración de la carne). Otro aspecto de interés tecnológico de los inhibidores enzimáticos, es su empleo como reguladores biológicos. García-Carreño y Hernández-Cortés (2000) definen un inhibidor enzimático como cualquier sustancia con capacidad para reducir la velocidad medida de una reacción catalizada por enzimas. Los inhibidores enzimáticos producen complejos proteína-proteína y se han descrito al menos 48 familias con capacidad para reducir la actividad de serina, cisteína, y aspartato proteasa (Otlewski *et al.*, 2005). Aun cuando no se tiene una explicación totalmente aceptada sobre el mecanismo de acción de los inhibidores enzimáticos de leguminosas, algunos autores sugieren que debe ser similar al reportado para inhibidores enzimáticos comunes. Un esquema de este último mecanismo, se muestra en la Figura 3.

Prácticamente todas las funciones de la célula requieren directa o indirectamente la presencia de enzimas para que las reacciones químicas ocurran a una velocidad adecuada. La actividad enzimática no siempre es biológicamente útil. Una actividad incontrolada, por ejemplo de las proteasas de la coagulación, tendría fatales consecuencias. Por este motivo, la naturaleza

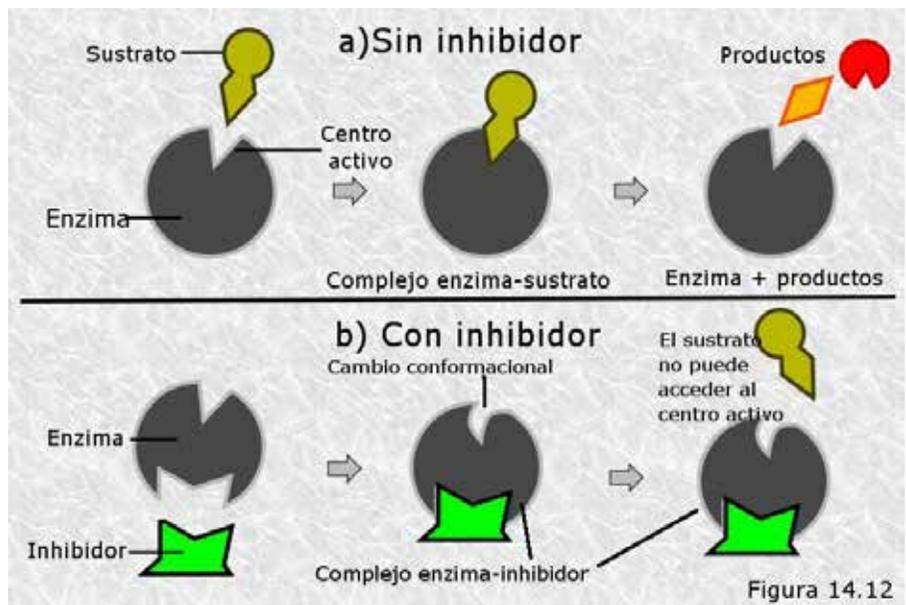


Figura 3

Enzima representada con inhibidor enzimático (a) y sin inhibidor enzimático (b)

ha desarrollado un gran número de inhibidores enzimáticos que frenan la actividad enzimática o llegan a anularla por completo. Estos inhibidores enzimáticos naturales están implicados en la regulación del metabolismo de la célula. Algunos inhibidores enzimáticos celulares son proteínas que se unen específicamente e inhiben una diana enzimática. Esto puede ayudar a controlar enzimas que pueden ser dañinas para la célula, como las proteasas o nucleasas. El hecho de que las enzimas catalicen prácticamente todas las reacciones biológicas relevantes, otorga a los inhibidores naturales un alto potencial de aplicación en diversos procesos bioquímicos, como la descomposición de los alimentos.

