

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
Facultad de Química
Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos

Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

**“EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL INHIBIDOR DE α -
AMILASA DE DIFERENTES VARIEDADES MEJORADAS DE
FRIJOL (*Phaseolus vulgaris*) Y SU EFECTO *IN VIVO*”**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Presenta:

IBQ. María Victoria Rodríguez García

Dirigido por:

Dra. Rosalía Reynoso Camacho

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Noviembre 2012
México



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

“EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL INHIBIDOR DE α -AMILASA DE DIFERENTES
VARIETADES MEJORADAS DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris*) Y SU EFECTO *IN VIVO*”

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Presenta:

I.B.Q. María Victoria Rodríguez García

Dirigido por:

Dra. Rosalía Reynoso Camacho

Dra. Rosalía Reynoso Camacho
Presidente

Firma

Dr. Jorge Alberto Acosta Gallegos
Secretario

Firma

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Vocal

Firma

Dra. Minerva Ramos Gómez
Suplente

Firma

Dr. Salvador Horacio Guzmán Maldonado
Suplente

Firma

M.S.P. Sergio Pacheco Hernández
Director de la Facultad

Dr. Irineo Torres Pacheco
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Noviembre 2012
México

RESUMEN

Los inhibidores de α -amilasa se emplean como una estrategia para controlar la obesidad y la diabetes. Estos inhibidores se encuentran principalmente en leguminosas, como el frijol arriñonado blanco, y funcionan como insecticidas naturales para la planta. Por otro lado, diversos estudios indican una asociación entre la concentración del inhibidor de α -amilasa y el contenido de compuestos fenólicos en frijol común (*Phaseolus vulgaris*). Lo anterior sugiere que variedades mexicanas mejoradas de frijol común, resistentes a sequías e insectos son una fuente alternativa para la obtención de estos inhibidores. El objetivo de este estudio es obtener los extractos proteicos de catorce variedades mejoradas de frijol, evaluar la actividad inhibitoria sobre α -amilasa y purificar el inhibidor con las mejores propiedades para su evaluación *in vivo*. Se les cuantificaron fenoles totales, obteniendo valores en un rango de 4.10-8.86 y de 0.12-0.07 mg EAG/g; taninos condensados con 4.55-15.25 y 0.67-3.15 mg eq. de catequina/g y antocianinas con 0.81-53.61 y 0.02-0.03 mg eq. cianidina-3-glucósido/100g, respectivamente. De acuerdo al menor actividad hemaglutinante y mayor actividad inhibitoria sobre α -amilasa, además de una mejor estabilidad a los cambios de temperatura (25, 30, 37, 40, 50, 60 and 100°C a pH 6.9) y pH (2, 2 a 6.9), las variedades C.72, Bayo Chileno y Negro Otomí, mostraron las mejores características. Sin embargo, no se encontró asociación entre el contenido de compuestos fenólicos y la actividad inhibitoria. De estas variedades, la mejor fue Bayo Chileno, por lo que se procedió a la purificación del inhibidor. Posteriormente, los extractos proteicos de las variedades Bayo Chileno y C.72 (menos estable), así como el inhibidor purificado de Bayo Chileno, se administraron intragástricamente a ratas en dosis de 0, 5, 15, 25 y 50 mg del inhibidor/kg, contra una carga de almidón. Siendo las dosis de 25 y 50 mg/kg, tanto del extracto proteico como del compuesto purificado, las más efectivas y ejerciendo un efecto hipoglucémico similar al de la acarbosa comercial. Los resultados indican que ciertas variedades mejoradas de frijol pueden emplearse como una fuente de inhibidores de α -amilasa, teniendo el potencial para incorporarse en la dieta promoviendo la salud.

Palabras clave: Inhibidor de α -amilasa, frijol (*Phaseolus vulgaris*), glucosa en sangre.

SUMMARY

Alpha-amylase inhibitors are being used as a strategy for the control of obesity and diabetes. These inhibitors are mainly found in leguminous, such as white kidney bean, and function as natural insecticides for the plant. On the other hand, several reports indicate a relationship between α -amylase inhibitor and phenolic contents in common bean. Therefore, improved Mexican varieties of *Phaseolus vulgaris*, resistant to drought and insects, could be an alternative source for these inhibitors. The aim of this study was to obtain protein extracts from fourteen improved varieties of common bean, to evaluate the α -amylase inhibitory activity and purify that with better properties for the *in vivo* studies. Total phenol content was in the range of 0.12-0.07 mg GAE/g, condensed tannins from 3.36 to 13.45 mg CAE/g and anthocyanins from 0.02 to 0.03 mg GCE/100 g. Based on the lowest hemagglutination activity and highest α -amylase inhibition, as well as both temperature (25, 30, 37, 40, 50, 60 and 100°C at pH 6.9) and pH (2, 2 to 6.9) stability, varieties C-72, Bayo Chileno and Negro Otomí were the most suitable. On the other hand, there was no correlation between phenolic content and inhibition activity. As Bayo Chileno showed the best properties, we proceed to purify the inhibitor to further evaluate *in vivo*. Therefore, the proteic extract from varieties Bayo Chileno and C.72 (less stable) and the purified inhibitor of Bayo Chileno were intragastrically administered to rats at different doses (0, 5, 15, 25 and 50 mg of the inhibitor/kg) against a starch load, being 25 and 50 mg/kg the most effective doses for both samples of Bayo Chileno and exerting similar hypoglycemic effect to that of commercial acarbose. Therefore, the results indicate that certain improved bean varieties could be employed as source for α -amylase inhibitor and have the potential to be used in dietary regimes that are designed to promote human health.

(Keywords: α -amylase inhibitor, beans (*Phaseolus vulgaris*), blood glucose).

AGRADECIMIENTOS

Al H. Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo otorgado para la realización de mis estudios de Posgrado.

A la Universidad Autónoma de Querétaro y al Programa de Posgrado en Alimentos del Centro de la República, por permitirme formar parte de su alumnado y poder desarrollar este proyecto de Investigación.

A la Dra. Rosalía Reynoso Camacho por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, por la orientación y el apoyo brindados, no sólo para permitir la generación de éste proyecto de investigación, sino, también por creer en mí y ayudarme a crecer profesional y personalmente.

A mis sinodales: Dra, Minerva Ramos, Dra. Ma. Guadalupe Loarca, Dr. Jorge Alberto Acosta, Dr. Horacio Guzmán, por sus valiosas aportaciones y observaciones para la realización y mejora de éste proyecto, por su tiempo y colaboración para hacer de éste un proyecto de calidad y ayudarme a crecer profesionalmente.

A mis grandes amigas Raquel, Diana, Lilia, Tere y Consuelo, que sin importar la situación estuvieron siempre apoyándome y ayudándome incondicionalmente. Gracias por afrontar las complicaciones y por compartir todos esos momentos conmigo. Las quiero mucho.

A Armando Aguilera Rodríguez, por compartir conmigo cada momento, por enseñarme otra forma de ver la vida, y recordarme lo que soy capaz de hacer y lo fuerte que puedo llegar a ser.

A mis compañeros y amigos de laboratorio: Consuelo, Diego, Mireya, Mayra, Dania, Marely y Claudia, quienes siempre me brindaron su apoyo y ayuda, tanto académica como personalmente.

A todo el personal administrativo que hizo posible la culminación de ésta etapa en mi vida.

DEDICATORIAS

A mi mayor tesoro ...

Mi familia, a quienes les debo todo lo que soy.

A los 2 grandes pilares de mi vida...

Mis padres, Victoria y Felipe que sin importar las complicaciones y obstáculos que se atravesasen siempre han luchado para ayudarme a salir adelante y me han impulsado a luchar por mis sueños y lograr cada una de mis metas. Los amo mucho.

A mi mejor amiga, mi cómplice y la niña más increíble que he tenido el placer de tener en mi vida...

Mi hermana, Miriam, quién a pesar de ser menor que yo me ha enseñado tantas cosas de la vida a veces sin darse cuenta, gracias por luchar junto a mi durante todos estos años. Te amo Miriam.

A mis preciosos ángeles quienes fundaron las bases de una familia sólida, quiénes me bendicen y cuidan cada día desde el cielo...

Mis abuelitos, Victoria, Ma. de Jesús y José, gracias por el precioso regalo que me han legado. Los amo y los extraño.

A las mujeres más fuertes e increíbles que he conocido en mi vida:

Mis tías, Cony, Male, Tey y Rosy, quienes siempre y a pesar de la distancia han estado a mi lado, gracias por hacer de mi vida algo maravilloso, por cuidarme y apoyarme incondicionalmente, las amo.

A Dios por darme la oportunidad de llegar hasta este momento rodeada de las personas que amo...

i. ÍNDICE

		Página
	Resumen	i
	Summary	ii
	Agradecimientos	iii
	Dedicatorias	iv
i	Índice	v
ii	Índice de Cuadros	viii
iii	Índice de Figuras	ix
1.	INTRODUCCIÓN	1
2.	ANTECEDENTES	3
2.1	Enfermedades crónico-degenerativas	3
2.1.1	Obesidad	4
2.1.2	Diabetes mellitus	5
2.2	Alfa-amilasa (α -amilasa)	5
2.3	Tratamientos para el control de la obesidad y diabetes	7
2.3.1	Inhibidores	9
2.3.1.1	Inhibidores de α -glucosidasa	9
2.3.1.2	Acarbosa	9
2.4	Frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	10
2.4.1	Producción	11
2.4.2	Variedades mejoradas de frijol (<i>P. vulgaris</i>)	12
2.4.3	Composición química y compuestos fenólicos en el frijol	13
2.4.4	Propiedades antioxidantes y antiobesigénicas del frijol	14
2.5	Inhibidor de α amilasa del frijol común (<i>P. vulgaris</i>)	14
2.5.1	Distribución y biosíntesis del inhibidor de α -amilasa de <i>P. vulgaris</i>	15
2.5.2	Mecanismo de acción del inhibidor de <i>P. vulgaris</i>	16
2.5.3	Efectos benéficos del inhibidor de α -amilasa	17
2.5.3.1	Reducción de la glucosa e insulina en plasma debido al inhibidor obtenido del extracto de frijol (<i>P. vulgaris</i>)	17
2.5.3.2	Eficiencia de la isoforma 1 del inhibidor de α -amilasa en el extracto reduce la actividad de α -amilasa en el hombre	17
2.5.4	Seguridad y toxicidad de los extractos del inhibidor de α -amilasa asociados con el consumo de frijoles	18
2.5.4.1	Estudios de toxicidad en tratamientos agudos	18
2.5.4.2	Estudios de toxicidad en tratamientos crónicos	18
3	JUSTIFICACIÓN	20
4	HIPÓTESIS	21

5	OBJETIVOS	22
6	MATERIALES Y MÉTODOS	23
6.1	Materiales:	23
6.2	Métodos	23
6.2.1	Obtención del extracto del inhibidor	23
6.2.2	Extracto metanólico	24
6.2.3	Extracto de antocianinas	24
6.2.4	Cuantificación de compuestos fenólicos totales	24
6.2.5	Cuantificación de taninos condensados	25
6.2.6	Cuantificación de antocianinas	25
6.3	Actividad del inhibidor	26
6.4	Determinación de la temperatura y pH óptimos	26
6.5	Purificación del inhibidor de α -amilasa	26
6.6	Cuantificación de proteína	27
6.7	Prueba de la pureza del inhibidor	27
6.8	Perfil electroforético	28
6.9	Experimentos en animales	28
6.10	Análisis estadístico	28
7	RESULTADOS Y DISCUSIONES	29
7.1	Caracterización parcial de las harinas y extractos proteicos totales de las distintas variedades de frijol	29
7.1.1	Contenido de compuestos fenólicos totales, taninos condensados y antocianinas en la harina distintas variedades de frijol	29
7.1.2	Contenido de compuestos fenólicos totales, taninos y antocianinas en el extracto proteico de las distintas variedades de frijol mejoradas	31
7.2	Actividad hemaglutinante (contenido de lectinas) en el extracto proteico de las distintas variedades de frijol	32
7.3	Actividad del inhibidor sobre la enzima α -amilasa pancreática humana	34
7.4	Correlaciones entre la actividad inhibitoria, contenido de compuestos biocativos y actividad hemaglutinante	35
7.5	Patrón electroforético del extracto de proteico de frijol de las 5 variedades seleccionadas	38
7.6	Estabilidad del inhibidor en el extracto proteico	39
	Determinación de la estabilidad del inhibidor en el extracto proteico	39
7.6.1.	Efecto de la concentración del inhibidor sobre la actividad inhibitoria sobre la α -amilasa humana	39

7.6.2.	Efecto del tiempo sobre la actividad del inhibidor de α -amilasa pancreática humana	41
7.6.3.	Efecto del pH sobre la actividad del inhibidor de α -amilasa pancreática humana	42
7.6.3.1	Efecto del pH (condiciones fisiológicas) sobre la actividad del inhibidor de α -amilasa pancreática humana	42
7.6.4.	Efecto de la temperatura sobre la actividad del inhibidor de α -amilasa humana	44
7.7	Purificación del inhibidor de α -amilasa	45
7.7.1	Estandarización del proceso de purificación del inhibidor de α -amilasa	48
7.8	Electroforesis de las fracciones purificadas	49
7.9	Efecto hipoglucemiante del inhibidor en el extracto y purificado a distintas dosis	51
7.9.1	Efecto hipoglucemiante del extracto proteico total de la variedad Bayo Chileno	51
7.9.2	Efecto hipoglucemiante del inhibidor en el extracto proteico total de la variedad Cacahuete 72 (C.72)	52
7.9.3	Efecto hipoglucemiante del inhibidor purificado de la variedad Bayo Chileno	54
7.9.4	Efecto hipoglucemiante del extracto proteico e inhibidor purificado de la variedad Bayo Chileno	56
8.	CONCLUSIONES	59
9.	ANEXOS	60
10.	Referencias bibliográficas	62

ii. ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Cambios en la prevalencia de las enfermedades crónico-degenerativas ocurridas en México, entre 1994 y 2006.	4
2	Producción preliminar estimada por tipo de frijol para los ciclos agrícolas Primavera-Verano (PV) 1998 y Otoño-Invierno (OI) 1998/99	10
3	Producción de frijol en México	11
4	Estudios en humanos sobre la eficacia de extracto que contiene la isoforma 1 del inhibidor de α -amilasa sobre la digestión del almidón	19
5	Contenido de fenoles totales, taninos y antocianinas en las harinas de frijol crudo de las distintas variedades de frijol	30
6	Contenido de fenoles totales, taninos y antocianinas en el extracto proteico de las distintas variedades de frijol.	34
7	Determinación de las correlaciones entre la actividad inhibitoria el contenido de fenoles totales, antocianinas, taninos condensados y actividad hemaglutinante.	37
8	Inhibición de α -amilasa por acción del inhibidor del extracto proteico total a distintas temperaturas	46

iii. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Sitios de acción de la α -amilasa en el organismo y productos de la acción de la α -amilasa salival y pancreática.	7
2	Sitios de acción de los fármacos orales	9
3	Síntesis del inhibidor en cotiledón y axis (eje embrionario) en la grano del frijol	16
4	Unidades de hemaglutinación en el extracto proteico de las distintas variedades de frijol mejoradas	33
5	Inhibición de la enzima α -amilasa por acción del inhibidor en el extracto proteico total de las diferentes variedades de frijol.	36
6	Variedades de frijol que presentaron mayor inhibición de α -amilasa y menor actividad hemaglutinante.	37
7	Gel de electroforesis del extracto proteico total de las variedades de frijol.	39
8	Efecto de la concentración sobre la actividad del inhibidor de α -amilasa pancreática humana (37 °C/pH 6.9/1 h)	40
9	Cinética de inhibición de la enzima α -amilasa por los extractos proteicos de las variedades de frijol (37 °C/pH6.9/0.7 mg/mL)	41
10	Efecto del pH sobre el inhibidor de α -amilasa pancreática humana (37 °C/pH 6.9/1 h)	43
11	Porcentaje de inhibición de la enzima α -amilasa a distintos pHs utilizando extractos proteicos de diferentes variedades de frijol.	44
12	Proceso de purificación del inhibidor de α -amilasa del frijol Bayo Chileno.	48
13	Proceso de purificación estandarizado del inhibidor de α -amilasa	49
14	Perfil electroforético de las fracciones purificadas del inhibidor de alfa-amilasa de la variedad Bayo Chileno	50
15	Efecto hipoglucémico del extracto proteico total de la variedad Bayo Chileno evaluado en ratas sanas	53
16	Efecto hipoglucémico del extracto proteico total de la variedad Cacahuate 72 (C.72) en ratas sanas	55
17	Efecto hipoglucémico del inhibidor purificado de la variedad Bayo Chileno evaluado en ratas sanas	57

