



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

“IMPORTANCIA DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN EL DETERIORO
DEL AMARANTO PROVOCADO POR UN ALMACENAMIENTO
INADECUADO”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERA EN ALIMENTOS

P R E S E N T A:

PÉREZ ZÁRATE FRIDA EDME

ASESOR: Dr. ENRIQUE MARTÍNEZ MANRIQUE

COASESOR: I.A VERÓNICA JIMÉNEZ VERA

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MEXICO, 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.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ
Jefa del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el Art. 28 del Reglamento de Exámenes Profesionales nos permitimos comunicar a usted que revisamos la: **TESIS**

Importancia del estrés oxidativo en el deterioro del amaranto provocado por un almacenamiento inadecuado

Que presenta la pasante: **Frida Edme Pérez Zárate**

Con número de cuenta: **40807194-9** para obtener el Título de: **Ingeniera en Alimentos**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

“POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 14 de noviembre de 2012.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	IA. Laura Margarita Cortazar Figueroa	
VOCAL	Dra. Elsa Gutiérrez Cortez	
SECRETARIO	Dr. Enrique Martínez Manrique	
1er SUPLENTE	IA. Miriam Álvarez Velasco	
2do SUPLENTE	IA. Verónica Romero Arreola	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 120).
HHA/pm

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis se realizó bajo la asesoría del Dr. Enrique Martínez Manrique y la I.A Verónica Jiménez Vera en el Laboratorio de Bioquímica y Fisiología de Granos y Semillas (Laboratorio 8) de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria (UIM) ubicada en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Agradecemos el apoyo brindado para la realización de esta tesis al proyecto PAPIIME con clave: PE-200113.

El Jurado de Examen Profesional estuvo constituido por:

Presidente	IA. Laura Margarita Cortazar Figueroa	FES-Cuautitlán, UNAM
Vocal	Dra. Elsa Gutiérrez Cortez	FES-Cuautitlán, UNAM
Secretario	Dr. Enrique Martínez Manrique	FES-Cuautitlán, UNAM
Suplente	IA. Miriam Álvarez Velasco	FES-Cuautitlán, UNAM
Suplente	IA. Verónica Romero Arreola	FES-Cuautitlán, UNAM

AGRADECIMIENTOS

A MIS PADRES:

Gracias por el apoyo y ejemplo que en cada segundo de mi vida me han brindado.

Por sus cuidados, amor y comprensión.

Por sus sabios consejos que me orientaron por el camino recto de la vida.

Pero gracias principalmente por tener en ustedes a mis mejores amigos.

Con respeto y admiración.

Los Amo.

A MIS SERES QUERIDOS MÁS CERCANOS:

A quienes guardo profundo agradecimiento por sus consejos y por el enorme cariño que siempre me han brindado.

A MIS PROFESORES:

Que a lo largo de mis estudios han dejado alguna huella en mi formación; en especial al Dr. Enrique Martínez Manrique y a la I.A Verónica Jiménez Vera por su valiosa orientación profesional y confianza depositada para la elaboración de este trabajo.

A MIS AMIGOS:

Gracias por estar conmigo en todo este tiempo donde hemos vivido momentos inolvidables, pero sobre todo por su cariño, para el cual no existen palabras que expresen el significado de la amistad.

Recuerden que siempre los llevaré en mi corazón.



ÍNDICE

Resumen.....	i
Introducción.....	ii
Capítulo 1. Antecedentes	
1. Origen e historia del amaranto.....	1
1.1 Clasificación taxonómica del amaranto.....	2
1.2 Descripción botánica.....	2
1.3 Composición química y aporte nutrimental.....	6
1.4 Producción de amaranto en México.....	8
1.4.1 Caracterización de la producción de amaranto en el D.F.....	10
1.4.2 Superficie destinada al cultivo de amaranto.....	12
1.4.3 Volumen de producción de amaranto.....	13
1.4.4 Rendimiento del cultivo de amaranto.....	13
1.4.5 Precio medio rural (PMR) del amaranto.....	15
1.4.6 Valor de la producción de amaranto.....	16
1.5 Estrés oxidativo y radicales libres.....	18
1.5.1 Especies Reactivas de Oxígeno (ERO's).....	18
1.5.2 Daño provocado por las ERO's.....	21
1.5.2.1 Proceso de lipoperoxidación.....	21
1.5.2.2 Química de la oxidación de proteína.....	22
1.5.3 Enzimas de defensa contra estrés oxidativo.....	24
1.5.3.1 Enzimas.....	24
1.5.3.2 Eliminadores.....	25
Capítulo 2. Metodología Experimental	
2.1 Objetivos.....	27
2.2 Cuadro metodológico.....	28
2.3 Materiales y métodos.....	29
2.3.1 Material biológico.....	29
2.3.2 Parámetros de deterioro.....	29
2.3.2.1 Ensayos de germinación.....	29
2.3.3 Análisis bioquímico.....	30



2.3.3.1 Escape de electrolitos.....	30
2.3.3.2 Determinación de Malondialdehído (MDA).....	31
2.3.3.3 Determinación de Peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂).....	33
2.3.3.4 Determinación de Carbonilos.....	34
2.3.4 Actividad enzimática.....	36
2.3.4.1 Actividad de Peroxidasa (POX).....	36
2.3.4.2 Actividad de Catalasa (CAT).....	37
2.3.4.3 Actividad de Superóxido dismutasa (SOD).....	38
2.4 Métodos estadísticos.....	40
Capítulo 3. Resultados y Discusión	
3.1 Parámetros de deterioro: Ensayos de germinación.....	41
3.2 Análisis bioquímico.....	42
3.2.1 Escape de electrolitos.....	42
3.2.2 Determinación de Malondialdehído (MDA).....	43
3.2.3 Determinación de Peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂).....	45
3.2.4 Determinación de Carbonilos.....	46
3.3 Actividad enzimática.....	48
3.3.1 Actividad de Peroxidasa (POX).....	48
3.3.2 Actividad de Catalasa (CAT).....	48
3.3.3 Actividad de Superóxido dismutasa (SOD).....	49
Conclusiones.....	52
Referencias.....	53



LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1.	Clasificación taxonómica del amaranto.....	2
2.	Composición química de la semilla de amaranto (Por cada 100 gramos de porción comestible).....	6
3.	Perfil de aminoácidos en amaranto (mg de aminoácidos/g de proteína).....	7
4.	Composición del aceite de la semilla de amaranto.....	8
5.	Concentración de MDA (μM MDA/g) de semillas de amaranto provocada por un deterioro acelerado (40 °C-75% HR).....	44
6.	Contenido de carbonilos (μM de Carbonilos/mg proteína) de semillas de amaranto provocada por un deterioro acelerado (40 °C-75% HR).....	47
7.	Actividad de Catalasa (μM de H_2O_2 /g) de semillas de amaranto provocada por un deterioro acelerado (40 °C-75% HR).....	49
8.	Actividad de Superóxido dismutasa (μM de Adenocromo/g) de semillas de amaranto provocada por un deterioro acelerado (40 °C -75% HR).....	50



LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Planta de amaranto especie <i>A. hypochondriacus</i>	2
2.	Descripción botánica del amaranto.....	3
3.	Secciones de la semilla de amaranto izquierdo (transversal) y derecho (longitudinal).....	5
4.	Ubicación geográfica de los principales estados productores de amaranto en México.....	9
5.	Volumen de producción de amaranto a nivel nacional y por estado.....	10
6.	Ubicación geográfica de las delegaciones Milpa Alta, Tláhuac y Xochimilco, en el D.F.....	11
7.	Superficie cultivada de amaranto en México y en el D.F.....	11
8.	Superficie cultivada de amaranto en el D.F.....	12
9.	Volumen de la producción de amaranto en el D.F.....	13
10.	Rendimiento del cultivo de amaranto en México y en el D.F.....	14
11.	Rendimiento del cultivo de amaranto en el D.F.....	14
12.	Precio medio rural (PMR) del amaranto a nivel nacional y en el D.F.....	15
13.	Precio medio rural (PMR) del amaranto en el D.F.....	16
14.	Valor de la producción de amaranto a nivel nacional y en el D.F.....	16
15.	Valor de la producción de amaranto en el D.F.....	17
16.	Representación metabólica de las especies reactivas de oxígeno (ERO's).....	19
17.	Química de las especies reactivas de oxígeno (ERO's).....	20
18.	Materiales para ensayos de germinación.....	30



19.	Equipo usado para medir conductividad del agua de remojo de semillas de amaranto.....	31
20.	Espectrofotómetro usado para la determinación de malondialdehído y carbonilos en semillas de amaranto.....	32
21.	Fluorómetro para la determinación de peróxido de hidrógeno en semillas de amaranto.....	33
22.	Espectrofotómetro para la determinación de actividad enzimática en semillas de amaranto.....	39
23.	Pérdida de germinación de semillas de amaranto provocada por un deterioro acelerado (40 °C-75% HR).....	41
24.	Conductividad eléctrica (μS) de semillas de amaranto provocada por un deterioro acelerado (40 °C-75% HR).....	43
25.	Concentración de peróxido de hidrógeno ($\mu\text{M H}_2\text{O}_2/\text{g}$) de semillas de amaranto provocada por un deterioro acelerado (40 °C- 75% HR).....	45



RESUMEN

El cultivo del amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) mejor conocido como, huautli o alegría, es uno de los cultivos más antiguos de Mesoamérica, los aztecas y mayas, lo consumían junto con el maíz y el frijol. El amaranto se caracteriza por su gran valor nutrimental en vitaminas, minerales, fibra y lípidos, pero sobre todo por su alto contenido proteico, el cual posee un balance muy adecuado de aminoácidos esenciales, siendo similar al contenido proteínico de la leche.

Por otra parte, el almacenamiento inadecuado de semillas provoca reacciones de deterioro, las cuales están relacionadas con la generación de estrés oxidativo. El estrés oxidativo produce especies reactivas de oxígeno, las cuales pueden provocar daño en membrana celular, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. El amaranto tiene una mayor resistencia al deterioro durante el almacenamiento, pero el porqué de ésta característica agronómica no se sabe. Una posibilidad es que estas reacciones de deterioro provocadas por estrés oxidativo no sucedan en el amaranto o tenga un mejor sistema de defensa. Es por eso que en el presente trabajo, se estudió la relación entre el deterioro del amaranto por un almacenamiento inadecuado y la generación de estrés oxidativo, así como la actividad enzimática de defensa contra la oxidación.

Para ello se almacenaron semillas de amaranto bajo condiciones inadecuadas (40 °C-75% HR) durante 9, 18, 27, 36, 45 y 56 días. Se evaluó la calidad del amaranto mediante el porcentaje de germinación y el escape de electrolitos, también se cuantificó la producción de peróxido de hidrógeno, oxidación de lípidos y proteínas, así como el mecanismo enzimático de defensa contra especies reactivas de oxígeno. Los resultados mostraron un incremento en la pérdida de germinación y lixiviación de electrolitos lo cual indicó un daño en membranas celulares. También se encontró peroxidación de lípidos y oxidación de proteínas; estos resultados indican la generación de estrés oxidativo en la semilla de amaranto, pero en menor grado que el reportado en otros estudios realizados con trigo, maíz y frijol. El sistema enzimático de defensa de las semillas de amaranto representado por la superóxido dismutasa y la catalasa, se mantuvo activo durante el proceso de deterioro disminuyendo solo al final.

Estos resultados explican en parte la mayor resistencia del amaranto durante el almacenamiento ante factores abióticos.



INTRODUCCIÓN

Dentro de la gran diversidad genética existente en Mesoamérica, centro de origen y dispersión de numerosas especies, el amaranto ocupa un lugar preferente. Constituyendo una de las cinco plantas esenciales en la alimentación básica de las civilizaciones prehispánicas mesoamericanas (Itúrbide y Gispert, 1991). El amaranto es una planta anual productora de pequeñas semillas en abundancia perteneciente a la familia *Amaranthaceae*. Una de sus principales cualidades es su alto contenido nutritivo, con 15 a 18 % de proteína de alta calidad biológica, alto contenido de fibra, grasa, calcio, hierro, vitaminas A y C. Además es una planta muy adaptable a condiciones de crecimiento limitadas en agua, nutrientes minerales y resistente al calor extremo (Mujica, 1997). El amaranto se produce en un ciclo corto (150-180 días, según la especie y variedad), soporta la escasez e irregularidad de lluvias, necesita de la humedad solamente en el momento de la siembra hasta que aparezcan los retoños. La cantidad total de agua requerida por la semilla de amaranto a través de su ciclo vital es de solo el 60% del agua en comparación al trigo o la cebada, por lo tanto la semilla de amaranto es un cultivo ideal para las regiones secas (Ortega, 2009).

Por otra parte, el grano almacenado libre de plagas y enfermedades conserva su potencial nutritivo, entre los 5 y 7 años si se mantiene en un lugar seco, fresco y ventilado (Mujica, 1997). Pero no se sabe con certeza qué lo hace tan resistente. A pesar de su importancia, el amaranto es una especie poco estudiada y la investigación relacionada con su deterioro y calidad de semilla es escasa. Sin embargo se han realizado estudios con maíz, trigo y frijol y se ha observado que la pérdida de calidad de dichas semillas es provocada por el estrés oxidativo (Basavarajappa *et al.*, 1991; Galleschi *et al.*, 2002; Cadena, 2007). La presencia de oxígeno en el almacén puede promover la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO's). El desbalance en la producción de ERO's y la defensa antioxidante provoca un daño conocido como estrés oxidativo, que provoca cambios fisiológicos y bioquímicos los cuales provocan el deterioro y muerte celular en granos o semillas (Camarena, 2006).



Sin embargo, las semillas poseen mecanismos de protección que impiden la formación de radicales libres (RL) como los antioxidantes, los cuales se clasifican en enzimáticos, fabricados por la propia célula (superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y peroxidasa (POX), y no enzimáticos, que ingresan en el organismo a través de la dieta o de suplementos con formulaciones antioxidantes (Vitamina E y C, betacarotenos, flavonoides y licopeno). La susceptibilidad a estrés oxidativo va a depender del equilibrio entre pro-oxidantes y antioxidantes de la célula. Pero, ¿ésto no ocurre en el amaranto?, ¿no se produce estrés oxidativo? o ¿su sistema de defensa es muy eficiente? esto no se ha reportado.

Es por eso que el objetivo de este trabajo fue determinar la relación entre el deterioro del amaranto (*A. hypochondriacus*) y la generación de estrés oxidativo provocado por un almacenamiento inadecuado, mediante la determinación de parámetros de deterioro y la actividad de su sistema enzimático de defensa.

Para cumplir este objetivo se colocó el material biológico en condiciones de almacenamiento inadecuadas a 40 °C y 75% HR, el grado de deterioro de las semillas se evaluó midiendo el porcentaje de germinación y la conductividad del agua de remojo; para determinar si se generó estrés oxidativo se midió la presencia de peróxido de hidrógeno, malondialdehído y carbonilos en la semilla de amaranto y por último para evaluar el sistema enzimático de defensa contra el estrés oxidativo se cuantificó la actividad de las enzimas peroxidasa, catalasa y superóxido dismutasa (POX, CAT y SOD).

CAPÍTULO 1

ANTECEDENTES



ANTECEDENTES

1. ORIGEN E HISTORIA DEL AMARANTO

El amaranto es una planta autóctona de América, domesticada, cultivada y utilizada desde hace más de 4000 años. Las excavaciones arqueológicas revelan que las semillas y hojas fueron consumidas por habitantes prehistóricos mucho antes del proceso de domesticación, ya que en las regiones tropicales y subtropicales era una planta importante de recolección. Esta especie tan importante en la época pre-hispánica, actualmente está retomando auge, por su excelente calidad nutritiva y amplia adaptación, incluso en ambientes desfavorables (Sauer, 1976).

El amaranto es considerado como un pseudocereal ya que tiene propiedades similares a las de los cereales pero botánicamente no lo es. La palabra amaranto proviene del griego *Amarantón* y significa inmarcesible, que no se marchita. Los indígenas llamaban al amaranto huautli o huauquiltil y los conquistadores lo denominaron bleado (Hernández y Herrerías, 1998).

La familia *Amaranthaceae* comprende más de 60 géneros y aproximadamente 800 especies de plantas herbáceas anuales o perennes, cuyas características cambian notablemente, dependiendo del ambiente en el que crecen, lo que dificulta la identificación de la planta.

