



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“IMPLEMENTACION DE UN METODO PARA DETERMINAR
INHIBIDORES DE α -AMILASA Y SU APLICACION EN CEREALES Y
LEGUMINOSAS”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA

ANTONIO PALOALTO BONIFAZ



MÉXICO, D.F.

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dr. Valle Vega Pedro

VOCAL: M. en C. Lucas Florentino Bernardo

SECRETARIO: M. en C. Cornejo Barrera Lucia

1er. SUPLENTE: Q.F.B. Ortiz Palma Pérez Juan Diego

2° SUPLENTE: Dra. Gonzales Hernández Iliana Elvira

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 4C DEL DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA, EDIFICIO A, FACULTAD DE QUÍMICA, CIUDAD UNIVERSITARIA, MÉXICO, D.F.

ASESOR DEL TEMA:

M en C. Bernardo Lucas Florentino _____

SUPERVISOR TÉCNICO:

Jesús Antonio Beaz Rivera _____

SUSTENTANTE (S):

Antonio Paloalto Bonifaz _____

INDICE

	Página
Introducción.....	1
Objetivos.....	2
Objetivo general.....	2
Objetivos específicos.....	2
Marco teórico.....	3
Enzimas.....	3
α -amilasa.....	4
Aplicaciones.....	5
Métodos para medir la actividad de la enzima α -amilasa.....	7
Inhibidores enzimáticos.....	9
Almidón.....	11
Composición.....	11
Amilosa.....	12
Amilopectina.....	13
Gelificación y retrogradación.....	15
Cereales y leguminosas.....	18
Cereales.....	18
Trigo.....	19
Maíz.....	21
Cebada.....	22
Leguminosas.....	23
Frijol.....	25

Garbanzo.....	26
Lenteja.....	27
Metodología general.....	29
Materiales.....	30
Reactivos.....	30
Equipos.....	31
Desarrollo del sistema enzimático y establecimiento de las condiciones de inhibición.....	32
Método de extracción.....	32
Método de cuantificación.....	34
Aplicación del método desarrollado a diferentes muestras vegetales crudas y con un tratamiento térmico previo.....	36
Resultados y discusión.....	37
Desarrollo del sistema enzimático y establecimiento de las condiciones de inhibición.....	37
Análisis proximal a la muestra de trigo.....	37
Método de extracción.....	38
Método de cuantificación.....	39
Definición de las unidades de inhibición (UIA).....	42
Metodología implementada.....	43
Ejemplo para calcular las UIA.....	47
Aplicación del método propuesto a diferentes muestras biológicas.....	49
Muestras biológicas sin tratamiento térmico.....	49
Muestras biológicas con tratamiento térmico.....	52

Conclusiones.....	55
Bibliografía.....	57

INTRODUCCION.

Los inhibidores enzimáticos son sustancias que reducen la actividad catalítica de una enzima (1). Dentro de estos inhibidores se encuentran los inhibidores de α -amilasa, que se encuentran en alimentos de alto consumo como son los cereales y leguminosas (2). Estos factores tóxicos pueden afectar las α -amilasa salivales, pancreáticas y bacterianas. El efecto de este inhibidor como factor antinutricional no se ha estudiado extensamente pero se reporta que las enzimas proteolíticas del tracto digestivo inactiva el efecto inhibitorio de esta antienzima, además, por el proceso general que se le da a los alimentos en su preparación, puede ser suficiente para la inactivación de estos factores tóxicos de naturaleza proteínica; por lo tanto, está en discusión que se pueda considerar como factor antinutricional (3). La fracción proteínica responsable del efecto inhibidor hacia la α -amilasa, se encuentra en las albuminas de los materiales que las contienen (4). Estos inhibidores actúan de manera no competitiva y han sido propuestos para el tratamiento de la diabetes y obesidad (2,4-7).

Todos los animales dependen de amilasas digestivas para hidrolizar y utilizar el almidón como fuente de alimento; así los insectos y sus larvas que infestan los granos de cereales y leguminosas, requieren de estas amilasas digestivas para su desarrollo y supervivencia; por lo tanto, estas plagas de insectos provoca grandes daños a los granos de cereales y leguminosas ocasionando sustanciales pérdidas. Por lo anterior, estos inhibidores se encuentran extensamente estudiados, para desarrollar cultivos transgénicos, donde se les incorpore la antienzima, para que puedan funcionar como insecticidas naturales y hacer cultivos más resistentes hacia plagas de insectos y hongos (8,9).

Por lo tanto, es necesario contar con un método que sea rutinario y rápido así como preciso y reproducible, que permita determinar cuantitativamente la presencia de inhibidores de α -amilasa en granos de cereales y leguminosas crudas y procesadas por lo que este trabajo pretende lo anterior.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Desarrollar un método para determinar el contenido de inhibidores de α -amilasa en granos de cereales y leguminosas.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Establecer y definir un sistema enzimático con las condiciones de análisis para determinar la actividad amilolítica de la α -amilasa en una matriz alimenticia.
- Establecer las condiciones para poder definir la actividad inhibitoria de la antienzima.
- Determinar la actividad inhibitoria de la α -amilasa en muestras de cereales y leguminosas representativas.
- Realizar en las muestras de cereales y leguminosas seleccionadas un tratamiento térmico simulando el proceso térmico comúnmente utilizado.
- Determinar la actividad inhibitoria de la α -amilasa con la finalidad de observar el efecto del tratamiento térmico sobre la antienzima.

MARCO TEORICO

Enzimas.

Las enzimas, catalizadores de los sistemas biológicos, son moléculas de gran interés que determinan la pauta de las transformaciones químicas. Las características más sobresalientes de las enzimas son su poder catalítico y especificidad; además, la actividad de muchas enzimas está regulada.

Son una clase de macromoléculas muy eficaces en catalizar diversas reacciones químicas, debido a su capacidad para unirse específicamente a un gran número de moléculas. Utilizando fuerzas intermoleculares, los enzimas acercan los sustratos con una orientación óptima, siendo esto el preludio para establecer o romper enlaces químicos. En esencia, al estabilizar los estados de transición catalizan la reacción de la especie química de mayor energía. Con esta selección, una enzima determina cuál de las distintas reacciones químicas potenciales va a tener lugar. Las enzimas también pueden actuar como interruptores moleculares que regulan la actividad catalítica y transforman energía debido a su capacidad para acoplar la actividad de centros de unión separados. Las enzimas aceleran las reacciones multiplicando su velocidad por un millón de veces e incluso más. De hecho, la mayoría de las reacciones en los sistemas biológicos no tienen lugar a velocidades perceptibles en ausencia de enzimas. Los enzimas son altamente específicas tanto en la reacción que catalizan como en la selección del sustrato, un enzima cataliza normalmente una sola reacción química o un grupo de reacciones estrechamente relacionadas, en las reacciones catalizadas son raras las reacciones colaterales que conducen a la formación de productos secundarios. El grado de especificidad del sustrato es normalmente elevado y a veces prácticamente absoluto, los enzimas proteolíticos varían marcadamente en su grado de especificidad por el sustrato. Las actividades de las enzimas están reguladas, por la inhibición enzimática producida por el producto final de una vía biosintética, por proteínas reguladoras, que pueden inhibir o inducir la actividad y por modificación covalente de las enzimas.

En 1964 la “International Union of Biochemistry and Molecular Biology” (IUBMB) estableció una comisión para desarrollar una nomenclatura de las

enzimas. Las reacciones enzimáticas fueron divididas en seis grupos principales numerados del 1 al 6 **(10)**.

1. *Oxidorreductasas*: catalizan reacciones de óxido reducción.
2. *Transferasas*: Catalizan varios tipos de transferencias de grupos de una molécula a otra.
3. *Hidrolasas*: Catalizan reacciones que implican la ruptura hidrolítica de enlaces químicos, tales como C=O, C-N, C-C.
4. *Liasas*: Catalizan la adición o eliminación de grupos para formar dobles enlaces.
5. *Isomerasas*: Transforma sus substratos de una forma isomérica a otra (transferencia de grupos intramoleculares).
6. *Ligasas*: Cataliza la formación de enlaces entre dos substratos. La energía requerida para la formación del enlace deriva de la hidrólisis del ATP.

Por otro lado dentro de los cereales, existe una clasificación basada en el trabajo clásico de Osborne hacia fines del siglo pasado, en donde, según su solubilidad, se distinguen cuatro fracciones proteínicas. **(11, 12)**.

Albuminas: son proteínas solubles en agua. Su solubilidad no es afectada por concentraciones salinas razonables, además, estas proteínas son coagulables por el calor.

Globulinas: son proteínas insolubles en agua pura, pero son solubles en disoluciones salinas diluidas e insolubles a altas concentraciones salinas.

Prolaminas: son proteínas solubles en alcohol etílico de 70%

Glutelinas: son proteínas solubles en ácidos o bases diluidos.

α -amilasa

Las amilasas están clasificadas bajo hidrolasas que se subdividen en aquellos que hidrolizan compuestos O-glicosil, N-glicosil y S-glicosil, como es la hidrólisis de los enlaces glucosídicos internos en el almidón y polisacáridos relacionados para producir dextrinas y oligosacáridos. Las α -amilasas hidrolizan enlaces internos 1,4- α -D-glucosídicos en oligosacáridos o polisacáridos en una manera aleatoria con los

grupos reducidos liberados en la configuración α . Los enlaces α -1,4 que están cerca de los enlaces α -1,6 son resistentes a la hidrólisis. Una hidrólisis extensa de las amilopectinas produce α -dextrinas límite. De acuerdo a la recomendación de la IUBMB, la α -amilasa, por lo tanto, tiene el nombre sistemático de 1,4- α -D-glucano glucanohidrolasa y un número de código de EC 3.2.1.1. Este esquema de clasificación está basado en el tipo de reacción catalizada y el sustrato específico de la enzima individual. En la **figura 1**. Se muestra la estructura tridimensional **(13,14)**.

Recientemente, se ha propuesto una clasificación alternativa de las hidrolasas glucosídicas basada en la secuencia de aminoácidos, este esquema de clasificación se basa en la relación directa entre la secuencia y la similitud de plegado, y provee una conveniente herramienta para predecir mecanismos de información. Sin embargo, esta clasificación basada en la secuencia y las similitudes estructurales puede causar una confusión innecesaria porque en este esquema, una enzima se define por su secuencia primaria como una proteína, pero no directamente por su función catalítica intrínseca **(13)**.

Aplicaciones

Las α -amilasas desempeñan un papel importante en el metabolismo de los hidratos de carbono de los microorganismos, plantas y animales. Las α -amilasas derivadas de *Bacillus licheniformis* o de organismos relacionados para aplicaciones comerciales son estables a temperaturas mayores a 90°C, relativamente menos dependientes a los iones Ca^{2+} y activas en un amplio rango de pH (6.0 a 8.5). Las α -amilasas utilizadas para el proceso de alimentos se obtienen por fermentación controlada de *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis* conteniendo genes de α -amilasas de *Bacillus megaterium*, como un polvo amorfo de color blanco a café o en líquido. Las aplicaciones típicas de estas enzimas incluyen la preparación de jarabes de almidón, dextrosa, alcohol, cerveza y productos de panadería. Industrialmente la α -amilasa es utilizada en la licuefacción de almidón para producir dextrinas que después se sacarifican por glucoamilasas para producir altas cantidades de glucosa para la producción de jarabe de maíz, combustible o bebidas

alcohólicas. En la industria de la panificación, la α -amilasa se adiciona a la masa para asegurar un continuo suministro de azúcares fermentables para el crecimiento de las levaduras y producción de gas. La α -amilasa es una de las enzimas incorporadas en los detergentes para ropa para eliminar manchas de almidón de los tejidos e incrementar la eficiencia y reducir los ingredientes químicos en los detergentes (13).

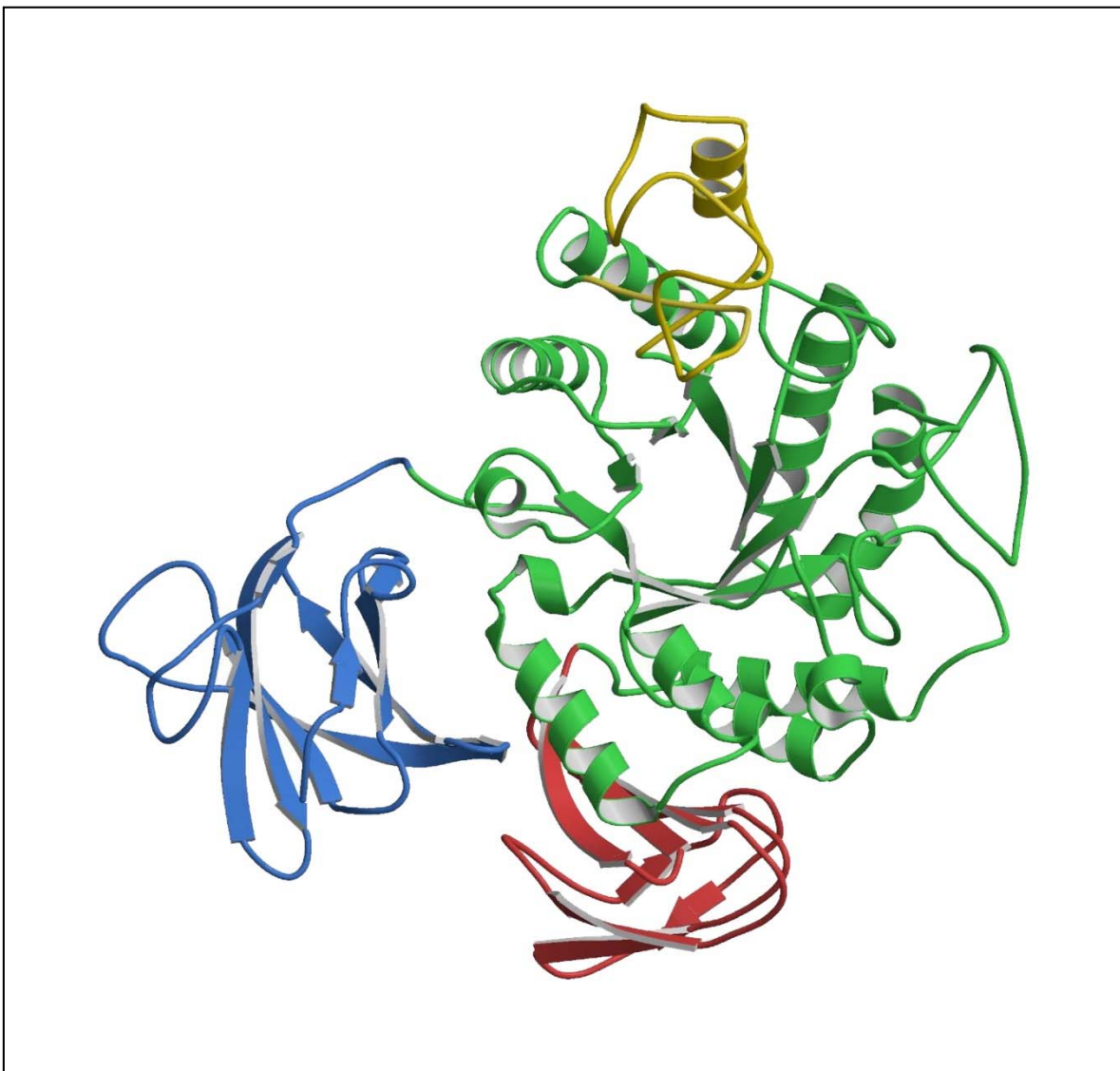


Figura 1. Estructura tridimensional de la enzima α -amilasa.

Métodos para medir la actividad de la enzima α -amilasa.

Los métodos para medir la actividad de la enzima α -amilasa se caracteriza por el tipo de sustrato empleado en un procedimiento particular. Hay tres métodos que se utilizan rutinariamente para la medición de la actividad de la α -amilasa.