18	Efecto hipoglucémico evaluado en ratas sanas del extracto proteico total de la variedad Bayo Chileno, así como el inhibidor purificado empleando 25 mg inhibidor/kg peso corporal	58
----	---	----

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad el incremento en la tasa de mortalidad debido a las complicaciones generadas por las enfermedades crónico degenerativas como la diabetes y la obesidad representa uno de los principales problemas en nuestro país (Yusuf *et al.*, 2001; Secretaría de Salud, 2007).

Dentro de los principales factores de riesgo que están relacionados con la salud se encuentra la dieta actual del mexicano, ya que se basa principalmente en alimentos ricos en calorías y alto contenido de grasa. La denominada comida rápida es alta en carbohidratos, que al ser metabolizados en el organismo liberan una gran cantidad de glucosa en el torrente sanguíneo, siendo éste uno de los factores que pudieran influir en el desarrollo de las enfermedades mencionadas (Aguilar-Salinas *et al.*, 2003; Revista de endocrinología, 2004)

La amilasa, denominada también ptialina o tialina, es un enzima hidrolasa que tiene la función de degradar el glucógeno y el almidón para formar azúcares simples. Esta enzima se produce principalmente en las glándulas salivares (sobre todo en las glándulas parótidas) y en el páncreas. Esta característica de la enzima permite su uso con fines preventivos en la salud, desarrollando herramientas pronósticas y la creación de fármacos, que pudiera ayudar en el tratamiento de padecimientos como la diabetes y la obesidad (Ganong, 1995; García-Luna y López-Gallardo, 2007; Córdova-Villalobos *et al.*, 2008; Fisiología Gastrointestinal, 2011).

Existen fármacos que ayudan a minimizar la digestión del almidón impidiendo su completa degradación y absorción en el intestino. En la actualidad no sólo se aplica un tratamiento sino que se buscan alternativas que pudieran ser empleadas como un complemento para el control de las enfermedades crónico-degenerativas.

Entre estas opciones se encuentran los inhibidores o retardadores de la absorción o digestión (Jiang *et al.*, 2008; Tormo *et al.*, 2004) de carbohidratos (inhibidores de α -amilasa o disacaridasas, inhibidores de glucoamilasas, y algunos inhibidores enzimáticos, como, inhibidores de α -glucosidasas, que actúan inhibiendo la hidrólisis de los hidratos de carbono en el tubo digestivo y retrasan su absorción

(acarbosa y miglitol) o inhibidores de α -amilasa que actúan inhibiendo la degradación de carbohidratos complejos a nivel intestinal (Tormo *et al.*, 2004; Arroyo-Bros y Caixás-Pegragós, 2007), teniendo éstos un papel primordial en el tratamiento de la relación obesidad-diabetes.

Se buscan también alternativas como lo es el inhibidor de α -amilasa que es un compuesto antinutricio que se encuentra en el grano frijol, formando parte de su composición natural. Por esta razón, el frijol se emplea como una fuente del inhibidor siendo este un complemento en el tratamiento de la diabetes y la obesidad. El mecanismo de acción del inhibidor se basa en la disminución de la digestión del almidón, mediante un bloqueo del sitio activo de la enzima. Uno de los efectos benéficos que proporciona el inhibidor de α -amilasa es la propiedad anti-obesigénica, a causa de la movilización de la grasa que se origina por la restricción de energía debido a la acción del inhibidor sobre el almidón. Así mismo, también se reduce hasta un 85% el exceso de glucosa post-pandrial en el plasma al disminuir de un 20 a un 50 % la digestión del almidón (Ishimoto y Chrispeels, 1996; Celleno *et al.*, 2007, Jiang *et al.*, 2008).

En México se han generado variedades de frijol resistentes al ataque de insectos y a la sequía favoreciendo la producción de estos granos en climas extremos y suelos que no son aptos para ningún otro tipo de cultivo, sin embargo, por razones principalmente de presentación (estética), no han sido aceptadas por el consumidor, por lo tanto una alternativa de estos materiales podría ser, su uso como fuente de inhibidores de α -amilasa por la industria farmacéutica.

2. ANTECEDENTES

2.1 Enfermedades crónico-degenerativas

Durante el último siglo se ha presentado un incremento dramático en la incidencia de enfermedades crónico degenerativas para muchos países, debido principalmente a la predominancia de deficiencias nutricionales en la dieta. En nuestro país se ha incrementado la tasa de mortalidad debida a complicaciones de enfermedades crónico degenerativas, que son un grupo heterogéneo de padecimientos que contribuye a la mortalidad por diabetes y enfermedades cardiovasculares, su evolución natural puede modificarse con acciones que cambien el curso clínico de las condiciones que determinan su incidencia. Entre ellas se encuentran el sobrepeso y la obesidad, las concentraciones anormales de los lípidos sanguíneos, la hipertensión arterial, el tabaquismo, el sedentarismo, la dieta inadecuada y el síndrome metabólico (Yusuf *et al.*, 2001).

Las variaciones de la prevalencia de la obesidad, el sobrepeso, las dislipidemias, la hipertensión arterial y el síndrome metabólico en el periodo comprendido por las Encuestas Nacionales de Salud 1994-2006 (Cordova-Villalobos *et al.*, 2008) se muestran en el Cuadro 1. El porcentaje de la población con un peso mayor al deseable (índice de masa corporal [IMC] >25 kg/m²) aumentó 13% en el periodo de 1994 a 2000 y el cambio fue mayor (33.5%) entre los años 2000 y 2006. La misma tendencia creciente se observó en la prevalencia del “síndrome metabólico”, concepto que identifica los casos con mayor riesgo de desarrollar diabetes o enfermedad cardiovascular a mediano plazo (Aguilar-Salinas *et al.*, 2001, 2004).

Una derivación intermedia en la evolución natural de las enfermedades crónico degenerativas es la diabetes de tipo 2. El porcentaje de adultos con diabetes (diagnóstico previo establecido por un médico) creció 25% entre cada encuesta nacional (de 4 a 5.8% en el periodo de 1994 a 2000 y de 5.8 a 7% entre 2000 y 2006). Se calcula que el 7% de la población general en México padece diabetes, esta representa un 21% de los habitantes entre 65 a 74 años (Cordova-Villalobos *et al.*, 2008; FMD, 2011).

Cuadro 1. Cambios en la prevalencia de las enfermedades crónico-degenerativas ocurridas en México, entre 1994 y 2006.

	Encuesta Nacional de Enfermedades crónicas 1994 (%)	Encuesta Nacional de Enfermedades crónicas 2000 (%)	Encuesta Nacional de Enfermedades crónicas 2006 (%)
Sobrepeso*	38	38.4	39.8
Obesidad [‡]	20.9	23.7	30.8
Hipertensión arterial	26.6	30.7	30.8
Colesterol- HDL <40 mg/dL	61	63.6	-
Triglicéridos <150 mg/dL	42.3	47.8	-
Síndrome metabólico [∞]	26.6	34	-
Diabetes [#]	4.0	5.8	7

*Índice de masa corporal de 25 a 29.9 kg/m²

[‡] Índice de masa corporal de > 30 kg/m²

[∞] Definido con base en los criterios del Programa Nacional de Educación en Colesterol 2001

[#] Diagnóstico previo

Referencia: Encuestas Nacionales de Salud 1994-2006 (Cordova-Villalobos *et al.*, 2008)

2.1.1 Obesidad

Uno de los padecimientos más importantes que ha incrementando su incidencia es la obesidad. La obesidad, incluyendo el sobrepeso como estado premórbido, es una enfermedad crónica caracterizada por almacenamiento excesivo de tejido adiposo en el organismo, acompañada de alteraciones metabólicas que predisponen a la presentación de trastornos que deterioran el estado de salud, asociada en la mayoría de los casos a patología endócrina, cardiovascular y ortopédica (OMS, 2011 a).

La obesidad es una enfermedad de etiología multifactorial de curso crónico en la cual se involucran aspectos genéticos, ambientales y de estilo de vida, que conducen a este trastorno metabólico. Se caracteriza por un balance positivo de energía, que ocurre cuando la ingestión de calorías excede al gasto energético ocasionando un aumento en los depósitos de grasa corporal y por lo tanto la ganancia de peso (Tapia-Vildósola, 2008; OMS, 2011 a).

2.1.2 Diabetes mellitus

La diabetes mellitus es un trastorno metabólico caracterizado principalmente por hiperglicemia. Varios procesos patogénicos están involucrados en su desarrollo, que van desde la destrucción autoinmune de las células β en el páncreas, con la consecuente deficiencia en la insulina, hasta las anormalidades resultantes en la resistencia a la acción de la insulina (Mora y Ospina, 2009, OMS, 2011 b).

- Diabetes de tipo 1. Se caracteriza por una producción deficiente de insulina y requiere la administración diaria de esta hormona.
- Diabetes de tipo 2. Se debe a una utilización ineficaz de la insulina. Representa el 90% de los casos mundiales y se debe en gran medida a un peso corporal excesivo y a la inactividad física.
- Diabetes gestacional. Es un estado hiperglucémico que aparece o se detecta por vez primera durante el embarazo.

Se ha llegado a la conclusión de que uno de los factores determinantes en la detonación de esos padecimientos es la dieta actual del mexicano, que se basa principalmente en alimentos elevados en calorías y con altos porcentajes de grasas. La denominada comida rápida contiene una alta concentración de carbohidratos complejos, que al ser metabolizados en el organismo liberan una gran cantidad de glucosa en el torrente sanguíneo, siendo éste uno de los factores que pudieran desencadenar estas enfermedades (Aguilar-Salinas *et al.*, 2003; Revista de endocrinología, 2004)

2.2 Alfa amilasa (α -amilasa)

Cuando se consumen carbohidratos complejos como el almidón en la dieta, las enzimas que actúan en el organismo son las amilasas que degradan estos compuestos, liberando moléculas más simples como la glucosa o algunos disacáridos (maltosa y sacarosa) al torrente sanguíneo. Estos carbohidratos simples

se utilizan para producir energía, y sin embargo, el exceso de carbohidratos será almacenado como glucógeno y lípidos (Ganong, 1995).

La α -amilasa (1,4- α -D-Glucano glucanohidrolasa) es un enzima hidrolasa que tiene la función de digerir el glucógeno y el almidón para formar azúcares simples, se produce en las glándulas salivales (sobre todo en las glándulas parótidas) y en el páncreas. Tiene un pH de 7 y es completamente dependiente de los iones cloruro. Dado que puede actuar en cualquier punto de la cadena de almidón es más rápida que la β -amilasa. En los animales es una enzima digestiva y su pH óptimo está entre 6.7 y 7.2. La digestión de los hidratos de carbono comienza en la boca con la amilasa salival y continúa en el intestino delgado con la amilasa pancreática (Ganong, 1995; García-Luna y López- Gallardo, 2007; Fisiología Gastrointestinal, 2011).

El almidón está compuesto por cadenas lineales de glucosa unidas por enlace $\alpha(1,4)$ que se ramifica en ciertos puntos con enlaces $\alpha(1,6)$. La amilasa salival o ptialina rompe sólo un pequeño porcentaje de los carbohidratos complejos e insolubles (almidón) en el enlace $\alpha(1,4)$ hasta formar unidades como dextrinas y posteriormente maltosas (a pH prácticamente neutro, alrededor de 6.8). La ptialina es capaz de desdoblar el almidón hasta glucosa, pero requiere para este efecto un contacto prolongado con el sustrato. Los alimentos permanecen en la boca durante poco tiempo, y es probable, que en el momento en que son deglutidos, no más del 5% de todos los almidones ingeridos se encuentren ya hidrolizados. La digestión continúa durante un período de hasta 1 hora, hasta que los alimentos se mezclan con las secreciones gástricas. En este momento la actividad de la amilasa salival queda bloqueada por el ácido de las secreciones del estómago, ya que su actividad enzimática desaparece por completo cuando el pH desciende a un pH 4 aproximadamente. No obstante, antes de que los alimentos se mezclen con el jugo gástrico el porcentaje de almidones que han sido hidrolizados hacia maltosa oscila entre el 30% y 40% (Guyton y Hall, 1998; García-Luna y López-Gallardo, 2007; Secreciones en el tubo digestivo, 2011).

Posteriormente, la amilasa pancreática participa a nivel intestinal en el lumen duodenal, rompiendo los enlaces $\alpha(1,4)$ (de algunos de los carbohidratos complejos

restantes) y los productos resultantes son glucosa, maltosa, maltotriosa y dextrinas (Figura 1). La dextrina es hidrolizada fundamentalmente por una glucoamilasa aunque también por isomaltosa-sacarasa. La maltosa y maltotriosa son hidrolizadas por la isomaltasa que rompe los enlaces $\alpha(1,6)$ y forma un complejo con la sacarasa, mientras que la α -glucosidasa da como resultado moléculas de glucosa libres (Ganong, 2001; García-Luna y López Gallardo, 2007).