Al respecto, se han realizado estudios empleando inhibidores de tripsina. Los inhibidores se han encontrado en gran parte en las leguminosas del género de *Phaseolus*, como la soya o las habas. También, se han encontrado en dichos vegetales inhibidores de quimiotripsina (Linder, 1978). Sánchez y col. (1998) encontraron que la alubia y el garbanzo inhibieron aproximadamente el 50% de la actividad proteolítica en pescado (surimi de lenguado y croca) al añadirlos en proporciones (3:1 v/v) de inhibidor de leguminosa, respectivamente.

5.4.1 Inhibidores de proteasas

Se pueden definir como compuestos termo lábiles de naturaleza proteica, que alteran la digestión de las proteínas, inhibiendo la acción de las enzimas digestivas que se enfocan hacia la hidrólisis de las proteínas de la dieta; los más conocidos son los que reaccionan con proteasas de serina, como la tripsina y la quimiotripsina. Los inhibidores de proteasas son los factores antinutricionales más conocidos, encontrados principalmente en semillas de leguminosas, también están presentes en otros alimentos, como los huevos, los productos lácteos y las papas. Se ha estudiado la presencia de este factor principalmente en el ovomucoide de los huevos de aves, el amaranto, la soya y el frijol.

Se ha logrado identificar diez familias de inhibidores de proteasas en función de la secuencia de aminoácidos que las conforman, siendo tres las más ampliamente distribuidas: las familias Bowman-Birk (que actúa uniéndose a



la tripsina y quimo tripsina), Kunitz (que actúa uniéndose en forma preferente a la tripsina) y las de la papa.

El efecto más importante de los inhibidores de proteasas es la inhibición del crecimiento, producida principalmente por la inactivación de la tripsina y la quimotripsina, debido a la formación de complejos estables e inactivos (Elizalde *et al.*, 2009).

Conclusión

Los inhibidores de leguminosas son una opción viable para la reducción significativa en la actividad proteolítica, ya que cuentan con una composición química y propiedades beneficiosas aplicables en la preservación de productos marinos. Dicha condición puede favorecer al aprovechamiento de este abundante recurso pesquero en México.

Algunos componentes de los vegetales como las leguminosas, pueden ser aprovechados en el control de la descomposición de los alimentos, como inhibidores de proteasas. Pero es necesario realizar más investigaciones sobre los mismos, para realizar una verdadera innovación en el diseño de alimentos.

Los pescados y moluscos no sólo son una fuente de alimentación, debido a sus características nutricionales, sino también un recurso que se puede aprovechar para investigaciones futuras en diferentes áreas.