Uno de estos métodos es el “método de azúcares reductores”, en este método se analizan los azúcares reductores midiendo el incremento de nuevos extremos reductores de los fragmentos producidos por la acción hidrolítica de la α -amilasa sobre el almidón soluble. En el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico, la concentración del ácido nitroaminosalicílico formado en el hemiacetal reductor es medida colorimétricamente. El método de Bernfeld es el método de azúcares reductores más utilizado para medir la actividad de la α -amilasa, a continuación se describe de forma general el procedimiento de este método **(13)**:

Se incuba 1 mL de solución enzimática correctamente diluida por 3 minutos a 20 °C con 1 mL de solución de almidón. La reacción enzimática se para con la adición de 2 mL de reactivo ácido 3,5-dinitrosalicílico. El tubo que contiene la mezcla se calienta por 5 minutos en un baño de agua hirviendo y después se enfría la mezcla con agua de la llave, se adicionan 20 mL de agua a la mezcla y finalmente la densidad óptica de la solución es determinada por espectrofotometría. Se prepara un blanco siguiendo los pasos anteriores pero sin la enzima. Se establece una curva estándar con maltosa (0.2 a 2 mg, en 2 mL de agua), que es usada para convertir las lecturas del espectrofotómetro en miligramos de maltosa. La actividad de la α -amilasa se expresa en términos de miligramos de maltosa liberada en 3 minutos a 20 °C por un 1 mL de solución enzimática **(15)**.

A partir del método de Bernfeld que se describió arriba se derivan procedimientos modificados para enfocarse a cierto tipo de análisis o de muestras, un procedimiento modificado para el análisis en escala pequeña de α -amilasa en cereales es el siguiente:

Se combinan 250 μ L de enzima α -amilasa (200 mM de acetato de sodio, pH 5.5 y 10 mM de CaCl_2) con 250 μ L de solución de almidón 1%, incubándose la mezcla por 10 minutos a 37 °C. La reacción se detiene agregando 500 μ L de ácido dinitrosalicílico (1% de ácido nitrosalicílico, 30% de sodio tartrato de potasio, 40%

de NaOH 1N), calentado la mezcla por 5 minutos en un baño de agua a 100°C y enfriada hasta temperatura ambiente con agua fría, y luego se clarifica por centrifugación. Se mide la absorbancia a 547 nm, calculándose la actividad usando una curva estándar de maltosa. En este método se define una unidad enzimática como la cantidad de enzima que cataliza la liberación de 1 μmol de grupos reductores del almidón soluble, medidos como maltosa por minuto a 37 °C.

La medición de la actividad de la α -amilasa por el método de azúcares reductores es preciso si la muestra no se encuentra combinada con otras enzimas amilolíticas **(16)**.

Otro método para medir la actividad enzimática es el “método de teñido del sustrato de almidón”, este procedimiento involucra la hidrólisis del almidón teñido por la enzima α -amilasa y la medición de la absorbancia a 610 nm de los fragmentos solubles teñidos liberados en la solución por la degradación del sustrato. Este método no es afectado por sustancias reductoras y es por lo tanto aplicable particularmente para la medición de la actividad enzimática en medios de cultivo celular que contienen glucosa u otros azúcares reductores. Existen dos tipos de sustratos de almidón teñidos que están disponibles comercialmente. Uno de estos almidones teñidos es el almidón entrecruzado marcado con colorante, está hecho por almidón de papa entrecruzado parcialmente hidrolizado. Este sustrato forma una red insoluble de polímeros que se hincha en agua o buffer, resultando en una suspensión. El sustrato se conoce por ser muy resistente hacia la β -amilasa, y es particularmente adecuado para el análisis de α -amilasa en granos de cereales que comúnmente contienen cantidades considerables de β -amilasa como un contaminante común en el extracto enzimático **(17)**.

Se ha desarrollado un micro ensayo utilizando almidón entrecruzado marcado con colorante para la detección rápida de la actividad de la α -amilasa. Se observó una correlación lineal entre la absorbancia y la concentración enzimática en un rango de 50 ng. Este ensayo se utiliza rutinariamente en el monitoreo de la producción de α -amilasa recombinante producidos en células de levadura transformadas. Por este método se define una unidad de actividad de α -amilasa como la cantidad de enzima que da un valor de absorbancia de 0.100. Esta

definición es la más utilizada en la medición de actividades relativas, tal como el monitoreo de fracciones de una columna cromatográfica. Los valores de absorbancia obtenidos en los ensayos basados en el sustrato teñido se pueden convertir a unidades internacionales utilizando una curva estándar **(18)**.

Por último, otro método para medir la actividad de la enzima α -amilasa es el “método del sustrato definido” en este método se utilizan oligosacáridos sintéticos de bajo peso molecular con una estructura definida que tiene como ventaja la eliminación de la variabilidad del sustrato. Por lo tanto, estos no son sustratos naturales y la medición de la actividad puede fallar para revelar algunas propiedades enzimáticas únicas, tal como el enlace y la hidrólisis del almidón crudo. Estos sustratos, sin embargo, no son específicos para α -amilasas, ya que otras amilasas como la β -amilasa o glucoamilasas, también pueden fácilmente romper el sustrato **(13)**.

Inhibidores enzimáticos

Cualquier compuesto que reduzca la actividad de una enzima es un inhibidor. La reducción de la actividad enzimática puede suceder de varias maneras. A nivel celular, el inhibidor puede funcionar por (a) alterando la permeabilidad de una célula o inhibiendo los mecanismos de transporte, (b) interfiriendo con la formación de compuestos fosfatados de alta energía como el ATP, (c) interfiriendo con las reacciones sintéticas involucradas en la formación de constituyentes celulares, o (d) inhibiendo la enzima directamente. A nivel molecular, tanto *in vivo* como *in vitro* la inhibición de una enzima por un compuesto puede resultar por su reacción con la apoenzima, con cofactores necesarios, con activadores, o con intermediarios en la reacción química. Un inhibidor puede reaccionar directamente con grupos esenciales del sitio activo de la enzima, con grupos específicos de la enzima que no están involucrados en el sitio activo pero que son importantes para mantener la conformación del sitio activo o para asegurar que las subunidades de la enzima se mantengan juntas **(1)**.

Los inhibidores son glicoproteínas sintetizadas como preproteínas que requieren de una escisión proteolítica para su activación. Los procesos de traslación

producen la activación de inhibidor formado por la asociación de dos cadenas polipeptídicas, subunidades α y β . En la estructura cristalina del complejo enzima-inhibidor, el inhibidor de α -amilasa I (α -AI-I) existe como un dímero que enlaza dos moléculas de enzima porcina pancreática. Se han estudiado en detalle dos familias de inhibidores de α -amilasa, incluidos inhibidores basados en hidratos de carbono y proteínas. El conocimiento de la acción inhibitoria de estos compuestos es de gran interés en medicina y en el intento para el desarrollo de terapias para la diabetes, hiperlipemia y obesidad. Los inhibidores de α -amilasa se encuentran en microorganismos y plantas superiores. Una variedad de inhibidores de α -amilasa tanto endógena como exógena, se producen en los granos de cebada y trigo. El inhibidor de α -amilasa/subtilisina de la cebada se ha estudiado extensamente y su estructura tridimensional se conoce, este inhibidor es activo contra las enzimas endógenas de las plantas. El segundo tipo de inhibidores son hidratos de carbono derivados de la familia trestatina y se encuentran también en *Streptomyces*. El inhibidor más común en esta clase de inhibidores es la acarbosa, un pseudo tetrasacárido con una unidad ciclitol y una unidad aminoazúcar en el extremo no reducido. La unión del inhibidor a la enzima induce cambios estructurales en el sitio activo, involucrando extensos enlaces de hidrogeno y apilamiento hidrofóbico. Tendamistat, es uno de los inhibidores más potentes de α -amilasas de mamíferos, es una proteína ácida de 74 aminoácidos aislada de medio de cultivo de *Streptomyces tendae*. Esta clase de inhibidores también incluyen HAIM (*S. griescosporeus*), AI-3688 (*S. aureofaciens*) y PAIM (*S. griseosporeus*). En el complejo enzima-inhibidor, la conformación del sitio activo de la enzima se induce para dar cabida a un enlace fuerte con Tendamistat o inhibidores relacionados. Las semillas de frijol común contienen una familia de proteínas involucradas en el mecanismo de defensa, compuestas por fitohemaglutininas e inhibidores de α -amilasa. Los inhibidores de α -amilasa inhiben la actividad de algunas α -amilasa de mamíferos e insectos pero no inhiben las enzimas endógenas de las plantas **(13)**.

Almidón.

El almidón, es un constituyente común de las plantas superiores, es la principal forma en que almacenan los hidratos de carbono y se encuentra en forma de granos. En los cereales y otras plantas superiores, los granos se forman en plastidios. Estos plastidios que forman el almidón se llaman amiloplastos. En los cereales que tienen los granos de almidón simples (trigo, maíz, centeno, cebada, sorgo y mijos), cada plastidio contiene un grano y en el caso del arroz y avena, que contienen granos compuestos, se encuentran muchos granos en cada amiloplasto **(11, 19)**.

El almidón en los cloroplastos de las plantas es transitorio y se acumula durante el periodo de luz y es utilizado durante la oscuridad. Se almacena el almidón acumulado en los órganos de reserva durante una fase en el ciclo de vida de las plantas y es utilizado en otro momento, el almidón de los órganos de reserva de muchas plantas son importantes comercialmente **(19)**.

La sacarosa es el azúcar más común en la mayoría de las plantas ya que ésta es un producto importante de la fotosíntesis, una de las formas principales en las que el material se transforma alrededor de las plantas y el substrato principal para el metabolismo de las plantas. Desde el punto de vista de la osmosis, es muy ventajoso para la planta almacenar su exceso de energía en forma de almidón, que es insoluble y de peso molecular extraordinariamente grande, en lugar de sacarosa. Como el almidón se sintetiza en los plastidios, estas estructuras tienen que poseer todas las enzimas necesarias para la formación del grano **(11)**.

Composición.

El almidón es un material semicristalino, sus granos muestran birrefringencia. La propiedad de birrefringencia es debida al alto grado de estructuración que el grano de almidón tiene. El almidón está compuesto fundamentalmente por glucosa, aunque puede contener una serie de constituyentes en cantidades mínimas, estos aparecen a niveles tan bajos, que es discutible si son oligoconstituyentes del almidón o contaminantes. Incluso, aunque, estos constituyentes mínimos se encuentren en pequeñas cantidades en el almidón, pueden afectar las propiedades

del almidón. Los almidones de los cereales contienen pequeñas cantidades de grasas. Generalmente, el nivel de lípidos en el almidón de cereal, esta entre 0,5 y 1%. Además de otras sustancias minerales a bajos niveles, los almidones contienen fosforo y nitrógeno. En los cereales, la mayor parte del fosforo está en forma de fosfolípidos. Todos los almidones contienen también bajos niveles de nitrógeno (<0,05%); parte de este pertenece a los lípidos y el resto puede ser proteínico. El almidón está básicamente constituido por polímeros de α -D-glucosa. Químicamente, se pueden distinguir dos tipos de polímeros: amilosa, que fundamentalmente es un polímero lineal; y amilopectina que está fuertemente ramificado (11).

Amilosa.

La amilosa es un polímero lineal de α -D-glucosa unida en α -1,4. El peso molecular es del orden de 250 kd (1500 unidades de glucosa anhidra), pero varía mucho, no solo según las especies de plantas, sino también dentro de la misma especie y depende también del estado de maduración. Cuando se lixivia el almidón para separar la amilasa calentando ligeramente por encima de la temperatura de gelificación del almidón, la amilosa se solubiliza y es esencialmente lineal. A medida que se va aumentando la temperatura de lixiviación, la amilosa que se obtiene es de mayor peso molecular y más ramificado. Las ramificaciones de la amilosa son de cadena larga con cadenas laterales de centenares de restos de glucosa. Los puntos de unión son enlaces α -1,6, iguales a los encontrados en la amilopectina. Las ramificaciones de la amilosa, son tan largas y tan escasas. Que en varios sentidos la molécula actúa como una entidad sin ramificar. La naturaleza lineal y de gran longitud, confiere a la amilosa algunas propiedades únicas, por ejemplo: su capacidad para formar complejos con yodo, alcoholes o ácidos orgánicos. Estos complejos son llamados caltratos o complejos de inclusión helicoidal. La amilosa se puede precipitar de una solución de almidón por la adición de alcohol n-butílico. El alcohol y la amilosa, forman un complejo insoluble cuya naturaleza es similar a la formada por el yodo con la amilosa. El conocido color producido por el yodo con el almidón, se atribuye a iones poliyodados en el núcleo central de la hélice de la

amilosa. La naturaleza lineal y de gran longitud de la amilosa, es también responsable de la tendencia a asociarse consigo misma y precipitarse de la solución. La amilosa cristalizará fácilmente en una solución. En la **Figura 2** se muestra la estructura de la amilosa (**11**).

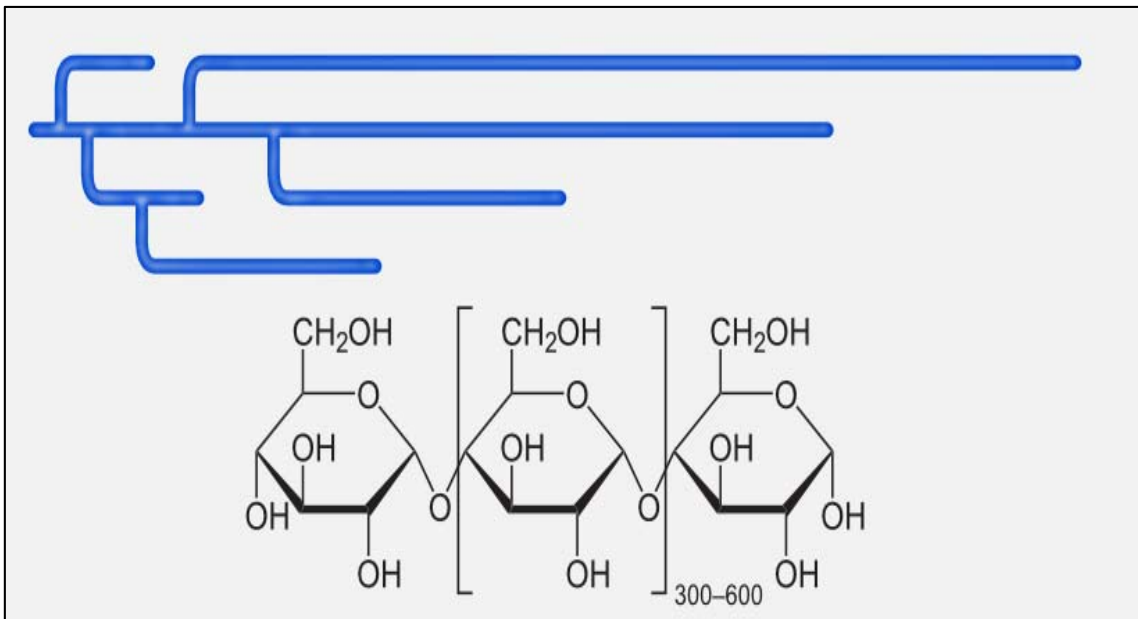


Figura 2. Estructura de la amilosa.

Amilopectina.

Como la amilosa, la amilopectina está formada por α -D-glucosa, unida por enlaces α -1,4 y la amilopectina contiene enlaces α -1,6. Este nivel de ramificación indica que, la cadena unitaria de la amilopectina presenta cada 20-25 unidades de glucosa una ramificación. El peso molecular de la amilopectina es de unos 10^5 kd. Es ciertamente una molécula enorme, una de las mayores que se encuentran en la naturaleza, con 595,238 restos de glucosa o 29,762 cadenas con un grado medio de polimerización de 20. La amilopectina está ramificada al azar. La molécula tiene tres tipos de cadenas: cadena "A", compuestas por glucosa con enlaces α -1; cadenas "B", compuestas por glucosa con enlaces α -1,4 y α -1,6; y cadenas "C", de glucosa con enlaces α -1,4 y α -1,6 y además un grupo reductor. Las cadenas "A" no tienen ramificaciones y las cadenas "B" si las tienen; la cadena "C" esta ramificada y además posee el único grupo reductor de la molécula. La forma más utilizada

para determinar la estructura de la amilopectina es con una serie de enzimas, que degradan la molécula parcialmente. Una de estas enzimas es la β -amilasa que ataca a los grupos finales no reductores de las cadenas de almidón e hidroliza uno sí y otro no los enlaces α -1,4. En la **Figura. 3** se muestra la estructura de la amilopectina **(11)**.