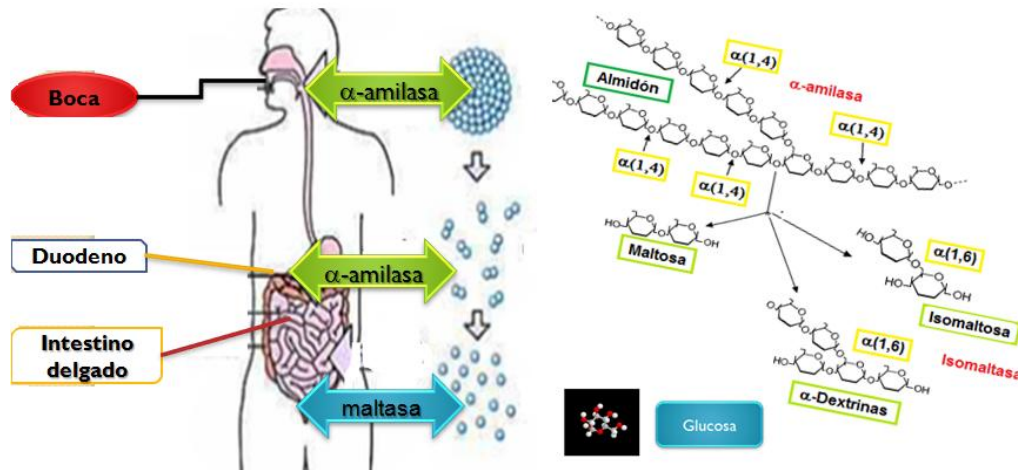


Figura 1. Sitios de acción de la α -amilasa en el organismo y productos de la acción de la α -amilasa salival y pancreática (Ganong, 1995; García-Luna y López Gallardo, 2007).

2.3 Tratamientos para el control de la obesidad y diabetes

Las características mencionadas, tanto de la enzima como de la dieta, introducen oportunidades para la prevención, el desarrollo de herramientas pronósticas y la creación de fármacos, que pudiera ayudar en el tratamiento de dichos padecimientos. Existen algunos productos que ayudan a minimizar la digestión del almidón impidiendo su completa degradación y absorción en el intestino, por lo que en la actualidad no sólo se aplica un tratamiento clínico sino que se buscan alternativas que son empleadas como un complemento para el tratamiento de las enfermedades crónico-degenerativas, usando sustancias que permitan mantener un control de dichas enfermedades. Entre las que se encuentran

los inhibidores o retardadores de la absorción (Jiang *et al.*, 2008; Tormo *et al.*, 2004) de carbohidratos (inhibidores de α -amilasa o disacaridasas, inhibidores de glucoamilasas), que actúan a diferente nivel ayudando a regular los niveles de glucosa en el organismo (Figura 2). Es necesario considerar que para elegir un determinado fármaco, debe guiarse por la alteración fisiopatológica predominante, su efecto en la disminución de la HbA1c (hemoglobina glicosilada), sus posibles efectos indeseables y contraindicaciones y, por último, su precio (Arroyo-Bros y Caixás-Pegragós, 2007; Córdova-Villalobos *et al.*, 2008).

Los fármacos antihiper glucémicos orales se clasifican en:

Secretagogos: Actúan estimulando la secreción endógena de insulina; incluyen las sulfonilureas (SU), las meglitinidas (repaglinida), y los derivados de la D-fenilalanina (nateglinida)

No secretagogos o sensibilizadores: Mejoran la resistencia a la insulina y aumentan su sensibilidad en el hígado, en tejidos muscular y adiposo, entre éstos se encuentran la metformina [MTF] y las tiazolidinedionas o glitazonas.

Inhibidores: Inhibidores de α -glucosidasas, que inhiben la hidrólisis de los hidratos de carbono en el tubo digestivo y retrasan su absorción (acarbosea o miglitol) o inhibidores de α -amilasa que inhiben la degradación de carbohidratos complejos a nivel intestinal. Teniendo éstos un papel primordial en el tratamiento de la relación obesidad-diabetes. (Tormo *et al.*, 2004; Arroyo-Bros y Caixás-Pegragós, 2007).

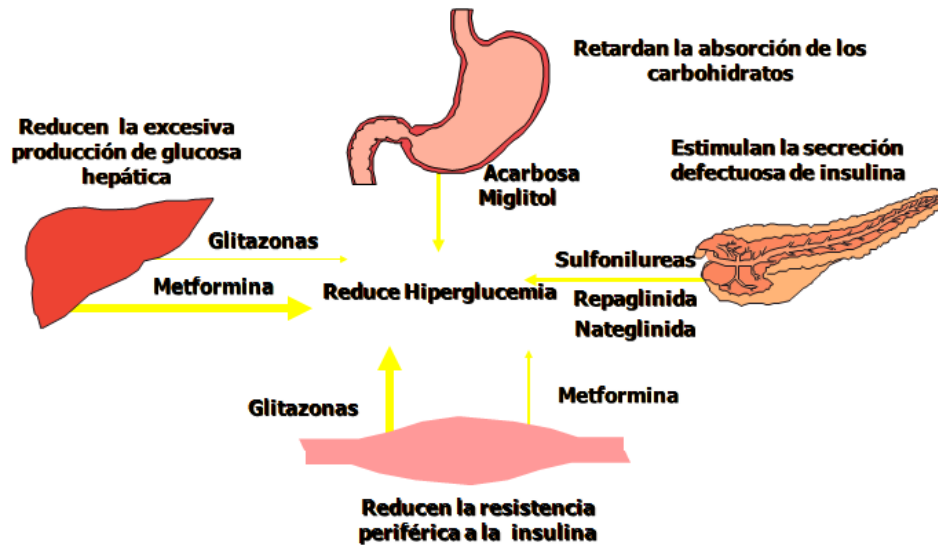


Figura 2. Sitios de acción de los fármacos orales (DeFronzo, 1999)

2.3.1 Inhibidores

2.3.1.1 Inhibidores de α -glucosidasa: Disminuyen la glucemia y la insulinemia posprandial, mejoran el perfil glucémico y reducen la HbA1c alrededor de un 0.77%. Los efectos adversos son principalmente gastrointestinales (diarrea, flatulencia, dolor abdominal), como consecuencia de la metabolización por la flora local de los hidratos de carbono que llegan al colon. La dosificación escalonada, iniciada con dosis bajas, puede contribuir a mejorar su tolerancia. Entre sus contraindicaciones se encuentran la enfermedad intestinal, la pancreatitis, la hipersensibilidad a los principios activos, en menores de 18 años, el embarazo y la lactancia (Lebovitz, 1997; Arroyo-Bros y Caixás-Pegragós, 2007).

2.3.1.2 Acarbosa: Es una pseudotetramaltosa de origen microbiano utilizada en la diabetes para retrasar la absorción de los hidratos de carbono y evitar los picos posprandiales de glucosa. El mecanismo de acción de la acarbosa se basa en la inhibición de las enzimas presentes en la membrana mucosa del intestino delgado (α -glucosidasas) implicadas en la degradación de los disacáridos, oligosacáridos y polisacáridos de los alimentos, en consecuencia, la glucosa procedente de estos carbohidratos se libera con mayor lentitud y pasa a la sangre más lentamente. Algunos de los efectos adversos más frecuentes son flatulencia y ruidos intestinales,

ocasionalmente, diarrea y distensión abdominal y con menor frecuencia, dolor abdominal. Se buscan también alternativas o fármacos que hayan sido obtenidos de productos naturales como lo es el inhibidor de α -amilasa que es compuesto antinutricio que se encuentra en el frijol, formando parte de su composición natural (Chaisson, 2002; Arroyo-Bros y Caixás-Pegragós, 2007). Por ésta razón el frijol puede emplearse como una fuente del inhibidor para su posterior empleo como un complemento en el tratamiento de la diabetes y la obesidad.

2.4 Frijol común (*Phaseolus vulgaris*)

El frijol común, pertenece a la familia de las fabáceas (leguminosas). La planta puede llegar a medir de 50 a 70 cm de altura; sus granos, son reniformes oblongas a ovals o redondeadas, poco comprimidas, color rojo, amarillo, café o negro, entre otros. Entre sus componentes antinutricios que tienen potencial benéfico para la salud se encuentran las antocianinas, taninos, algunos compuestos fenólicos como vainillina y catequina, fitohemagluteninas e inhibidores de α -amilasa. La producción de acuerdo al tipo de grano se muestra en el Cuadro 2. (Acosta-Gallegos y Pérez -Herrera, 2000; Reynoso-Camacho *et al.*, 2007; Jiang *et al.*, 2008, Dirección General Adjunta de Planeación Estratégica y Análisis Sectorial, 2009).

Cuadro 2. Producción preliminar estimada por tipo de frijol para los ciclos agrícolas Primavera-Verano (PV) 1998 y Otoño- Invierno (OI) 1998/99

Tipo de grano	Ciclo PV 98 Miles de toneladas	Tipo de grano	Ciclo OI 98/99 Miles de toneladas
Negro (brillante y opaco)	222,838	Mayocoba	233,000
Pinto Nacional	261,000	Peruano	42,000
Bayo	44,500	Negro (opaco)	92,000
Manzano	25,000	Otros	79,000
Flor de Mayo	88,500		
Otros	93,974		
Total	735,812	Total	446,000

Fuente: Centro de Estadística Agropecuaria SAGAR, 1999.

Datos ajustados con información de la Unión Nacional de Productores de Frijol, 1999.

Referencia: Acosta-Gallegos y Pérez -Herrera, 2000.

2.4.1 Producción

La producción de frijol en México está orientada a satisfacer la demanda nacional, ya que al igual que el maíz, el consumo de esta leguminosa ocupa un lugar importante dentro de la dieta diaria en las familias mexicanas (Cuadro 3).

Cuadro 3. Producción de frijol en México

Año	Prod ¹	Superficie ²		Rendimiento ³			Precio MR ⁵ (\$)	Valor Prod ⁶ (\$)
		Semb	Cos	R	T	R+T ⁴		
2005	0.83	1.75	1.26	1.58	0.47	0.66	6903	5708
2006	1.39	1.81	1.72	1.59	0.68	0.80	6301	8733
2007	0.99	1.69	1.49	1.70	0.52	0.67	6984	6942
2008	1.07	1.63	1.42	1.65	0.51	0.75	N/D	N/D

/1 millones de toneladas, 2/ superficie sembrada y cosechada en millones de ha,
/3 toneladas por hectárea, /4 riego + temporal, /5 precio medio rural en pesos,
/6 valor de la producción en millones de pesos.

N/D cifra no disponibles.

Fuente: elaboración propia con datos de SIAP, con base en FIRA Boletín Informativo No. 316, Vol. XXXIII, 2001.

Referencia: Dirección General Adjunta de Planeación Estratégica y Análisis Sectorial, 2009

Como se puede observar en el cuadro anterior, la producción de frijol muestra un comportamiento variable desde el año 2002, el incremento más importante en la producción se dio entre el 2005 y 2006 (67.6%). Este es debido principalmente a dos factores: una mayor superficie sembrada y al incremento en el rendimiento por hectárea (Dirección General Adjunta de Planeación Estratégica y Análisis Sectorial, 2009).

En el país existe un fuerte desequilibrio entre las distintas regiones del país en lo referente al consumo de esta leguminosa, esto aunado a que la composición de las variedades más demandadas no es congruente con las que, por sus características de resistencia a factores adversos o por su alto rendimiento, se producen, ocasionando especulaciones con las variedades de mayor demanda. También debido a la especulación con los precios de las variedades preferentes, se obtienen producciones mayores a la demanda con el consecuente abatimiento de los precios, es decir, que se produzcan cantidades excedentes de frijol, provocando

caídas en los precios y generando así grandes pérdidas económicas a los productores de hasta un 60% (Acosta-Gallegos y Pérez-Herrera, 2000).

Tomando en cuenta el excedente generado de ciertas variedades y el bajo valor monetario que éste adquiere generando pérdidas a los productores, pudieran utilizarse algunas de estas materias primas para la obtención de otros subproductos que puedan ser empleados como alternativas y complementos en los tratamientos de las enfermedades crónico degenerativas que actualmente se han incrementado en el país como lo son la diabetes y obesidad. Uno de estos subproductos es el inhibidor que se obtiene directamente del grano de frijol (formando parte de su constitución natural) (Acosta-Gallegos y Pérez-Herrera, 2000).

2.4.2. Variedades mejoradas de frijol (*P. vulgaris*)

Los programas de mejoramiento del frijol en México se han enfocado en la obtención de variedades con alto rendimiento de grano y resistencia a factores adversos bióticos (enfermedades, plagas y malezas) y abióticos (sequía, temperaturas extremas, salinidad y suelos pobres). Las características físico-químicas del grano, como tamaño, color y uniformidad, sabor, tiempo de cocción y contenido de proteína, se relacionan con mejor calidad culinaria y nutricional del frijol y son importantes para los consumidores. Por ello también se incorporan estas características como criterios de selección en el mercado mexicano. Es por todo lo anterior que las variedades mejoradas de frijol han llegado a ocupar hasta el 80% de la superficie destinada para el cultivo del frijol, sobre todo en los estados del norte de la República. Algunos de las variedades de frijol mejoradas se mencionan a continuación: Pinto Villa, Pinto Saltillo, Flor de Mayo Eugenia, Flor de Mayo Anita, Flor de Junio Marcela, Bayo Madero, Higuera, Negro 8025, Negro Jamapa, Negro Otomí (Rosales-Serna *et al.*, 2004); Allende-Arrarás *et al.*, 2006).

2.4.3 Composición química y compuestos fenólicos en el frijol

Los carbohidratos se encuentran presentes en un 52.4% de peso seco, por lo que son la parte principal del grano frijol; y se componen principalmente de carbohidratos complejos, almidón y fibra dietética, y de oligosacáridos como, rafinosa, estaquiosa y verbascosa. Además el frijol es una fuente importante de proteínas, conteniendo entre 16 y 33 % (Guzmán-Maldonado y Paredes-López, 1998; Iniestra-González *et al.*, 2005).

El frijol aporta 34.4%, 19.1% y 15.9% de las cantidades diarias recomendadas de ácido fólico, hierro y zinc, respectivamente. Por otro parte, esta leguminosa contiene una serie de compuestos conocidos como factores antinutricios, entre los que destacan los fitatos, oxalatos, entre otros, los cuales reducen el valor nutritivo de la semilla. Sin embargo, esta capacidad inhibitoria se reduce significativamente con los procesos térmicos culinarios (Serrano y Goñi, 2004).

Dentro de los compuestos fenólicos del frijol se pueden mencionar flavonoides como daidzeina, genisteina (en el frijol negro y en bajas cantidades), kaempferol y quercetina; ácidos fenólicos como ácido gálico, catequina, ácido p-hidroxibenzoico, ácido vanílico, ácido p-cumárico, y ácido ferúlico, así como antocianinas. Estos compuestos poseen propiedades antioxidantes; sin embargo, las condiciones edafoclimáticas y época del año en las que se cultive el frijol, son factores determinantes en la calidad nutracéutica de dicha leguminosa (Iniestra-González *et al.*, 2005).