Existen tres especies de amaranto que producen semilla y que, a su vez, son las más apreciadas (Hernández y Herrerías, 1998):

<i>Amaranthus caudatus</i>	Se cultiva en la región de los Andes
<i>Amaranthus cruentus</i>	Originaria de México y Centroamérica
<i>Amaranthus hypochondriacus</i>	Procedente de la parte central de México



1.1 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DEL AMARANTO

TABLA 1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DEL AMARANTO

REINO	<i>Plantae</i>
DIVISIÓN	<i>Magnoliophyta</i>
CLASE	<i>Magnoliopsida</i>
ORDEN	<i>Caryophyllales</i>
FAMILIA	<i>Amaranthaceae</i>
GÉNERO	<i>Amaranthus</i>
ESPECIE	<i>A. hypochondriacus</i>

Fuente: Itúrbide y Gispert, 1991

1.2 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

El amaranto es una especie anual, herbácea o arbustiva de diversos colores que van del verde al morado o púrpura con distintas coloraciones intermedias como muestra la (Figura 1).



Fuente: Vibrans, 2008

Figura 1. Planta de amaranto especie *A. hypochondriacus*



La raíz es pivotante con abundante ramificación y múltiples raicillas delgadas, que se extienden rápidamente después que el tallo comienza a ramificarse, facilitando la absorción de agua y nutrientes, la raíz principal sirve de sostén a la planta, permitiendo mantener el peso de la panoja.

Las raíces primarias llegan a tomar consistencia leñosa que anclan a la planta firmemente y que en muchos casos sobre todo cuando crece algo separadas una de otras, alcanza dimensiones considerables.

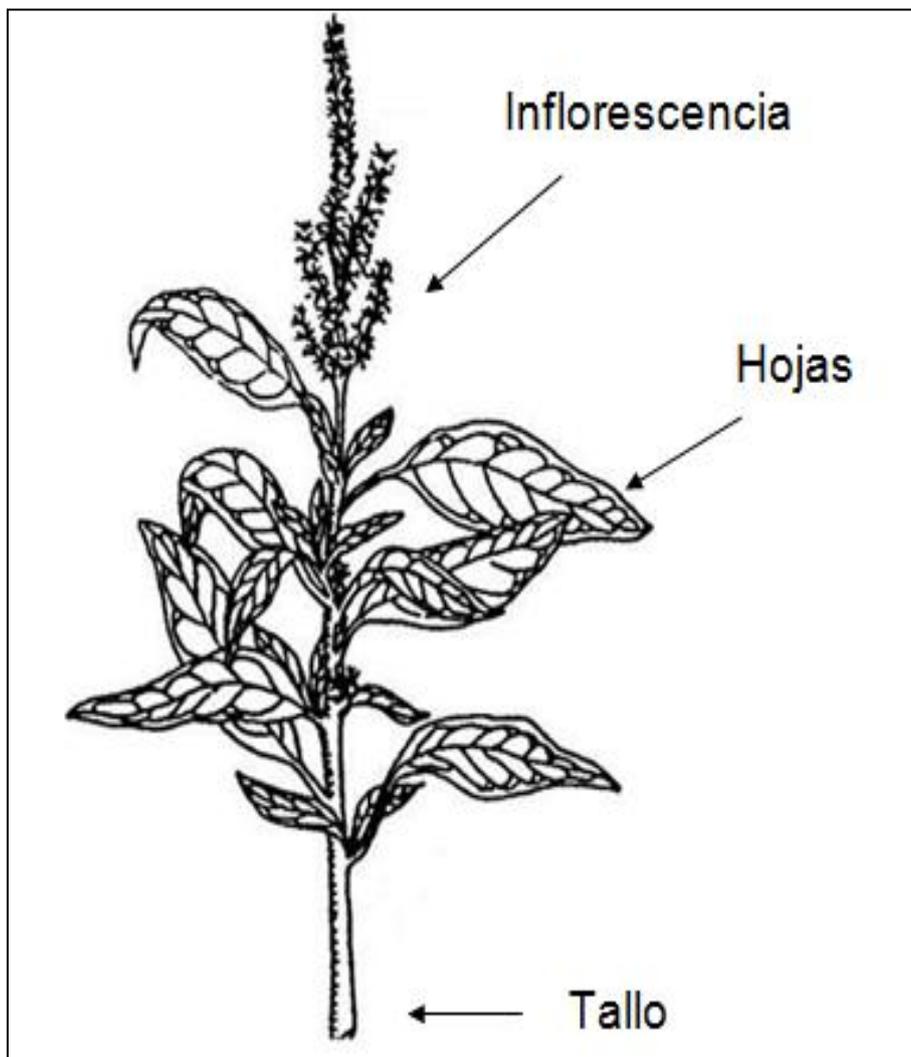


Figura 2. Descripción botánica del amaranto



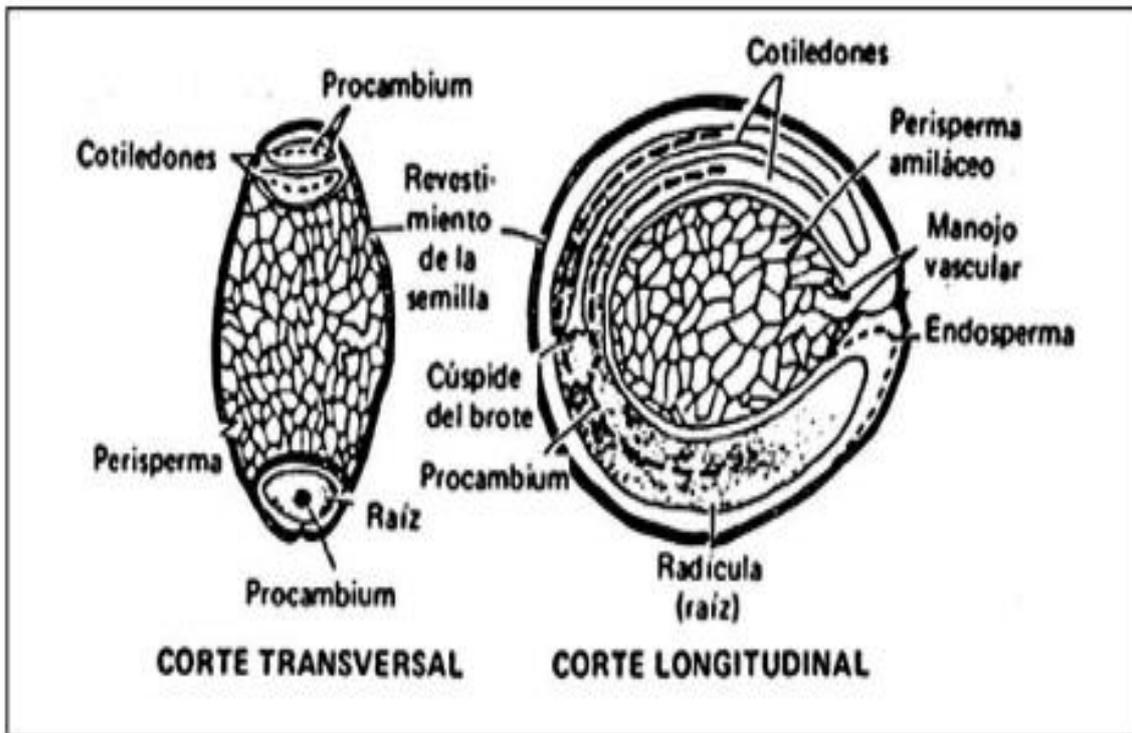
El tallo es cilíndrico y anguloso con gruesas estrías longitudinales que le dan una apariencia acanalada (ver Figura 2), alcanza de 0.4 a 3 m de longitud, cuyo grosor disminuye de la base al ápice, presenta distintas coloraciones que generalmente coincide con el color de las hojas, aunque a veces se observa estrías de diferentes colores, presenta ramificaciones que en muchos casos empiezan desde la base o a media altura y que se originan de las axilas de las hojas. El número de ramificaciones es dependiente de la densidad de población en la que se encuentre el cultivo.

Las hojas son pecioladas, sin estípulas de formas ovales, elípticas, opuestas o alternas con nervaduras prominentes en el envés, lisas o poco pubescentes de color verde o púrpura cuyo tamaño disminuye de la base al ápice, presentando borde entero, de tamaño variable de 6.5 a 15 cm (ver Figura 2).

En *Amaranthus hypochondriacus* las inflorescencias son muy grandes y ramificadas, de color uniforme, verde o rojo, con muchas flores que tienen brácteas agudas, lo que da una sensación de aspereza al tocarlas.

La semilla es pequeña, lisa, brillante de 1 a 1.5 mm de diámetro, ligeramente aplanada, de color blanco, aunque existen de colores amarillentos, dorados, rojos, rosados, púrpuras y negros; el número de semillas varía entre 1.000 – 3.000 por gramo (Nieto, 1990), las especies silvestres presentan granos de color negro con el epispermo muy duro.

En el grano se distinguen cuatro partes importantes (ver Figura 3): epispermo que viene a ser la cubierta seminal, constituida por una capa de células muy finas; endospermo que viene a ser la segunda capa; el embrión formado por los cotiledones que es el más rico en proteínas y la más interna llamada perispermo el cual es rico en almidones (Irving *et al.*, 1981).



Fuente: Irving *et al.*, 1981

Figura 3. Secciones de la semilla de amaranto izquierdo (transversal) y derecho (longitudinal)

El período vegetativo varía de 150 a 180 días, dependiendo de los factores agroambientales y cultivares utilizados; las épocas de siembra, varían de acuerdo a las condiciones climáticas.

Las principales cualidades del amaranto que lo hacen especial son:

- Revierta en condiciones muy calientes y se convierte en cereal con un alto contenido nutritivo en proteína, fibra, calcio, hierro y vitaminas A y C.
- Planta muy adaptable a condiciones de crecimiento muy limitadas en agua y nutrientes minerales, tipo de suelo y altura.
- Resistente al calor extremo.
- El grano almacenado conserva su potencial nutritivo, durante los 5 y 7 años si se mantiene en un lugar seco, fresco y ventilado.



1.3 COMPOSICIÓN QUÍMICA Y APOORTE NUTRIMENTAL

El valor alimenticio del amaranto es relevante en proteína, y dentro de esta, su contenido de los ocho aminoácidos esenciales es muy superior al de los demás alimentos de origen vegetal de uso común. Son significativos los contenidos de grasa, fibra y minerales, dentro de los que sobresalen el hierro y el calcio (Tabla 2). El balance de aminoácidos y valor nutritivo en general es muy similar a los niveles recomendados por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), para la alimentación humana, si se utiliza una mezcla de iguales proporciones de amaranto y trigo/amaranto/maíz (Hernández y Herrerías, 1998).

TABLA 2. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA SEMILLA DE AMARANTO

(Por cada 100 gramos de porción comestible)

COMPONENTE	CONTENIDO (%)
PROTEÍNA	12 - 19
CHOS	71.8
LÍPIDOS	6.1 - 8.1
FIBRA	3.5 - 5.0
CENIZAS	3.0 - 3.3

Fuente: Nieto, 1990

Su proteína es de excelente calidad pues el balance de aminoácidos está cercano al requerido para la nutrición humana (ver Tabla 3) y su aminoácido limitante (aminoácidos de tipo esencial que cuando se consumen a menor nivel que el requerido por la especie, limitan el desempeño de todos los demás aminoácidos para formar proteína) es la leucina que permite que la proteína se absorba y utiliza hasta el 70%, cifra que puede aumentar hasta el 79% según las variedades. El cómputo aminoacídico es de 86% en *A. hypochondriacus*. Se puede apreciar el alto valor biológico de su proteína comparándola con los cómputos químicos de la proteína del trigo (73%) y soya (74%), mientras que las proteínas de origen animal no tienen aminoácidos limitantes (Hernández y Herrerías, 1998).



**TABLA 3. PERFIL DE AMINOÁCIDOS EN AMARANTO
(mg de aminoácidos/g de proteína)**

AMINOÁCIDOS	<i>A. hypochondriacus</i>
Isoleucina	39
Leucina	57
Lisina	55
Metionina + cistina	47
Fenilalanina + tirosina	73
Treonina	36
Triptófano	11
Valina	45

Fuente: FAO/OMS/UNU, 1985

Lo que destaca de la proteína del amaranto es su alto contenido en lisina comparado con otros cereales, lo que permite una excelente complementación aminoacídica con las proteínas de maíz, arroz y trigo (Itúrbide y Gispert, 1991).

La proteína del amaranto se encuentra principalmente en el embrión (65%) a diferencia de otros cereales como maíz y arroz que presentan sobre el 80% de la proteína en el endospermo (Bressani, 1989). La semilla de amaranto contiene entre 5 y 8% de grasa y su aceite es reconocido por ser la fuente vegetal con mayor concentración de escualeno (precursor del colesterol y acción antioxidante) aproximadamente 6% (Lyon and Becker, 1987; Rayas-Duarte and Joeb, 1992).

Los principales ácidos grasos presentes en el aceite de amaranto son el ácido oleico y el ácido linolénico (Tabla 4). También contiene gran cantidad de minerales principalmente calcio, magnesio y hierro.

**TABLA 4. COMPOSICIÓN DEL ACEITE DE LA SEMILLA DE AMARANTO**

ÁCIDO GRASO	CONTENIDO (g/100 g)
Acido oléico	29.3
Acido linoléico	44.0
Acido palmítico	18.4
Acido linolénico	1.3
Acido mirístico	0.2
Acido miristoleico	0.1
Acido miristolénico	0.1
Acido palmitoleico	0.8
Acido palmitolénico	0.9
Acido esteárico	3.8
Acido no identificado	1.2

Fuente: Casillas, 1986

1.4 PRODUCCIÓN DE AMARANTO EN MÉXICO

De acuerdo con estadísticas del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), del 2006-2011, la producción de amaranto en México ha mostrado un comportamiento fluctuante. La distribución de la producción se caracteriza por una alta concentración en la zona centro del país, donde los principales estados productores del grano en orden de importancia son Puebla, Estado de México, Morelos, Tlaxcala y Distrito Federal (ver Figura 4), los cuales aportan más del 90 por ciento del total de la producción (ver Figura 5).

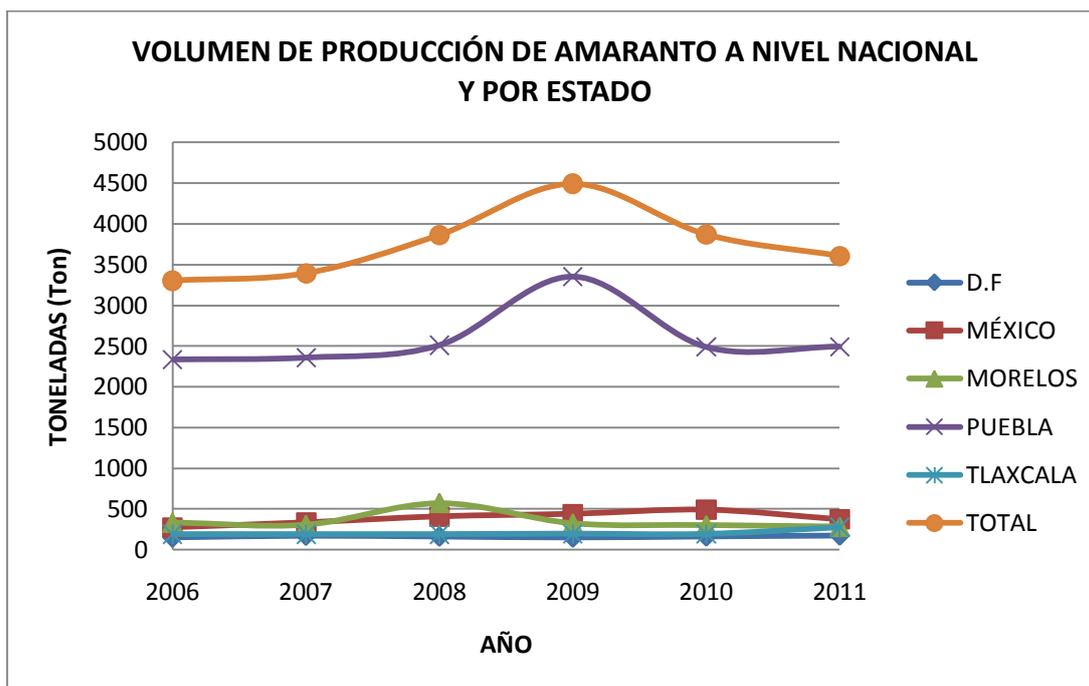


Fuente: Santacruz de León, 2010

Figura 4. Ubicación geográfica de los principales estados productores de Amarantho en México.