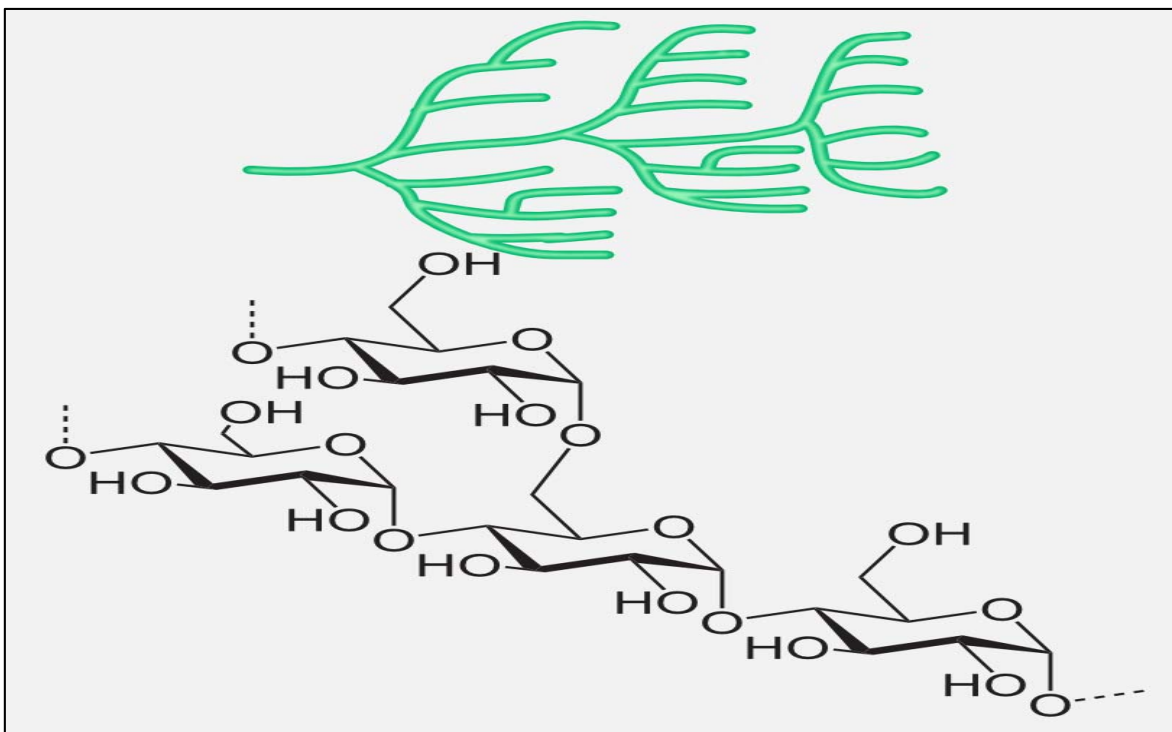


Figura 3. Estructura de la amilopectina.

Los almidones naturales, tales como los del maíz, arroz, trigo y papa, contienen 70-80% de amilopectina y 20-30% de amilosa. La afinidad a la solución de yodo del almidón desengrasado y el color azul derivado del complejo yodo-amilosa, son dos métodos comúnmente utilizados para determinar el contenido de amilosa aparente en el almidón. Los resultados obtenidos por estos métodos, sin embargo, se ven afectados por la presencia de lípidos y la estructura de la amilopectina, por la ramas de las cadenas largas de la amilopectina también puede hacer un complejo con el yodo y dar una afinidad al yodo y color azul adicional. Los complejos de la amilosa con los lípidos reducen su habilidad para formar un complejo con el yodo **(19)**.

Gelificación y retrogradación.

Cuando se calientan los granos de almidón con agua y temperatura suficientemente alta para que gelifiquen y se ha solubilizado parcialmente el almidón, se dice que se ha empastado. Por lo tanto, la pasta de almidón puede variar, desde los granos gelificados con solamente una pequeña cantidad de almidón soluble, hasta un sistema en el cual prácticamente todo el almidón es soluble y no se pueden encontrar restos de granos **(11)**.

La gelificación se puede caracterizar como el proceso por el cual las moléculas de almidón dispersas en un medio acuoso se reasocian y forman estructuras de red tridimensionales. Las asociaciones intercatenarias de las cadenas pueden involucrar cadenas tanto cortas como largas dependiendo de la extensión de las asociaciones entre los segmentos de cadenas ordenadas. Estas estructuras constituidas se conocen como zonas de entrecruzado “cross-linked” en una red de gel **(19)**.

Expresado de forma general, el entrecruzado es la unión covalente de dos moléculas de almidón para constituir una molécula más grande. El enlace se consigue formando un diéster con ácido fosfórico, o formando un enlace éter. Aunque generalmente se considera el entrecruzamiento entre moléculas diferentes, también puede ocurrir dentro de la gran molécula de amilopectina. Sin embargo, estos enlaces intermoleculares, no tendrán gran efecto sobre las propiedades del almidón. Un entrecruzamiento muy pronunciado aumenta la temperatura de gelificación del almidón y, por lo tanto, será necesaria una temperatura más alta para la gelificación. Los niveles bajos de entrecruzamiento, no alteran significativamente la temperatura de gelificación del almidón, pero alteran materialmente sus propiedades de empaste. El almidón entrecruzado, se hincha menos y es menos soluble que el almidón de donde procede. Las propiedades mecánicas del gel están determinadas por la densidad y estabilidad de las zonas de unión o entrecruzamiento intermoleculares **(11)**.

Para los geles de almidón, se cree que las interacciones no covalentes de las cadenas involucran la formación de doble hélices intermoleculares estabilizadas por

puentes de hidrogeno. Los microdominios de cadenas ordenadas que se producen están lejos del equilibrio y siempre estarán influenciadas por la historia térmica y de procesamiento, así como la composición molecular (amilosa, amilopectina) y la estructura fina del polímero **(19)**.

Las soluciones acuosas de amilosa son bastante inestables, y el enfriamiento a temperatura ambiente muestra un desarrollo de turbidez y finalmente forma un precipitado o un gel dependiendo de la concentración y tamaño molecular de las cadenas poliméricas. En general, la precipitación de la amilosa es favorecida por longitudes de cadena corta, bajas concentraciones y enfriamiento lento, mientras que la gelificación es favorecida por longitudes de cadena más largas, altas concentraciones y enfriamiento rápido. La velocidad de agregación y el estado físico del material agregado también depende del tamaño de las cadenas de amilosa **(11, 19)**.

En cuanto a la amilopectina, aunque las soluciones de amilopectina se consideran generalmente como estables, bajo condiciones adecuadas (usualmente baja temperatura y alta concentración) estas pueden formar geles. La gelificación de la amilopectina es un proceso mucho más lento que el observado para la amilosa y ocurre substancialmente a altas concentraciones. Por otro lado, la cinética de la gelificación de las amilopectina es más sensible a la temperatura de almacenamiento (1-25 °C) que la de amilosa. La incompatibilidad termodinámica de los polisacáridos del almidón es de importancia para la microestructura y propiedades viscoelásticas de los geles del almidón. La amilosa y la amilopectina en soluciones acuosas han mostrado ser inmiscibles a concentraciones moderadas (6%) dando lugar a la separación de fases de los dos polímeros; una fase enriquecida en amilosa, y la otra conteniendo principalmente amilopectina. Cuando ocurre la separación de fases, la concentración efectiva de ambos polímeros en sus respectivas fases es elevada, lo cual puede influenciar profundamente en las propiedades mecánicas del sistema compuesto. Las composiciones poliméricas de las fases continuas y dispersas son dependientes de la relación de amilosa: amilopectina. A un valor particular de esta relación llamada punto de inversión de fase, la fase continua se convierte en la discontinua o dispersa y viceversa.

Mediciones de sistemas de mezclas amilosa-amilopectina confirman que sus propiedades reológicas dependen fuertemente en la relación de peso de los dos polímeros, el comportamiento viscoelástico de los geles parece ser regido por un proceso de separación, produciendo un sistema compuesto. Cambios drásticos en las propiedades de la red, identificados con el punto de inversión de fase, ocurren a una relación amilosa: amilopectina de 0.17. Se pueden esperar diferentes propiedades para los geles de almidón, dependiendo de la medida de la separación macromolecular y el tipo de material solubilizado durante el empastado y almacenamiento. Se ha encontrado que los altos niveles de amilosa soluble y poder de hinchamiento aumenta la elasticidad, mientras que los altos niveles de amilopectina soluble parece perjudicar la gelificación. La amilosa tiende a separarse de la amilopectina durante el calentamiento de las dispersiones acuosas de los granos de almidón **(19)**.

Se puede imaginar el gel como cadenas de almidón con capas de moléculas de agua retenidas por puentes de hidrogeno. Al ir enfriándose la pasta de almidón, las cadenas van perdiendo energía y los enlaces de hidrogeno se hacen más fuertes proporcionando fuerza al gel. Al envejecer el gel, o si se congela y descongela, las cadenas de almidón tienden a interactuar fuertemente entre sí, forzando al agua a salir del sistema. Un almacenamiento prolongado da lugar a una mayor interacción entre las cadenas de almidón y eventualmente a la formación de cristales. Este proceso llamado retrogradación, es la cristalización de cadenas de almidón en el gel. Como el área cristalizada altera el índice de refracción, el gel se va volviendo más opaco a medida que la retrogradación progresa **(11)**.

La retrogradación es inducida por baja temperatura, alto contenido de amilosa y la presencia de sustancias polares. Por otro lado los surfactantes impiden la retrogradación. En general la susceptibilidad del almidón a la retrogradación es también controlada por el peso molecular, concentración, temperatura y la presencia de componentes no amiláceos (sales, sacáridos, lípidos, ácidos, hidrocoloides, surfactantes), por consecuencia de la retrogradación las distancias intermoleculares entre las moléculas de almidón disminuyen. Durante el almacenamiento del gel de almidón, especialmente a bajas temperaturas, el

almidón insoluble (especialmente amilosa) precipita. La retrogradación no solo ocurre en la fracción de amilosa sino también de la los granos gelatinizados de amilopectina, la asociación de las moléculas de amilosa lineales tiene lugar en la primera etapa de la retrogradación mientras que el lento incremento en la rigidez del gel de almidón se atribuye a la cristalización de la amilopectina. El proceso de retrogradación es rápido a bajas temperaturas, este proceso se puede acelerar con ciclos repetidos de congelamiento y descongelamiento del gel de almidón **(20)**.

Cereales y leguminosas.

La oferta de cereales y leguminosas a nivel internacional responde a factores muy diversos; durante los últimos años es frecuente hacer énfasis en la seguridad alimentaria, la demanda de biocombustibles y la participación de “comodities” o producto agrícola destinado a uso comercial en el mercado de valores. Paralelamente, el volumen de producción en cada ciclo agrícola se encuentra determinado por factores como la superficie destinada al cultivo, los rendimientos obtenidos, las expectativas de importaciones y exportaciones en el comercio internacional y los precios en el mercado **(21)**.

Cereales.

Los cereales son las semillas de hierbas cuyo tamaño es lo suficientemente grande para manipularlos económicamente. Desde el punto de vista botánico, todos los cereales son miembros de las gramíneas o herbáceas, los granos difieren considerablemente en el tamaño y forma, aunque anatómicamente son muy semejantes. El hábitat de los cereales también varía considerablemente. Mientras el sorgo es un xerófito que crece casi en condiciones desérticas, el trigo y la cebada lo hacen en climas templados e incluso fríos. El maíz crece mejor en climas húmedos y relativamente cálidos, mientras que el arroz de tierras bajas es una planta típica de terrenos pantanosos y marismas, que crece en agua poco profundas **(22)**.

Los cereales almacenan energía en el grano en forma de almidón. La cantidad de almidón contenido en los granos de cereal, varía, pero generalmente oscila entre

60 y 75% del peso del grano. Por esto, gran parte del alimento consumido por los humanos, está en forma de almidón; una fuente excelente de energía. Además de su valor nutritivo, el almidón es importante a causa de su efecto sobre las propiedades físicas de muchos de nuestros alimentos, aparte de ser un producto industrial importante, particularmente en la industria papelera **(11)**.

La composición de las semillas varía dentro de una especie igual que entre diferentes especies. En general, el contenido de humedad varía desde un 10 a un 15 %, la proteína desde el 8 al 15 % y a la grasa desde el 3 al 5 %, si bien la avena y el maíz pueden alcanzar un contenido de grasa del 8 o 9 %. El contenido de hidratos de carbono, principalmente almidón, es del orden del 60 al 70 % como se mencionó anteriormente, mientras que la fibra y las cenizas alcanzan el 2 %. La digestibilidad del nitrógeno es de aproximadamente 0,9 y el valor biológico de 0,60 a 0,75. La calidad de la proteína varía, tendiendo a estar limitada por el contenido de lisina **(22)**.

Los principales cereales utilizados en la alimentación humana son el trigo, la cebada, el arroz, el maíz, el centeno, el migo y la avena **(12)**.

Trigo

El trigo común (*Triticum aestivum*) es una de las especies de trigo más importantes de las zonas templadas. Su altura es de 1 metro aproximadamente y cada planta tiene de 1-3 espigas, el tallo consta de una serie de internodos huecos y de nodos sólidos, a lo largo del cual se sitúan paralelamente las delgadas hojas envainadas. La inflorescencia es una espiga, las semillas están firmemente unidas al raquis y protegidas por dos pequeñas hojas, la palea y lema. La capa de aleurona del grano de trigo posee numerosas células cuadráticas ricas en proteína, vitaminas y minerales, la capa inferior a esta, el endospermo, es el depósito alimenticio del germen y de ella se obtienen la harina y sémola. El componente principal del endospermo es el almidón, el componente proteínico más importante es el gluten, este es considerablemente rico en grasa, vitaminas y minerales **(12)**.

El trigo es uno de los cereales más importantes en la alimentación humana. En general, no se consume directamente, se usa en la elaboración de alimentos

sobre todo en la industria de la panificación, así como en la fabricación de pastas, galletas, bebidas y hasta en la producción de combustibles **(23)**. A continuación se muestra la composición química del trigo.

Tabla 1. Composición química del trigo (g /100 g) **(12)**.

Humedad	Proteína	Lípidos	Almidón	Otros hidratos de carbono	Fibra bruta	minerales
13.2	11.7	2.2	59.2	10.1	2.0	1.5

El trigo es una de los granos de mayor producción mundial. El 71% de la producción de este cultivo se concentra en 11 países, ocupando los tres primeros lugares China con el 17%, la india con el 12% y estados unidos con el 10%, seguidos por ocho países de distintos continentes, en la **tabla 2** se muestran la producción de los principales productores de trigo en los años recientes. La producción de trigo en México representa solo el 0.5% del total mundial, en superficie cosechada su participación fue menor, sin embargo, los rendimientos obtenidos por México están por encima del promedio mundial y de los tres principales países productores, al obtener 4.8 ton/ha **(21)**.

Tabla 2. Principales productores de trigo (miles de toneladas).

País/Año	2006	2007	2008	2009	2010	2011	Promedio
China	108466	109298	112464	115115	115181	117410	112989
India	69355	75807	78570	80679	80804	86874	78681
U.S.A	49216	55820	68016	60366	60062	54413	57982
Rusia	44927	49368	63765	61740	41508	56240	52925
Francia	35364	32764	39006	38332	40787	38037	37382
Canadá	25265	20054	28611	26848	23167	25261	24868
Alemania	22428	20828	25989	25192	24107	22800	23557
Pakistán	21277	23295	20959	24033	23311	25214	23015
México	3378	3515	4019	4116	3677	3628	3722
Mundo	602892	612601	683153	686795	653355	704080	657146

Fuente. Datos de FAO **(24)**.

Maíz.