También se ha reportado que las variedades agrupadas por color de testa con mayor concentración de factores antinutricios (donde la mayoría tiene efectos biológicos positivos) son las de tipo negro y bayos, siendo así una fuente importante de antioxidantes y por lo tanto podrían disminuir enfermedades en las cuales la presencia de oxidación por radicales libres esté presente, como obesidad, diabetes y cáncer. El mecanismo de acción de estos compuestos se basa en su potencial como compuestos antioxidantes, logrando disminuir el estrés oxidativo en el organismo, lo cual puede crear una protección en diferentes tejidos que están sometidos a un proceso de oxidación durante la obesidad, como las células β

pancreáticas, tejido adiposo, renal, muscular, entre otros. Se ha reportado que los compuestos fenólicos activan al receptor activado por proliferador de peroxisomas y (PPAR γ), el cual está implicado en la inhibición de las cinasas de IKB, disminuyendo la expresión de citocinas proinflamatorias y moléculas de adhesión en tejidos como el riñón y el endotelio, reduciendo así el riesgo de desarrollar placa aterosclerótica y daño renal. Los fenoles funcionan también también como un activador directo para la translocación de los transportadores GLUT4, permitiendo la entrada de glucosa en la célula, reduciendo de ésta manera los niveles de glucosa libre en sangre (Serrano y Goñi, 2004; Díaz-Batalla *et al.*, 2006; Zeng *et al.*, 2011).

2.4.4 Propiedades antioxidantes y antiobesigénicas del frijol

Algunos compuestos fenólicos pueden reducir la digestibilidad de las proteínas y la biodisponibilidad de minerales, y los galactooligosacáridos pueden ocasionar flatulencias. Sin embargo, algunos de los factores antinutricios son los que han demostrado tener efectos benéficos a la salud (taninos, fenoles, antocianinas). Una de las propiedades nutraceuticas del frijol se enfoca en la capacidad que tiene para disminuir o incluso prevenir la obesidad. Dentro de los componentes que contribuyen a este efecto tanto en el frijol crudo como en el frijol cocido son los carbohidratos no digeribles y de digestión lenta, como el almidón resistente, la fibra y los oligosacáridos, inhibidores de amilasas, fitohemaglutininas, taninos (Serrano y Goñi, 2004; Díaz-Batalla *et al.*, 2006; Reyes-Rivas *et al.*, 2008).

2.5 Inhibidor de α amilasa del frijol común (*P. vulgaris*)

Los inhibidores de α -amilasa son proteínas que interfieren con la hidrólisis del almidón y por lo tanto reducen los niveles de glucosa sanguínea, glucosa plasmática postprandial, insulina, péptido C y péptido inhibidor gástrico, lo que sugiere que estos inhibidores pueden emplearse con propósitos terapéuticos en diabetes y control de obesidad. El inhibidor de la α -amilasa de frijol, ha sido extraído, purificado y empleado de manera comercial como anti-diabético y antiobesigénico. Se han realizado varios estudios en los cuales se demuestra la baja actividad que presentan los extractos del inhibidor, se ha reportado también que empleando

métodos no sólo de extracción sino de purificación adecuados puede obtenerse el inhibidor con una mayor actividad y potencial para poder ser empleado en tratamientos para la diabetes y obesidad. El inhibidor de α -amilasa es legalmente aceptado como un complemento en el tratamiento de éstas enfermedades (Serrano y Goñi, 2004; Jiang *et al.*, 2008, Mune-Mune *et al.*, 2011).

2.5.1 Distribución y biosíntesis del inhibidor de α -amilasa de *P. vulgaris*

Algunos inhibidores extraídos directamente de cereales se asocian con alergias produciendo asma y dermatitis, lo cual no ocurre con el inhibidor extraído y purificado directamente del frijol, representando una ventaja para su administración (Jiang *et al.*, 2008). Se han determinado dos isoformas principales del inhibidor, 1 (α -AI1) y 2 (α -AI2), siendo la isoforma 1 la que presenta una mayor actividad anti-amilasa en humanos ya que se encuentra distribuida en la mayoría de las variedades de frijol. En la planta de frijol, la isoforma 1 sólo se encuentra en el grano y se concentra 3 veces más en el axis (eje embrionario) que en el cotiledón, aparentemente esto debido a que la glicosilación del inhibidor es más eficiente en este compartimento, permitiendo una mayor liberación del compuesto, no se ha encontrado evidencia de la presencia de la isoforma 1 en otros órganos de la planta (Figura 3), representando aproximadamente un 9 a 11 % de la proteína total de la semilla (Kusaba *et al.*, 2000; Jiang *et al.*, 2008).

La síntesis del inhibidor ocurre al mismo tiempo que la de las faseolinas y fitohemaglutinina (PHA), acumulándose en las vacuolas de la planta, el inhibidor es similar a una lectina típica (en cuanto al tiempo y sitios donde se sintetiza como una proteína completa) del frijol, es sintetizado en el retículo endoplásmico rugoso, posteriormente es modificado en el aparato de Golgi, donde es liberado mediante un péptido señal y una N-glicosilación, y es transportado a las vacuolas que lo almacena y donde es procesado proteolíticamente (Moreno *et al.*, 1990; Jiang *et al.*, 2008).

La actividad máxima del inhibidor se obtiene en un intervalo de temperatura de entre 22 y 37 °C. El tiempo de incubación para la activación del inhibidor varía entre 10 minutos a un pH de 4.5, y entre 40 minutos a 120 minutos para un pH de

6.9, que es el óptimo para la enzima α -amilasa. (Marshall y Lauda 1975; Le Berre-Anton *et al.*, 1997; Jiang *et al.*, 2008).

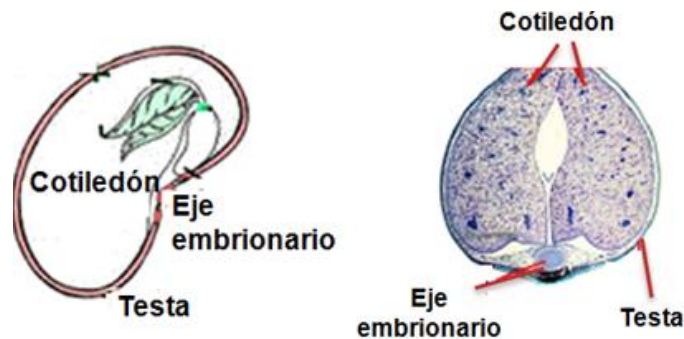


Figura 3. Síntesis del inhibidor en cotiledón y axis (eje embrionario) en el grano de frijol (Jiang *et al.*, 2008).

2.5.2 Mecanismo de acción del inhibidor de *P. vulgaris*

El mecanismo de acción del inhibidor se basa en la prevención de la digestión del almidón, mediante un bloqueo completo del sitio activo de la enzima. Algunos estudios mostraron que algunos residuos de His, Trp, Tyr y Arg son importantes en el mecanismo del inhibidor (no se menciona en específico en que aminoácido se lleva a cabo), también se sugirió que el sitio activo del inhibidor sufre un rearrreglo en la Arg, en la subunidad α y en el Trp y Tyr en la subunidad beta, aunque no se conoce con precisión el papel que desempeña cada uno de estos fragmentos, así como el de los residuos. En el curso de acción de la unión del complejo inhibidor-enzima, el inhibidor se une al sitio activo de la enzima, lo cual conduce a una formación extensiva de puentes de hidrógeno entre los residuos de aminoácidos y partes del sitio activo de la enzima. Esto ocasiona cambios conformacionales en el sitio donde la enzima tiene su sitio activo (principalmente en los residuos de aminoácidos anteriormente mencionados) que ahora es sustituido por el inhibidor de α -amilasa, el dominio de la α -amilasa (A y B) y en las áreas cercanas, dejando completamente bloqueado el sitio activo de la enzima e imposibilitando su unión y actuación con el almidón (Ishimoto y Chrispeels, 1996; Jiang *et al.*, 2008).

2.5.3 Efectos benéficos del inhibidor de α -amilasa

Uno de los efectos benéficos que proporciona el inhibidor de α -amilasa es la propiedad anti-obesigénica, a causa de la movilización de la grasa que se origina por la restricción de energía debido a la acción del inhibidor sobre los carbohidratos, reduciendo de esta manera la grasa corporal, se reducen también hasta un 85% el exceso glucosa post-pandrial en el plasma al disminuir de un 20 a un 50% la digestión del almidón. De igual manera se ha observado un efecto anorexigénico después de la administración crónica del inhibidor que puede variar de acuerdo a la concentración del inhibidor, en algunas ratas se observó hasta los 77 días de administración (Tormo *et al.*, 2004; Celleno *et al.*, 2007; Jiang *et al.*, 2008).

2.5.3.1 Reducción de la glucosa e insulina en plasma debido al inhibidor obtenido del extracto de frijol (*P. vulgaris*)

Los niveles de glucosa postpandrial en plasma se reducen siempre y cuando se consuma el inhibidor antes ó durante el consumo de alimentos, aunque se demostró que el inhibidor comienza su acción 30 a 50 minutos después de haber sido ingerido. De igual manera se observó una disminución basal de hormonas como la insulina, el péptido C y el péptido inhibidor gástrico, cuando el inhibidor fue consumido en la dieta. La disminución de insulina en plasma se observa en un lapso de 30 a 40 minutos después del consumo del inhibidor (Tormo *et al.*, 2004; Jiang *et al.*, 2008).

2.5.3.2 Eficiencia de la isoforma 1 del inhibidor de α -amilasa en el extracto sobre la actividad de α -amilasa en el hombre

Se ha demostrado que el inhibidor se inactiva a las 4 horas de haberlo consumido. La baja eficacia del inhibidor mostrado en algunos estudios se debe principalmente a la baja actividad derivada por un pobre proceso de purificación y probablemente a mezclas con otros compuestos que hacen decrecer su actividad. También se ha demostrado que el inhibidor de α -amilasa es resistente a la proteólisis *in vitro* bajo concentraciones fisiológicas de quimotripsina, además de que el inhibidor es estable en los jugos gástricos y duodenales, reduciendo la actividad

de la amilasa hasta en un 15 % debido al pH duodenal (Hollenbeck, 1983; Kilpatrick *et al.*, 1983; Jiang *et al.*, 2008).

2.5.4 Seguridad y toxicidad de los extractos del inhibidor de α -amilasa asociados con el consumo de frijoles

Se han encontrado algunos efectos tóxicos durante el consumo de frijoles crudos tanto en animales como en humanos, presentándose una erupción cutánea que se manifiesta con cambios en la coloración y textura en la piel. Esto se ha relacionado con la actividad hemaglutinante de una lectina del frijol la fitohemaglutinina (PHA) en tabletas obtenidas del extracto (inhibidor) del frijol sin purificar, para evitar dicha toxicidad es necesario separar al inhibidor de las lectinas permitiendo así una administración segura. (Kilpatrick *et al.*, 1983; Marzo *et al.*, 2002).

2.5.4.1 Estudios de toxicidad en tratamientos agudos

En estudios agudos realizados en ratas Wistar sanas (hembras y machos) no se observaron efectos adversos donde se administró hasta una concentración de 1668 mg/kg de peso corporal del producto comercial conocido como Phase 2 (extractos con inhibidor de α -amilasa de frijol blanco), se hizo un estudio comparativo de diferentes presentaciones comerciales de inhibidores de α -amilasa obteniendo beneficios a la salud, pero con algunos efectos adversos (Cuadro 4) (Harikumar *et al.*, 2005).

2.5.4.2 Estudios de toxicidad en tratamientos crónicos

En estudios crónicos, la alimentación y administración continua del compuesto a las ratas sanas Wistar durante un tiempo de 20 a 24 meses demostró que pueden emplearse tratamientos de hasta 3000 u inhibidor de α -amilasa/g de peso que contengan menos de 3400 U de fitohemaglutinina/g de peso. Por otro lado se determinó que la administración del inhibidor comercial pudiera ser de hasta 6 g de Phase 2/kg de peso por día para a un individuo de 70 kg, sin que se presenten efectos adversos bajo éstas condiciones. Se realizaron distintos estudios,

administrando durante diferentes periodos de tiempo para probar la acción del compuesto en humanos (Cuadro 4). (Chokshi, 2006; Jiang *et al.*, 2008).

Cuadro 4. Estudios en humanos sobre la eficacia de extracto proteico que contiene la isoforma 1 del inhibidor de α -amilasa sobre la digestión del almidón

Dosis del inhibidor Phase 2/ Duración (Administración oral)	Efectos	Autor/año
3.3 mg en 570 mL (18 sujetos sanos)/4 Semanas	Administrado oralmente, aumento de la movilidad gastrointestinal y de las secreciones pancreático-biliares.	Jain, <i>et al.</i> , 1991.
1500 mg (Phase 2) antes de cada alimento (60 sujetos sanos) /6 Semanas.	Pérdida de peso (grasa corporal) sin efectos adversos.	Meiss y Ballerini, 2003.
1500 mg 2 veces al día (27 sujetos sanos)/8 Semanas	Pérdida de peso y disminución de TAG en plasma respecto a los controles.	Udani, <i>et al.</i> , 2004.

GIT. Tracto gastrointestinal
Phase 2. Marca comercial del extracto del inhibidor

Debido a las propiedades previamente mencionadas y a los bajos efectos adversos mostrados por el inhibidor purificado parcial o totalmente, esta proteína tiene potencial para ser empleada como un complemento en el tratamiento contra la diabetes y obesidad.

JUSTIFICACIÓN

Actualmente México ocupa el quinto lugar a nivel mundial como productor de frijol, donde las variedades mejoradas ocupan hasta un 80% de la superficie destinada para este cultivo, ya que, presenta características propias como los son la resistencia a plagas y a la sequía, así como una mayor producción, permitiendo con ello el aprovechamiento de suelos que por sus características no son aptos para ningún otro tipo de cultivo. Sin embargo, algunas variedades, tienen poca aceptabilidad por parte del consumidor, lo que ha ocasionado un fuerte desequilibrio entre el consumo y producción del mismo, que conlleva a su vez a una baja comercialización del grano y propicia que se almacene por periodos prolongados provocando un decremento en su calidad fisicoquímica y nutricional, generando con ello pérdidas económicas a los productores de hasta un 60%.

Es por ello que una opción para las cantidades excedentes de las variedades mejoradas de frijol pudieran ser el utilizarlas como alternativas para la obtención de compuestos como lo es el inhibidor de α -amilasa, el inhibidor puede ser utilizado para el control de la obesidad y la diabetes, enfermedades en las que México ocupa el primer y séptimo lugar respectivamente, y que están estrechamente relacionadas con el consumo de una dieta alta en almidón y grasa.