Puebla es el principal productor y registró en el 2011 un valor de 2493.50 toneladas que representa el 69.15 por ciento de la cosecha nacional (ver Figura 5); en el año 2009, registró una cifra record de 3355.68 toneladas, lo que contribuyó a que la producción nacional en ese año fuera de 4493.33 toneladas. Sin embargo, la producción de amaranto en Puebla ha registrado una tendencia a la baja, como resultado de los descensos en la superficie cosechada.

Por esa razón, sería importante promover el aumento en la siembra y cosecha del amaranto, brindando asesoría técnica a los productores, realizando estudios sobre la capacidad del grano para resistir el almacenamiento en condiciones inadecuadas y el desarrollo de nuevos productos elaborados con amaranto para generar un mercado mayor para su procesamiento.

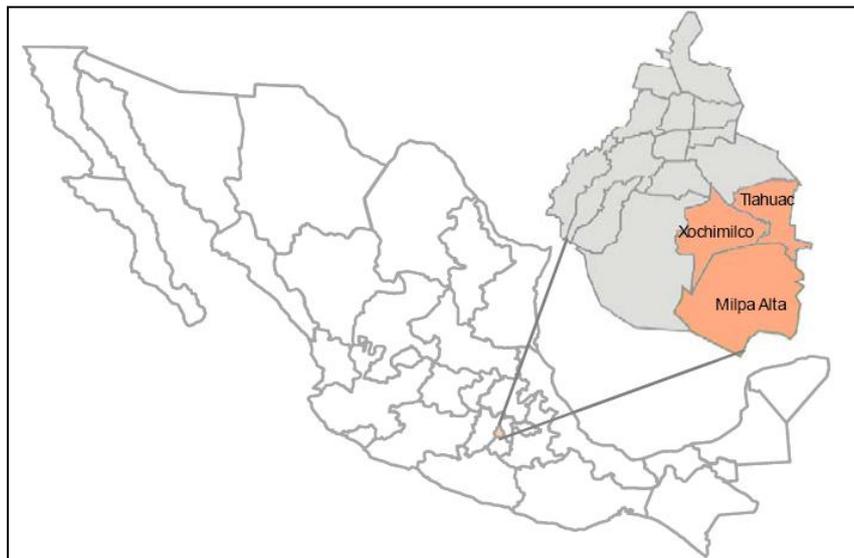


Fuente: Datos de SIAP (2010)

Figura 5. Volumen de producción de amaranto a nivel nacional y por estado.

1.4.1 CARACTERIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE AMARANTO EN EL D.F

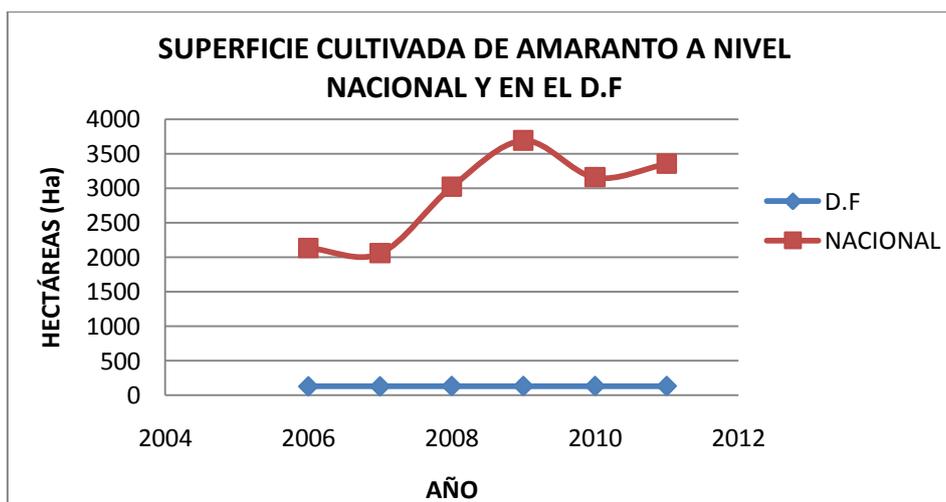
En el área rural del Distrito Federal el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) ha determinado una superficie potencial de 4000 hectáreas con muy buena productividad para cultivar Amarantho en condiciones de temporal, ubicándose en las delegaciones de Tláhuac, Xochimilco y Milpa Alta (ver Figura 6). Actualmente la superficie cultivada con amaranto no rebasa las 200 Hectáreas (ver Figura 7) en las comunidades de San Andrés Mixquic, Santiago Tulyehualco, San Gregorio Atlapulco, San Juan Ixtayopan y San Antonio Tecómitl.



Fuente: Santacruz de León, 2010

Figura 6. Ubicación geográfica de las delegaciones Milpa Alta, Tláhuac y Xochimilco, en el D.F.

Esta reducida superficie cosechada se debe en parte a la falta de maquinaria para la cosecha, trilla y limpia de la semilla, lo que se refleja en altos costos de producción; a carencias en la transferencia de tecnología en los diferentes eslabones de la cadena productiva de amaranto y por no estar considerada como especie prioritaria en el marco de las políticas agropecuarias nacionales (Muruga *et al.*, 2004).



Fuente: SIAP (2010)

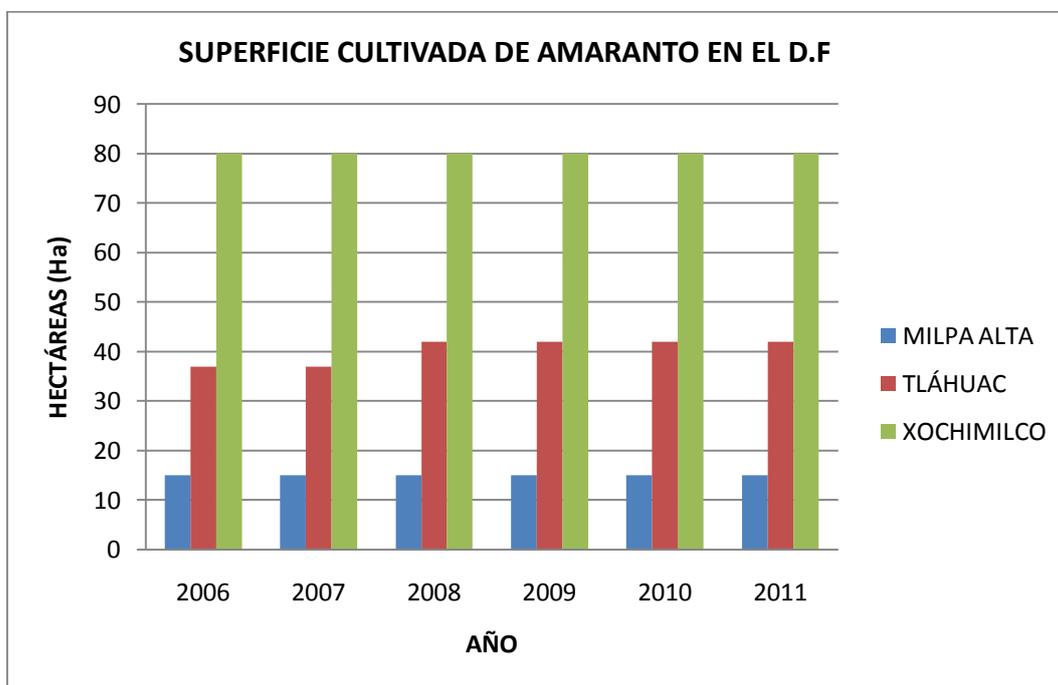
Figura 7. Superficie cultivada de amaranto a nivel nacional y en el D.F



A pesar de que el amaranto no ocupa un lugar entre los productos básicos del sector agropecuario mexicano como el maíz, trigo, soya, arroz, frijol u otros granos, es importante señalar que la FAO lo cataloga como un cultivo con alta cantidad y calidad de nutrientes, por lo que podría aprovecharse en México, ya que es un cultivo originario de nuestro país (Fundación Mexicana Para El Desarrollo Rural, 2010)

1.4.2 SUPERFICIE DESTINADA AL CULTIVO DE AMARANTO

En cuanto a la superficie sembrada y cosechada, la delegación Milpa Alta ha permanecido constante durante el período 2006 – 2011, con un total de 15 hectáreas, mientras que Tláhuac se ha mantenido constante en los últimos cuatro años con 42 hectáreas y Xochimilco presenta una tendencia estable en el mismo período, con valores de 80 hectáreas permaneciendo en el primer lugar (ver Figura 8).



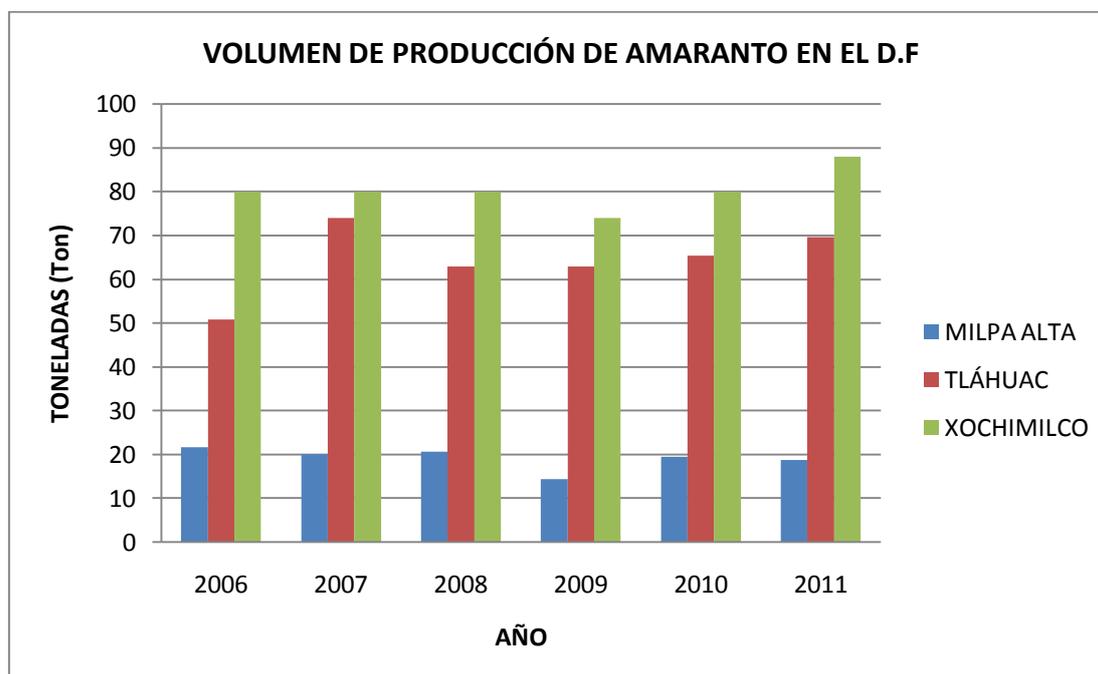
Fuente: SIAP (2010)

Figura 8. Superficie cultivada de amaranto en el D.F.



1.4.3 VOLUMEN DE PRODUCCIÓN DE AMARANTO

En cuanto al volumen de producción de la semilla de amaranto, la delegación Milpa Alta ha presentado una tendencia a la baja en el período 2006 – 2011. Tláhuac ha presentado altibajos obteniendo el valor máximo de 74 toneladas en el 2007 y el mínimo en el 2006 con 50.8 toneladas. Xochimilco ha presentado una tendencia constante de 80 toneladas en los primeros tres años y manteniéndose como principal zona de producción (ver Figura 9).

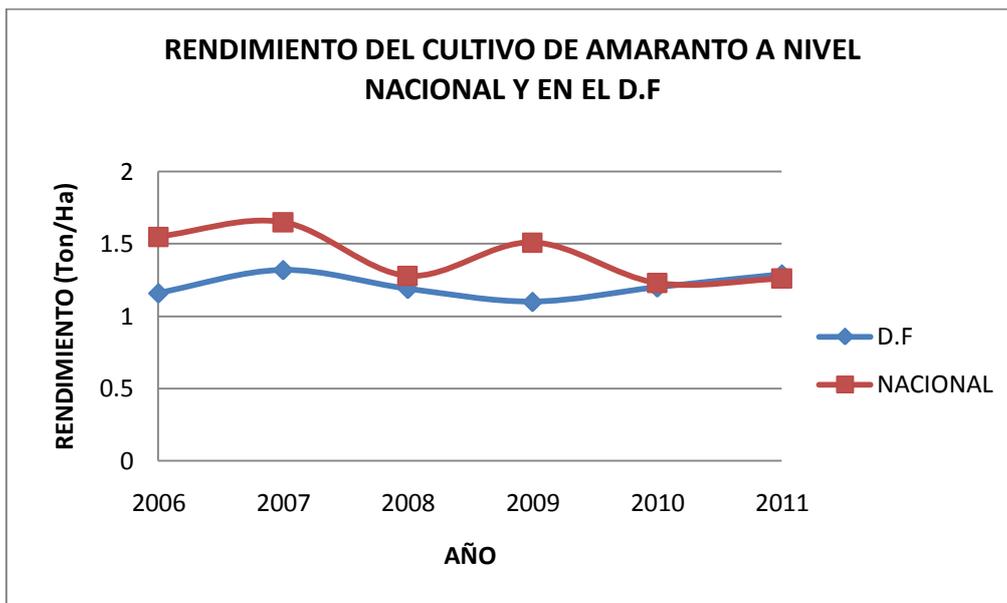


Fuente: SIAP (2010)

Figura 9. Volumen de la producción de amaranto en el D.F.

1.4.4 RENDIMIENTO DEL CULTIVO DE AMARANTO

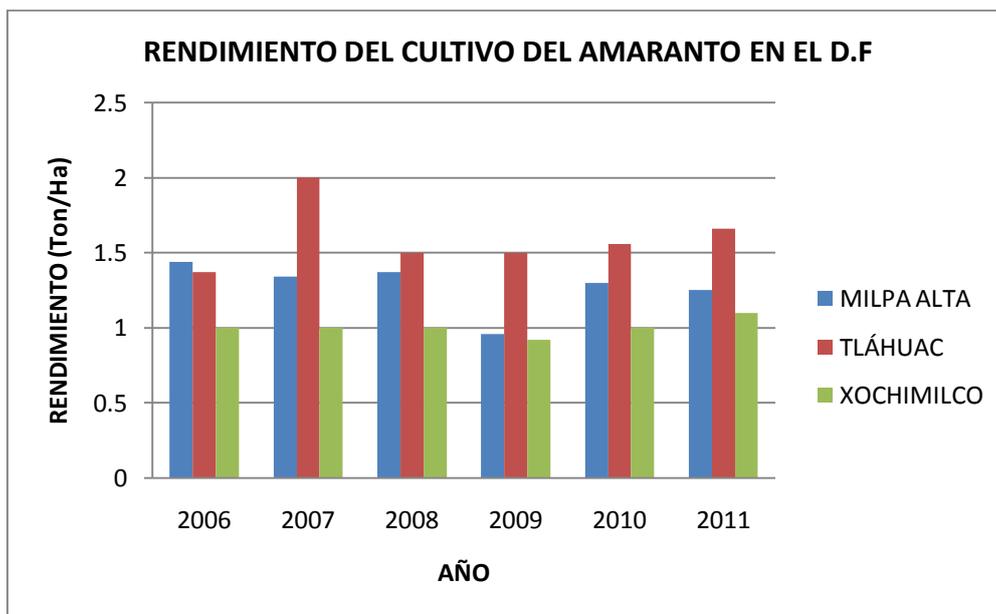
En cuanto al rendimiento del cultivo de amaranto en el D. F presenta altibajos, obteniendo el valor máximo en el 2007 con 1.32 t/ha y el mínimo en el 2009 con 1.10 t/ha, pero en general se encuentra por abajo del promedio nacional (ver Figura 10).



Fuente: SIAP (2010)

Figura 10. Rendimiento del cultivo de amaranto a nivel nacional y en el D.F

Es importante señalar que el rendimiento promedio del amaranto es de 1.5 toneladas por hectárea, lo cual, es mejor que el frijol que ofrece 0.7 toneladas por hectárea, e igual que la soya, con 1.5 t/ha y el cártamo, con 1.4 t/ha (Martínez, 2006).