El maíz (*Zea mays*) es el cultivo más importante de México. El maíz blanco se utiliza principalmente para la elaboración de tortillas y tamales, pero de él también pueden obtenerse aceite e insumos para la fabricación de barnices, pinturas, cauchos artificiales y jabones. El maíz amarillo también se utiliza para consumo humano en una amplia variedad de platillos, sin embargo, su principal destino es la alimentación del ganado y la producción de almidones **(23)**.

El maíz necesita una temperatura moderadamente alta, gran humedad y suelo margoso (suelo compuesto de arcilla, limo y arena con abundante cantidad de materia vegetal), la inflorescencia es una espiga con numerosos granos comprimidos que le confieren el típico aspecto de mazorca, las cuales maduran en un periodo de 3 a 5 meses. El grano de maíz es el mayor de las semillas de cereales, es liso y anguloso y el embrión relativamente grande **(21)**.

El maíz tiene un valor nutritivo inferior al del trigo, particularmente por contener escasa niacina y por tener una riqueza proteínica relativamente baja ya que, además de ser deficiente en lisina como la proteína de trigo, lo es también en triptófano **(12)**. A continuación se muestra la composición química del maíz.

Tabla 3. Composición química del maíz (g /100 g) **(12)**.

Humedad	Proteína	Lípidos	Almidón	Otros hidratos de carbono	Fibra bruta	minerales
12.5	9.2	3.8	62.6	8.4	2.2	1.3

El 80% de la producción de maíz se concentra en 10 países; ocupando los primeros 4 lugares, Estados Unidos con el 40%, China con el 20%, Brasil con el 6% y México con el 3% de la producción. Los otros 6 países en conjunto ocupan el 11% del volumen producido de maíz **(21)**. En la **tabla 4** se muestra la producción de los principales productores de maíz en los años recientes.

Tabla 4. Principales productores de Maíz (miles de toneladas).

País\Año	2006	2007	2008	2009	2010	2011	Promedio
U.S.A	267501	331175	307142	332549	316165	313918	311408
China	151731	152419	166032	164108	177541	192904	167456
Brasil	42662	52112	58933	50720	55364	55660	52575
México	21893	23513	24320	20143	23302	17635	21801
Argentina	14446	21755	22017	13121	22677	23800	19636
India	15097	18955	19731	16720	21726	21570	18967
Indonesia	11610	13288	16324	17630	18328	17629	15801
Francia	12775	14357	15819	15288	13975	15703	14653
Ucrania	6426	7421	11447	10486	11953	22838	11762
Mundo	706839	789927	829105	820539	850445	883460	813386

Fuente. Datos de FAO (24).

Cebada.

La cebada (*Hordeum vulgare*) es uno de los primeros cereales cultivados, sin embargo, su consumo en la actualidad ha descendido a medida que se han generalizado otros cereales, como el trigo. Así hoy en día la mayor parte de la cebada se utiliza como pienso del ganado y el resto para la obtención de malta y la elaboración de cerveza y whisky (12).

Este cereal se halla extensamente adaptado, encontrándose desde el Círculo Ártico hasta el interior del Ecuador, la planta es de apariencia similar a la del trigo, la inflorescencia es una espiga y la cariopsis vestida. Existen tres tipos principales de cebada. En primer lugar la cebada barbada de seis carreras, con tres núcleos desarrollados en cada uno de los nudos del raquis, el núcleo central es ligeramente mayor y simétrico, mientras que los otros dos son menores y retorcidos. La segunda variedad es la cebada barbada de dos carreras, las flores laterales de cada nudo son estériles, dando lugar así a dos filas de núcleos sobre cada uno de los raquis. Finalmente, la tercera variedad es la cebada desbarbada, en donde la lema y la palea se desprenden y se pierden durante la trilla (12). En la siguiente tabla se muestra la composición química de la cebada (22).

Tabla 5. Composición química de la cebada (g /100 g). (12).

Humedad	Proteína	Lípidos	Almidón	Otros hidratos de carbono	Fibra bruta	minerales
11.7	10.6	2.1	52.2	19.6	1.6	2.3

La producción de la cebada ha tenido un incremento en los últimos años. Los principales productores de este cultivo agruparon el 70% de la producción mundial, los tres primeros lugares en la producción de este cultivo son Rusia con el 12%, Alemania con el 9% y Francia con el 8%. México no tiene una participación notable en la producción mundial de cebada, pues representa solo el 0.5% tanto del volumen producido como de la superficie cosechada, colocándose así en el lugar 33 a nivel internacional. En la siguiente tabla se muestra la producción de los principales productores de cebada en los años recientes (21).

Tabla 6. Principales productores de Cebada (miles de toneladas).

País\Año	2006	2007	2008	2009	2010	2011	Promedio
Rusia	18037	15559	23149	17881	8350	16938	16652
Alemania	11967	10384	11967	12288	10412	8734	10959
Francia	10401	9474	12172	12876	10102	8775	10633
Ucrania	11341	5981	12612	11833	8485	9098	9892
Canadá	9573	10984	11781	9517	7605	7756	9536
España	8136	11945	11261	7349	8157	8328	9196
Turquía	9551	7307	5923	7300	7250	7600	7488
Australia	4257	7160	7997	7909	7294	7995	7102
México	869	653	781	519	672	487	664
Mundo	139510	134121	154724	151541	123844	134279	139670

Fuente. Datos de FAO (24).

Leguminosas.

La utilización de leguminosas para la alimentación, tanto del ser humano como de los animales, se remonta a tiempos inmemorables. Su elevado contenido proteínico las convierte en una importante y económica fuente de proteínas vegetales, que adquiere especial relevancia en aquellos países en que la ingesta proteínico-calórica es baja. Las leguminosas destacan por su contenido en hidratos de carbono y en algunos minerales y vitaminas, así como por la baja cantidad de grasa. Actualmente las leguminosas no solo tienen un interés nutricional, sino también terapéutico, debido a los efectos beneficiosos, derivados de su consumo frecuente en campos importantes como las enfermedades cardiovasculares, la carcinogénesis y la diabetes. Estos beneficios se atribuyen, además de a las proteínas contenidas en ellas, a las sustancias que las acompañan, entre ellas la

fibra, las saponinas, las isoflavonas, el ácido fítico y otras. Las legumbres que se han cultivado tradicionalmente con destino al consumo humano son el garbanzo, la lenteja, el frijol, el haba y la soja. El valor nutritivo depende de sus componentes, es decir de la cantidad y la calidad de los nutrientes, así como de la presencia o ausencia de sustancias que afecten a su utilización nutritiva o con efectos tóxicos. El valor nutritivo de las leguminosas se atribuye fundamentalmente a su elevado contenido de proteínas, aunque también pueden ser buenas fuentes de hidratos de carbono, lípidos, minerales y vitaminas. Las leguminosas se han considerado tradicionalmente excelentes fuentes de proteína vegetal. Las cantidades de este nutriente en la leguminosas oscila entre el 17 % y el 42%, el valor biológico de esta proteínas viene condicionado por niveles relativamente bajos de aminoácidos azufrados, como la metionina y la cistina. El contenido de hidratos de carbono de las leguminosas oscila entre el 26 a 60%, siendo normalmente el almidón el glúcido mayoritario. El contenido de grasa es normalmente bajo oscila entre el 1 a 6%, en general, aportan pequeñas cantidades de lípidos, pero de buena calidad, siendo los ácidos grasos predominantes el oleico, el linoleico y el linolénico, cuya naturaleza insaturada incide en las propiedades nutritivas y bromatológicas de estas semillas. La presencia de minerales y vitaminas en las leguminosas está sujeta a variaciones interespecíficas, se admite que son buenas fuentes del complejo B, en cuanto a minerales, la aportación a la dieta de calcio, hierro, cinc, fosforo y magnesio suele ser notable en relación con otros alimentos. La ingestión de leguminosas en estado crudo como única fuente proteínica se ha relacionado con una serie de alteraciones fisiológicas, metabólicas e inmunológicas, que se atribuyen a la presencia de algunos factores antinutritivos en estas semillas. Sin embargo, salvo en casos excepcionales y en situaciones muy específicas, la presencia de estas sustancias es de poca importancia, ya que por un lado las variedades habitualmente utilizadas para consumo humano contienen cantidades pequeñas y por otro, los procesos culinarios de remojo y cocción destruyen la mayor parte de los factores tóxicos termolábiles. Además, su reducción, eliminación o desnaturalización puede alcanzarse por selección genética o por diferentes procedimientos físicos, químicos o biológicos **(12)**.

Frijol.

El frijol (*Phaseolus vulgaris*) es una leguminosa ampliamente distribuida y conocida con una gran variedad de nombres locales, no obstante, los más comunes son los de judía seca, frijol común, enana o frijol.

Se puede consumir como una verdura fresca con la vaina, o más frecuentemente, como semilla seca, esta es una fuente de proteína especialmente importante para los miembros más pobres de la sociedad, sobre todo en América Central y América del Sur, donde se consume en grandes cantidades. La calidad de la proteína está limitada por la deficiencia de metionina, aunque esta se consume con frecuencia con los cereales lo que contribuye un ejemplo de efecto de suplementación mutua (22). En la **Tabla 7** se muestra la composición química.

Tabla 7. Composición química del frijol (g /100 g) (12).

Energía (kcal)	Proteínas	Lípidos	Glúcidos	Humedad	fibra
286	17-23	1-2	45-49	8-12	25.4

En cuanto a su producción, el 72% del volumen producido de frijol se concentra en 10 países, en donde la India y Brasil ocupan los dos primeros lugares con 17% y 16% respectivamente, mientras que México se encuentra en el 6 lugar con el 6% (21).

Tabla 8. Principales productores de Frijol (miles de toneladas).

País/Año	2006	2007	2008	2009	2010	2011	promedio
India	3270	3930	3010	2430	4890	4470	3667
Brasil	3458	3169	3461	3487	3159	3435	3362
Birmania	2502	2814	3218	3375	3000	3722	3105
China	1559	1532	1708	1489	1339	1583	1535
U.S.A.	1096	1161	1159	1150	1442	900	1151
México	1386	994	1123	1041	1156	568	1045
Tanzania	626	643	571	774	868	676	693
Uganda	424	435	440	452	455	464	445
Kenia	532	430	265	465	391	578	443
Mundo	20609	20999	20927	20995	23136	23250	21653

Fuente. Datos de FAO (24).

Garbanzo.

El garbanzo (*Cicer arietinum*) pertenece a la familia leguminosa, este género comprende más de cuarenta especies. La *arietinum* es la única que se explota comercialmente.

Es una planta herbácea, en general trepadora; alcanza una altura de 25 a 100 centímetros, su tallo es erecto, ramificado con pubescencia glandular, sus hojas son pinnadas y terminadas en arista. Sus vainas son rectangulares y contienen una o dos semillas relativamente largas que son los garbanzos.

De acuerdo con su uso, las variedades se clasifican en comestibles (*Cicer arietinum* variedad *macrocarpum*), que tienen flores blancas y semillas de color castaño claro; y en variedades forrajeras (*Cicer arietinum* variedad *fuscum* o *vulgare*), cuyas flores son violáceas o rosadas y su semilla de color castaño rojizo o negro. El garbanzo para consumo humano se distingue del de consumo animal por su tamaño, color, textura y dureza.

El garbanzo se ha consumido como alimento humano y forrajero por su alto contenido en proteínas e hidratos de carbono; para la alimentación humana se consume el grano en forma entera, en harina o pasta.

El garbanzo contiene en promedio 20% de proteína, porcentaje que si bien es menor que las otras leguminosas es dos veces mayor que el correspondiente a los cereales; contiene aminoácidos de los conocidos como indispensables para la dieta humana como: isoleucina, leucina, fenilalanina, treonina y valina. Su contenido de lisina es particularmente alto, lo que lo hace buen complemento de los cereales (25). En la siguiente tabla de muestra su composición química.

Tabla 9. Composición química del garbanzo (g /100 g) (12).

Energía (kcal)	Proteínas	Lípidos	Glúcidos	Humedad	fibra
329	17-21	4-6	50-60	6-10	15

El garbanzo es originario del medio oriente, desde la prehistoria se conoció y cultivo en la India, Egipto y Grecia donde ha sido muy apreciado como alimento. Posteriormente se extendió a regiones del Mediterráneo, Asia y África. Con el descubrimiento de América se introdujo y extendió su cultivo, especialmente en

México, Chile y Colombia. Actualmente los principales países productores son, en orden decreciente, India, Pakistán, Turquía, Irán, y Australia **(21)**. En la **Tabla 10** se muestra la producción de los principales productores de cebada en los años recientes.

Tabla 10. Principales productores de garbanzo (miles de toneladas).

País/Año	2006	2007	2008	2009	2010	2011	Promedio
India	5575	6334	5749	7060	7480	8220	6736
Pakistán	480	838	475	741	562	496	598
Turquía	552	505	518	563	531	487	526
Australia	232	313	443	445	602	513	425
Birmania	260	330	348	404	441	467	375
Etiopía	211	254	287	312	285	323	278
Irán	325	329	113	209	268	290	256
México	163	148	165	132	132	72	135
Canadá	163	225	67	76	128	91	125
Mundo	8459	9748	8600	10451	10964	11624	9974

Fuente. Datos de FAO **(24)**.

Lenteja.

La *lens esculentum* es una legumbre que encierra semillas con forma de lente, llamadas lentejas. Es una planta anual de porte erecto, su tallo es delgado, llega a alcanzar una altura de 20 a 50 centímetros y sus raíces son superficiales. La lenteja es muy tolerante a una gran diversidad de ambientes, gracias a una variabilidad genética existente en la planta, por ello se cultiva en los 5 continentes **(26)**.

Las leguminosas hacen una contribución importante en la dieta de los humanos ya que son buena fuente de proteínas, hidratos de carbono, vitaminas y minerales **(Tabla 11)**. A pesar de estos beneficios nutricionales, el consumo de leguminosas ha caído en los países industrializados en los recientes años, una tendencia que puede contribuir probablemente a los desequilibrios nutricionales asociados con dietas que son bajas en fibra y excesivamente dependientes de proteínas animales **(27, 28)**. A continuación se presenta su composición química.

Tabla 11. Composición química de la lenteja (g /100 g) **(12)**.