4. HIPÓTESIS

Las diferentes variedades mejoradas de frijol cultivadas en México debido a sus características de mejoramiento entre las que destacan una mayor actividad insecticida que es la principal función del inhibidor en la planta, son fuentes importantes del inhibidor de α -amilasa que presenta una elevada actividad inhibitoria y estabilidad, con capacidad de disminuir la disponibilidad de glucosa en el organismo.

5. OBJETIVOS

Objetivo general:

Extraer y purificar el inhibidor de α -amilasa en diferentes variedades mejoradas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) y determinar su efecto *in vivo*.

Objetivos específicos:

- Determinar la relación existente entre el contenido de fenoles y la actividad del inhibidor en diferentes variedades de frijol.
- Determinar las condiciones óptimas de pH y temperatura de la actividad del inhibidor (extracto) *in vitro*.
- Purificar el inhibidor de las variedades mejoradas de frijol que presenten mayor actividad inhibitoria.
- Evaluar *in vivo* el efecto agudo de un extracto proteico y del inhibidor purificado de α -amilasa.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Materiales:

Las variedades de frijol evaluadas fueron: Pinto Saltillo, Pinto Durango, Bayo Chileno, Bayo Madero, *Eugenia, *Anita, FJ B08045 (FJ 45), FJ B08058 (FJ 58), Dolores, Aluyori, Azufrasin, Cacahuatate 72 (C.72), Negro 8025 y Negro Otomí, todos cosecha 2011. Estos materiales fueron donados por el Campo Experimental Bajío del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) localizado en Celaya, Guanajuato. Las variedades fueron almacenadas en cámaras de refrigeración a 4 °C. (*) Líneas de la variedad Flor de Mayo. FJ: Flor de Junio.

Los reactivos para la cuantificación de fenoles, taninos, antocianinas, así como ensayos de inhibición (sobre la enzima α -amilasa pancreática humana) y hemaglutinación fueron obtenidos de los laboratorios SIGMA ALDRICH® y J.T. BAKER®. Los reactivos empleados para electroforesis fueron obtenidos de los laboratorios BIO-RAD®.

Para la purificación se utilizó una columna de SP-Sepharose (intercambio iónico) y Sephacryl-S100-HR (filtración en gel), ambas de Farmacia de Biotec. Amersham-GE.

Para los estudios *in vivo* se usaron ratas Wistar con un peso de 350 ± 10 gramos fueron adquiridas del bioterio Rismart S.A., de C.V.

6.2 Métodos

6.2.1 Obtención del extracto proteico total del frijol

El frijol crudo (100 gramos harina) fueron acidificados en 1 L de ácido acético (20 mM/L) con 0.2 gramos de ácido ascórbico/L, se agitó durante 30 min. Después se ajustó a pH 5 con NaOH 1 M, la mezcla se agitó por 2 h más y posteriormente se colocó en un cuarto frío toda la noche (4 °C), el extracto se centrifugó (10000 x *g*/15 min), al sobrenadante se le adicionaron 0.15 gramos de CaCl₂, después se ajustó el pH a 9 con NaOH 1 M. Nuevamente se dejó en un cuarto frío toda la noche (4 °C), el precipitado que se formó se removió por centrifugación (3000 x *g*/10 min) y a la fracción del sobrenadante se le ajustó el pH a 3.8 con HCl 1 M. Dejando en un

cuarto frío toda la noche (4 °C), el extracto se clarificó por centrifugación (10000 x g/15 min), se tomó el sobrenadante y se diluyó en proporción (1:2) con agua destilada (Le Berre-Anton *et al.*, 1997; Ishimoto *et al.*, 2001; Tormo *et al.*, 2004).

6.2.2 Extracto metanólico

Para la cuantificación de compuestos fenólicos totales y taninos condensados en las harinas de frijol crudo, se realizó una extracción, para lo cual a 0.2 gramos de harina de frijol crudo se le adicionaron 10 mL de metanol, protegiendo de la luz y agitándose durante 24 h, después se centrifugó a 5000 x g/10 min a temperatura ambiente, para obtener el sobrenadante al que se denominó extracto de frijol.

6.2.3 Extracto de antocianinas

Para la obtención del extracto de antocianinas, a 0.5 gramos de harina de cada variedad de frijol se le adicionó 4 mL de etanol acidificado (85 mL de etanol al 95 % + 15 mL de HCl 1.0 N); se protegió de la luz y se mezcló durante 2 min, después se ajustó el pH a 1 con HCl. Se agitó durante 30 min protegido de la luz, para después centrifugar 10 000 x g/ 20 min a temperatura ambiente, y por último se obtuvo el sobrenadante.

6.2.4 Cuantificación de compuestos fenólicos totales

Se determinó por el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu (Singleton *et al.*, 1999), el cual se basa en la oxidación de los compuestos fenólicos por el reactivo de Folin-Ciocalteu (mezcla de ácido fosfotúngstico y ácido fosfomolibdico) que al reducirse da una mezcla de óxidos azules de tungsteno y de molibdeno. La coloración azul producida absorbe a 765 nm. Para la cuantificación de fenoles totales, se tomó una alícuota de 40 µL del sobrenadante del extracto de frijol y se llevó a un volumen final de 500 µL, posteriormente se mezcló con 250 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu (1N) y después se adicionaron 1250 µL de Na₂CO₃ (20%) y se dejó reposar en la obscuridad por 2 h a temperatura ambiente. Se midió la absorbancia a 765 nm en un espectrofotómetro. La cuantificación se realizó por

interpolación de los resultados en una curva estándar de ácido gálico (0 a 32 µg), y se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico por gramo de harina (mg eq. ácido gálico/g de harina). La cuantificación se realizó por triplicado con 2 repeticiones.

6.2.5 Cuantificación de taninos condensados

La cuantificación de taninos se realizó de acuerdo al método de la vainillina, descrito por Deshpande y Cheryan (1987), adaptado para el uso de microplaca. A 100 µL del sobrenadante obtenido del extracto metanólico de frijol se agregaron 500 µL de una solución (1:1) recién preparada de vainillina al 1% en metanol y vainillina al 1% en HCl al 8%. Posteriormente, se preparará un blanco al cual se le adicionarán 100 µL de metanol y 500 µL de HCl al 4%. Para cuantificar los taninos condensados se determinó la absorbancia a 492 nm en un espectrofotómetro. Se utilizó una curva estándar de (+) catequina (0-0.8 mg/mL) y los resultados obtenidos se expresaron como miligramos equivalentes de (+) catequina/g de harina (mg eq. catequina /g harina). La cuantificación se realizó por triplicado con 2 repeticiones.

6.2.6 Cuantificación de antocianinas

La determinación de antocianinas totales se realizó siguiendo el método de Abdel-Aal y Hucl (1999) con modificaciones de Rivera-López (1998). El sobrenadante del extracto de antocianinas del frijol se llevó a un volumen de 10 mL en un matraz aforado usando etanol acidificado. Posteriormente se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a 535 nm. El valor de la absorbancia obtenido se sustituyó en la siguiente fórmula:

$$C = (A/\epsilon) \times (V/1000) \times PM \times (1/\text{gramo de muestra}) \times 10^6$$

Donde: C = concentración de antocianinas totales (miligramo/kilogramo);
A = absorbancia a 535 nm; ϵ = coeficiente de absortividad molar de cianidina 3-O-glucósido ($25\ 965\ \text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$); V = Volumen total del extracto de antocianinas (mL)
Y PM = Peso molecular de la cianidina 3-glúcosido (449 gramos/mol)

Los resultados se expresaron como mg equivalentes de cianidina 3-glucósido/kg de muestra. La cuantificación se realizó por triplicado con 2 repeticiones.

6.3 Actividad del inhibidor

La actividad de α -amilasa se determinó por el método W26X de Bernfeld (1955) con algunas modificaciones. A 0.4 mL de una solución de almidón al 1.5% (p/v) en una solución amortiguadora de fosfato de sodio 40 mM (pH 6.9), se agregaron 5 μ L de α -amilasa (Amilasa pancreática humana, SIGMA-ALDRICH), se incubó a 30 °C por 15 min. La reacción se detuvo adicionando 0.8 mL de ácido dinitrosalicílico (DNS). 1 mL de la solución se hirvió por 10 min, después se enfrió y diluyó con 4 mL de agua y la absorbancia se leyó a 540 nm. Los blancos se prepararon sin α -amilasa. Los ensayos para el inhibidor de α -amilasa se realizaron como se describe anteriormente, pero la solución de α -amilasa y del inhibidor (0.7 mg/mL) se preincubó 1 h antes de la adición del sustrato (Le Berre-Anton *et al.*, 1997). El ensayo se realizó por triplicado con 2 repeticiones.

6.4 Determinación de la temperatura y pH óptimos

La actividad de α -amilasa se determinó por el método W26X de Bernfeld (1955) con algunas modificaciones previamente descritas. Para determinar el efecto del pH en la actividad inhibitoria se modificó el pH del extracto proteico que contiene el inhibidor a 2, 4.5, 6, 6.9 y 8 (empleando un solo pH para cada ensayo). Por otro lado, para determinar el efecto de la temperatura en otro experimento se modificó la temperatura de reacción a 25, 30, 35, 37, 40, 60 y 100 °C (empleado una sola temperatura en cada ensayo). El ensayo se realizó por triplicado con 2 repeticiones.

6.5 Purificación del inhibidor de α -amilasa

La purificación del inhibidor de α -amilasa (α -AI) se realizó de acuerdo a los métodos descritos en Tormo *et al.* (2004) con algunas modificaciones. La fracción del sobrenadante diluida se purificó por cromatografía de intercambio iónico utilizando una fase estacionaria de "SP Sepharosa" (Farmacia de Biotec. Amersham-

GE), equilibrada con una solución amortiguadora de formato de sodio 25 mM (pH 3.8). El extracto se pasó a través de la columna SP-Sepharose que se lavó con la solución amortiguadora de formato de sodio 25 mM (pH 3.8) hasta un valor de extinción de 0.01 a 280 nm, el α -AI se eluyó con una solución amortiguadora que contenía NaCl 0.5 M (en la solución de formato de sodio). En las primeras muestras colectadas se obtuvo la fracción de α -AI (Marshall y Lauda, 1975; Le Berre-Anton *et al.*, 1997; Ishimoto *et al.*, 2001; Tormo *et al.*, 2004; Jiang *et al.*, 2008).

6.6 Cuantificación de proteína

La cuantificación de proteínas se llevó a cabo por el método de Bradford (1976). Se mezcló 1 mL del Reactivo de Bradford más 100 μ L de agua (para el estándar) o 100 μ L la muestra y se leyó a una longitud de onda de 595 nm (el color es estable por una hora). Para preparar el reactivo de Bradford, se mezclaron 10 mg de azul de Coomasie con 10 mL de ácido fosfórico y 4.7 mL de etanol absoluto. Se aforó a 100 mL con agua destilada, se dejó reposar por 24 h a temperatura ambiente en la obscuridad. Se filtró y se guardó a temperatura ambiente protegiéndose de la luz. Los resultados se reportaron como mg de proteína/mL (Bradford, 1976). El ensayo se realizó por triplicado con 2 repeticiones.

6.7 Prueba de la pureza del inhibidor

Para determinar las impurezas (fitohemaglutininas) en las muestras obtenidas de la purificación, la actividad de hemaglutinación de las preparaciones de α -AI se midió de acuerdo al método previamente reportado por Le Berre-Anton *et al.* 1997. En placas de microtitulación se colocaron 25 μ L de diluciones seriadas 1:2 de α -AI (1 mg/mL) y éstas se mezclaron a temperatura ambiente con solución salina estéril (NaCl al 9%), se adicionó una suspensión (1:1) de eritrocitos O Rh+ al 5% (v/v), los cuales previamente se lavaron 3 veces en la misma solución. La hemaglutinación se leyó 2 h después a temperatura ambiente utilizando un esteroscopio y se reportó como unidades de hemaglutinación por mg de proteína (Le Berre-Anton *et al.*, 1997). El ensayo se realizó por triplicado con 2 repeticiones.

6.8 Perfil electroforético

La determinación del perfil electroforético se realizó siguiendo la metodología establecida para Electroforesis mediante SDS-PAGE, con el sistema Tris-Tricina.

6.9 Experimentos en animales

Se evaluaron *in vivo* tanto el extracto proteico como el inhibidor de α -amilasa purificado proveniente de las diferentes variedades de frijol mejoradas que mostraron mayor actividad inhibitoria *in vitro*. Se utilizaron 5 grupos de animales sanos de 2.5 meses de edad con peso aproximado de 300 gramos \pm 10 gramos: Control negativo (Solución de NaCl); tratamiento 1: Inhibidor 5 mligramos (mg)/kilogramo (kg) de peso corporal; tratamiento 2: Inhibidor 15 mg/kg de peso corporal, tratamiento 3: Inhibidor 25 mg/kg de peso corporal, tratamiento 4: Inhibidor 50 mg/kg de peso corporal y tratamiento 5: 1 mg acarbosa/kg de peso corporal (Control positivo).

A los animales en ayuno se les administraron oralmente 2 gramos/kg de peso corporal de almidón soluble de papa en una solución de NaCl (9 g/L), posteriormente se les administró el α -AI de acuerdo al tratamiento que les correspondía por grupo. Para la determinación de glucosa se extrajo sangre directamente del tallo del animal y la concentración de glucosa se determinó a los 0, 15, 30, 60, 90, 120, 150 y 180 min, empleando un glucómetro de la marca ROCHE, para lo cual se utilizaron tiras reactivas de la marca Accutrend. El fundamento del glucómetro consiste en la medición del poder reductor generado por la enzima glucosa deshidrogenasa, al metabolizar la glucosa a gluconolactona indicando la concentración en mg/dL (Tormo, 2004).

6.10 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se expresaron como la media \pm el error estándar (EE). La evaluación estadística de los datos se determinará mediante el análisis de varianza (ANOVA) a un nivel de confianza de 95 %. Se realizó el análisis de comparación de medias aplicando la prueba de Tukey y en las pruebas que impliquen comparación contra un control se empleó la prueba de Dunnett. Los análisis estadísticos se realizaron en el programa estadístico JMP 5.0.1.

7. RESULTADOS Y DISCUSIONES

7.1 Caracterización parcial de las harinas y extractos proteicos totales de las distintas variedades de frijol

7.1.1 Contenido de compuestos fenólicos totales, taninos condensados y antocianinas en la harina (extracto metanólico ó etanólico) distintas variedades de frijol

Existen reportes de que en la planta el inhibidor de α -amilasa actúa como un insecticida natural, por lo cual pudiera estar presente principalmente en variedades de frijol con elevada concentración de compuestos fenólicos, debido a que esos compuestos poseen también capacidad insecticida. En el ser humano ambos compuesto tienen actividad para ayudar a disminuir los niveles de glucosa libre en el torrente sanguíneo (Serrano y Goñi, 2004; Díaz-Batalla *et al.*, 2006; Zeng *et al.*, 2011).