Fuente: SIAP (2010)

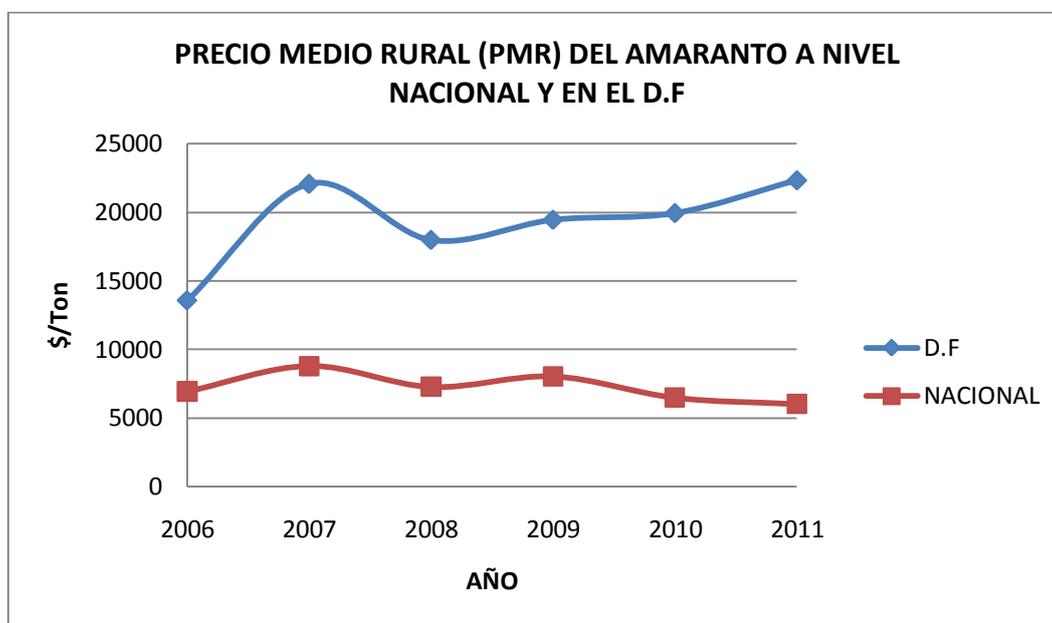
Figura 11. Rendimiento del cultivo de amaranto en el D.F.



En la Figura 11 se observan los valores de rendimiento del cultivo de amaranto por delegación del D.F, Milpa Alta presenta altibajos en el periodo 2006 – 2011, Tláhuac obtuvo el máximo valor de rendimiento en el 2007 con 2 t/ha, sin embargo la tendencia es hacia un decremento. Xochimilco presenta una constante con valores entre 0.92 – 1.10 t/ha.

1.4.5 PRECIO MEDIO RURAL DEL AMARANTO

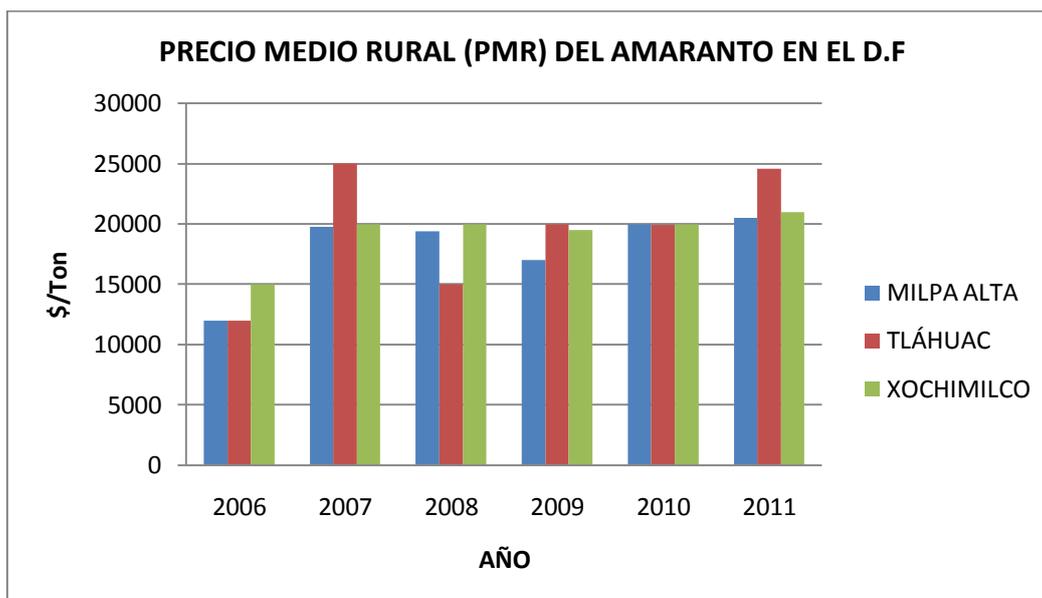
En cuanto al Precio Medio Rural (PMR) de la semilla de amaranto, el D.F se encuentra por arriba del valor promedio nacional (ver Figura 12).



Fuente: SIAP (2010)

Figura 12. Precio medio rural (PMR) del amaranto a nivel nacional y en el D.F.

En la Figura 13 se observan los valores a nivel regional, la delegación Tláhuac presenta el mayor valor en el año 2007 con \$25000.00/tonelada, mientras que Milpa Alta y Xochimilco presentan altibajos obteniendo el valor máximo de \$21000.00/tonelada en el 2011.

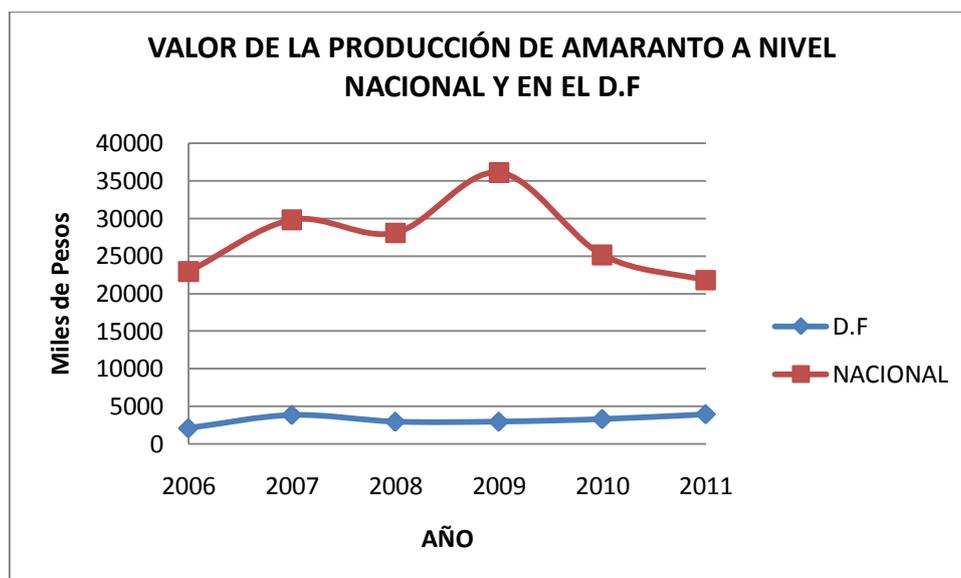


Fuente: Datos de SIAP (2010)

Figura 13. Precio medio rural (PMR) del amaranto en el D.F

1.4.6 VALOR DE LA PRODUCCIÓN DE AMARANTO

En cuanto al valor de la producción de la semilla de amaranto en miles de pesos, el D.F contribuye con un valor bajo con respecto al nacional (ver Figura 14).

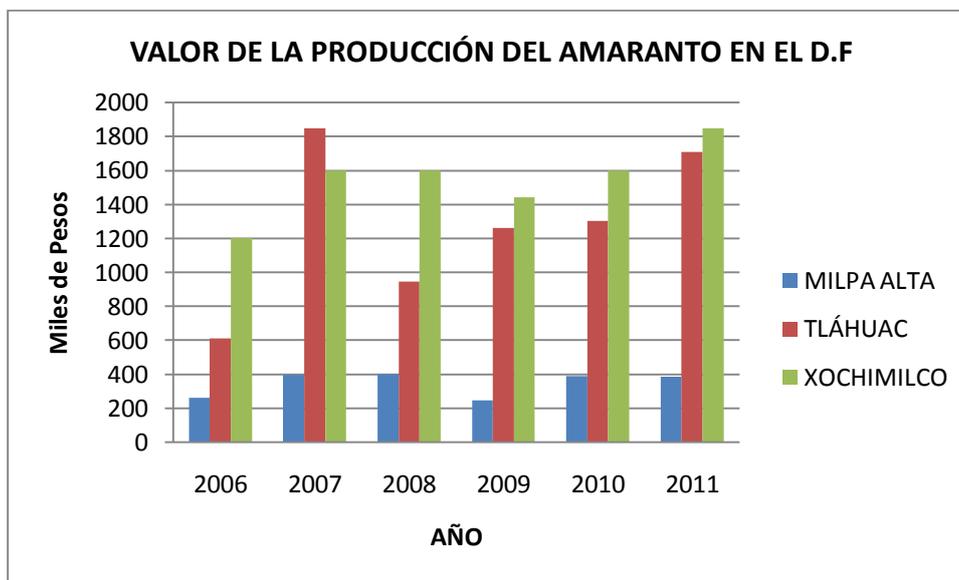


Fuente: SIAP (2010)

Figura 14. Valor de la producción de amaranto a nivel nacional y en el D.F.



En la Figura 15 se observa el comportamiento a nivel regional del valor de producción del amaranto, donde la delegación Tláhuac presenta el primer lugar en el año 2007 con un valor de \$1850.00, mientras que Milpa Alta tuvo una tendencia a la baja y Xochimilco presentó altibajos en el periodo 2006 – 2011.



Fuente: SIAP (2010)

Figura 15. Valor de la producción de amaranto en el D.F.

La importancia de este cultivo, radica en la potencial demanda del producto y sus derivados que, ante la oportunidad del mercado que representa el D. F, los mecanismos de producción, transformación y comercialización tienen que volverse más eficientes y rentables pues la superficie de cultivo y el volumen de producción no satisfacen la demanda local.

México es centro de origen de la especie *A. hypochondriacus*, a pesar de su importancia, es una especie poco estudiada y la investigación relacionada con los aspectos de deterioro y calidad de semilla es escasa, sin embargo se han realizado estudios con maíz y trigo, donde se ha observado que la pérdida de calidad de dichas semillas es provocada por el estrés oxidativo (Basavarajappa *et al.*, 1991; Galleschi *et al.*, 2002). Pero lo que pasa en el amaranto no se ha estudiado, sería importante tener conocimiento de este fenómeno debido a su importancia nutrimental.



1.5 ESTRÉS OXIDATIVO Y RADICALES LIBRES

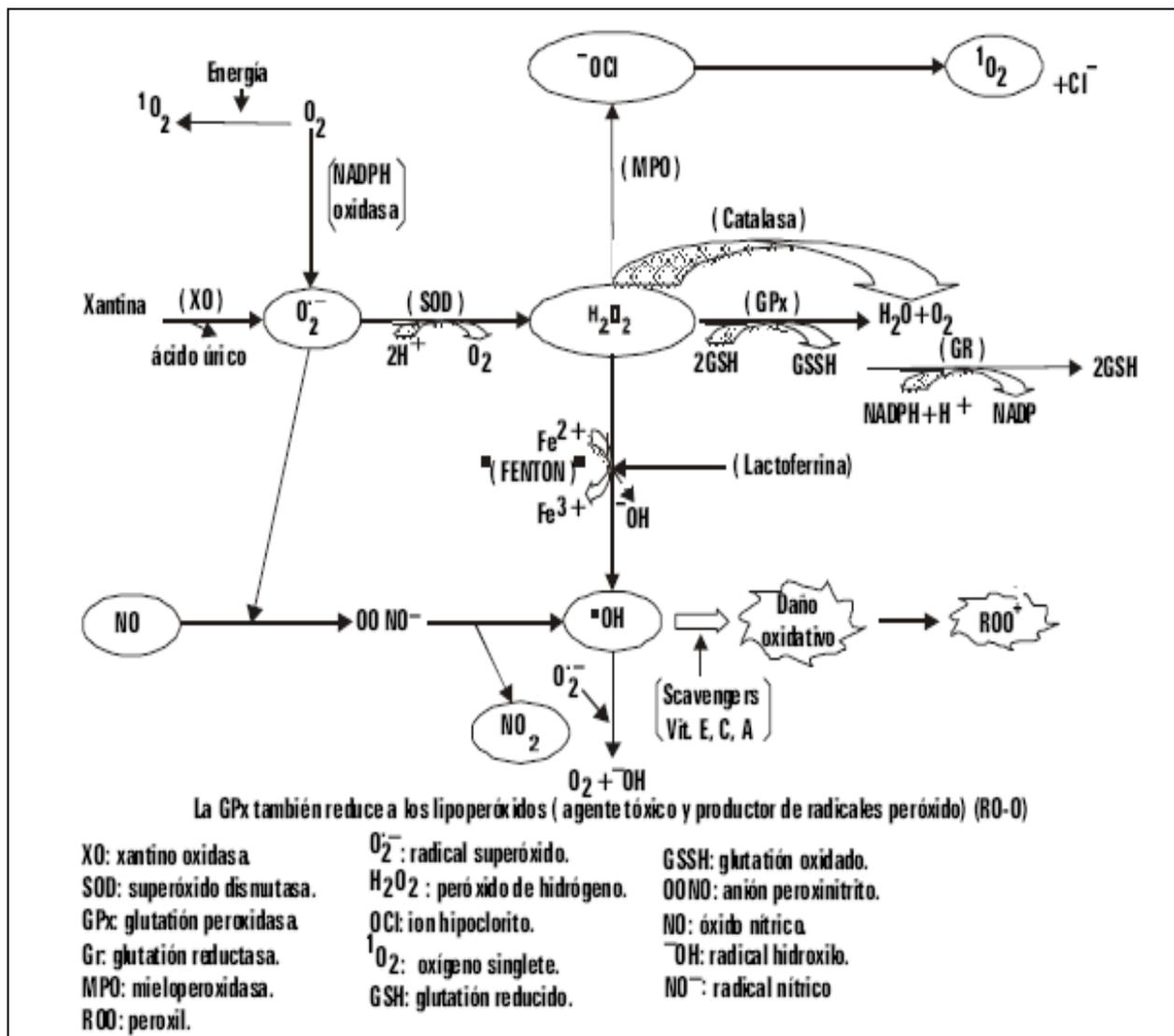
El desbalance en la producción de especies reactivas del oxígeno (ERO's) y la defensa antioxidante, provoca un daño oxidativo conocido como estrés oxidativo, que lleva a una variedad de cambios fisiológicos y bioquímicos, los cuales provocan el deterioro y muerte celular (Pérez y Pérez, 2000).

1.5.1 ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO (ERO's)

La mayor parte del oxígeno celular es reducido a través de reacciones enzimáticas, pero del 2 - 5 % escapa a esta reducción bivalente y elige la monovalente, y de ello resulta la formación de radicales libres de oxígeno (RLO), que no son más que átomos o moléculas que poseen un número impar de electrones en su órbita más externa, y que también se generan cuando ocurre una adición a un doble enlace.

Son muy inestables y pueden reaccionar con otras moléculas, entregando o recibiendo un electrón. Últimamente prefiere llamarsele Especies Reactivas de Oxígeno (ERO's), para agrupar a algunos compuestos que como el peróxido de hidrógeno, no constituyen un verdadero radical.