Energía (kcal)	Proteínas	Lípidos	Glúcidos	Humedad	fibra
314	20-28	1-3	50-58	7-9	11.7

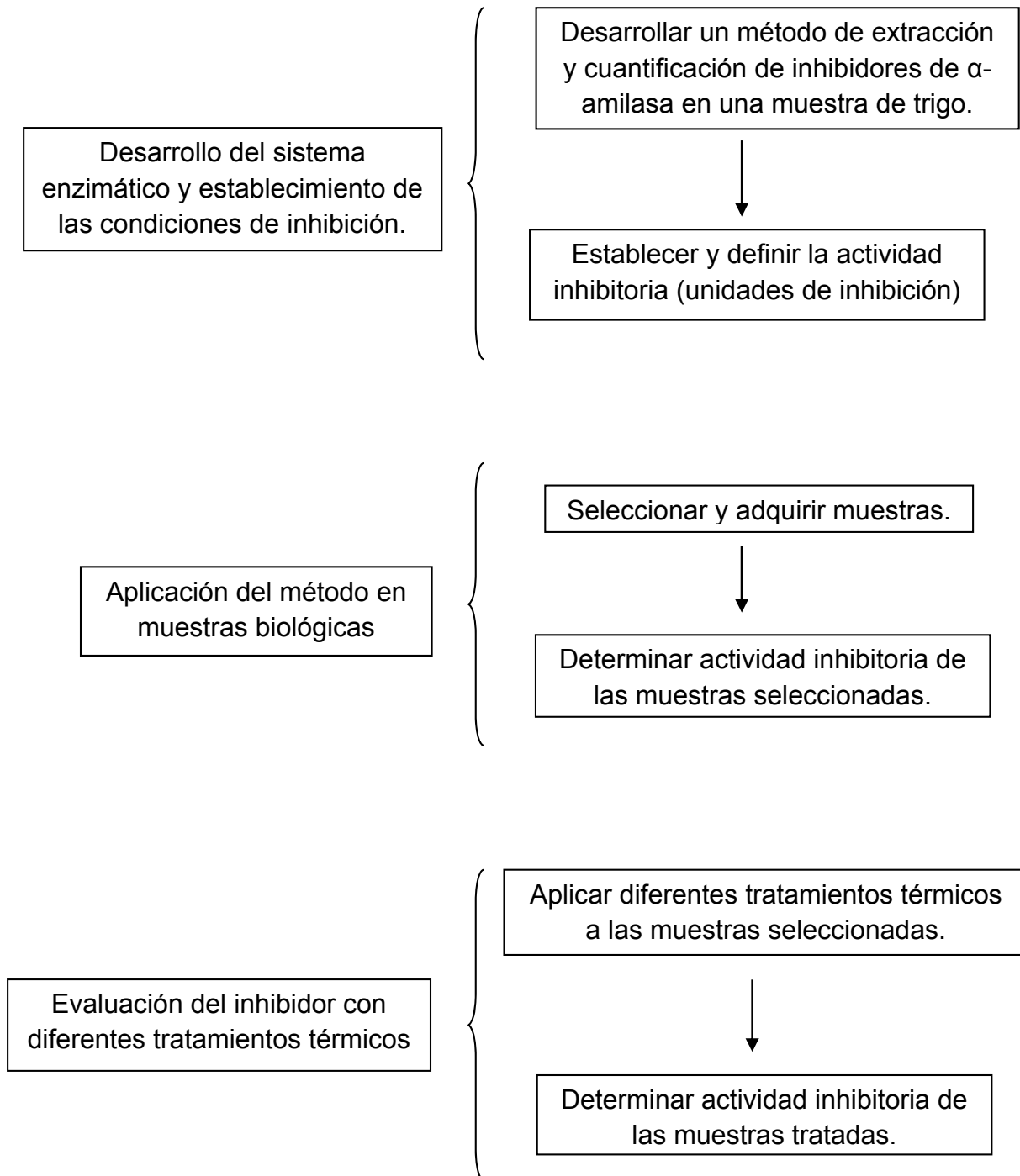
La lenteja es uno de los cultivos más importantes en el mundo en cuanto a leguminosas, y es usada como una fuente de proteína barata para la gente desde el comienzo de la agricultura. Los principales productores de lentejas son Canadá, India, Turquía, mientras que México se encuentra muy por debajo en cuanto a la producción de esta leguminosa **(29)**.

Tabla 12. Principales productores de lenteja (miles de toneladas).

País\Año	2006	2007	2008	2009	2010	2011	promedio
Canadá	692.80	733.90	1043.20	1510.20	1947.10	1531.90	1243.18
India	946.20	910.00	810.00	953.30	1031.60	943.80	932.48
Turquía	622.68	535.18	131.19	302.18	447.40	405.95	407.43
U.S.A	147.15	165.56	108.55	265.08	392.68	214.64	215.61
Nepal	157.96	164.69	161.15	147.73	151.76	206.87	165.03
Australia	36.00	131.00	64.23	143.00	140.00	379.66	148.98
China	127.00	134.00	150.00	120.00	125.00	150.00	134.33
México	7.01	9.04	8.16	6.50	2.71	8.22	6.94
Mundo	3340.09	3300.24	2825.98	3905.68	4765.63	4411.10	3758.12

Fuente. Datos de FAO **(24)**.

METODOLOGIA GENERAL



MATERIALES

A continuación se describen los reactivos y equipo, tomando en cuenta que aquellos no descritos aquí, son material fungible común de laboratorio, reactivos grado analítico y el agua destilada con una resistencia no menor a 1 MΩ.

Reactivos

- Solución enzimática (0.002 mg/mL): Pesar 1 mg de enzima α -amilasa tipo X-A de *Aspergillus oryzae* (Sigma A-0273) y llevar a un aforo de 5 mL, de esta solución tomar 1 mL y llevar a un aforo de 100 mL con agua destilada.
- Solución de almidón: Calentar a ebullición 0.05 g de almidón soluble (Sigma S-2630) con 5 mL de agua destilada durante 1.5 minutos, agregar 0.5 mL de acetato de calcio 1.3 M (pH 6.0) y 0.5 mL de NaCl 0.1 M. Ajustar el pH a 6.0 con ácido acético glacial y llevar a un aforo de 100 mL con agua destilada.
- Acetato de calcio 1.3M (pH 6.0): Pesar 5.726 g de acetato de calcio monohidratado $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Ca}\cdot\text{H}_2\text{O}$, ajusta el pH a 6.0 con ácido acético glacial (el necesario para llegar al pH indicado) y aforar a 25 mL con agua destilada.
- Solución de yodo-yoduro al 6% (p/v): Pesar 3 g de yoduro de potasio (KI) y disolver en 10 mL de agua destilada, agregar 0.3 g de yodo metálico sublimado y disolverlo con el KI, llevar a un aforo de 50 mL con agua destilada.
- Solución de yodo-yoduro 1% (v/v): Tomar 4.15 mL de la solución yodo-yoduro 6% y aforar a 25 mL con HCl 0.5 M.
- Solución de NaCl al 0.9% (p/v): pesar 0.9 g de NaCl, disolver en agua destilada y aforar a 100 mL

Equipos

- Agitador magnético múltiple Corning ® stirrer modelo 440825
- Centrifuga Eppendorf ® modelo 5702
- Vortex LabLine ® modelo super-mixer 1290
- Baño de agua Grant ® modelo LR 22493
- Potenciómetro Thermo Scientific ® modelo Orion star series
- Espectrofotómetro Thermo Scientific ® modelo GENESYS 10 UV scanning
- Estufa de circulación forzada Lab-line ® modelo Imperial III
- Liofilizadora Labconco ® modelo FreeZone 4.5

El procedimiento que se siguió para el desarrollo de este proyecto se dividió en dos fases, que a continuación se describen.

Fase 1: Desarrollo del sistema enzimático y establecimiento de las condiciones de inhibición.

Para implementar la metodología se utilizaron granos de trigo, ya que se reporta que este grano de cereal tiene un alto contenido de inhibidores de α -amilasa **(30)**.

En resumen, para la extracción de los inhibidores en la muestra, se utilizó solución de NaCl (0.9%), agitación mecánica (400 rpm) ensayándose dos diferentes tiempos (2 y 4 horas) y a una temperatura de 4 °C; para la separación del sobrenadante del extracto se evaluaron dos formas: por centrifugación (4000 rpm/ 1 h) y filtración con ayuda de vacío (papel filtro Watman No. 50) y para la cuantificación de actividad inhibitoria (AI) se tomó como base el método yodométrico **(31, 32)**: se ensayaron tres valores de pH (5.0, 6.0 y 7.0), dos temperaturas (30 y 37 °C) y tres tiempos de incubación (10, 15 y 20 minutos). A continuación se describen completamente estos procesos.

Extracción: Se molió el grano de trigo a una tamaño de partícula de 0.5 mm, y se suspendieron 0.6 g de harina de trigo en 25 mL de solución NaCl 0.9 %, se agitó a 4°C/ 400 rpm a los dos tiempos seleccionados, posteriormente se separó el sobrenadante del residuo con los dos procesos a evaluar, para que posteriormente se llevara el sobrenadante a un aforo de 25 mL, obteniendo así el extracto crudo. En la **figura 4**, se muestra de forma esquemática el método de extracción de los inhibidores de α -amilasa de las muestras biológicas.

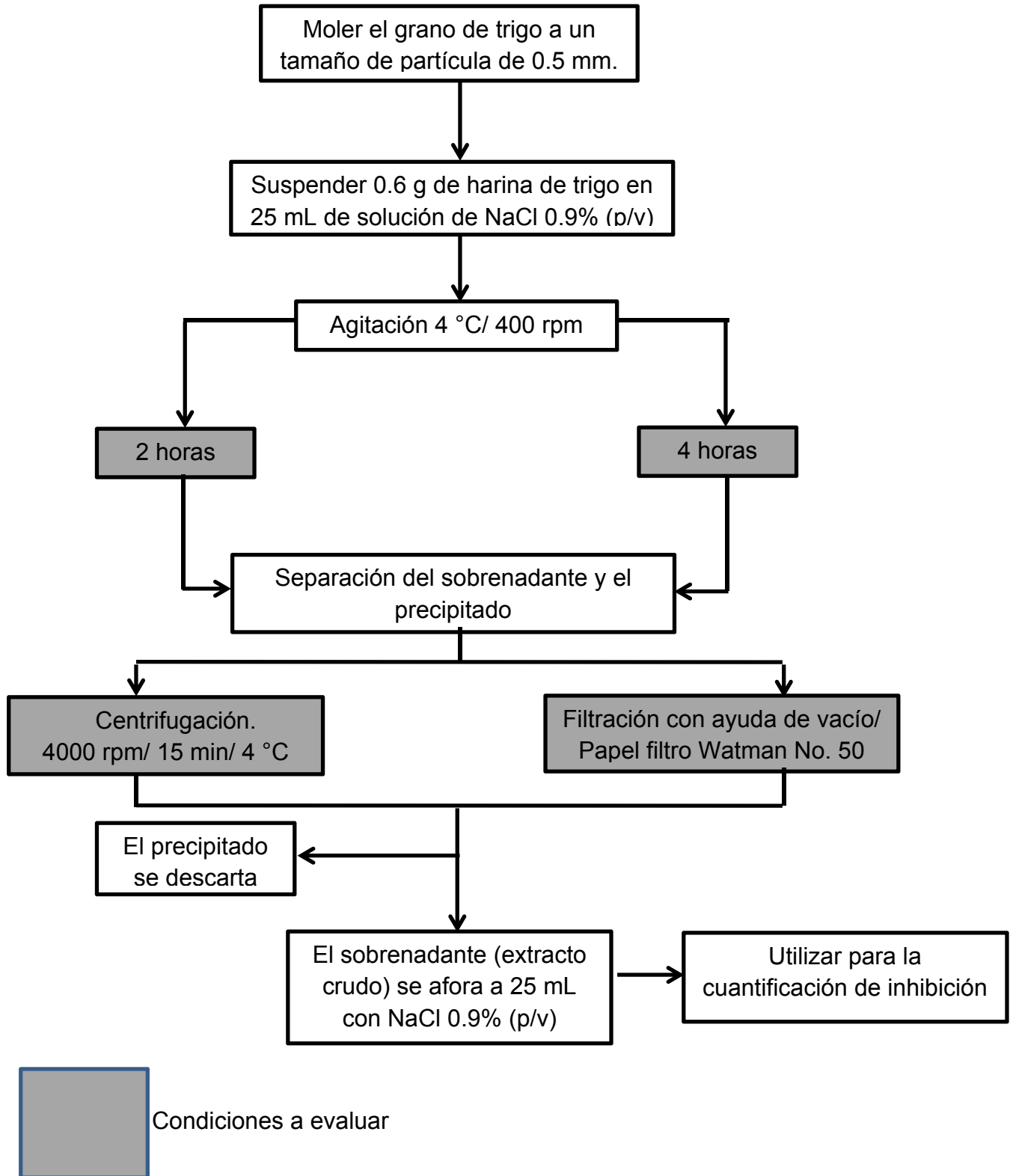


Figura 4. Procedimiento a evaluar para la extracción de inhibidores de α -amilasa de muestras biológicas.

Cuantificación: se colocaron 4 mL de solución enzimática con 4 mL de extracto en un tubo de ensaye, se agito en vortex y se incubó el sistema en un baño de agua durante 10 minutos y a las temperaturas por evaluar, después se tomaron 2 mL de la mezcla anterior y se añadieron a otro tubo de ensaye conteniendo 2 mL de solución de almidón a los pH ensayados, se incubó el sistema en un baño de agua a los tiempos y temperaturas estudiadas, posteriormente para detener y desarrollar el color se añadieron al sistema 2 mL de solución yodo-yoduro 1%, finalmente, esta se llevó a un aforo de 10 mL con agua destilada y se midió la absorbancia a 620 nm utilizando una celda de 0.5 cm con lo cual se obtiene la actividad enzimática del extracto . Para obtener la actividad enzimática del sistema (AES), se siguió el procedimiento descrito anteriormente, excepto que, se sustituyeron los 4 mL de extracto por 4 mL de agua. En la **figura 5**, se muestra de forma esquemática el método de cuantificación de los inhibidores de α -amilasa de las muestras biológicas.

Para la cuantificación se necesita preparar los siguientes blancos.

Blanco de espectrofotómetro (**BE**).

- Colocar en un tubo de ensaye 8 mL de agua y 2 mL de solución de yodo-yoduro 1 % (v/v)

Blanco del sistema (**BS**)

- Colocar en un tubo de ensayo 2 mL de almidón, 6 mL de agua y 2 mL de solución de yodo-yoduro 1 % (v/v)

Blanco de muestra 1 (**BM1**)

- Colocar en un tubo de ensaye 2 mL de almidón, 2 mL de solución de yodo-yoduro 1 % (v/v), 1 mL de extracto y 5 mL de agua

Blanco de muestra 2 (**BM2**)

- Colocar en un tubo de ensaye 2 mL de almidón, 1 mL de extracto, 1 mL de agua
- Incubar en un baño de agua (en las mismas condiciones de tiempo y temperatura que los extractos de las muestras biológicas)
- Al termino del tiempo de incubación, agregar 2 mL de solución de yodo-yoduro 1 % (v/v) y 4 mL de agua

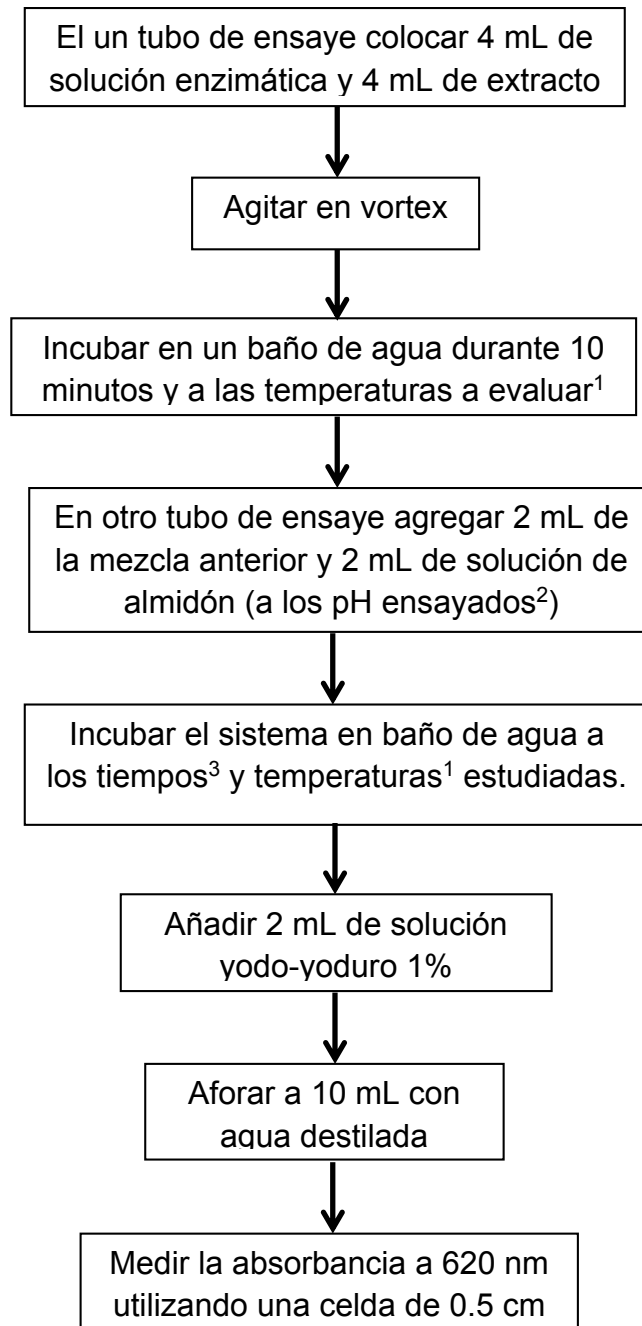


Figura 5. Procedimiento a evaluar para la cuantificación de inhibidores de α -amilasa.