Debido a que se ha propuesto que los frijoles con mayor concentración de fenoles presentan mayor cantidad del inhibidor, se llevaron a cabo las determinaciones para evaluar las posibles asociaciones.

El análisis de la harina (extracto metanólico o etanólico) de las variedades: Pinto Saltillo, Pinto Durango, Bayo Chileno, Bayo Madero, Eugenia, Anita, FJ B08045, FJ B08058, Dolores, Aluyori, Azufrasin, C. 72, Negro 8025 y Negro Otomí (Cuadro 5), indica que los resultados obtenidos en cuanto a compuestos fenólicos se encuentran muy próximas al intervalo reportado de 5.03 hasta 10.89 mg eq. de ácido gálico/g (Guzmán-Maldonado, *et al.*, 2002; Xu y Chang, 2009), siendo la variedades que presentaron mayor concentración: Negro Otomí con 8.34 ± 0.0 mg eq. de ácido gálico/g, Negro 8025 con 8.86 ± 0.0 mg eq. de ácido gálico/ y Pinto Durango con 5.06 ± 0.01 mg eq. de ácido gálico/g.

El contenido de taninos condensados en el grano de las distintas variedades se encuentra también dentro de los valores anteriormente reportados para éste tipo de compuestos desde 4.6 hasta 48.18 mg eq. de catequina/g (Guzmán-Maldonado *et al.*, 2002, 2008; Xu y Chang, 2009), siendo las variedades con los valores más

altos de taninos: Negro Otomí con 15.25 ± 0.06 mg eq. de catequina/g y Bayo Chileno con 13.20 ± 0.02 mg eq. de catequina/ g

El contenido de antocianinas para las variedades de frijol Negro Otomí fue de 46.54 ± 2.25 mg eq cianidina-3-glucósido/100 g muestra y Negro 8025 con 53.61 ± 1.55 mg eq cianidina-3-glucósido/100 g muestra, estos valores están dentro de lo reportado desde 3.75 hasta 54.1 mg eq cianidina-3-glucósido/100 g (Guzmán-Maldonado et al., 2008, Reynoso Camacho *et al.*, 2008), el resto de las variedades mostró niveles menores lo cual se refleja en la leve coloración púrpura que estas variedades presentan, ya que, las antocianinas son compuestos que brindan coloraciones que van de la gama rojo al púrpura en los vegetales que los contienen.

Cuadro 5. Contenido de fenoles totales, taninos y antocianinas en las harinas de frijol crudo de distintas variedades de frijol

Variedad	Fenoles totales (mg/g)	Taninos condensados (mg/g)	Antocianinas (mg/100g)
Azufrasin	4.81 ± 0.00^f	7.20 ± 0.01^d	0.81 ± 0.06^c
Aluyori	4.10 ± 0.00^l	9.00 ± 0.04^b	0.58 ± 0.04^f
Cacahuete 72	4.91 ± 0.00^e	7.25 ± 0.02^c	$1.56 \pm 0.46^{d,e,f}$
Pinto Saltillo	4.26 ± 0.00^j	3.50 ± 0.00^g	1.13 ± 0.23^d
Pinto Durango	5.06 ± 0.01^c	$5.60 \pm 0.05^{e,f}$	$1.87 \pm 0.38^{d,e,f}$
Bayo Chileno	4.15 ± 0.00^k	13.20 ± 0.02^a	1.13 ± 0.34^c
Bayo Madero	4.11 ± 0.01^l	4.20 ± 0.03^g	$1.51 \pm 0.34^{d,e,f}$
*Eugenia	4.58 ± 0.01^g	10.6 ± 0.02^b	$1.54 \pm 0.39^{d,e,f}$
*Anita	4.42 ± 0.00^i	7.20 ± 0.01^d	$3.54 \pm 0.76^{d,e}$
FJ 45	4.56 ± 0.02^g	4.55 ± 0.02^f	$2.24 \pm 1.12^{d,e,f}$
FJ 58	4.99 ± 0.01^d	$5.50 \pm 0.01^{e,f,g}$	$2.96 \pm 0.80^{d,e}$
Dolores	4.51 ± 0.00^h	$6.65 \pm 0.0^{c,d,e}$	$3.72 \pm 0.52^{e,f}$
Negro 8025	8.86 ± 0.01^a	13.15 ± 0.02^a	53.61 ± 1.55^a
Negro Otomí	8.34 ± 0.00^b	15.25 ± 0.06^a	46.54 ± 2.25^b

Fenoles totales y taninos condensados: mg de ácido gálico y catequina/g harina cruda, respectivamente; antocianinas mg cianidina-3-glucósido/100 g de harina cruda.

Los datos se expresan como la media \pm EE. ^{a-l} Letras distintas en cada columna indican diferencia significativa $P \leq 0.05$ con la prueba de Tukey.

7.1.2 Contenido de compuestos fenólicos totales, taninos y antocianinas en el extracto proteico en diferentes variedades mejoradas de frijol

En cuanto al contenido de fenoles totales en el extracto proteico total se observó una disminución de aproximadamente un 95% en prácticamente todas las variedades en comparación con las concentraciones obtenidas para la harina de frijol (extracto metanólico) (Cuadro 6).

. Ésta disminución pudiera deberse a la formación de complejos polifenol-proteína que se propician por las condiciones bajo las cuales se obtiene el extracto proteico, que impiden la unión de los compuestos fenólicos con el molibdato y tungstato que permiten la formación de un compuesto colorido mediante el cual pueden ser cuantificables los polifenoles, ocasionando que estos compuestos sean indetectables por la técnica (Saura-Calixto *et al.*, 1991; Bakkalbai *et al.*, 2009). Las variedades que contienen la más elevada concentración de polifenoles fueron Bayo Madero con 0.16 ± 0.01 mg eq. de ácido gálico/g, Cacahuete 72 con 0.17 ± 0.0 mg eq. de ácido gálico/g, FJ 58 con 0.16 ± 0.0 mg eq. de ácido gálico/g y FJ 45 con 0.16 ± 0.01 mg eq. de ácido gálico/g (Cuadro6).

En cuanto a la concentración de taninos condensados en el extracto proteico también puede observarse una disminución de aproximadamente un 75% (con respecto al extracto metanólico) en casi todas las variedades, exceptuando las variedades FJ 58, Eugenia, Bayo Chileno y Negro Otomí. La disminución podría estar relacionada al solvente utilizado para la extracción o a la formación de complejos tanino-proteína que se propicia por las condiciones bajo las cuales se obtiene el extracto proteico, impidiendo de ésta manera la interacción con la vainillina. En cuanto a las variedades en las cuales la disminución no fue tan notoria pudiera relacionarse con ciertas características que poseen estos frijoles, ya que, que en estudios previos (Paredes-López y Valverde *et al.*, 2008, Aguirre-Santos y Gómez Aldapa, 2010) se ha demostrado que algunas variedades de frijol Flor de Mayo, Flor de Junio así como Pintos y Bayos poseen una mayor dureza y rigidez en la testa y de igual manera un mayor contenido de fibra, lo que protege éste tipo de compuestos impidiendo su hidrólisis y su detección con la técnica empleada

(Paredes-López y Valverde *et al.*, 2008, Aguirre-Santos y Gómez Aldapa, 2010). Las variedades que presentaron mayor concentración de taninos fueron Negro 8025 y Negro Otomí con 3.15 ± 0.10 y 3.15 ± 0.03 mg eq. de catequina/g muestra respectivamente.

En las antocianinas del extracto proteico puede observarse una disminución prácticamente total (99%) del contenido de éstos compuestos en comparación con los valores obtenidos en las harinas (extracto etanólico). De igual manera esto puede deberse a las condiciones bajo las cuales se obtiene el extracto proteico, ya que, dichos compuestos presentan una elevada inestabilidad a pH mayor a 2 propiciando la formación de compuestos denominados chalconas o hemiacetales que son incoloros y por lo tanto indetectables por la técnica. Además se ha determinado que bajo la influencia de pH mayor o igual a 7 se presenta formas quinoidales que son compuestos muy sensibles que pueden ser degradados inmediatamente al tener contacto con el aire (Huttings, 1999). Las variedades que presentaron la composición más elevada de antocianinas fueron Negro Otomí y Negro 8025 con 0.2 ± 0.0 y 0.3 ± 0.0 mg eq. de cianidina-3-glucósido/100 g muestra).

7.2 Actividad hemaglutinante (contenido de lectinas) en el extracto proteico de las distintas variedades de frijol

Las lectinas son proteínas que forman parte de la composición natural del frijol. Sin embargo, este tipo de compuestos pueden llegar a ser dañinos en concentraciones elevadas, ya que son capaces de aglutinar los eritrocitos interfiriendo con la absorción de nutrientes y favoreciendo la adhesión de bacterias patógenas al epitelio intestinal provocando con ello infecciones e incluso ulceraciones, además de un incremento en el tamaño del bazo y páncreas. Se ha reportado que concentraciones de 0.5 a 1 mg/kg de peso pueden llegar a ser letales (De Olivera, *et al.*, 1989; Herzing, *et al.*, 1997; De Mejía *et al.*, 2003; Hernández-Cruz *et al.*, 2005).

En la Figura 4 puede observarse la concentración de lectinas en los extractos de las distintas variedades de frijol, haciendo notar que se han reportado concentraciones muy altas en otras variedades que van desde 400 a 2300 unidades

de hemaglutinación/g proteína en frijol crudo en Mayo Criollo, Flor de Junio Marcela, Bayo Victoria y Pinto Villa (De Mejía *et al.*, 2003) y las concentraciones obtenidas en este estudio son menores hasta en un 95 % de fitohemaglutininas en comparación con lo obtenido por De Mejía *et al.* (2003), favoreciendo así la obtención de un extracto con muy bajo contenido de este tipo proteínas. Siendo las variedades que presentaron menor actividad hemaglutinante Negro Otomí, Pinto Durango, Cacahuate 72, Bayo Chileno, Aluyori, Azufrasin, Anita, FJ 45 todas con 10 U de hemaglutinación/mg de proteína, mientras que las otras variedades contienen de 20 a 80 U hemaglutinación/mg de proteína.

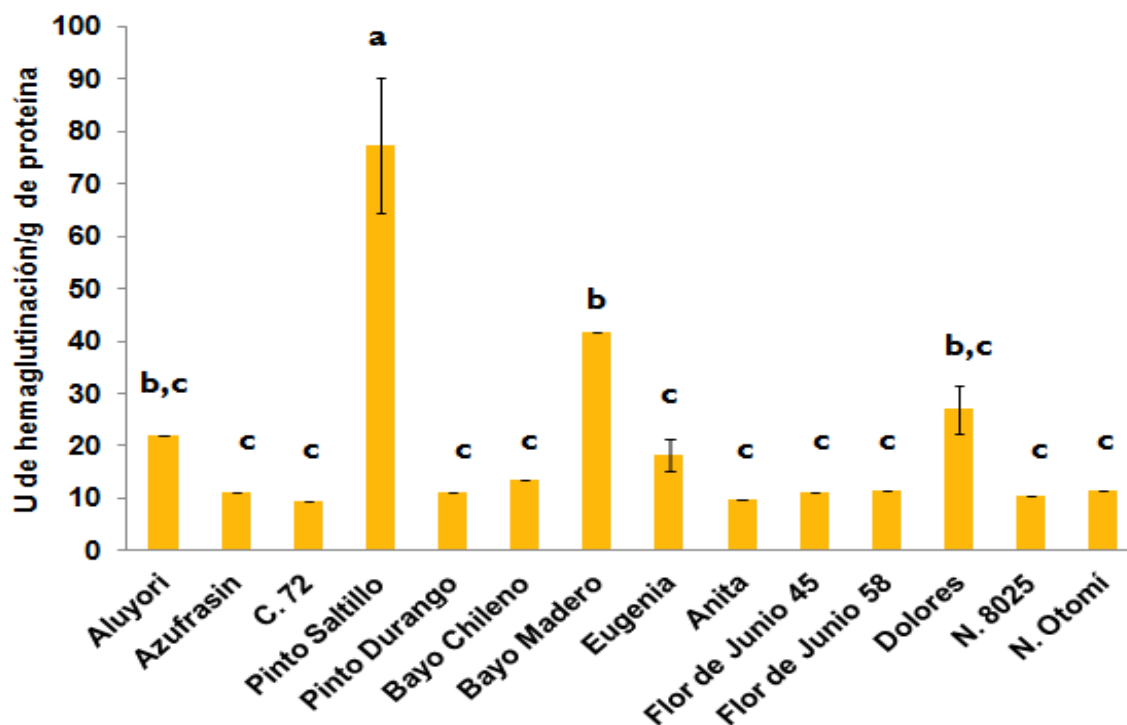


Figura 4. Unidades de hemaglutinación en el extracto proteico de las distintas variedades de frijol mejoradas

N.8035 y N. Otomí (Variedades de frijol Negro) La actividad hemaglutinante en las diferentes variedades de frijol (extracto proteico) reportado como unidades de hemaglutinación/g de proteína. Los datos se expresan como la media \pm EE. ^{a,b,c} Letras diferentes en cada columna indican diferencia significativa $P \leq 0.05$ con la prueba de Tukey.

Cuadro 6. Contenido de fenoles totales, taninos y antocianinas en el extracto proteico de las distintas variedades de frijol.

Variedad	Fenoles totales (mg/g)	Taninos condensados (mg/g)	Antocianinas (mg /100 g)
Azufrasin	0.14 ± 0.01 ^f	0.92 ± 0.08 ⁱ	0.003 ± 0.000 ^{d,e}
Aluyori	0.12 ± 0.01 ^h	2.56 ± 0.08 ^{c,d}	0.002 ± 0.000 ^f
C. 72	0.17 ± 0.00 ^a	1.13 ± 0.07 ^{h,i}	0.003 ± 0.000 ^{d,e,f}
Pinto Saltillo	0.14 ± 0.01 ^f	0.84 ± 0.04 ^j	0.006 ± 0.000 ^d
Pinto Durango	0.15 ± 0.01 ^{d,e}	2.60 ± 0.07 ^{b,c,d}	0.003 ± 0.000 ^{d,e,f}
Bayo Chileno	0.13 ± 0.01 ^g	2.68 ± 0.05 ^{b,c}	0.007 ± 0.001 ^c
Bayo Madero	0.16 ± 0.00 ^b	0.67 ± 0.08 ^k	0.003 ± 0.000 ^{0e,f}
*Eugenia	0.14 ± 0.01 ^f	1.68 ± 0.07 ^g	0.003 ± 0.000 ^{d,e,f}
*Anita	0.13 ± 0.01 ^g	2.05 ± 0.02 ^f	0.003 ± 0.000 ^{d,e}
FJ 45	0.16 ± 0.00 ^c	0.79 ± 0.04 ^j	0.004 ± 0.001 ^{d,e,f}
FJ 58	0.16 ± 0.01 ^b	2.31 ± 0.02 ^e	0.003 ± 0.000 ^{d,e}
Dolores	0.15 ± 0.01 ^d	1.21 ± 0.13 ^h	0.002 ± 0.000 ^{e,f}
Negro 8025	0.15 ± 0.00 ^d	3.15 ± 0.03 ^a	0.03 ± 0.000 ^a
Negro Otomí	0.14 ± 0.01 ^e	3.15 ± 0.04 ^a	0.02 ± 0.000 ^b

Fenoles totales y taninos condensados: mg de ácido gálico y catequina/g harina cruda, respectivamente; Antocianinas mg cianidina-3-glucósido/100 g de harina cruda.