Bibliografía

- An, H., Margo, Y.P. y Seymour, T.A. (1996). *Roles of food Science and Technology* 7: 321-326.
- Ayerza, R. y W. Coates. (2005). *Chia: Rediscovering an Ancient Crop of the Aztecs*. University of Arizona Press.
- Badui, S. 2006. Capítulo 5. *Química de Alimentos*. Pearson Education. 4^a Edición. México.
- Becker, R. (1989). "Preparation, composition, and nutritional implications of amaranth seed oil". *Cereal Foods World*. 34 (11):950-953.
- Capitani, M.I. (2013). Caracterización y funcionalidad de subproductos de chíá (*Salvia hispánica* L.). Aplicación en tecnología de alimentos. Tesis Doctoral. Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA). Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata (FCE-UNLP).
- Carvajal-García, A.V., Cortés-Ruiz, J.A., Méndez-Gómez, E. y Rivas-Montaño, A. M. (2014). "Calidad Tecnológica y Frescura del Atún Aleta Amarilla (*Thunnus albacares*): Empleo Como Materia Prima en la Industria Procesadora de Mazatlán, Sinaloa". *Biotecnia*, 24.
- Casp V., y Requena J. (2003). *Procesos de conservación de alimentos*, Mundi-Prensa, Madrid.
- Dávalos M.S., Zamora P.D. y Natividad, B.I. (2005). "Alimentos marinos: tipificación y proceso de almacenamiento". *Revista Digital Universitaria*, 6:2-11.
- Elizalde A., Porrilla Y., y Chaparro D. (2009). Factores anti nutricionales de las semillas. Facultad de Ciencias Agropecuarias, 7:46 - 53.
- Espinoza S.C., Quispe S.M. (2011). *Tecnología de cereales y leguminosas*. 1ra. ed. México.
- García-Carreño y Hernández-Córtes, P. (2000). "Use of protease inhibitors in seafood products". En: *Seafood enzymes. Utilization and influence on postharvest seafood quality*. Editores: Haard, N.F. y Simpson, B.K. Editorial Haard & Simpson.
- García-Carreño, L.F. (1996). *Proteinase inhibitors. Trends in food science and technology*. 7:197-203.
- Haros, M. (2013). "Reducción de fitato en pan enriquecido con salvado por bifidobacterias productoras de fitasa". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57:10239 - 10244.
- Ixtaina, V.Y. (2010). Caracterización de la semilla y el aceite de chíá (*Salvia hispánica* L.) Obtenido mediante distintos procesos. Aplicación en tecnología de alimentos Tesis Doctoral. Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA). Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata (FCE-UNLP).
- Konishi, Y. y Yoshimoto, N. (1989). "Amaranth Globulin as a Heat-stable Emulsifying Agent". *Agricultural and Biological Chemistry*. 53 (12):3327-3328.
- Linder, E. (1978). *Toxicología de los alimentos*. Edit. Acribia. Zaragoza, España. pp. 4-9.
- Marcone, M.F. y Yada, R.Y. (1991). Isolation, Purification, and Characterization of the Oligomeric Seed Globulin from *Amaranthus hypochondriacus*. *Agricultural and Biology Chemistry*. 55 (9):2281-2289.
- Mendoza, E. y Clavo, C. (2010). *Bromatología: composición y propiedades de los alimentos*. México, Editorial Mc Graw Hill.
- Olmedillo, B., Farré, R., Asensio, C. y Martín, M. (2010). Papel de las leguminosas en la alimentación actual de Actividad dietética. Sitio web: www.elsevier.es/dietetica.
- Otlewski, J., Jelen, F., Zakrzwska y Oleksy, A. (2005). "The many faces of protease-protein inhibitor interaction". *European Molecular Biology Organization*. 24 (7): 1303-1310.
- Rodríguez, G.M. y Ramírez, N.J. (2007). *Conservas de pescado y sus derivados*. Tecnología en alimentos. Universidad del Valle.
- Sahagún, B. (1579). *Historia general de las cosas de Nueva España (Codex Florentino)*. Eds. A.M. Garibay, (1989). Editorial Porrúa (México).
- Sánchez A., Ramírez J. y Morales A. (1998). "Detección de inhibidores de proteasas en extractos de leguminosas y su efecto sobre proteasas endógenas del músculo de calamar". *Ciencia y Tecnología de Alimentos* 2: 12-19.
- Sikorski, Z.E. (1990). *Seafood: Resources, Nutritional Composition and Preservation*. Fla. CRC Press Inc. Boca Ratón.
- Tosco, G. (2004). "Los beneficios de la chíá en humanos y animales. Nutrientes de la semilla de chíá y su relación con los requerimientos humanos diarios". *Actualidades Ornitológicas*, N° 119.
- Tosi, E.A., Ré, E., Lucero, H. y Masciarelli, R. (2001). "Dietary fiber obtained from amaranth (*Amaranthus cruentus*) grain by differential milling". *Food Chemistry*. 73 (4):441-443.
- Whitaker, J.R. (1996). "Protease inhibitor". In: *Food Chemistry* (O. R. Fennema, Ed). 7:486-487.
- Zdzislaw, E.S. (1994). Capítulo 5: Preparación de las capturas para su conservación y comercialización. En *Tecnología de los productos del mar: Recursos, composición nutritiva y conservación* (pp. 105-109). España: Acribia.