¹Temperaturas a evaluar: 30 y 37 °C

²Condiciones de pH: 5.0, 6.0 y 7.0

³Tiempos a evaluar: 10, 15 y 20 minutos

Fase 2. Aplicación del método desarrollado a diferentes muestras vegetales crudas y con un tratamiento térmico previo.

Para validar la metodología implementada, se seleccionaron y ensayaron tres cereales: trigo, maíz y cebada; mientras que para el caso de leguminosas, estas fueron frijol, lenteja y garbanzo.

Con la finalidad de corroborar la sensibilidad al calor de los inhibidores enzimáticos con los procesos térmicos utilizados en la elaboración de estos alimentos, se les aplicó a cada una de las muestras un tratamiento térmico, con las condiciones térmicas utilizadas en su proceso de preparación más común.

RESULTADOS Y DISCUSION

Fase 1: Desarrollo del sistema enzimático y establecimiento de las condiciones de inhibición.

Se utilizó una muestra de trigo (*Triticum aestivum*) para establecer el sistema enzimático para determinar la actividad de la enzima α -amilasa, es por ello que se hizo un análisis proximal de este grano. A continuación se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 13. Análisis bromatológico de muestra de trigo (*Triticum aestivum*)^a.

Determinación	Método utilizado	Base húmeda ^b	Base seca ^b
Humedad	65°C Estufa con vacío	9.82 ± 0.058	-----
Lípidos	Goldfisch.	2.20 ± 0.041	2.44 ± 0.046
Cenizas	Mufla (550°C)	1.43 ± 0.061	1.59 ± 0.068
Proteína	Kjeldahl	10.00 ± 0.132	11.09 ± 0.147
Fibra cruda	Hidrólisis alcalina, Hidrólisis acida y calcinación	1.99 ± 0.094	2.21 ± 0.104
Hidratos de carbono digeribles ^c .	Por diferencia	74.56	82.67

^a se muestran los valores promedio \pm desviación estándar (n=3)

^b Resultados expresados en g del componente por cada 100g de muestra (%)

^c Los hidratos de carbono se calcularon por diferencia

El objetivo del análisis bromatológico fue para verificar la condición de los granos de trigo a utilizar para establecer este sistema enzimático. En la tabla anterior se muestran los resultados obtenidos, los cuales, al compararse con los reportados en la literatura (ver **tabla 1**) se observa que son muy parecidos (**12**).

Método de extracción.

En la **figura 4** se presenta el procedimiento para la extracción de la antiensima del material biológico, probándose dos tiempos de agitación y dos formas de separación del sobrenadante junto con el precipitado.

En la siguiente tabla se muestran los resultados obtenidos en cuanto al ensayo del tiempo de agitación; este proceso se llevo a cabo a una temperatura de 4 °C y 400 rpm.

Tabla 14. Condiciones de agitación de la muestra.

Tiempo de agitación	% actividad de la enzima ^a	% Actividad del extracto ^a	%inhibición	Distribución “t de student” ^b
2 horas	65.21 ± 0.5643	30.86 ± 0.1071	34.35	Significativamente
4 horas	65.21 ± 0.5643	30.63 ± 0.0594	34.58	iguales

^a Todas las determinaciones se hicieron por triplicado mostrándose en la tabla el promedio de los resultados obtenidos ± la desviación estándar (n=3).

^b Nivel de confianza del 95% ($\alpha = 0.05$)

Para la comparación de los resultados obtenidos se realizó un análisis estadístico, utilizando la prueba “t de student” que es una distribución de probabilidad que surge del problema de estimar la media de una población cuando el tamaño de la muestra es pequeño. Sirve para determinar si hay diferencia entre dos medias muestrales, construyendo un intervalo de confianza entre las medias de dos poblaciones; si la diferencia entre el valor promedio de las muestras entra dentro de este intervalo se considera que no hay diferencia significativa entre estas; pero en caso de que este valor no quede dentro del intervalo, las muestras son significativamente diferentes, para este análisis estadístico y los posteriores, se utilizó el programa “STATGRAPHICS plus” versión 5.1.

Al observar los resultados de las condiciones de agitación ensayadas y tomando en cuenta el análisis estadístico hecho, se observa que el tiempo de agitación no es un punto crítico en la metodología, debido a que el porcentaje de inhibición obtenido fue similar, por lo tanto, el tiempo de agitación que se propone es de 2 horas.

Para el proceso de separación del sobrenadante y el residuo se ensayó el método de centrifugación (4000 rpm/ 1 hora) y un método de filtración con vacío (papel filtro Watman número 50), en la siguiente tabla se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 15. Métodos de separación del sobrenadante y el precipitado.

Método	% actividad de la enzima ^a	% Actividad del extracto ^a	%inhibición	Distribución "t de student" ^b
Centrifugación	73.51 ± 0.8069	37.99 ± 0.0989	35.51	Significativamente diferentes
Filtración	73.51 ± 0.8069	48.74 ± 0.1563	24.76	

^c Todas las determinaciones se hicieron por triplicado mostrándose en la tabla el promedio de los resultados obtenidos ± la desviación estándar (n=3).

^b Nivel de confianza del 95% ($\alpha= 0.05$)

Los resultados anteriormente expuestos demuestran que los métodos utilizados para la separación del sobrenadante y el residuo son un punto crítico en la implementación de la metodología, ya que los resultados obtenidos para cada método muestran diferencia, también se observa que el método por el cual se obtienen mejores resultados de inhibición y con menores variaciones en los resultados es el método de centrifugación, es por ello, que para la implementación de la metodología, en cuanto al proceso de separación del sobrenadante y el precipitado, se utilizara el proceso de centrifugación.

Medición de la actividad de la enzima en el sistema y la muestra.

Una enzima tiene su máxima actividad en un rango de pH. El pH óptimo de una enzima depende de un número de parámetros experimentales como son el tiempo de reacción, temperatura, naturaleza y concentración del sustrato, naturaleza y concentración del buffer, la carga iónica del medio, la preparación de la enzima, etc. (1).

En la determinación de la actividad de la α -amilasa en el sistema y de la muestra estudiada, se evaluaron tres valores de pH, dos temperaturas y tres tiempos de incubación como se muestra en la **figura 5**.

Para determinar las condiciones de pH óptimas para la metodología se evaluaron tres pH: 5.0, 6.0 y 7.0. En la **tabla 16** se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 16. Actividad del sistema con tres pH diferentes.

pH del sistema	Actividad del sistema (%)	Actividad del extracto (%)	Inhibición (%)
5.0	83.45 \pm 0.39	62.18 \pm 3.45	21.27
6.0	83.93 \pm 0.38	42.57 \pm 1.23	44.36
7.0	84.28 \pm 0.87	57.42 \pm 1.97	26.85

Todas las determinaciones se hicieron por triplicado mostrándose en la tabla el promedio de los resultados obtenidos \pm la desviación estándar (n=3).

Como se muestra en los resultados, el pH es punto crítico en el desarrollo de la metodología ya que aunque no se observe una diferencia notable en la actividad del sistema aplicando diferentes condiciones de pH, si se observa un efecto sobre la actividad del extracto y por lo tanto también del porcentaje de inhibición.

El rango de pH óptimo para la enzima α -amilasa reportado en la literatura es de 5.0 a 7.0 (**1**), lo cual corrobora los resultados obtenidos en cuanto a la actividad del sistema, ya que se muestra una actividad similar a los tres pH estudiados, sin embargo, el porcentaje de actividad del extracto si se ve afectado, lo que indica que el pH afecta a los inhibidores contenidos en la muestra estudiada, mostrando que el pH óptimo de los inhibidores de la muestra es de 6.0 ya que a este pH se mostró una mayor inhibición, por lo tanto, el pH que se utilizará en la metodología es de 6.0.

Como se dijo anteriormente existen varios parámetros o condiciones que afectan un sistema enzimático, una de estas condiciones son el tiempo y

temperatura de incubación, es por ello que para el desarrollo de la metodología se probaron tres tiempos y dos temperaturas de incubación.

Para el estudio del efecto que tiene el tiempo y temperatura de incubación en el sistema se siguió el procedimiento esquematizado en las **Figuras 4 y 5**, tomando en cuenta las condiciones establecidas anteriormente, es decir, en el proceso de extracción 2 horas de agitación y centrifugación para la separación del sobrenadante y el residuo y en la cuantificación un pH de 6.0. En la **Tabla 17 y Figura 6** se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 17. Resultados de la actividad enzimática.

Incubación a tres tiempos y 30 °C			
Tiempo de incubación (min)	Actividad del sistema (%)	Actividad del extracto (%)	Inhibición (%)
10	59,81 ± 0,64	51,53 ± 1,89	8,28
15	68,57 ± 0,57	57,29 ± 1,64	11,28
20	86,53 ± 0,59	41,47 ± 0,95	45,06
Incubación a tres tiempos y 37 °C			
Tiempo de incubación (min)	Actividad del sistema (%)	Actividad del extracto (%)	Inhibición (%)
10	63,29 ± 0,65	54,26 ± 1,56	9,03
15	75,86 ± 0,26	53,84 ± 0,54	22,02
20	88,98 ± 0,04	43,87 ± 0,45	45,11

Todas las determinaciones se hicieron por triplicado mostrándose en la tabla el promedio de los resultados obtenidos ± la desviación estándar (n=3).

Observando los resultados obtenidos en la **tabla 17 y la figura 6** con respecto a los tiempos de incubación se muestra que hay una tendencia directamente proporcional entre los tiempos de incubación y los porcentajes de actividad del sistema y el extracto para las dos temperaturas estudiadas, también en la **tabla 17** se observa que la variación en los resultados es menor en un tiempo de 20 minutos, por otro lado, se necesita una actividad del sistema alta para que se pueda apreciar mejor el porcentaje de inhibición, por lo anterior, en el desarrollo de la metodología se establecerá un tiempo de incubación de 20 minutos.

Con respecto a la temperatura de incubación se observa que el porcentaje de actividad del sistema en todos los tiempos es mayor en la temperatura de 37 °C, por

lo tanto; se utilizará la temperatura de 37 °C en el desarrollo de la metodología, también cabe mencionar que, en ciertas zonas geográficas, la temperatura ambiental supera los 30 °C, lo que ocasionaría una mayor complicación en el proceso de incubación de la metodología.

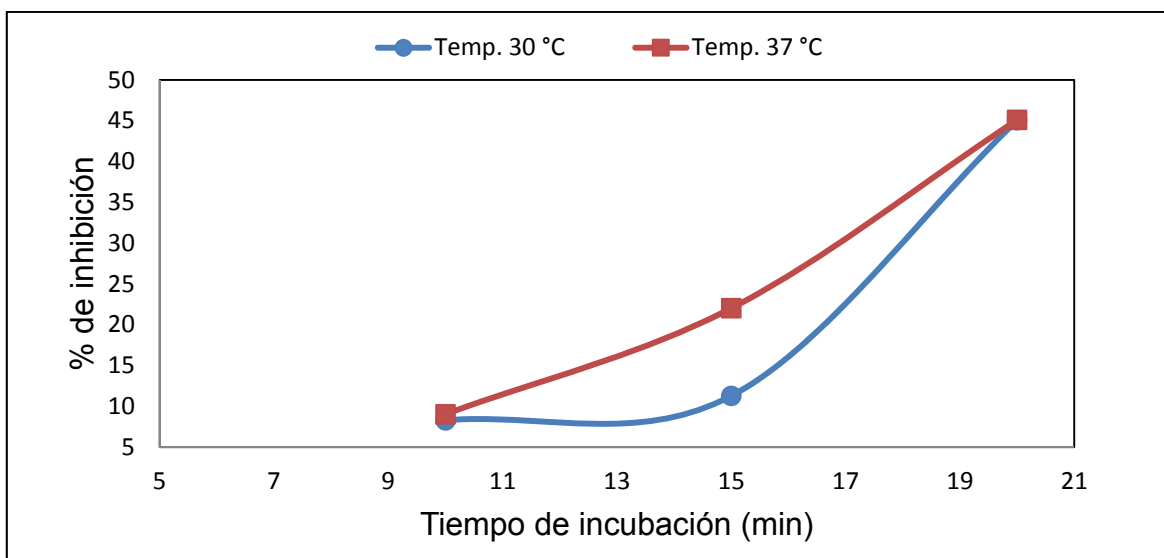


Figura 6. Actividad de inhibición a diferentes tiempos y temperaturas

Definición de la actividad inhibitoria (unidades de inhibición)

Tomando en consideración los resultados obtenidos con anterioridad y las condiciones evaluadas, la definición de una unidad de inhibición de α -amilasa (UIA) es la siguiente:

1 UIA se define como la cantidad de inhibidor que causa un 1% de inhibición de la enzima α -amilasa a 37 °C, pH 6.0 en 20 minutos dentro de las condiciones de la metodología propuesta (sistema desarrollado)

$$1 \text{ UIA} = 1\% \text{ de inhibición}$$

Una vez obtenidos los resultados anteriores, en las **Figuras 7, 8** se presenta en método de extracción y el método de cuantificación respectivamente y en la **Figura 9** se representa de forma esquemática la metodología completa desarrollada que se propone.

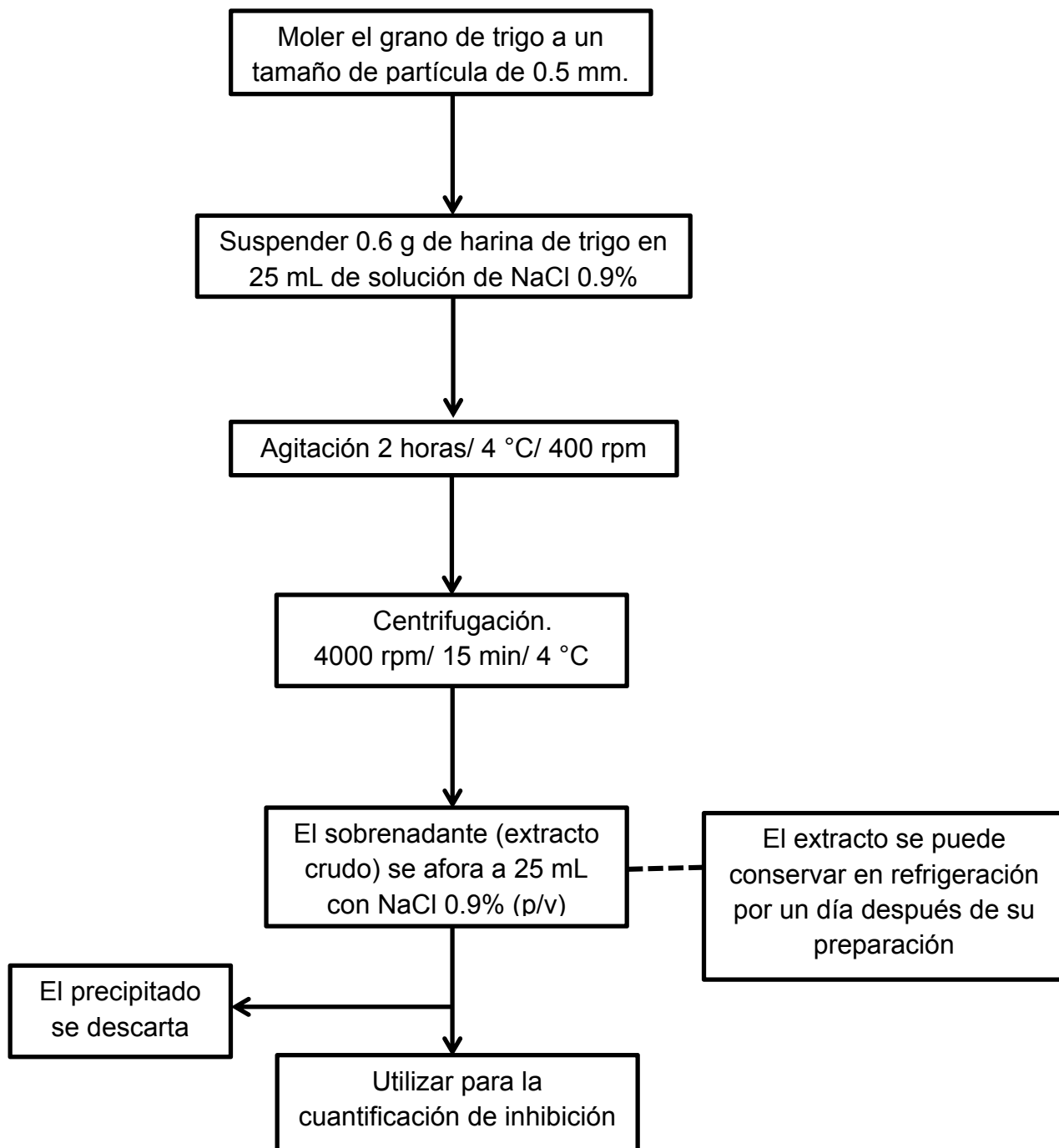


Figura 7. Procedimiento final para la extracción de inhibidores de α -amilasa en muestras biológicas.