Los datos se expresan como la media ± EE. ^{a-i} Letras distintas en cada columna indican diferencia significativa $P \leq 0.05$ con la prueba de Tukey.

7.3 Actividad del inhibidor sobre la enzima α -amilasa pancreática humana

La liberación de aproximadamente el 70 % de glucosa de carbohidratos complejos como el almidón se debe principalmente a la acción de la enzima α -amilasa pancreática humana.

La determinación de inhibición de la enzima α -amilasa se realizó *in vitro* basada en la técnica anteriormente mencionada en metodología (Bernfeld, 1955), pero, se hicieron algunas modificaciones a la misma. Primero se realizó una estandarización de la concentración del sustrato, concentración de la enzima y concentración del inhibidor, mediante cinéticas bajo los cuales se aplicarían los análisis de inhibición. Se encontró que las condiciones óptimas para el ensayo

fueron: sustrato al 15 % p/v de una solución de almidón en solución salina, extracto proteico con una concentración de 0.7 mg inhibidor/mL solución y con un volumen de 5 μ L (0.5 U de enzima). El análisis se realizó a un pH de 6.9 y a una temperatura de 37 °C durante una hora para simular las condiciones fisiológicas.

En la Figura 5 se indican los resultados obtenidos para el porcentaje de inhibición del inhibidor contenido en el extracto proteico total sobre la enzima α -amilasa pancreática humana.

Se ha reportado que el inhibidor obtenido de frijol blanco arriñonado presenta una inhibición de hasta un 89% bajo las condiciones óptimas *in vitro*, que son pH 4.5/30 °C (Jiang, 2008), Los valores que se obtuvieron en este estudio fueron menores en 20 a 30 %, lo cual pudiera deberse a las condiciones bajo las cuales se realizó este ensayo, donde se simularon las condiciones fisiológicas, así como una menor concentración del inhibidor de acuerdo a los resultados obtenidos en las cinéticas para este estudio. Sin embargo, a pesar de ser menores que lo previamente reportado, los mayores porcentajes de inhibición en éste estudio oscilan en un rango del 70 al 79 % de inhibición, un valor aceptable para las condiciones de temperatura y pH del organismo. Las que presentaron un mayor porcentaje de actividad inhibitoria fueron: Negro Otomí, Bayo Chileno, Aluyori, Azufrasin, Cacahuate 72 (C.72) y Pinto Saltillo con 79.03 ± 0.13 , 78.80 ± 0.07 , 72.78 ± 0.09 , 76.99 ± 0.38 , 71.07 ± 0.13 y 79.75 ± 0.27 , respectivamente.

7.4 Correlaciones entre la actividad inhibitoria, contenido de compuestos biocativos y actividad hemaglutinante

En el Cuadro 7 se muestran las posibles relaciones existentes entre las actividad inhibitoria, los compuestos bioactivos y la actividad hemaglutinante, donde no se encontró correlación entre los compuestos fenólicos y la actividad inhibitoria del compuesto sobre la acción de la enzima α -amilasa , de igual manera no existe relación entre la actividad inhibitoria y la actividad hemaglutinante entre los extractos de las distintas variedades de frijol mejoradas.

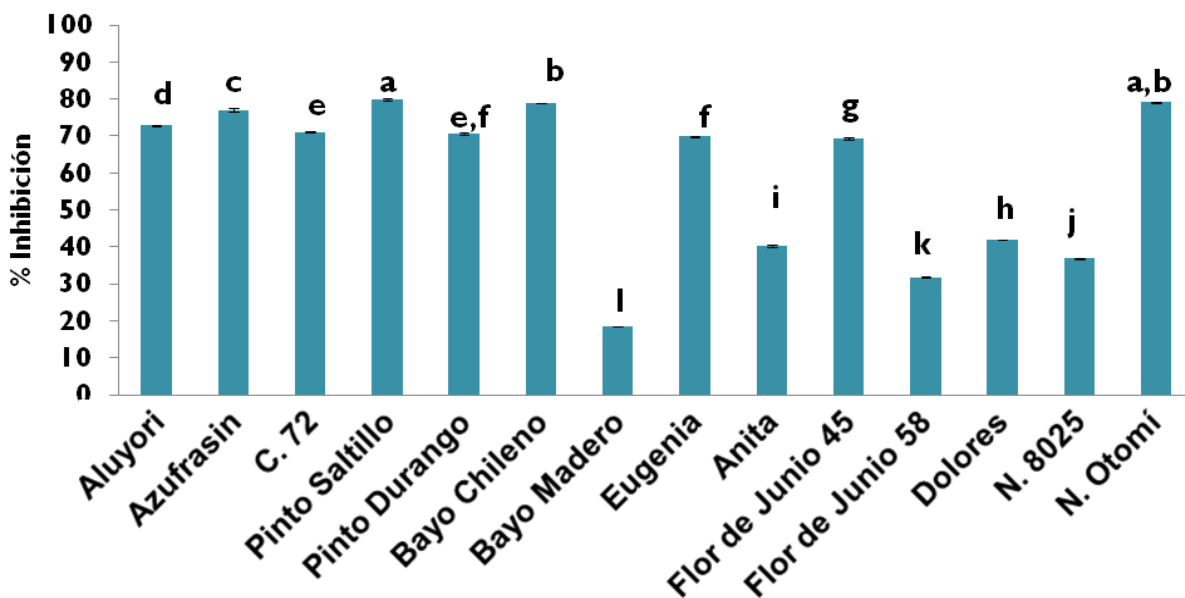


Figura 5. Inhibición de la enzima α -amilasa por acción del inhibidor en el extracto proteico total de las diferentes variedades de frijol.

Los datos se expresan como la media \pm EE. ^{a-f}. Letras diferentes en cada columna indican diferencia significativa $P \leq 0.05$ con la prueba de Tukey.

De acuerdo a los resultados obtenidos y al no encontrar correlación alguna entre los compuestos fenólicos y la actividad del inhibidor, se seleccionaron las variedades que tuvieron la menor actividad hemaglutinante así como la mayor actividad inhibitoria, que resultaron ser las mostradas en la Figura 6: Azufrasin con 10 U de hemaglutinación/g proteína y 79.89 % de inhibición respectivamente, Cacahuate 72 con 10 U de hemaglutinación/g proteína y 71.07 % de inhibición, Aluyori con 20 U de hemaglutinación/mg proteína y 72.78 % de inhibición, Bayo Chileno con 10 U de hemaglutinación/g proteína y 78.8 % de inhibición y Negro Otomí con 10 U de hemaglutinación/g proteína y 79.03 % de inhibición respectivamente (Figura 6).

Estas variedades se sometieron a pruebas de estabilidad modificando el pH y la temperatura, la variedad que presentó las características más estables fue sometida a un proceso de purificación del compuesto para finalmente proceder a los análisis *in vivo*.

Cuadro 7. Determinación de las correlaciones entre la actividad inhibitoria el contenido de fenoles totales, antocianinas, taninos condensados y actividad hemaglutinante.

	Actividad inhibitoria	Fenoles totales	Antocianinas	Taninos	Actividad hemaglutinante
Actividad inhibitoria	1	-0.39	0.002	0.008	0.004
Fenoles	-0.39	1	0.0311	-0.306	-0.09
Antocianinas	0.002	0.0311	1	0.643	-0.18
Taninos	0.08	-0.306	0.643	1	-0.38
Actividad hemaglutinante	0.004	-0.09	-0.18	-0.38	1

*Para demostrar correlaciones positivas entre los patrones a analizar es necesario que se muestre un valor fraccional ≥ 0.95

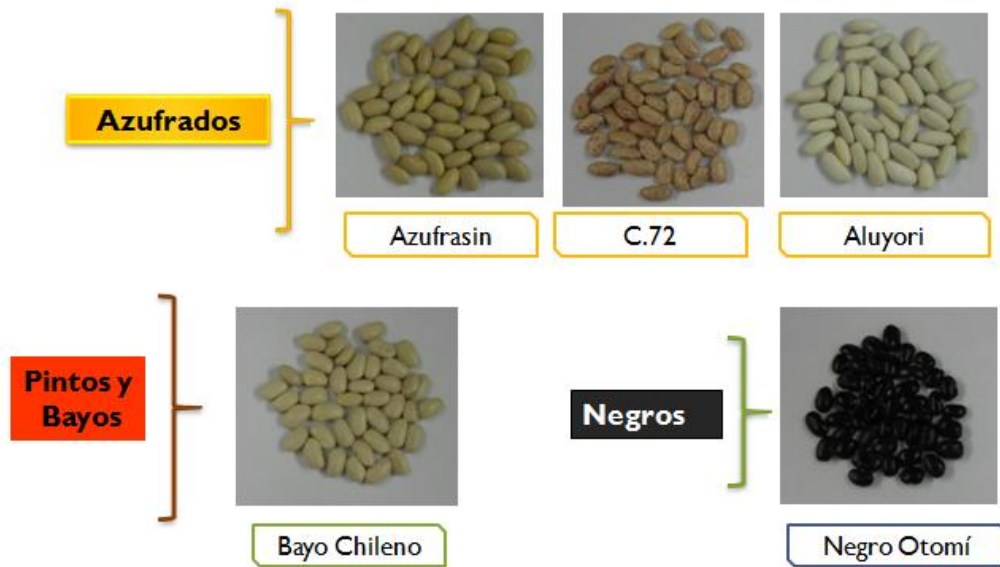


Figura 6. Variedades de frijol que presentaron mayor inhibición de α -amilasa y menor actividad hemaglutinante.

7.5 Patrón electroforético del extracto de proteico de frijol de las cinco variedades

Tomando en cuenta la elevada actividad inhibitoria de los extractos proteicos se realizó un gel de electroforesis para determinar la presencia del inhibidor en el barrido proteico, donde de acuerdo a lo reportado por Lee y Whitaker (2002) el inhibidor se encuentra en la banda correspondiente a un peso molecular promedio de 49 a 56.7 kDa.

En la Figura 7 puede observarse el patrón electroforético del extracto proteico de las variedades seleccionadas (por presentar alta actividad inhibitoria y bajo contenido de lectinas). En el carril 1 se encuentra el marcador de peso molecular y en los carriles 2 al 6 el extracto de cada una de las variedades seleccionadas.

En todos los carriles puede observarse un corrimiento similar donde se encuentran aparentemente proteínas del mismo peso molecular que van desde aproximadamente 22 hasta 86 kDa, sin embargo, en los carriles 5 y 6 correspondientes a las variedades Bayo Chileno y Negro Otomí puede observarse una banda a una altura aproximada de 85 kDa que corresponde a otro tipo de proteína que las variedades Azufrasin, Cacahuete 72 (C. 72) y Aluyori no presentan, en la literatura no hay reportes acerca de proteínas en el frijol con este peso molecular. Por otro lado, en todos los extractos aproximadamente a los 58 kDa puede observarse una banda que de acuerdo a los reportes corresponde al inhibidor, ya que, presenta el peso aproximado de acuerdo a los reportes anteriormente mencionados: aproximadamente 57 kDa (Jiang, 2008).

Posteriormente se realizaron pruebas de estabilidad en cuanto a pH y temperatura, de acuerdo a los resultados obtenidos se procedió a purificar el inhibidor de la variedad que resultó más estable en cuanto a variaciones de dichos parámetros (pH y temperatura). Se analizó el perfil electroforético de las fracciones colectadas de dicha variedad para comprobar la presencia del inhibidor en el purificado.

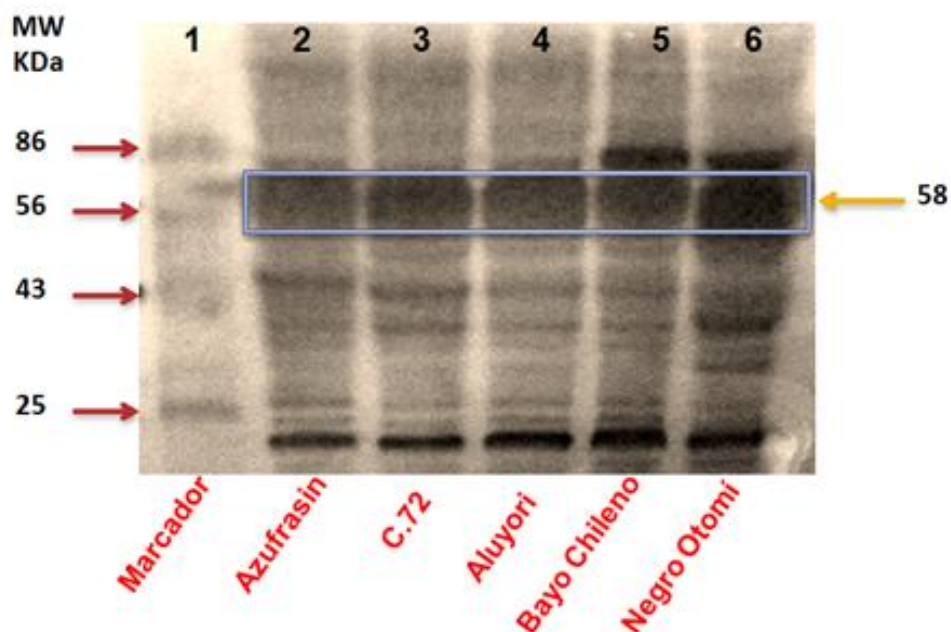


Figura 7. Gel de electroforesis del extracto proteico total de las variedades de frijol seleccionadas.

Carril 1. Marcador de peso molecular para proteínas de 6.5 kDa a 200 kDa; Carril 2. Azufrasin; Carril 3. Cacahuete 72 (C.72); Carril 4. Aluyori; Carril 5. Bayo Chileno; Carril 6. Negro Otomí.

7.6 Estabilidad del inhibidor en el extracto proteico

7.6.1. Efecto de la temperatura sobre la actividad del inhibidor de α -amilasa pancreática humana

En la Figura 8 se observan los resultados obtenidos en un experimento donde se varió la concentración del inhibidor (en el extracto proteico total) para observar el efecto que ésta tendría sobre la enzima. Se observó que para todos ellos la concentración adecuada del inhibidor oscilaba entre 0.6 a 0.8 mg del inhibidor/mL de solución. Resultados similares a los encontrados en un estudio realizado por Tormo (2004), donde el mayor porcentaje de inhibición se observó a partir de una concentración de 0.6 mg/mL, y el valor de saturación para el compuesto fue superior a 1 mg/mL. En un estudio realizado con el inhibidor (1.5 mg/mL) de α -amilasa obtenido del frijol arriñonado blanco se reportó que las condiciones óptimas de

inhibición utilizando α -amilasa pancreática porcina fueron a pH 4.5, y a 30°C durante una hora (Tormo, 2004; Jiang, 2008).