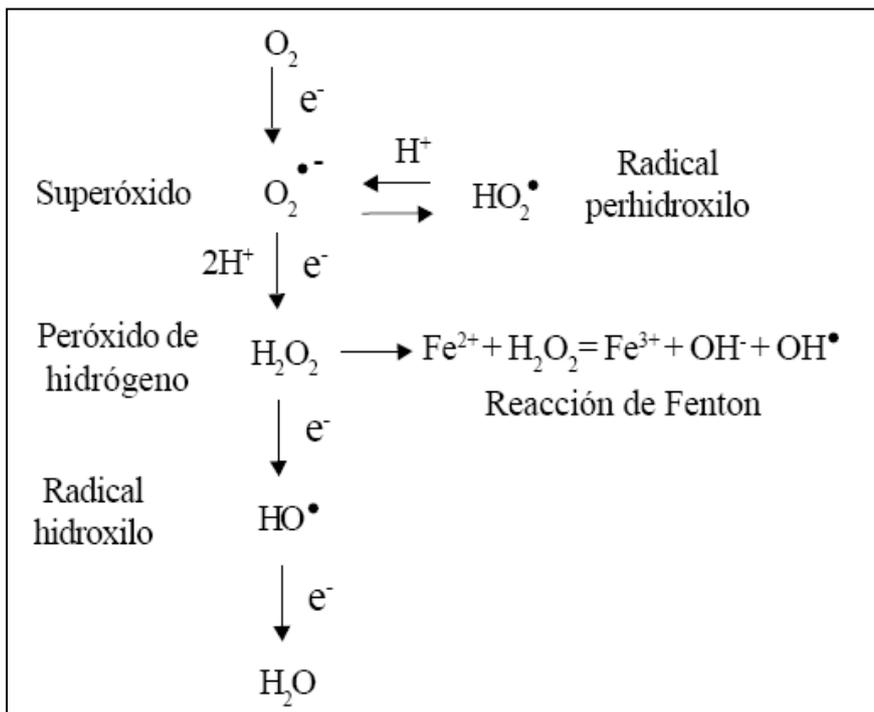
Estas ERO's son moléculas altamente reactivas que atacan constantemente a las células mediante reacciones bioquímicas de REDOX, que ocurren como parte normal del metabolismo celular o por la exposición a factores ambientales y se forman de la manera siguiente (ver Figura 16). La reducción univalente del O_2 produce el radical superóxido (O_2^-) cuya fuente más importante es la NADPH-oxidasa (Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato-oxidasa) durante la respiración. La reacción univalente subsecuente (ver Figura 17), genera el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a través de la enzima superóxido dismutasa (SOD), que no es un RLO, pero tiene una alta capacidad oxidante por vía de la reacción de Fenton, y forma el radical hidroxilo (OH^-) que es varios miles de veces más reactivo que el O_2^- y deriva fácilmente a la formación de nuevos radicales libres (Pérez y Pérez, 2000).



Fuente: Pérez y Pérez, 2000

Figura 16. Representación metabólica de las especies reactivas del oxígeno (ERO's).

Las especies reactivas explicadas no son las únicas, existen otras como el peroxil (ROO·) y el alcoxil (RO·), resultantes de la acción del ·OH, que constituyen la fase inicial de la peroxidación lipídica. También existe el oxígeno singlete (1O_2), el óxido nítrico (NO·), el anión peroxinitrito (OONO·) y el ion hipoclorito (OCl·) formado a partir del H_2O_2 por la enzima mieloperoxidasa (MPO).



Fuente: Pérez y Pérez, 2000

Figura 17. Química de las especies reactivas de oxígeno (ERO's)

Las ERO's desempeñan un papel importante durante la defensa de las plantas en contra de patógenos. Para disminuir el daño provocado por la producción de ERO's, los organismos aeróbicos han evolucionado mecanismos antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. Como resultado de la respuesta de la planta, se producen ERO's por un incremento en la actividad de las enzimas NADPH-oxidasa ubicada en la membrana plasmática, peroxidasas unidas a la pared celular y aminooxidasa ubicadas en el apoplasto (espacio extracelular de la membrana plasmática). A diferencia del anión superóxido, el peróxido de hidrógeno puede difundirse al interior de la célula y activar los genes de defensa, conduciendo a la muerte celular programada (MCP) (Davison *et al.*, 2002; Grant and Loake, 2000; Hammond-Kosack and Jones, 2000). Además la actividad de las enzimas que detoxifican a las ERO's, tales como catalasa y ascorbato peroxidasa son suprimidas por ácido salicílico y óxido nítrico (Klessig *et al.*, 2000), como resultado se crea un balance a favor de la acumulación de ERO's.



1.5.2 DAÑO PROVOCADO POR LAS ERO´S

1.5.2.1 PROCESO DE LIPOPEROXIDACIÓN

La lipoperoxidación, es un proceso de oxidación de ácidos grasos poliinsaturados de la membrana celular vía radicales libres, el cual se considera por Wilson y McDonald (1985) como la base de la pérdida de poder germinativo y viabilidad en una semilla.

Una molécula reactiva, como es el hidroxilo (OH^\cdot), ataca un ácido graso, constituyente de triacilgliceroles o fosfoacilgliceroles. La interacción del radical libre va dirigida al carbono adyacente a un doble enlace, ocasionando un rompimiento homolítico al sustraer un hidrógeno que forma agua al unirse al radical, mientras que el ácido graso presenta un radical libre (electrón) en el carbono afectado por el hidroxilo. Una vez que a un fosfolípido se le arrebatara un electrón, éste busca estabilizar su estructura química y toma el electrón de la molécula próxima, generándose así una reacción en cadena (Velázquez *et al.*, 2004).

Los productos de la lipoperoxidación son aldehídos, cetonas, esteres, alcoholes. Este proceso repetitivo conduce a la membrana a perder sus propiedades fisicoquímicas y culmina con la muerte de la célula (Velázquez *et al.*, 2004).

Para medir el daño provocado por oxidación en lípidos, se puede hacer uso de métodos que nos ayuden a identificar productos terminales de la acción oxidante, el ejemplo más común es, la cuantificación de malondialdehído (Pérez y Pérez, 2000).



1.5.2.2 QUÍMICA DE LA OXIDACIÓN DE PROTEÍNA

La oxidación es la cesión o pérdida de electrones de los átomos de un elemento. A nivel molecular, la pérdida de electrones conlleva el cambio en el grado de oxidación de un grupo químico ya sea por reacción directa con especies reactivas de oxígeno o por reacción indirecta con productos secundarios del estrés oxidativo (Díaz y Membrillo, 2006).

Todas las cadenas laterales de los aminoácidos que forman parte de las proteínas son susceptibles de ser atacadas por el radical hidroxilo, aunque algunas son más vulnerables que otras como es el caso de las cadenas laterales de la tirosina, la fenilalanina, el triptófano, la histidina, la metionina y la cisteína. En consecuencia, la exposición de proteínas a sistemas generadores de radicales libres conduce a modificaciones en la estructura terciaria, que puede acompañarse de una fragmentación química, un incremento en la susceptibilidad al ataque proteolítico y a la pérdida de la función biológica (Velázquez *et al.*, 2004).

En general, el grado de daño oxidativo de un blanco específico (llámese cualquier organismo vivo que pueda sufrir estrés oxidativo) depende de varios factores: la concentración del blanco, la constante de reacción del oxidante con el blanco, la localización del blanco con respecto al lugar de generación del oxidante, eventos secundarios (reacciones en cadena), reacciones antioxidantes y reacciones de reparación (Díaz y Membrillo, 2006).

Todas las proteínas son potenciales blancos de oxidación. Dentro de las principales modificaciones que sufren ante la oxidación son la pérdida de la actividad catalítica, modificaciones en aminoácidos, formación de grupos carbonilo, alteración de la estabilidad térmica, cambio en la viscosidad, fragmentación, formación de enlaces covalentes inter o intraprotéicos, formación de puentes disulfuro y mayor susceptibilidad a proteólisis (Díaz y Membrillo, 2006).



La oxidación por generación de grupos carbonilos se lleva acabo químicamente por cuatro rutas principales:

La primera es la oxidación directa de prolina, lisina, arginina y treonina por reacción con ERO's; los productos de la oxidación de dichos aminoácidos son: 2-pirrolidona a partir de prolina, semialdehído α -aminoadípico a partir de lisina, semialdehído glutámico a partir de arginina y prolina y ácido 2-amino-3-cetobutírico a partir de treonina (Díaz y Membrillo, 2006).

La segunda ruta de formación de grupos carbonilo involucra la ruptura de la cadena polipeptídica por medio de la ruta de α -amidación o por la oxidación de residuos de ácido glutámico lo cual conlleva a la formación de péptidos en los cuales el aminoácido N-terminal está bloqueado por un derivado α -cetoacilo (Díaz y Membrillo, 2006).

La dos rutas de oxidación restantes implican reacciones secundarias con moléculas que presentan grupos carbonilo reactivos formados previamente por reacción directa de biomoléculas con ERO's; por ejemplo, por reacción de Michael del grupo amino de lisina, la entidad imidazol de histidina o el grupo sulfidril de cisteína con malondialdehído 4-hidroxi-2-nonenal y 2-propenal (ambos productos de la peroxidación lipídica) y por reacción de cetoaminas, cetoaldehídos y deoxiosonas, que son productos de la reacción de azúcares reductores o sus productos de oxidación, con el grupo amino de residuos de lisina (glicación y glicoxidación, respectivamente) (Díaz y Membrillo, 2006).

Aunque la carbonilación es un indicador de oxidación no específico del nivel de grupos carbonilo en proteínas, analíticamente ha resultado más factible y reproducible la medición del grado de carbonilación que el de otros tipos de oxidación proteica. Los grupos carbonilo han sido detectados y cuantificados por conjugación con 2,4-dinitrofenilhidrazina mediante ensayos espectrofotométricos o inmunoquímicos (Díaz y Membrillo, 2006).



1.5.3 ENZIMAS DE DEFENSA CONTRA ESTRÉS OXIDATIVO

Todos los seres vivos que utilizan el oxígeno para obtener energía liberan ERO's. Esta situación es incompatible con la vida, a menos que existan en las células mecanismos de defensa que las neutralicen.

A estas defensas se les denomina antioxidantes y se considera como tal a cualquier sustancia que en concentraciones normales posea una afinidad mayor que cualquier otra molécula para interaccionar con un radical libre. El antioxidante, al colisionar con un RLO le cede un electrón, que se oxida a su vez y se transforma en un RLO débil no tóxico como la vitamina E (Pérez y Pérez, 2000).

No todos actúan de esta forma, en el caso de las enzimas catalizan o aceleran reacciones químicas que utilizan substratos que a su vez reaccionan con los RLO.

Existe una primera línea de defensa antioxidante constituida por enzimas y eliminadores de radicales.

1.5.3.1 ENZIMAS

Los mecanismos enzimáticos incluyen a las enzimas superóxido dismutasa (SOD), ascorbato peroxidasa (AP), glutatión peroxidasa (GP) y catalasa (CAT). SOD actúa como la primera línea de defensa en contra de las ERO transformando el O_2^- en H_2O_2 (Benezer *et al.*, 2008).

- La citocromo oxidasa está encargada de evitar la reducción univalente del oxígeno.
- La superóxido dismutasa está especializada en captar el radical anión superóxido mediante una dismutación y así convertirlo en peróxido de hidrógeno.



- Catalasa y peroxidasas, glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión reductasa (GR) que neutralizan al H_2O_2 y lo convierten en agua.

Las enzimas AG, GP y CAT subsecuentemente lo detoxifican reduciéndolo a H_2O . La extensión del estrés oxidativo en una célula está determinada por la cantidad de superóxido, H_2O_2 y radicales hidroxilo. Por lo tanto, el balance de las actividades de SOD, AP y CAT es crucial para suprimir los niveles tóxicos de ERO's en la célula. Si cambia el balance de estas enzimas se inducen mecanismos compensatorios que involucran a otras enzimas, por ejemplo, cuando se reduce la actividad de CAT otras enzimas como ascorbato peroxidasa (AXP) y glutatión peroxidasa (GPX) son inducidas.

Los antioxidantes no enzimáticos incluyen al ascorbato, glutatión, tocoferol, flavonoides, alcaloides y carotenoides. Estos eliminan directamente al anión superóxido y al peróxido de hidrógeno por su capacidad antioxidante intrínseca (Halliwell, 2006).

1.5.3.2 ELIMINADORES

- La vitamina E o tocoferol neutraliza al radical OH^\cdot por su ubicación en las membranas donde su protección es particularmente importante.
- La vitamina C, por su carácter reductor, reacciona rápidamente con el O_2^\cdot y con el OH^\cdot , también es captor del oxígeno singlete y del ion hipoclorito.
- El glutatión (GSH), además de captar el H_2O_2 como substrato de la GPx, también capta al 1O_2 y al OH^\cdot .
- La transferrina y la ceruloplasmina son transportadoras de metales de transición, hierro y cobre respectivamente, que son generadores de RLO.



Este sistema defensivo, que lo mismo puede estar en el citosol que en las membranas, no es totalmente efectivo, por lo que hay involucrada una segunda línea constituida por:

- Sistemas reparadores de biomoléculas que reparan el daño producido al ADN y que pudieran propiciar trastornos genéticos o cancerígenos.
- Sistemas eliminadores de componentes celulares oxidados como las macroproteinasas y las endonucleasas.

Todo este sistema de defensa no está estudiado en el amaranto, es por eso que en el presente trabajo se pretende estudiar el sistema enzimático de defensa de la semilla de amaranto y de analizar posibles efectos provocados por el deterioro durante su almacenamiento explorando la posibilidad de que se genere estrés oxidativo en la semilla de amaranto deterioradas.

CAPÍTULO 2

METODOLOGÍA

EXPERIMENTAL



2.1 OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

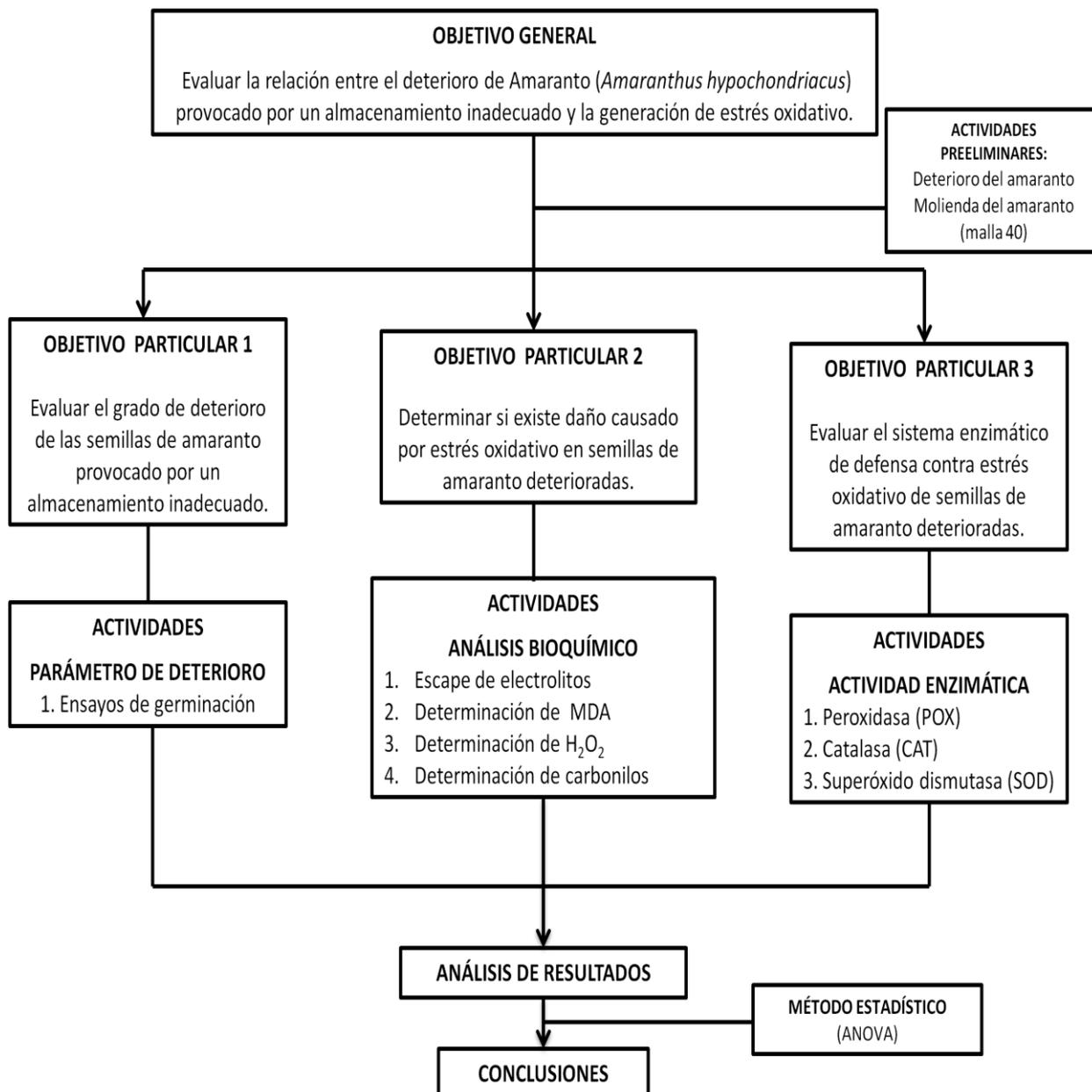
Evaluar la relación entre el deterioro del Amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) provocado por un almacenamiento inadecuado y la generación de estrés oxidativo.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar el grado de deterioro de las semillas de amaranto provocado por un almacenamiento inadecuado.
2. Determinar si existe daño causado por estrés oxidativo en semillas de amaranto deterioradas.
3. Evaluar el sistema enzimático de defensa contra estrés oxidativo de semillas de amaranto deterioradas.