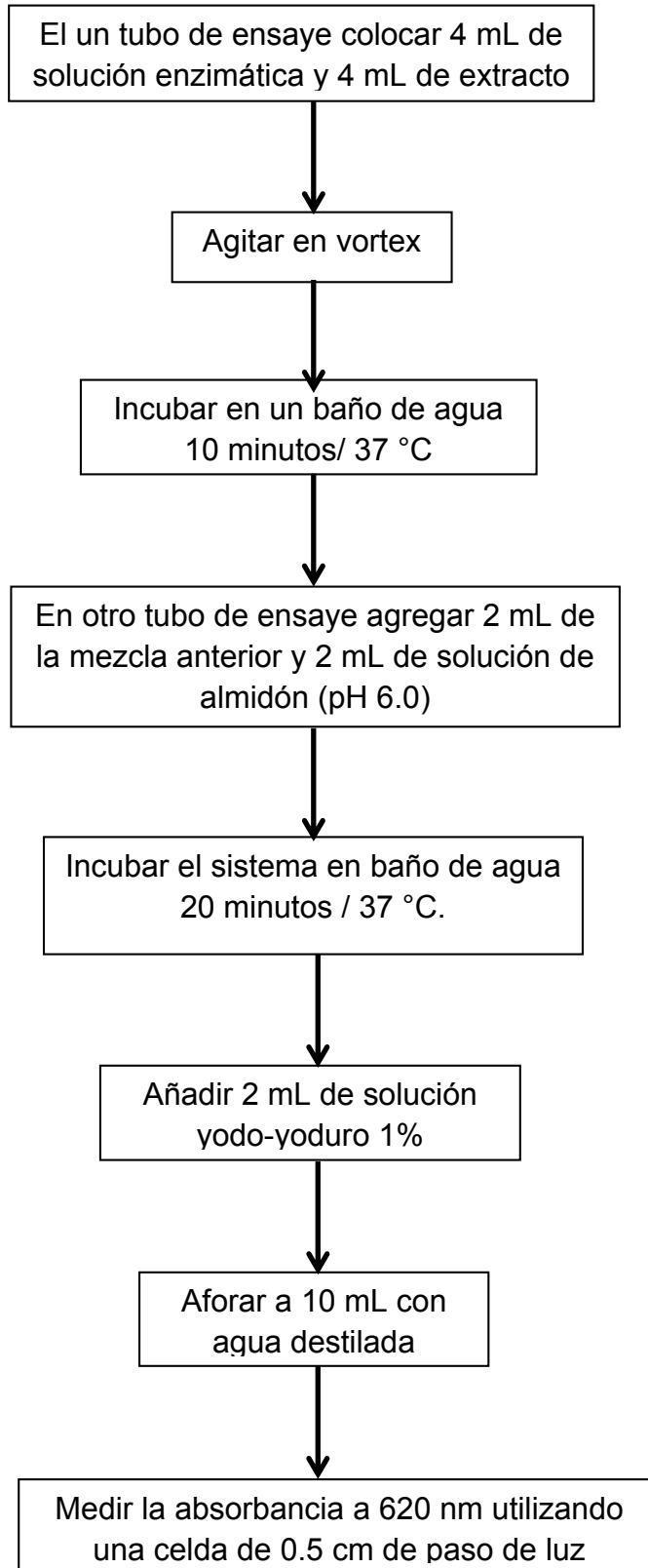
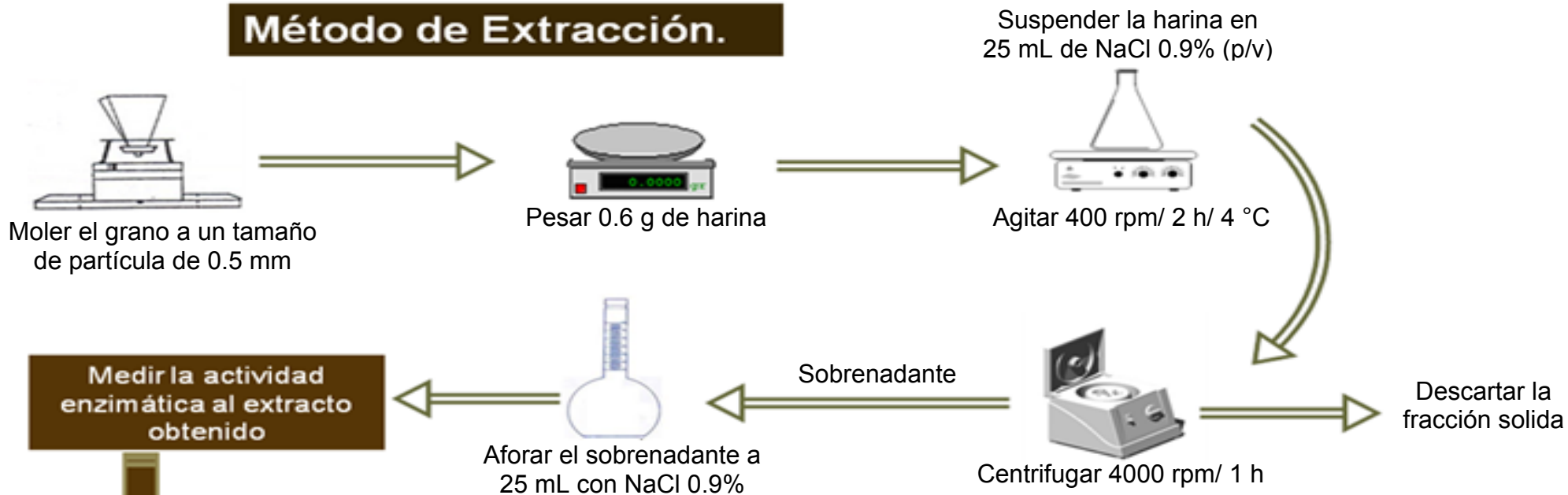


Figura 8. Procedimiento final para la cuantificación de inhibidores de α -amilasa en muestras biológicas.

Método de Extracción.



Método de medición de la actividad enzimática.

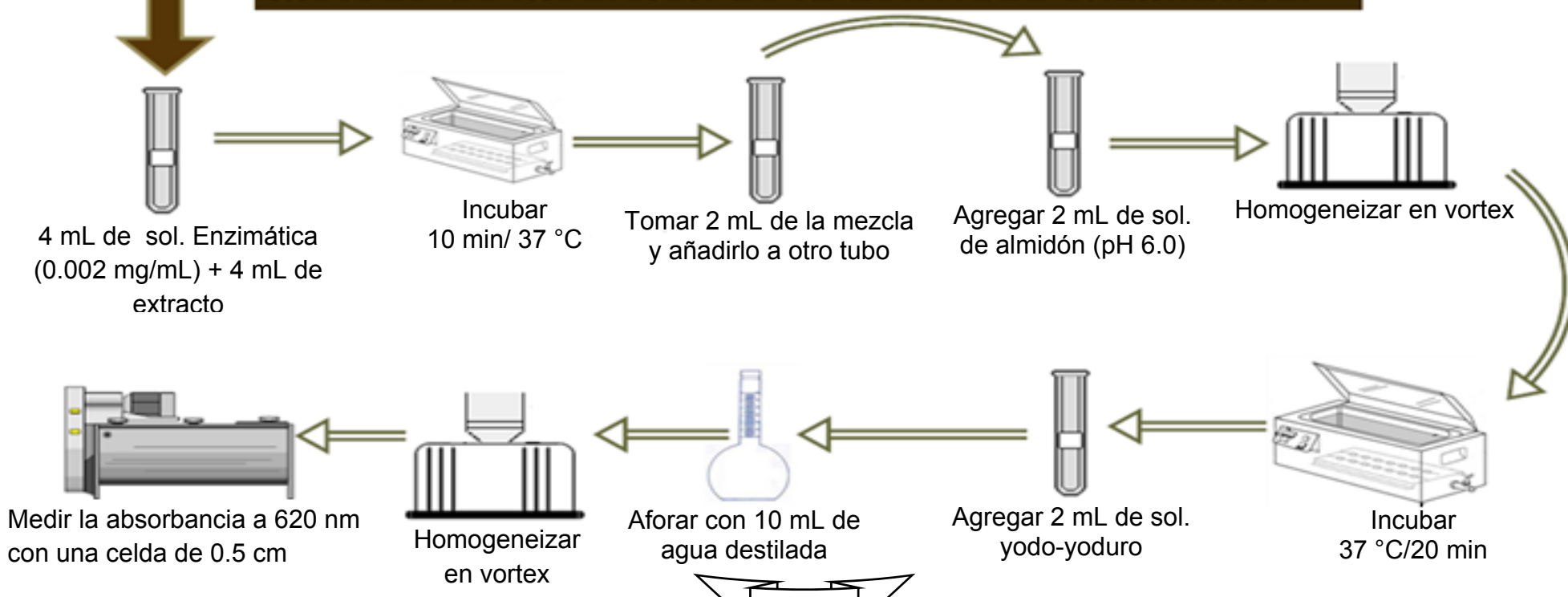


Figura 9. Método desarrollado para extraer y cuantificar inhibidores de α -amilasa en muestras biológicas

Para determinar la cantidad de UIAs que se reportan por gramo de muestra, la forma para calcularlo es la siguiente:

$$\% \text{ actividad enzimática del sistema (\% AES)} \qquad \% AES = \frac{BS - ASE}{BS} \times 100$$

$$\% \text{ actividad enzimática del extracto (\% A1)} \qquad \% A1 = \frac{BM1 - BM2}{BM1} \times 100$$

$$\% \text{ actividad enzimática total (extracto + enzima) (\% A2)} \qquad \% A2 = \frac{BM1 - AEE}{BM1} \times 100$$

$$\% \text{ actividad enzimática con inhibición (\% AEI)} \qquad \% AE = \% A2 - \% A1$$

$$\% \text{ Actividad de inhibición (\% AI)} \qquad \% AI = \% AES - \% AEI$$

$$\frac{UIA}{g \text{ muestra}} = \left(\frac{\% AI}{1 \text{ mL extracto}} \right) \left(\frac{Vol. aforo (mL)}{\text{peso muestra (g)}} \right)$$

Dónde: BS: blanco del sistema

ASE: absorbancia de la solución enzimática

BM1: blanco de muestra 1

BM2: blanco de muestra 2

AEE: absorbancia enzimática del extracto

Vol. aforo: es el volumen final al cual se aforo en el proceso de extracción

A continuación se muestra un ejemplo para calcular las UIA/ g de muestra a partir de datos obtenidos experimentalmente con la metodología implementada.

Peso de la muestra: 0.6046 g

Tabla 18. Datos experimentales para calcular la actividad enzimática del sistema

Actividad enzimática del sistema		Actividad enzimática del extracto	
Repetición	Absorbancia	Repetición	Absorbancia
1	0.098	1	0.026
2	0.101	2	0.033
3	0.096	3	0.031
4	0.104	BM1	0.353
5	0.111	BM2	0.124
6	0.116		
7	0.117		
8	0.118		
9	0.115		
BS	0.486		

Para ejemplificar el cálculo de la actividad enzimática del sistema, se tomara el dato de la repetición 1.

$$\% AES = \frac{BS - ASE}{BS} \times 100$$

$$\% AES = \frac{0.486 - 0.098}{0.486} \times 100 = 79.84\%$$

De la misma manera como se obtuvo el resultado de la repetición 1, se calculan las demás repeticiones, después se hace un promedio de todos los resultados obtenidos y se calcula la desviación estándar y el coeficiente de variación y nos quedará este resultado:

Promedio (%)	77.69
SD	1.80
CV (%)	2.31

Para ejemplificar el cálculo de la actividad enzimática del extracto, se tomara el dato de la repetición 1.

% actividad enzimática del extracto (% A1)

$$\% A1 = \frac{BM1 - BM2}{BM1} \times 100 \qquad \% A1 = \frac{0.353 - 0.124}{0.353} \times 100 = 64.87 \%$$

% actividad enzimática total (extracto + enzima) (% A2)

$$\% A2 = \frac{BM1 - AEE}{BM1} \times 100 \qquad \% A2 = \frac{0.353 - 0.026}{0.353} \times 100 = 90.65 \%$$

El %A2 se calcula de la misma manera para todas las repeticiones, después se hace un promedio de todas los resultados obtenidos, en este caso el promedio de %A2 es: 91.50%.

% actividad enzimática con inhibición (%AEI)

$$\% AEI = \%A2 - \%A1 \qquad \% AEI = 91.50 - 64.87 = 26.63\%$$

% Actividad de inhibición (% AI)

$$\% AI = \%AES - \%AEI \qquad \% AI = 77.69 - 26.63 = 51.06 \%$$

Por ultimo las UIA/ g de muestra se calculan de la siguiente forma

$$\frac{UIA}{g \text{ muestra}} = \left(\frac{\% AI}{1 \text{ mL extracto}} \right) \left(\frac{Vol. aforo (mL)}{\text{peso muestra (g)}} \right)$$

$$\frac{UIA}{g \text{ muestra}} = \left(\frac{51.06}{1 \text{ mL extracto}} \right) \left(\frac{25 \text{ mL}}{0.6046 \text{ g}} \right) = 2111 \frac{UIA}{g \text{ muestra}}$$

Fase 2. Aplicación del método propuesto a diferentes muestras biológicas.

Referente a la **Fase 2** que corresponde a la aplicación del método desarrollado a diferentes muestras biológicas, una vez implementado el método de cuantificación de inhibidores de α -amilasa, éste se aplicó a tres cereales (Trigo, Maíz y Cebada) y a tres leguminosas (Frijol, Lenteja y Garbanzo) crudas y con un tratamiento térmico.

Muestras biológicas sin tratamiento térmico.

A continuación se presenta en la **Tabla 19**. Los resultados para los tres cereales y tres leguminosas sin tratamiento térmico.

Tabla 19. Resultados en muestras vegetales sin tratamiento térmico.

Muestra	Concentración (mg mL ⁻¹) ^a	% inhibición	UIA/ g muestra	UIA/g muestra promedio ^b	CV (%)
Trigo	24.61	52.71	2141.61	2110.77	1.47
	24.18	51.06	2111.21		
	24.28	50.50	2079.49		
Cebada	24.20	55.44	2291.30	2280.10	2.65
	23.98	55.96	2334.10		
	24.50	54.26	2214.89		
Maíz	21.89	55.11	2517.65	2472.68	2.10
	22.25	55.27	2484.39		
	22.25	53.75	2415.99		
Frijol	24.70	4.63	187.54	186.05	0.90
	25.04	4.61	184.23		
	24.81	4.62	186.39		
Lenteja	24.95	28.50	1142.26	1161.00	3.85
	24.93	28.14	1128.67		
	24.98	30.28	1212.06		
Garbanzo	24.65	1.17	47.58	45.83	5.09
	23.78	1.03	43.19		
	24.00	1.12	46.73		

^a Cada valor representa el promedio de una determinación por triplicado (n=3).

^b Valor promedio global de todas la determinaciones (n=9).

Se pesaron 600 ± 50 mg de muestra para cada repetición de cada una de las repeticiones, observándose que en este rango, mostro muy poca variación el porcentaje de inhibición, corroborándose esto con el coeficiente de variación, como se observa en la **Tabla 19**. También se observa que los cereales tienen mayor cantidad de UIA's que las leguminosas.

Como se mencionó anteriormente, los resultados muestran poca variación para cada tipo de grano, sin embargo, se hizo un análisis de varianza para asegurar que la varianza en los resultados obtenidos para cada grano son menores a 5%, en la **tabla 20** se muestran los resultados obtenidos de este análisis estadístico.

Tabla 20. Análisis de varianza para cada grano.

Muestra	UIA/ g muestra	Análisis de varianza ^a
Trigo	2141.61	Significativamente iguales
	2111.21	
	2079.49	
Cebada	2291.30	Significativamente iguales
	2334.10	
	2214.89	
Maíz	2517.65	Significativamente iguales
	2484.39	
	2415.99	
Frijol	187.54	Significativamente iguales
	184.23	
	186.39	
Lenteja	1142.26	Significativamente iguales
	1128.67	
	1212.06	
Garbanzo	47.58	Significativamente iguales
	43.19	
	46.73	

^a Nivel de confianza del 95% ($\alpha= 0.05$)

Los resultados obtenidos con el análisis estadístico corroboran que no existe diferencia significativa o una varianza mayor al 5% para cada tipo de grano, por lo tanto, lo que se puede concluir acerca de este análisis estadístico es que la metodología tiene una adecuada precisión.

Por otro lado, comparando los resultados de la **Tabla 19**, se observa que el contenido de UIA es diferente para cada muestra, sin embargo, se hizo un análisis estadístico para verificar lo anterior y en la **Tabla 21** se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 21. Análisis de varianza para cada grano.

Muestra	UIA/ g muestra	Análisis de varianza ^a	Grupos homogéneos ^{a,b}
Trigo	2141.61 2111.21 2079.49	Las muestras son significativamente diferentes	X
Cebada	2291.30 2334.10 2214.89		X
Maíz	2517.65 2484.39 2415.99		X
Frijol	187.54 184.23 186.39		X
Lenteja	1142.26 1128.67 1212.06		X
Garbanzo	47.58 43.19 46.73		X

^a Nivel de confianza del 95% ($\alpha= 0.05$)

^b Test de rangos múltiples.

En la **Tabla 21** se muestran los resultados del análisis estadístico, por un lado, se realizó un análisis de varianza el cual muestra que el contenido de UIA para las muestras es diferente, no obstante, el análisis de varianza no nos asegura que todas las muestras sean diferentes, es por ello, que también se hizo un test de rangos múltiples, el cual nos indica si todas las muestras son diferentes o hay grupos de muestras que sean significativamente iguales; los resultados obtenidos con este análisis indican que todas las muestras son diferentes, ya que no existen grupos homogéneos entre las muestras estudiadas. De este análisis estadístico se deduce

que la metodología tiene buena discriminación, ya que el contenido de UIA para cada muestra es diferente.

Muestras biológicas con tratamiento térmico.

Se aplicó un proceso térmico a las muestras, simulando las condiciones de procesamiento con las cuales se preparan los alimentos comúnmente; así para el trigo y la cebada se simuló en proceso de panificación (33), para el maíz, el proceso de nixtamalización (34) y para las leguminosas un proceso tradicional de cocción (35). En la **Tabla 3**. se muestran las condiciones del proceso térmico para cada muestra

Tabla 22. Condiciones de tratamiento térmico.

Muestra	Tratamiento
Trigo y Cebada	Horneado 220 °C/ 20 min/ humedad 15%
Maíz	Relación Grano: Agua 1:3; 1.5% Ca(OH) Cocción: 90 °C/ 40 min
Frijol, Lenteja y Garbanzo (14)	Relación semilla: agua 1:2 Autoclave: 121 °C (1.5 Kg/cm ²) / 15 min

Después de aplicar el tratamiento térmico a las muestras de acuerdo a la **tabla 22**, las muestras se secaron en una estufa de circulación forzada a 55 °C, posteriormente, se realizó un acondicionamiento a las muestras para tenerlas en forma de harina en forma similar que los granos crudos y se hizo la cuantificación de UIA en las mismas, en la **tabla 23** se muestran los resultados obtenidos.

Cuando se aplicó el tratamiento térmico a las muestras de frijol, lenteja y garbanzo no se consumió toda el agua de cocción, es por ello que se realizó una liofilización al agua de cocción, para evitar pérdidas del grano cocido que pudiera haber si se descarta esta agua de cocción.

Tabla 23. Resultados en muestras vegetales con tratamiento térmico.

Muestra	Concentración (mg mL ⁻¹) ^a	% inhibición	UIA/ g muestra	UIA/g muestra promedio ^b	CV (%)
Trigo	24.55	-4.27	-173.89	-166.74	-11.77
	24.14	-3.49	-144.55		
	24.33	-4.42	-181.77		
Cebada	24.03	-4.92	-204.80	-186.51	-8.63
	23.88	-4.30	-180.21		
	24.38	-4.25	-174.53		
Maíz	40.04	-0.09	-2.37	8.59	132.01
	40.09	0.32	7.87		
	40.44	0.82	20.28		
Frijol	24.96	-0.19	-7.57	-25.98	-2.06
	24.98	-0.94	-37.59		
	24.93	-0.82	-32.77		
Lenteja	25.05	-7.97	-318.15	-297.28	-6.33
	24.95	-7.03	-281.65		
	24.92	-7.28	-292.03		
Garbanzo	23.88	-6.97	-291.87	-248.47	-1.61
	24.46	-6.49	-265.12		
	24.02	-4.53	-188.43		

^a Cada valor representa el promedio de una determinación por triplicado (n=3).

^b Valor promedio global de todas la determinaciones (n=9).

Como se observa en la **Tabla 23**, el tratamiento térmico aplicado a las muestras, es suficiente para inactivar los inhibidores que en ellas se encuentran, también se observa que las α -amilasas que se encuentran en las muestras biológicas son resistentes al calor (**14**), ya que en todas las muestras, después del tratamiento térmico, había actividad enzimática, encontrándose una mayor actividad en las semillas de lenteja y en menor grado en el maíz, también se observa que la variación de los resultados es mayor comparándolos con los resultados de las muestras sin tratamiento térmico. Por otro lado, es importante resaltar que aunque en la **Tabla 23** no se presentan estos datos, la actividad enzimática de las muestras tratadas con calor es mucho menor que actividad enzimática de las muestras sin tratamiento.

Cabe mencionar que los valores obtenidos no pueden ser comparados con los reportados en la bibliografía, ya que para determinar la actividad de inhibición, se

realiza con otro sistema enzimático (metodologías diferentes) que ocupa diferentes condiciones de pH, tiempo, temperatura y reactivos, en especial la enzima (α -amilasa) y se expresan la actividad inhibitoria en otras unidades (**6, 37, 38**).

CONCLUSIONES

- En cuanto al diseño de la metodología para la cuantificación de inhibidores de α -amilasa es importante respetar la metodología especialmente al trabajar en las condiciones de pH (6.0), tiempo (20 min) y temperatura (37 °C) de incubación descritas, debido a que se utiliza un sistema enzimático y un pequeño cambio o variación en las condiciones especificadas, tendrá un cambio significativo en la cuantificación de los inhibidores.
- En cuanto al establecimiento de las condiciones y definición de las UIA se hace tomando como base los resultados obtenidos, favoreciendo, de tal manera que la metodología en general tenga una reproducibilidad mayor.
- Los reactivos utilizados en la metodología son accesibles, de bajo costo y de baja toxicidad, además de que los residuos que se generan causan un mínimo efecto en el medio ambiente, en comparación con los reactivos que se utilizan en otras metodologías para la cuantificación de estos inhibidores.
- La metodología propuesta cuantifica a los inhibidores de α -amilasa de manera general, es decir, que no caracteriza y cuantifica un inhibidor de α -amilasa en particular. Lo que se busco fue diseñar una metodología que sea rápida, discriminativa y precisa que se pueda aplicar de manera rutinaria para la cuantificación de inhibidores de α -amilasa en cereales y leguminosas.
- La metodología es precisa, ya que se obtienen resultados con coeficientes de variación adecuados, es discriminativa y relativamente rápida (aproximadamente 5 horas) comparándola con otras metodologías que para hacer la cuantificación de inhibidores pueden llegar a tomar varios días.

- En las muestras biológicas de cereales y leguminosas seleccionadas para el presente estudio, el contenido mayor de inhibidores de α -amilasa se encontró en el Maíz y Lenteja respectivamente
- Con respecto a los tratamientos térmicos que se aplicaron se concluye que con la aplicación del proceso térmico más común para granos y semillas de cereales y leguminosas estudiadas, es más que suficiente para la inactivación de estas antienzimas.
- El tratamiento con calor utilizado no desnatura todas las α -amilasas que se encuentran en las muestras biológicas, lo cual nos indica que la α -amilasa es una enzima relativamente termoestable en comparación con otras enzimas (la mayoría) a las cuales si se les aplican las mismas condiciones térmicas se desnaturalizan completamente.

BIBLIOGRAFIA

1. Whitaker J. R., 1972, Principles of enzymology for the food sciences. Ed. Marcel Dekker, Inc. New York, Pp. 257,287, 447-450.
2. Franco O. L., Rigden D. J., Melo F. R., Bloch Jr C., Silva C. P and Grossi de Sá M. F, 2000, Activity of wheat α -amylase inhibitors towards bruchid α -amylases and structural explanation of observed specificities. *European Journal of Biochemistry*. 267(8): 2166-2173.
3. Shahidi F. 1995, Beneficial health effects and drawback of antinutrients and phytochemicals in foods. In Shahidi F. Antinutrients and phytochemicals in food. Washington, D.C.: Americal Chemical Society; Pp. 1-9.
4. Valle V. P. y Lucas F. B., 2000, Toxicología de alimentos. 1ª ed. México, D. F. Pp. 93 (ISBN 92-75-37004-4)
5. Jyothi K. S., Hemalatha P. and Challa S. 2011. Evaluation of α -amylase inhibitory potential of three medicinally important traditional wild food plants of India. *International Journal of Green Pharmacy*. April-June: 95-99.
6. Sathishkumar T., Abarna S., Malini M., Nithya S., Prathishta P. and Lavanya J. 2011. Optimal extraction process and identification of A-amylase inhibitors from *Pouteria sapota*. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 3(4): 124-128.
7. Gupta L. H., Badole S. L., Bodhankar S. L. and Sabharwal S. G. 2011. Antidiabetic potential of α -amylase inhibitor from the seeds of *Macrotyloma uniflorum* in

- streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic mice. *Pharmaceutical Biology*. 49(2): 182-189.
8. Valencia A., Bustillo A. E., Ossa G. E. and Chrispeels M. J. 2000. α -amylases of the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) and their inhibition by two plant amylase inhibitors. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 30: 207-213.
 9. Priya S., Kaur N. and Gupta A. 2010. Purification, characterization and inhibition studies of α -amylase of *Rhyzopertha dominica*. *Pestide Biochemistry and Physiology*. 98: 231-237.
 10. Berg M. J., Tymoczko L. J. y Stryer L. 2008, Bioquímica, Ed. Reverte. Barcelona, Pp 183-193
 11. Hosney C. 1991. Principios de ciencia y tecnología de los cereales. Ed. Acribia, Zaragoza, Pp. 31.39, 51. 56, 71
 12. Astiasaran A. I. y Martinez H. J. 2000. Alimentos: composición y propiedades. Ed. Mc Graw Hill Interamericana. Madrid, Pp. 135, 137, 139, 152-153.
 13. Wong D. W., Robertson G. H. 2003, α -Amylases. In: Whitaker J. R., Voragen A. G., Wong D. W. Handbook of food enzymology. 1a ed. Marcel Dekker, Inc., New York, Pp. 693-704.
 14. Buscador: google. Consultado el 4 de abril del 2013. Responsable de la página IUBMB (International Union of Biochemistry and molecular Biology)

<http://www.enzyme-database.org/query.php?ec=3.2.1.1>
 15. Sidney P. C. and Nathan O. K. 1995. Amylases α and β . *Methods in enzymology*, 1: 149-158

16. Rinderknecht H., Wilding P. and Haverback B., 1967, A new method for the determination of alpha-amylase. *Experientia*. 23(10): 805
17. Linko Y., Saarinen P. and Linko M., 1975, Starch conversion by soluble and immobilized α -amylase. *Biotechnology and Bioengineering*. 17: 153-165.
18. Wong S. D., Batt B. S. and Robertson H. G., 2000, Microassay for rapid screening of α -amylase activity. *J. Agric. Food Chem.* 48: 4540-4543.
19. Costas G. B. 2009. Structural transitions and related physical properties of starch. In: BeMiller J., Whistler R. Starch: Chemistry and technology. 3ra ed., Elsevier, New York Pp. 332-354
20. Sobolewska-Zielinska J. and Fortuna T., 2010, Retrogradation of starches and maltodextrins of origin various. *Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria*. 9(1): 71-78.
21. Buscador: google. Consultado el 8 de abril del 2013. Responsable de la página SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Social, Pesca y Alimentación).
http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/Estudios_promercado/GRANOS.pdf
22. Muller H. G. y Tobin G. 1980. Nutrición y ciencia de los alimentos. Ed. Acribia. Zaragoza. Pp. 119.124, 133.135, 145-146.
23. Buscador: google. Consultado el 7 de abril del 2013. Responsable de la página SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera).
http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=14&Itemid=20

24. Buscador: google. Consultado el 11 de abril del 2013. Responsable de la página FAOSTAT (Food and Agriculture Organization of the United Nations).

<http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>

25. Buscador: google. Consultado el 11 de abril del 2013. Responsable de la página SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Social, Pesca y Alimentación).

<http://www.aserca.gob.mx/secsa/estudios/garbanzo.pdf>

26. Buscador: google. Consultado el 11 de abril del 2013. Responsable de la página SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera).

http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=191&Itemid=427

27. Rodríguez C., Frias J., Vidal-Valverde C. y Hernández A. 2008. Correlations between some nitrogen fractions, lysine, histidine, tyrosine, and ornithine contents during the germination of peas, beans, and lentils. *Food Chemistry*. 108: 245-252

28. Porres M. J., López-Jurado M., Aranda P. P. and Urbano G. 2003. Effect of heat treatment and mineral and vitamin supplementation on the nutritive use of protein and calcium from lentils (*Lens culinaris M*). in growing rats. *Nutrition*. 19(5): 451-456

29. Hefnawy T. H. 2011. Effect of processing methods on nutritional composition and antinutritional factors in lentils (*Lens culinaris*). *Annal of Agricultural Science*. 56(2): 57-61

30. Feng G. H., Richardson M., Chen M. S., Kramer K. J., Morgan T. D. and Reeck G. R. 1996. α -amylase inhibitors from wheat: amino acid sequences and patterns of inhibition of insect and human α -amylases. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 26(5): 419-426
31. Horwitz W. and Latimer G. 2005. Official Methods of Analysis of AOAC International, 18a ed, published AOAC International, Maryland, Chapter 27 pp. 30-31, 37, Chapter 32 p. 22-25.
32. Snell F. D., Snell C. T. and Snell C. A. 1961. Colorimetric methods of analysis. Vol. II A. D' Van Nostrand Company, Inc. New Jersey. Pp. 220-223
33. Mesas J. M. y Alegre M. T. 2002. El pan y su proceso de elaboración. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*. 3(5): 307-313
34. Castillo V. K., Ochoa M. L., Figueroa C. J., Delgado L. E., Gallegos I. J. y Morales C. J. 2009. Efecto de la concentración de hidróxido de calcio y tiempo de cocción del grano de maíz (*Zea mays* L.) nixtamalizado, sobre las características fisicoquímicas y reológicas del nixtamal. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 59(4): 425-432.
35. Flores Landero, C. 2010. Proceso óptimo de cocción de una variedad de frijol (*Phaseolus vulgaris*) de amplio consumo con un alto contenido de lectinas. Tesis de la Fac. de Química, UNAM, México, D.F. Pp. 37-38
36. Mehrabadi M., Bandani A. R. and Saadati F. 2010. Inhibition of sunn pest, *Eurygaster integriceps*, α -amylases by α -amylase inhibitors (T- α AI) from Triticale. *Journal of Insect Science*. 10:179

37. Islamov R.A. and Fursov O. V. 2007. Bifunctional inhibitor of α -amylase/trypsin from wheat grain. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 43(4): 379-382