2.2 CUADRO METODOLÓGICO





2.3 MATERIALES Y MÉTODOS

2.3.1 MATERIAL BIOLÓGICO:

En el presente trabajo se empleó la especie de amaranto: *Amaranthus hypochondriacus* variedad Tulyehualco, cosecha 2011.

Estas semillas de amaranto se sometieron a un deterioro acelerado. Para deteriorar las semillas, se colocaron en recipientes herméticos, que en la parte inferior contenían una solución saturada de NaCl (78.4 g de sal de grano en 200 mL de agua destilada) y en la parte superior, se colocaron las semillas sobre una charola perforada para evitar el contacto con la solución. Posteriormente se mantuvieron a una temperatura de 40 °C durante diferentes periodos de tiempo (9, 18, 27, 36, 45 y 56 días) y se manejó un control con cero días de almacenamiento. Después de cada periodo de almacenamiento se colectó una muestra de amaranto, la cual se guardó en recipientes con tapa y se mantuvieron en refrigeración (8 °C) hasta su uso.

2.3.2 PARÁMETROS DE DETERIORO

2.3.2.1 ENSAYOS DE GERMINACIÓN

Para poder determinar el efecto del almacenamiento inadecuado sobre la calidad de la semilla del amaranto se determinó su germinación. Se ha observado que algunos de los principales síntomas de la semilla deteriorada incluyen: pérdida de compuestos solubles por la anómala permeabilidad de las membranas celulares, reducción de la actividad enzimática y producción de sustancias tóxicas como ácidos grasos libres (Gutiérrez-Hernández *et al.*, 2007).



Se colocaron 50 semillas de amaranto desinfectadas con cloro al 1% sobre un sustrato (papel filtro) previamente humedecido con agua desionizada y se colocaron en cajas petri las cuales se mantuvieron a 25 °C durante 72 h. Al término de este tiempo, se contaron las semillas germinadas y los resultados se expresaron como porcentaje de germinación.



Figura 18. Materiales para ensayos de germinación

2.3.3 ANÁLISIS BIOQUÍMICO

2.3.3.1 ESCAPE DE ELECTROLITOS

La prueba de conductividad eléctrica permite estimar la integridad de la membrana celular. La pérdida de la integridad de las membranas y la subsiguiente pérdida de solutos citoplasmáticos con propiedades electrolíticas son indicativas del rápido deterioro de las semillas (Viloria y Méndez, 2011).

La cuantificación se realizó determinando la conductividad del agua de remojo de las semillas mediante un conductímetro (HI 3291 ATC Conductivity Probe Connect 1) (ver Figura 19) (Stewart and Bewley, 1980).

Se colocaron 1.8 g de semillas de amaranto en 20 mL de agua desionizada, posteriormente se incubaron por 24 h a una temperatura de 25 °C.



Figura 19. Equipo usado para medir conductividad del agua de remojo de semillas de amaranto

2.3.3.2 DETERMINACIÓN DE MALONDIALDEHIDO (MDA)

Para evaluar si existió daño en membranas provocado por oxidación en lípidos, se evaluaron productos terminales de la acción oxidante, en este caso, la cuantificación de malondialdehído (Pérez y Pérez, 2000). Esto permite asociar el deterioro de semillas de amaranto con el cambio en el contenido de fosfolípidos, midiendo la formación de malondialdehído como un producto secundario de la peroxidación. La mayoría de los aldehídos que reaccionan con tiobarbitúrico (TBA) son derivados de ácidos grasos insaturados.

Se colocaron 0.5 g de muestra de harina de amaranto en microtubos, se adicionaron 5 mL de una solución de ácido tiobarbitúrico al 0.5% y ácido tricloroacético al 20%, se centrifugó la muestra a 4500 g durante 15 min. El sobrenadante se utilizó para realizar tanto la prueba de MDA como la de peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Se mezcló una alícuota de solución de ácido tiobarbitúrico al 0.5% en ácido tricloroacético al 20% con una alícuota de la misma cantidad de sobrenadante. Se calentó la solución a 95 °C por 25 min, se dejó enfriar y se centrifugó por 1 min para clarificar la solución. Se leyó la absorbancia a 532 nm en un espectrofotómetro (Marca JENWAY Modelo Genova) (ver Figura 20), se dejó reaccionar la solución con el ácido tiobarbitúrico durante 30 min y se leyó la absorbancia a 600 nm (Heath and Packer, 1968).



La cuantificación se llevó a cabo determinando la diferencia de absorbancia a 532 nm menos la inespecífica a 600 nm de los productos generados después de reaccionar el TBA durante 30 min y usando un coeficiente de absorción molar del MDA ($\epsilon = 155 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Heath and Packer, 1968).

Cálculos:

$$\text{Absorbancia Total} = \text{Absorbancia}_{532 \text{ nm}} - \text{Absorbancia}_{600 \text{ nm}}$$

Sustituyendo en la fórmula:

$$A = abc$$

Donde:

A= Absorbancia

a= Coeficiente de absorción molar

b= Longitud del paso óptico

c= Concentración

Nota: Los resultados se expresan en μM de MDA/g de muestra.



Figura 20. Espectrofotómetro usado para la determinación de malondialdehído y carbonilos en semillas de amaranto



2.3.3.3 DETERMINACIÓN DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO (H₂O₂)

El H₂O₂ es un producto de las reacciones oxidativas que ocurren en los peroxisomas y en los cloroplastos. Los radicales hidroxilos formados a partir del H₂O₂ inician una serie de reacciones que conducen a la peroxidación de lípidos de membrana, formando malondialdehído (MDA), y a la destrucción de proteínas (Jaw-Neng and Ching-Huei, 1998). Por estas razones, se cuantificó el contenido de peróxido de hidrógeno, para observar si durante el deterioro de las semillas de amaranto se inducía tensión oxidativa.

El método está basado en el decremento de fluorescencia de la escopoletina en presencia de peróxido de hidrógeno y peroxidasa. Se realizó una curva patrón de peróxido de hidrógeno construyendo una serie de muestras de diferentes concentraciones de H₂O₂ 1 μM y agregando amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7 hasta completar un volumen de 250 μL. Se adicionó 250 μL de escopoletina 25 μM y 1.6 μL de peroxidasa, se dejó reposar por 5 min a 25 °C. Se agregó 2000 μL de tetraborato 0.15 M pH 10 y se leyó la fluorescencia en un fluorómetro (BIO-RAD) (ver Figura 21) (Hildebrandt *et al.*, 1978).



Figura 21. Fluorómetro para la determinación de peróxido de hidrógeno en semillas de amaranto



Cálculos:

Graficar Concentración de H₂O₂ vs % de Fluorescencia, obtener la ecuación de la recta y con esos valores obtenemos los µM de H₂O₂/g de muestra.

2.3.3.4 DETERMINACIÓN DE CARBONILOS

La determinación de proteína oxidada se realizó mediante la determinación de grupos carbonilos cuantificados por la reacción con 2,4 dinitrofenilhidrazina. El grado de oxidación de las proteínas de una célula se mide detectando carbonilos en la proteína total purificada. Los carbonilos se forman por la oxidación de la prolina y la arginina en semialdehído de glutamato y por rupturas de la cadena peptídica (Hansberg, 2002).

Para realizar esta prueba fue necesario conocer la concentración de proteína presente en las muestras problema, por lo tanto, primero se realizó una curva patrón de albumina bovina de acuerdo al método descrito por Lowry (Lowry *et al.*, 1951).

EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA SOLUBLE

Se homogeneizó 0.03 g de muestra de harina de amaranto con 600 µL de amortiguador de fosfatos 5 mM pH 7.5 que contenga una mezcla de inhibidor de proteasas. Al homogenizado se agregó 800 µL de amortiguador de fosfatos 5 mM pH 7.5. Los ácidos nucleicos fueron precipitados con 156 µL de sulfato de estreptomicina al 2% en HEPES 50 mM pH 7.2, se centrifugó la muestra a 4500 g durante 15 min. Al sobrenadante se añadió 156 µL de sulfato de estreptomicina al 2% en HEPES 50 mM pH 7.2 y se centrifugó.



El segundo sobrenadante se utilizó para la determinación del contenido de carbonilos (Sun and Carl, 1995).

CONTENIDO DE CARBONILOS EN PROTEÍNA

El extracto de proteína se colocó en microtubos y se adicionó 2,4 dinitrofenilhidrazina 10 mM en HCl 2 M, se dejó reaccionar durante 1 h a temperatura ambiente. El control fue tratado con HCl 2 M. Al término de la reacción, las proteínas fueron precipitadas con 500 μ L de ácido tricloroacético al 10% y se centrifugó a 4500 g durante 4 min. Los pellets se lavaron 3 veces con 800 μ L de etanol:acetato de etilo (1:1) para remover impurezas y después se centrifugó a 4500 g durante 4 min. El sobrenadante fue desechado después de cada lavado.

La proteína fue disuelta con 1.5 mL de guanidina 6 M en amortiguador de fosfatos 20 mM pH 2.5 durante 15 min a 37 °C. Se centrifugó la solución. La absorbancia se midió en un espectrofotómetro (ver Figura 20) a 366 nm contra la muestra control tratada con HCl 2 M (Levine *et al.*, 1990).

Cálculos:

$$A = abc$$

Donde:

A= Absorbancia

a= Coeficiente de absorción molar

b= Longitud del paso óptico

c= Concentración

Nota: Los resultados se expresan en μ M de Carbonilos/mg de proteína.



2.3.4 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

El comportamiento del sistema supresor de ERO's se cuantificó mediante la actividad de las enzimas: POX, CAT y SOD, con el objetivo de conocer de que manera influye el almacenamiento inadecuado y el estrés oxidativo sobre estos mecanismos de defensa.

OBTENCIÓN DE EXTRACTO ENZIMÁTICO

Se homogeneizó 0.3 g de muestra de harina de amaranto con 3 mL de amortiguador de fosfatos 5 mM pH 7.5 y se centrifugó a 4500 g durante 15 min. El sobrenadante se utilizó para la determinación de las enzimas: peroxidasa, catalasa y superóxido dismutasa.

2.3.4.1 ACTIVIDAD DE PEROXIDASA (POX)

La peroxidasa es una proteína pequeña, ubicua, que tienen una cisteína conservada en el sitio activo. Su función es catalizar la reducción de peróxido de hidrógeno por diversos donadores de electrones, realizándola a una velocidad del orden de $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Hansberg, 2002). La unidad funcional es el dímero, pero muchas son capaces de agruparse en decámeros de dímeros, se encuentran en concentraciones relativamente altas dentro de las células, algunas se encuentran en mitocondria y otras en cloroplastos, es aquí donde se degradan moléculas orgánicas liberando la energía química contenida en sus enlaces mediante un proceso que consume oxígeno, estas enzimas son activas a bajas concentraciones de peróxidos (<0.1mM) (Hansberg, 2002).

La mezcla de reacción consistió en mezclar: 500 μL de amortiguador de fosfatos 50 mM pH 6.7, 200 μL de guaiacol 50 mM, 200 μL de peróxido de hidrógeno 10 mM y 100 μL de extracto enzimático. Se preparó un blanco con agua destilada en lugar de extracto.



Se registraron los cambios de absorbancia en un espectrofotómetro (Beckman DU-450) (ver Figura 22) a 470 nm durante 5 min en intervalos de 5 s (Chance and Maehly, 1955).

Cálculos:

En un espectrofotómetro se registra la cinética de reacción de la POX, en tal cinética se registra tiempo y absorbancia, en los cuales se cambia el valor de absorbancia por concentración de H₂O₂ consumido en la generación del tetraguaiacol con la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración}_{\text{H}_2\text{O}_2} = \frac{\text{Absorbancia} \times \text{Moles de H}_2\text{O}_2 \text{ para generar tetraguaiacol}}{\text{Coeficiente de absorción molar}}$$

Graficar Tiempo vs Concentración de H₂O₂, obtener la ecuación de la recta y con el valor de la pendiente obtenemos los μM de H₂O₂/g de muestra.

2.3.4.2 ACTIVIDAD DE CATALASA (CAT)

La catalasa se encarga de catalizar la descomposición de peróxido de hidrógeno que se produce durante la respiración en H₂O y O₂ (Metzler, 1981) en un orden de 2 a 4x10⁸ M⁻¹s⁻¹ (Hansberg, 2002). Cada subunidad contiene una ferro-protoporfirina-IX (hemo b) o derivados del mismo como características estructurales, esta enzima se localiza en peroxisomas y mitocondrias de las células (Hansbeg, 2002).

La mezcla de reacción consistió en adicionar: 700 μL de amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7, 200 μL de peróxido de hidrógeno 30 mM y 100 μL de extracto enzimático. Se preparó un blanco con agua destilada en lugar de extracto. Se registraron los cambios de absorbancia en un espectrofotómetro a 240 nm durante 3 min en intervalos de 10 s (Aebi, 1984).



Cálculos:

En un espectrofotómetro se registra la cinética de reacción de la CAT, en tal cinética se registra tiempo y absorbancia, en los cuales se cambia el valor de absorbancia por concentración de H₂O₂ consumido con la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración}_{\text{H}_2\text{O}_2} = \frac{\text{Absorbancia}}{\text{Coeficiente de absorción molar} \times \text{Longitud del paso óptico}}$$

Graficar Tiempo vs Concentración de H₂O₂, obtener la ecuación de la recta y con el valor de la pendiente obtenemos los μM de H₂O₂/g de muestra.

2.3.4.3 ACTIVIDAD DE SUPERÓXIDO DISMUTASA

La superóxido dismutasa es una enzima que cataliza la dismutación del radical anión superóxido (O₂⁻) para dar oxígeno molecular (O₂) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (McCord and Fridovich, 1969), esta dismutación puede realizarse a una velocidad de 10⁹ M⁻¹s⁻¹ (Hansberg, 2002). La SOD se encuentra en la mitocondria en el espacio formado entre la membrana y la matriz.

La mezcla de reacción consistió en adicionar: 600 μL de amortiguador de carbonatos 50 mM pH 10.2, 200 μL de EDTA 0.5 mM, 100 μL de extracto enzimático y 100 μL de epinefrina.

Se preparó un blanco con agua destilada en lugar de extracto. Se registraron los cambios de absorbancia en un espectrofotómetro a 480 nm durante 3 min en intervalos de 10 s (Misra and Fridovich, 1972).



Cálculos:

En un espectrofotómetro se registra la cinética de reacción de la SOD, en tal cinética se registra tiempo y absorbancia, en los cuales se cambia el valor de absorbancia por concentración de Adenocromo formado con la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración Adenocromo} = \frac{\text{Absorbancia}}{\text{Coeficiente de absorción molar} \times \text{Longitud del paso óptico}}$$

Graficar Tiempo vs Concentración de Adenocromo, obtener la ecuación de la recta y con el valor de la pendiente obtenemos los μM de Adenocromo/g de muestra.



Figura 22. Espectrofotómetro para la determinación de actividad enzimática en semillas de amaranto



2.4 MÉTODOS ESTADÍSTICOS

El experimento fue conducido como un diseño completamente al azar con tres repeticiones.

Los datos fueron evaluados mediante un análisis de varianza (ANOVA), utilizando el paquete estadístico Origin 6.0, la comparación de medias se efectuó mediante la prueba t de student con un nivel de significancia de $\alpha=0.05$.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y

DISCUSIÓN



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 PARÁMETROS DE DETERIORO: ENSAYOS DE GERMINACIÓN

Los resultados de esta prueba realizada a las semillas de amaranto deteriorado bajo las condiciones de almacenamiento acelerado (40 °C y 75% HR) mostraron un decremento en el poder germinativo (ver Figura 23).

La germinación tuvo un valor inicial de 97.6% en la muestra control y disminuyó al aumentar el tiempo de almacenamiento hasta perderse completamente a los 56 días de deterioro. Algunas investigaciones han reportado el efecto negativo del almacenamiento inadecuado sobre la germinación de semillas de maíz y otros cultivos (Basavarajappa *et al.*, 1991). Viloria y Méndez (2011) indicaron que cuando las condiciones que rodean a la semilla son de alta temperatura (superior a 35 °C), normalmente se puede producir deshidratación y rupturas severas en las células cuando las semillas vuelven a ser hidratadas.

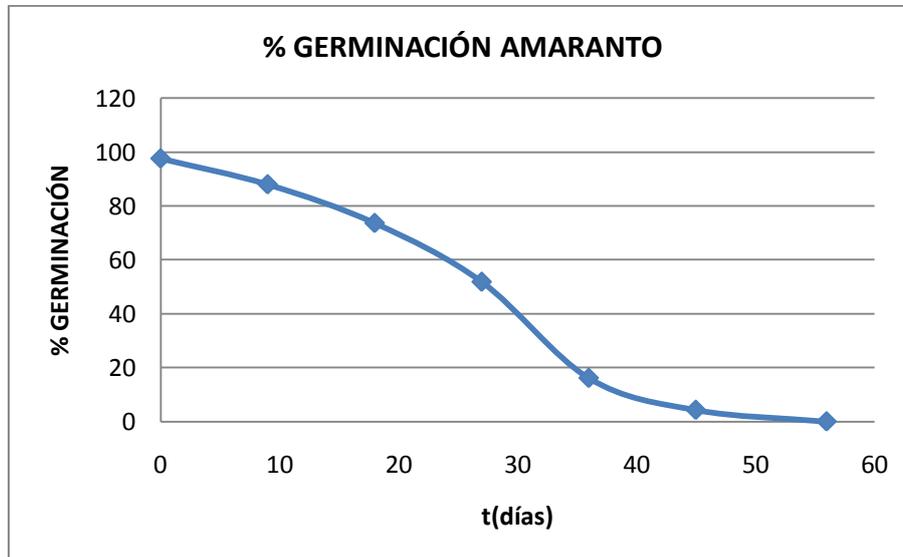


Figura 23. Pérdida de germinación de semillas de amaranto provocada por un deterioro acelerado (40 °C-75% HR)



También se ha demostrado la disminución paulatina del potencial fisiológico de semillas de maíz ocasionada por el envejecimiento natural, que merma progresivamente la capacidad germinativa, la velocidad de crecimiento inicial de la plántula y la tolerancia a condiciones adversas; tales efectos están asociados con alteraciones bioquímicas, éstas se expresan primero como reducciones en el desempeño germinativo y en el vigor de las semillas, posteriormente, a nivel del ADN (Gutiérrez-Hernández *et al.*, 2007).

La disminución en la germinación de las semillas de amaranto confirmó que se tenía un material deteriorado y con ello se podría evaluar la posible generación de estrés oxidativo, pero no se sabía que de lo reportado anteriormente para diversos tipos de semillas estaba ocurriendo en el amaranto, por lo tanto, se realizaron las siguientes pruebas en este estudio: con respecto a la permeabilidad de las membranas celulares, se determinó el escape de electrolitos cuantificado por conductividad eléctrica del agua de remojo.

También se evaluó el contenido de MDA y peróxido de hidrógeno ya que estas pruebas son indicadores de estrés oxidativo, y se cuantificó el daño en proteína mediante la prueba de carbonilos. Finalmente se evaluó el mecanismo enzimático de defensa de las semillas de amaranto contra estrés oxidativo (peroxidasa, catalasa y superóxido dismutasa).

3.2 ANÁLISIS BIOQUÍMICO

3.2.1 ESCAPE DE ELECTROLITOS

Los resultados mostraron que a mayor tiempo de almacenamiento mayor conductividad eléctrica en el agua de remojo de las semillas, lo cual sugiere un daño en membranas celulares (ver Figura 24).



La excesiva permeabilidad provoca la pérdida masiva de azúcares, iones inorgánicos entre otros componentes celulares, y algunos de ellos podrían quedar en la célula, pero en concentraciones inferiores a las óptimas para respiración, actividad enzimática y síntesis de macromoléculas (Gutiérrez-Hernández *et al.*, 2007).

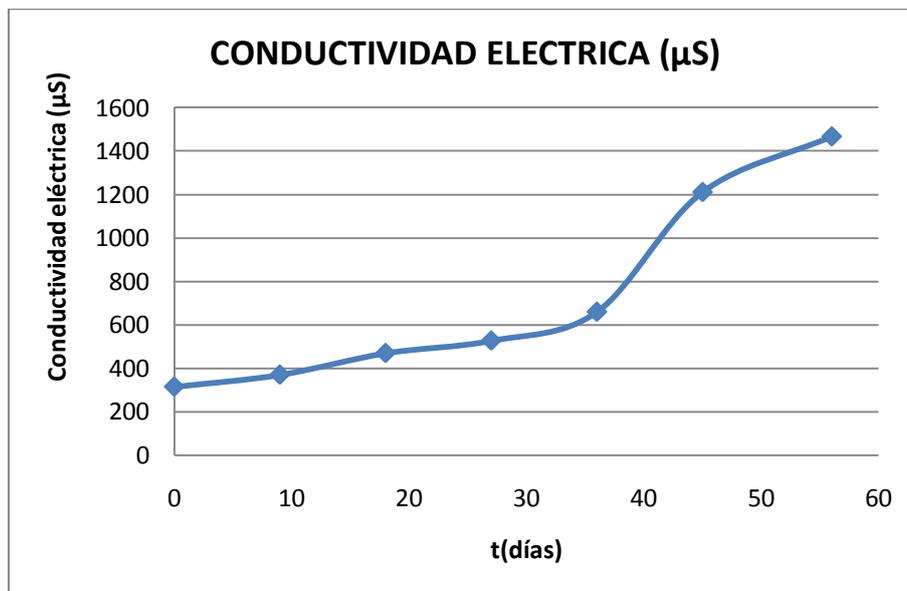


Figura 24. Conductividad eléctrica (µS) de semillas de amaranto provocada por un deterioro acelerado (40 °C-75% HR)

Resultados similares a los obtenidos en este trabajo fueron indicados por Viloria y Méndez (2011) quienes reportaron que el deterioro de las membranas de semillas de maíz, probablemente involucre la peroxidación lipídica y se asocia con el estrés oxidativo de radicales libres, lo cual conduce a la lixiviación de la membrana, sugiriendo que el almacenamiento inadecuado está dañando las membranas celulares de las células del amaranto.

3.2.2 DETERMINACIÓN DE MALONDIALDEHÍDO (MDA)

En las semillas de amaranto se observó que el contenido de MDA (Tabla 5) aumentó en un 49% con respecto al control, hasta los 18 días de deterioro.



Sin embargo a los 27 y 36 días la concentración disminuyó y fue estadísticamente ($P \leq 0.05$) igual al control, esto podría indicar que el sistema de defensa del amaranto está funcionando y disminuyendo o eliminando los radicales libres que provocan la lipoperoxidación (Hansberg, 2002).

TABLA 5. Concentración de MDA ($\mu\text{M MDA/g}$) de semillas de amaranto provocada por un deterioro acelerado (40 °C-75% HR)

MUESTRA	CONTROL	9d	18d	27d	36d	45d	56d
MDA ($\mu\text{M MDA/g}$)	9.94 ^a ±0.056	13.44 ^b ±0.282	14.82 ^b ±0.492	10.01 ^a ±0.753	9.62 ^a ±0.35	8.89 ^c	8.28 ^c ±0.661

*Diferentes letras entre columnas indican diferencia estadísticamente significativa ($P \leq 0.05$)

Por otra parte, a los 45 y 56 días de deterioro el contenido de MDA disminuyó aún más que el control y los valores fueron estadísticamente ($P \leq 0.05$) diferentes, estos resultados posiblemente se deba a que la semilla después de este periodo de almacenamiento, se encuentra muy deteriorada y/o muerta; por lo tanto no es capaz de formar el sustrato para la cuantificación de MDA, resultados similares se reportaron en las investigaciones realizadas por Bailly *et al.* (1996) durante el deterioro acelerado de semillas de girasol. El hecho del daño severo de las semillas se confirma por la pérdida de germinación observada en estas muestras (Figura 23); además es reforzado por su aumento en la conductividad (Figura 24).

Los cambios en el contenido de MDA durante los diferentes tiempos de almacenamiento a 40 °C apoyan la idea de que la pérdida de viabilidad de la semilla está asociada con la peroxidación de lípidos, sobre todo en los tiempos de almacenamiento más prolongados de 36, 45 y 56 días. Resultados similares reportaron Murthy *et al.* (2003), pues ellos concluyeron que al combinar elevadas temperatura y humedad relativa se pueden observar cambios significativos de lipoperoxidación.



Además, la peroxidación de lípidos también se ha demostrado durante envejecimiento de guisante (Harman and Mattick, 1976), soja (Stewart and Bewley, 1980) y maní (Sung and Jeng, 1994). Sin embargo los resultados obtenidos en estas semillas fueron mayores que los del amaranto, indicando un grado menor de daño de esta semilla, lo cual refuerza las propiedades especiales de dicho pseudocereal.

3.2.3 DETERMINACIÓN DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO (H₂O₂)

Las concentraciones de peróxido de hidrógeno presentes en las semillas de amaranto se mantienen estables en los diferentes días de deterioro con valores alrededor de 0.125 mM (ver Figura 25). Estos valores se encuentran por abajo del rango que enuncia Hansberg (2002) como tóxico para las células, el cual es de entre 10-100 mM.

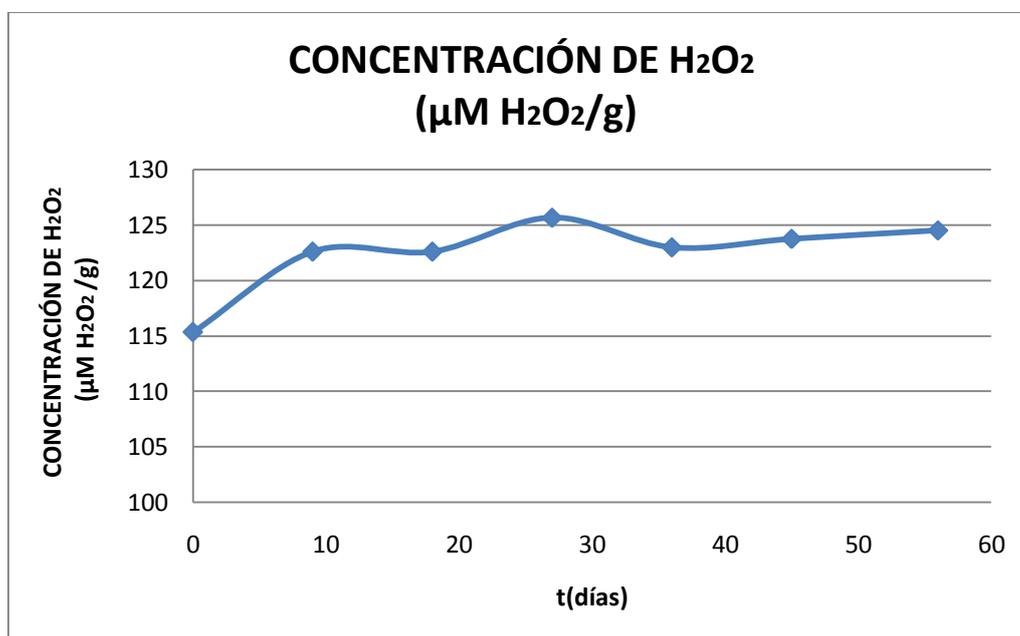


Figura 25. Concentración de peróxido de hidrógeno (µM H₂O₂/g) de semillas de amaranto provocada por un deterioro acelerado (40 °C-75% HR)



Con base en estos resultados, podemos sugerir que la presencia de peróxido de hidrógeno en semillas de amaranto, a pesar de que se encontró en concentraciones bajas, al parecer sí generó parte de los compuestos capaces de provocar deterioro.

La presencia de peróxido de hidrógeno en las semillas de amaranto y el daño a nivel lípidos reflejado por el aumento en la concentración de MDA (ver Tabla 5), confirmaron la presencia de estrés oxidativo en el amaranto, pero en menor concentración comparado con otros estudios realizados con trigo (Galleschi *et al.*, 2002), maíz (Basavarajappa *et al.*, 1991) y frijol (Cadena, 2007); provocado muy probablemente, por la presencia de radicales libres que generaron lipoperoxidación y formación de H_2O_2 .

3.2.4 DETERMINACIÓN DE CARBONILOS

Al determinar el daño por oxidación en proteínas de semillas de amaranto, se observó un incremento en el contenido de grupos carbonilos (ver Tabla 6), éste se mantuvo hasta los 36 días de deterioro donde se duplicó la concentración de carbonilos, y a los 45 y 56 días de deterioro hay una disminución y en todos los casos los valores fueron estadísticamente diferentes ($P \leq 0.05$) al control con excepción de las muestras con 18 días de deterioro.

El aumento en la concentración de grupos carbonilos hasta los 27 días de deterioro nos indica que sí se generó un daño a nivel proteínas provocado posiblemente por las ERO's, ya que las proteínas son las que llevan a cabo la mayoría de las funciones celulares muchas son capaces de absorber una gran cantidad de oxidaciones sin que aparentemente se vea afectada su función.



Sin embargo, es indudable que las consecuencias de las alteraciones en algunas funciones, por ejemplo, la recepción y transmisión de señales, el transporte de iones, la duplicación y la reparación del ADN, las respuestas a condiciones de tensión y el metabolismo energético, la transcripción y traducción pueden ser críticas para la célula (Hansberg, 2002).

La disminución de grupos carbonilos a los 45 y 56 días de deterioro tiene una relación con la pérdida total de germinación (Figura 23) y el aumento en la conductividad eléctrica (Figura 24), lo cual indica que la semilla está muy deteriorada y no se puede formar el sustrato para la cuantificación de carbonilos y que hubo daño en la membrana celular respectivamente.

TABLA 6. Contenido de carbonilos (μM de Carbonilos/mg proteína) de semillas de amaranto provocada por un deterioro acelerado ($40\text{ }^{\circ}\text{C}$ -75% HR)

MUESTRA	CONTROL	9d	18d	27d	36d	45d	56d
CARBONILOS (μM de Carbonilos/ mg proteína)	13.21 ^a ± 0.683	15.20 ^a ± 0.821	18.54 ^b ± 1.808	22.30 ^c ± 0.914	27.61 ^d ± 0.514	18.03 ^b ± 1.615	8.87 ^e ± 0.270

*Diferentes letras entre columnas indican diferencia estadísticamente significativa ($P \leq 0.05$)

Se han realizado estudios donde la presencia de grupos carbonilos indican modificaciones en las cadenas laterales de la proteínas, producto de la oxidación, provocado posiblemente por las ERO's (Díaz y Membrillo, 2006).

Aunque no está claro si el aumento de la carbonilación es causa o consecuencia del envejecimiento celular, Díaz y Membrillo (2006) han identificado que la oxidación de proteínas (medidas por carbonilación) correlaciona con la edad fisiológica de las células en diversos sistemas biológicos. Por lo tanto podemos inferir que el incremento de grupos carbonilos a los diferentes tiempos de almacenamiento, indica que el deterioro de proteínas se está llevando a cabo, sin embargo comparado con otros estudios realizados (Galleschi *et al.*, 2002; Basavarajappa *et al.*, 1991 y Cadena, 2007) el amaranto suele ser más resistente.



3.3 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

3.3.1 PEROXIDASA (POX)

Durante la determinación de la actividad de peroxidasa en las semillas de amaranto, ésta no fue detectada (ver Figura 25). De acuerdo a las investigaciones de Hansberg (2002) es posible que la actividad de peroxidasa no haya sido detectada, porque el contenido de peróxido de hidrógeno presente en las semillas de amaranto se encuentra en concentraciones relativamente altas a las necesarias para que esta enzima se active.

Además, como veremos después, la actividad de catalasa aumentó en relación directa al tiempo de deterioro, y como se sabe la catalasa usa como sustrato al peróxido de hidrógeno igual que la peroxidasa, pero la enzima que actúa primero es la catalasa, por lo tanto, otra explicación para la no detección de la actividad de la peroxidasa es que no fue necesaria.

Estos resultados sugieren que el mecanismo enzimático de defensa del amaranto es bueno ya que, al parecer, no fue necesaria la presencia de la actividad de la POX debido a las bajas concentraciones de peróxido de hidrógeno generado.

3.3.2 CATALASA (CAT)

La actividad de catalasa en semillas de amaranto a diferentes tiempos de almacenamiento inadecuado mostró un incremento (ver Tabla 7) hasta los 36 días de deterioro, es decir, la enzima se encuentra de forma activa, sin embargo a los 45 y 56 días hubo una disminución en su actividad. Según Cai *et al.*, (2011) el aumento de la actividad de CAT podría ser un indicador celular de las ERO's evaluadas, ya que la cantidad de CAT presente en las células aeróbicas es directamente proporcional al estado oxidativo de las células.



Es decir, que el sistema enzimático de defensa de la semilla de amaranto está reaccionando favorablemente al ataque de las ERO's.

TABLA 7. Actividad de Catalasa ($\mu\text{M de H}_2\text{O}_2/\text{g}$) de semillas de amaranto provocada por un deterioro acelerado (40 °C-75% HR)

MUESTRA	CONTROL	9d	18d	27d	36d	45d	56d
CAT ($\mu\text{M H}_2\text{O}_2/\text{g}$)	5.72 ^a ± 0.071	24.87 ^{bf} ± 0.451	26.55 ^b ± 0.393	36.53 ^c ± 0.612	46.77 ^d ± 0.328	16.812 ^e ± 0.492	21.64 ^f ± 0.579

*Diferentes letras entre columnas indican diferencia estadísticamente significativa ($P \leq 0.05$)

La inducción de la expresión de CAT se ha estudiado intensamente durante la germinación de semillas y germinación post-crecimiento de las plántulas de maíz y girasol, y muestra un mecanismo de regulación compleja (Cai *et al.*, 2011).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo coinciden con las conclusiones de Cai *et al.* (2011), donde la intensidad de la actividad de la catalasa varía de acuerdo a la viabilidad de la semilla; estos datos indican que el aumento de la actividad de CAT esta probablemente implicada en el mecanismo de defensa de la planta contra el estrés oxidativo, por lo tanto, los datos indican que hasta los 36 días de deterioro la semilla puede defenderse al ataque de las ERO's, pero la disminución en la actividad a los 45 y 56 días de deterioro posiblemente se deba a que la semilla está muy deteriorada, como se pudo observar en el aumento de MDA (Tabla 5) y grupos carbonilos (Tabla 6), y por lo tanto su mecanismo de defensa se afectó.

3.3.3 SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD)

Como puede observarse en la Tabla 8 la actividad de la superóxido dismutasa, se mantiene estable en los distintos periodos de tiempo de almacenamiento inadecuado.



Esto sugiere que la SOD si realizó su función de dismutar el anión superóxido y transformarlo en peróxido de hidrógeno, pues la actividad de la SOD tuvo una relación directa con la formación de peróxido de hidrógeno.

Ya que el daño provocado por las ERO's en las semillas de amaranto fue relativamente bajo en los diferentes días de almacenamiento, comparado con otras semillas como el trigo (Galleschi *et al.*, 2002) y maíz (Basavarajappa *et al.*, 1991) donde los niveles son más altos.

TABLA 8. Actividad de Superóxido dismutasa (μM de Adenocromo/g) de semillas de amaranto provocada por un deterioro acelerado (40 °C-75% HR)

MUESTRA	CONTROL	9d	18d	27d	36d	45d	56d
SOD (μM Adenocromo/g)	6.34 ^a ±0.130	7.06 ^a ±0.053	6.26 ^a ±0.042	10.31 ^b ±0.061	8.83 ^b ±0.38	7.15 ^a ±0.029	6.99 ^a ±0.047

*Diferentes letras entre columnas indican diferencia estadísticamente significativa ($P \leq 0.05$)

Por lo tanto, una mayor actividad de la SOD puede ser desencadenada por el aumento de producción de ERO's, como una medida de protección adoptada por el amaranto contra el daño oxidativo, porque la actividad de esta enzima es resultado del daño provocado en la semilla al ser sometida a un almacenamiento inadecuado.

Estos resultados coinciden con los reportes descritos por Cai *et al.* (2011) que sugieren la participación de SOD en el mecanismo de defensa durante la germinación y el desarrollo temprano de plántulas de piñón (*Jatropha curcas* L.).

Por lo tanto, se puede decir que las condiciones de almacenamiento inadecuado (40 °C-75% HR) sí afectaron la calidad agronómica del amaranto porque su porcentaje de germinación fue bajando hasta perderse totalmente a los 56 días de deterioro.



Se encontró daño en membrana celular reflejado por el aumento de la conductividad eléctrica y la oxidación de lípidos; también se determinó daño en proteínas; estos resultados indican que si se generó estrés oxidativo en las semillas de amaranto, pero es importante resaltar que los niveles fueron bajos comparados con otros estudios. La formación de peróxido de hidrógeno en las semillas de amaranto provocado posiblemente por las ERO's, fue controlada por las enzimas de defensa (CAT y SOD), las cuales se mantuvieron activas durante todo el proceso de deterioro.

CONCLUSIONES



CONCLUSIONES

- Durante este estudio se encontró que el amaranto almacenado bajo condiciones inadecuadas (40 °C-75% HR) sufrió pérdida de su calidad agronómica reflejado en la pérdida de su poder germinativo, y por lo tanto se tenía un material deteriorado para evaluar la posible presencia de estrés oxidativo y el mecanismo enzimático de defensa del mismo.
- El deterioro provocó daño en membranas celulares reflejado por un incremento en la conductividad eléctrica. También se detectó daño en lípidos, que está relacionado con el aumento de la concentración de malondialdehído (MDA) y tuvo una relación directa con el daño en membranas celulares.
- Además se observó que el deterioro de las semillas de amaranto provocó daño de sus proteínas, por el aumento en la concentración de grupos carbonilos que son producto de reacciones de oxidación, durante los diferentes días de almacenamiento. Mientras que, la presencia de peróxido de hidrógeno se mantuvo estable y a concentraciones bajas en los diferentes días de almacenamiento.
- Por lo tanto, con base en los resultados mencionados antes, se puede concluir que sí se generó estrés oxidativo en las semillas de amaranto deterioradas, pero en un nivel menor comparado con lo reportado en otras investigaciones realizadas con trigo, maíz y frijol.
- El sistema enzimático de defensa (CAT y SOD) de las semillas de amaranto se mantuvo activo durante todo el proceso de deterioro, aunque después de 45 días disminuyó, lo que nos indica que aunque sí fue afectado tuvo una mayor resistencia en el amaranto comparado con otras semillas. La actividad de la enzima peroxidasa no fue detectada muy probablemente porque la catalasa siempre estuvo activa y/o la concentración de peróxido de hidrógeno fue baja.

REFERENCIAS



REFERENCIAS

- Aebi, H. (1984). "Catalase in vitro". *Methods in Enzymology*. **105**:121-126.
- Bailly, C.; Benamar, A.; Corbineau, E. and Come, D. (1996), "Changes in malondialdehyde content and in superoxide dismutase, catalase and glutathione reductase activities in sunflower seeds as related to deterioration during accelerated aging". *Physiologia Plantarum*. **97**: 104-110.
- Basavarajappa, B. S.; Shetty, H. S. and Prakash, H. S. (1991). "Membrane deterioration and other biochemical changes, associated with accelerated ageing of maize seeds". *Seed Science and Technology*. **19**:279-286.
- Benezzer, B. M.; Castro, M. E. y García, P. E. (2008). La producción de especies reactivas de oxígeno durante la expresión de la resistencia a enfermedades en plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*. **26**(1):56-61.
- Bressani, R. (1989). The proteins of grain amaranth. *Foods Reviews International*. **51**:1338.
- Cadena, C. J. L. (2007). "Relación entre el deterioro de frijol (*Phaseolus vulgaris*) provocado por un almacenamiento inadecuado y la generación de estrés oxidativo", Tesis de Licenciatura. Ingeniería en Alimentos, FESC, UNAM.
- Cai, F. L.-J.; Mei, X.-L.; An, S.; Gao, L.; Tang and F. Chen. (2011). Lipid peroxidation and antioxidant responses during seed germination of *Jatropha curcas*. *International Journal of Agriculture and Biology*. **13**: 25–30.
- Camarena, G. (2006). "Las especies reactivas de oxígeno en defensa de las plantas contra patógenos", Universidad Autónoma Chapingo, *Revista Chapingo, Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*. **12**(1):5-30.
- Casillas, G. F. (1986). Importancia de la semilla de alegría. En: Primer Seminario Nacional del Amaranto. Chapingo, México. pp. 289-299.
- Chance, B. and Maehly, A. C. (1955). "Assay of catalase and peroxidase". *Methods in Enzymology*. **11**:764-775.
- Davison, P. A.; Hunter, C. N. and Horton, P. (2002). Overexpression of β -carotene hydroxylase enhances stress tolerance in *Arabidopsis*. *Nature*. **418**:203-206.



- Díaz, A. A. E. y Membrillo H. J. (2006). "Consecuencias fisiológicas de la oxidación de proteínas por carbonización de diversos sistemas biológicos". *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. Universidad Nacional Autónoma de México. **9**(001):34-44
- FAO/OMS/UNU. (1985). Necesidades de energía y proteínas. OMS., Ginebra. Serie de informes técnicos, No. 724.
- Fundación Mexicana Para El Desarrollo Rural, A. C., (2010). Boletín informativo. Fecha de consulta: Julio 2012. Disponible en: http://www.fmdr.org.mx/images/Boletin_octubre%202010.pdf
- Galleschi, L.; Capocchi, A.; Ghiringhelli, S. and Saviozzi, F. (2002). Antioxidants, Free Radicals, Storage Proteins and Proteolytic Activities in Wheat (*Triticum durum*) Seeds during Accelerated Aging. *Journal Agriculture Food Chemistry*. **50**(19):5450-5457.
- Grant, J. J. and Loake, G. J. (2000). Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. *Plant Physiology*. **124**:21-29.
- Gutiérrez-Hernández, G. F.; Virgen-Vargas, J. y Arellano-Vázquez, J. L. (2007). "Germinación y crecimiento inicial de semillas de maíz con envejecimiento natural". *Agronomía mesoamericana*. **18**(2): 163-170.
- Halliwell, B. (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology*. **141**:312-322.
- Hammond-Kosack, K. and Jones, J. D. G. (2000). Responses to plant pathogens. In: B.B. Buchanan, W. Gruissem, and R. Jones (eds.). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists. Waldorf, MD, USA. pp 1102-1154.
- Hansberg, W. T. (2002). "Biología de las Especies de Oxígeno Reactivas". Instituto de Fisiología Celular, Mensaje Bioquímico, Vol. XXVI. Departamento de Bioquímica, UNAM. México D.F.
- Harman, G. E. and Mattick, L. R. (1976). "Association of lipid oxidation with seed ageing and death". *Nature*. **260**:323-324.
- Heath, L. and Packer L. (1968). "Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation". *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **125**:189-198.



- Hernández, G. R. y Herrerías, G. G. (1998). Amaranto: Historia y promesa. Tehuacán: Horizonte del tiempo vol.1. Patrimonio Histórico de Tehuacán A. C. México. pp. 529.
- Hildebrant, A. G.; Roots, I.; Tjoe, M. and Heinermeier, G. (1978). "Hydrogen peroxide in hepatic microsomes". *Methods in Enzymology*. **52**:342-350.
- Irving, D. W.; Betschart, A. A. and Saunders, R. M. (1981). Morphologic studies on *Amaranthus cruentus*. *Journal Foods Science*. **46**: 1170-1173.
- Itúrbide, G. A. y Gispert M. (1991). La Agricultura en Mesoamérica: Amarantos de grano (*Amaranthus spp.*) Fecha de consulta: abril 2012. Disponible en:
http://www.rlc.fao.org/es/agricultura/produ/cdrom/contenido/libro09/Cap2_6.htm#auto
- Jaw-Neng, Lin and Ching-Huei K. (1998). Effect of oxidative stress caused by hydrogen peroxide on senescence of rice leaves. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*. **39**:161-165.
- Klessig, D. F.; Durner, J.; Noad, R.; Navarre, D.A.; Wendehenne, D.; Kumar, D.; Zhou, J. M.; Shah, J.; Zhang, S.; Kachroo, P.; Trifa, Y.; Pontier, D.; Lam, E. and Silva, H. (2000). Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. **97**:8849-8855.
- Levine, R. L.; Garland, D.; Oliver C. N.; Amici S.; Climent, I.; Lenz, A. G.; Ahn, B. W.; Shaltiel S. and Stadtman, E. R. (1990). "Determination of carbonyl content in oxidatively modified protein". *Methods in Enzymology*. **186**:464-478.
- Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, **193**:265-275.
- Lyon, C. K. and Becker, R. (1987). Extraction and refining of oil from amaranth seed. *Journal of American Oil Chemists Society*. **64**: 233.
- Martínez, V. (2006). Las buenas noticias también son noticia. Cobra amaranto importancia. Fecha de consulta: julio 2012. Disponible en:
<http://fox.presidencia.gob.mx/buenasnoticias/?contenido=26490&pagina=48>



- McCord, J. M. and Fridovich, I. (1969). "Superoxide Dismutase, an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein)". *The Journal of Biological Chemistry*. **244**(22): 6049-6055.
- Metzler, D. E. (1981). "Bioquímica de las reacciones químicas en las células vivas". Ediciones Omega. Barcelona. pp. 585-586.
- Misra, H. P. and Fridovich I. (1972). "Importance of glutathione peroxidase, catalase and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress". *Free radical biology and medicine*. **17**:235-248.
- Mujica, S. A. (1997). "El cultivo del Amaranto (*Amaranthus spp.*): producción, mejoramiento genético y utilización." Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Escuela de Post-Grado Maestría Agricultura Andina, UNA, Perú.
- Murthy, N. U. M.; Prakash, P. K. and Sun W. Q, (2003). "Mechanisms of seed ageing under different storage conditions for *Vigna radiata* (L.) Wilczek: lipid peroxidation, sugar hydrolysis, Maillard reactions and their relationship to glass state transition". *The Journal of Experimental Botany*, Vol. 54, No. 384, pp. 1057-1067.
- Muruaga, M. J. S.; Hernández, C. J. M. y De la Rosa C. M. A. (2004). Tecnología de producción del Amaranto para el Distrito Federal. INIFAP. Campo Experimental Valle de México. Chapingo, Edo. de México. México.
- Nieto, C. (1990). El cultivo de amaranto (*Amaranthus spp.*) una alternativa agronómica para Ecuador. INIAP, EE. Santa Catalina. Publicación Miscelánea. No. 52. Quito, Ecuador.
- Ortega, D. E. (2009). "Amaranto: planta latinoamericana con fuerzas colosales". Laboratorio de Fisiología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad Habana.
- Pérez, G. L. y Pérez, J. L. (2000). "Métodos para medir el daño oxidativo". Instituto Superior de Medicina Militar" Dr. Luis Diez Soto". La Habana, Cuba. *Revista Cubana*. **29**(3):192-198.
- Rayas-Duarte, P. and Joeb, R. (1992). "Study on the squalene content in amaranth grains (Abstracts)". Proceedings of the 6th Annual National Meeting of the Amaranth Institute, North Dakota State. University, Fargo, N.D.



- Santacruz de León, E.E. (2010). "Situación actual de la producción de Amarantho en el Distrito Federal, México" en Observatorio de la Economía Latinoamericana, N° 136. Fecha de consulta: Junio 2012. Disponible en: <http://www.eumed.net/cursecon/ecolat/mx/2010/eesl.htm>
- Sauer, J. D. (1976). The grain amaranths and their relatives: a revised taxonomic and geographic survey. *Annals of Missouri Botanical Garden*. **54**:103-137.
- SIAP. (2010). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Consulta SIACON/ SAGARPA. Fecha de consulta: Enero 2013. Disponible en: http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=351
- Stewart, R. C. R. and Bewley J. D. (1980). Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes". *Plant Physiology*. **65**:245-248.
- Sung, J. M. and Jeng, T. L. (1994). "Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes associated with accelerated aging of peanut seed". *Physiologia Plantarum*. **91**: 51-55.
- Sun, W. Q. and Carl L. (1995). "The Maillard reaction and oxidative stress during aging of soybean seeds". *Physiologia Plantarum*. **94**:94-105.
- Velázquez, P. M.; Prieto, G. B. y Contreras, P. R. (2004). "El envejecimiento y los radicales libres". *Ciencias* 75. P. 36-43.
- Vibrans, L. H. (2008) Fecha de consulta: julio 2012. Disponible en: <http://botanicaeconomicadeamaranto.blogspot.mx/2008/04/botnica-y-descripcin-del-amaranto.html>
- Vilorio, H. y Méndez, J. R. (2011). "Relación entre la conductividad eléctrica, pH del agua de remojo, germinación de semillas y crecimiento de plántulas de maíz (*Zea mays L.*) bajo dos condiciones experimentales", *Scientia Agropecuaria*. **2**:213-228.
- Wilson, D. O. Jr. and McDonald, M. B. Jr. (1985). "The lipid peroxidation of seed ageing". *Seed Science and Technology*. **14**:269-300.