En este estudio se emplearon condiciones para simular lo que ocurre en el organismo (pH 6.9 a 37 °C/1 h). En el gráfico (Figura 8) se observa que a una concentración de 0.6 mg/mL apenas comenzaba a notarse un ligero incremento en el porcentaje de inhibición (que pudiera ser comparable con estudios previos por Tormo, 2004), mientras que a una concentración que oscila de 0.8 mg/mL a 1 mg/mL en todos los extractos, puede observarse una saturación del mismo. Considerando un promedio de las concentraciones obtenidas se tomó como un valor de saturación el determinado a los 0.8 mg/mL. Por todo lo anterior, se demostró para los ensayos inhibitorios que la concentración de 0.7 mg/mL es el valor óptimo de concentración para los ensayos de inhibición.

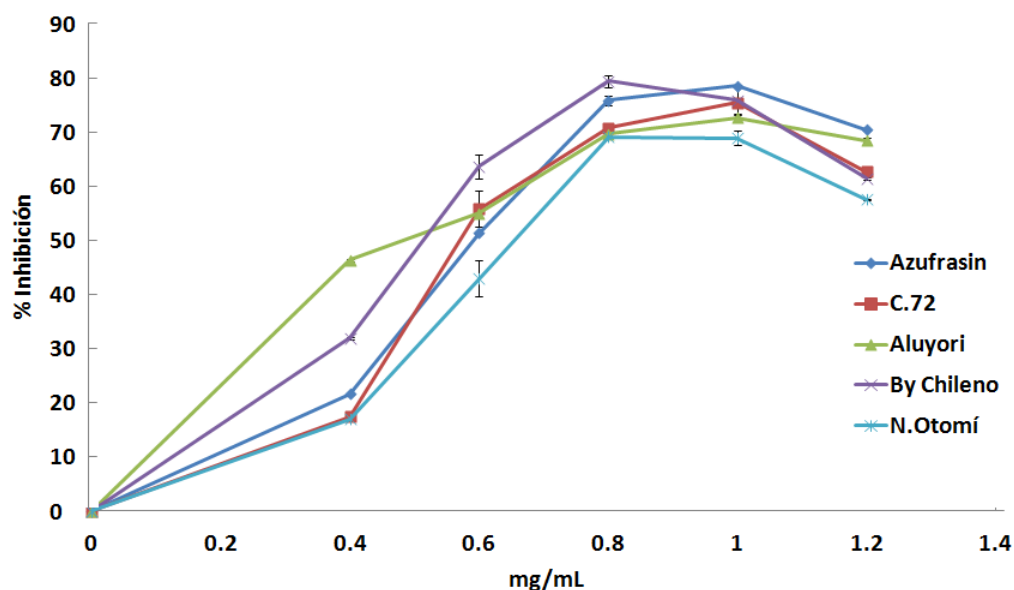


Figura 8. Efecto de la concentración sobre la actividad del inhibidor de α -amilasa pancreática humana (37 °C/pH 6.9/1 h)

Los datos se expresan como la media \pm EE

7.6.2. Efecto del tiempo sobre la actividad del inhibidor de α -amilasa pancreática humana

Es importante determinar a qué tiempo comienza a actuar el inhibidor, así como el porcentaje de inhibición que éste podría alcanzar durante cierto periodo para proceder a los estudios *in vivo* tomando en cuenta el tiempo de acción del compuesto para explicar el comportamiento que el inhibidor pudiera propiciar sobre los niveles de glucosa.

En la Figura 9 puede observarse la cinética de actividad del inhibidor (37 °C/ pH 6.9) en las variedades seleccionadas. Se alcanzó una actividad inhibitoria considerable a partir de los 30 minutos para todas las variedades en un rango de inhibición que va de un 30 hasta un 60%, mostrando el máximo pico de inhibición en un tiempo de 60 minutos para las cinco variedades con una inhibición que va desde un 65 hasta un 78%. De ésta manera se determinó el tiempo al que pudiera obtenerse la máxima inhibición en los experimentos *in vivo*, estos resultados son similares a lo reportado por Jiang (2008), donde bajo las condiciones óptimas del inhibidor (30°C/ pH 4.5), se alcanza a los 60 minutos una inhibición de 60 %.

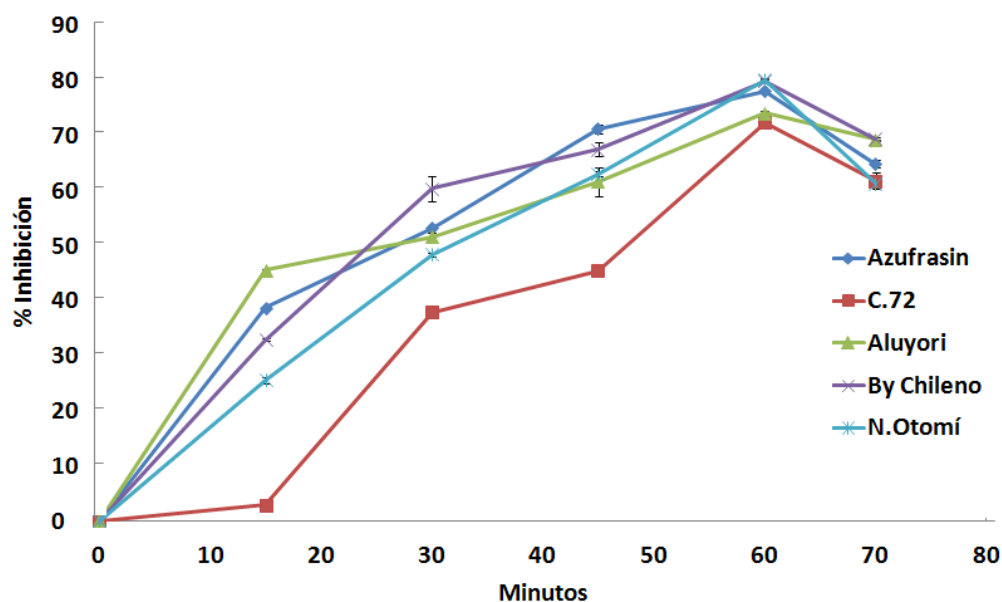


Figura 9. Cinética de inhibición de la enzima α -amilasa por los extractos proteicos de las variedades de frijol (37 °C/pH6.9/0.7 mg/mL).

Los datos se expresan como la media \pm EE.

7.6.3. Efecto del pH sobre la actividad del inhibidor de α -amilasa pancreática humana

Uno de los parámetros importantes en la estabilidad del inhibidor es el valor de pH del medio en el que se encuentre, ya que, este puede influir cuando se considere la administración del inhibidor por vía oral, ya que el tracto gastrointestinal tiene variaciones en el pH.

En reportes previos se ha determinado que el valor óptimo de pH para lograr la máxima actividad del inhibidor *in vitro* oscila en un rango de 4.5 a 5.5 obteniéndose una inhibición aproximada del 80% a una temperatura de 30 °C durante 1 hora (Le Berre, *et al.*, 1997; Jiang, *et al.*, 2008).

En la Figura 10 se observa que para la mayoría de las variedades el pH óptimo para los estudios *in vitro* estuvo en el rango de 4.5 a 6 alcanzando porcentajes de inhibición del 70 al 80%, excepto para la variedad a Cacahuete 72 donde el pH óptimo de inhibición fue 4.5 con una inhibición aproximada del 70 % seguido del pH 6.9 con una inhibición aproximada del 68 %. Los resultados coinciden con lo reportado anteriormente en cuanto al rango de pH establecido como óptimo pH 4.5 (Jiang, 2008).

La ligera disminución en cuanto al porcentaje de inhibición alcanzado en éste estudio pudiera deberse a que se empleo una temperatura de 37 °C, además se observó que a un pH de 6.9 (condiciones fisiológicas) no hubo diferencia considerable, alcanzando aún valores de inhibición en el rango de 60 a 70 % a éste pH.

7.6.3.1 Efecto del pH (condiciones fisiológicas) sobre la actividad del inhibidor de α -amilasa pancreática humana

En la Figura 11 se observan los resultados obtenidos en un experimento donde se emplearon las condiciones fisiológicas que simulan el tracto gastrointestinal al cual se somete un compuesto ingerido por vía oral a una temperatura de 37 °C. La solución del inhibidor fue colocada a un pH de 2 durante una hora, mimetizando las condiciones a las que se somete el compuesto al interactuar con el pH estomacal y el tiempo aproximado que permanece un alimento en este órgano, posteriormente el pH de la solución del inhibidor fue reajustado a

6.9, permaneciendo así durante 15 minutos y posteriormente sometido a la reacción. Se encontró una disminución en el porcentaje de inhibición en todas las variedades, en comparación con el estudio donde únicamente se empleó el pH de 6.9, siendo menor en la variedad Bayo Chileno con una disminución de solo 10% respecto al ensayo donde únicamente se evaluó un pH (6.9), seguida por Aluyori con una disminución del 12%, mientras que la variedad con mayor inestabilidad ante éste cambio fue Cacahuate 72 con una disminución de aproximadamente el 36% de la actividad inhibitoria. Los porcentajes finales de inhibición fueron de 71, 60 y 46 % respectivamente para Bayo Chileno, Aluyori y Cacahuate 72, respectivamente. Éstos resultados arrojan una buena aproximación de lo que sucedería a nivel fisiológico al consumir el inhibidor debido a los efectos que éste pudiera tener al pasar por la variación de pH a que éste se enfrentaría para hasta actuar en el intestino delgado.

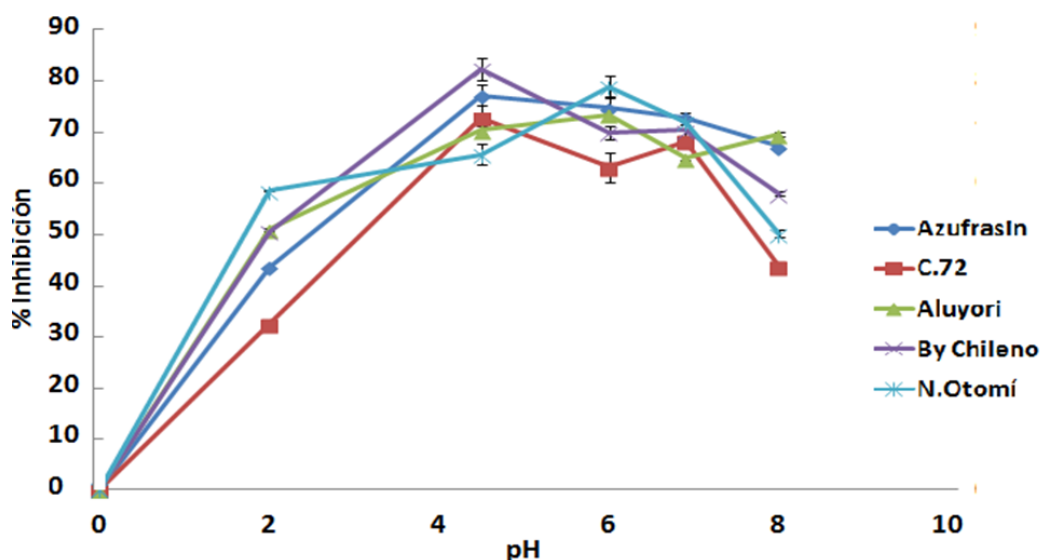


Figura 10. Efecto del pH sobre el inhibidor de α -amilasa pancreática humana (37 °C/pH 6.9/1 h)

Los datos se expresan como la media \pm EE

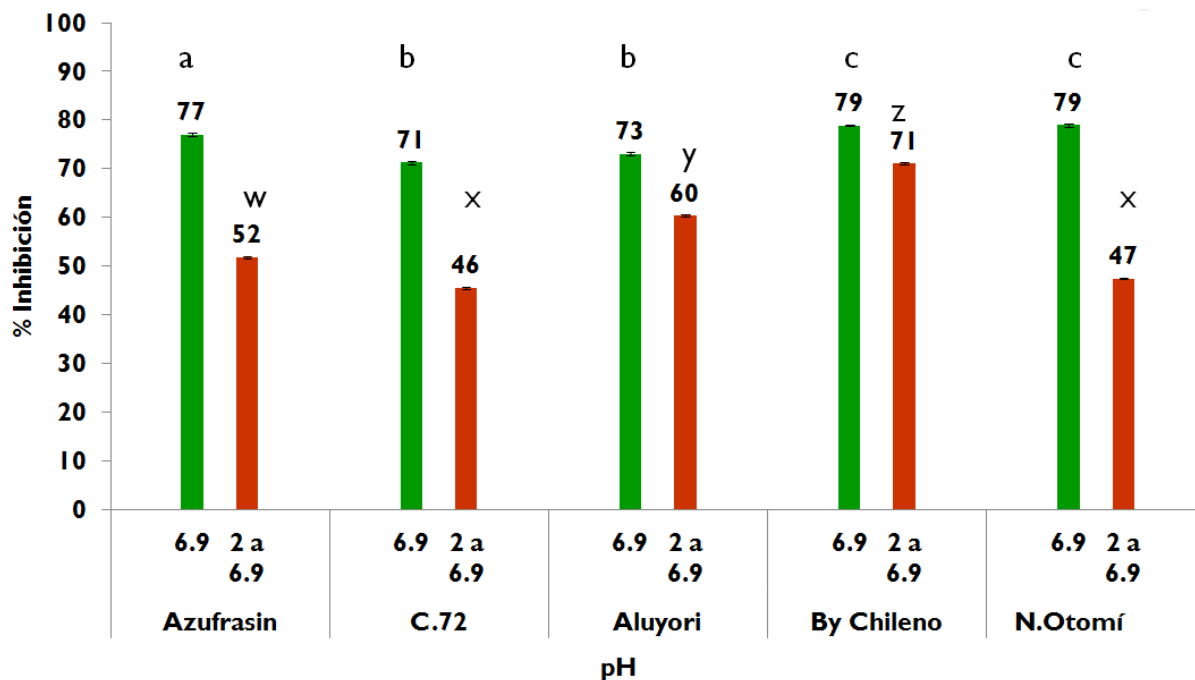


Figura 11. Porcentaje de inhibición de la enzima α -amilasa a distintos pHs utilizando extractos proteicos de diferentes variedades de frijol.

Los datos se expresan como la media \pm EE. ^{a-b,; w-z} Letras distintas en cada columna indican diferencia significativa $P \leq 0.05$ con la prueba de Tukey entre variedades a pH 6.9 y pH de 2 a 6.9.

7.5.4. Efecto de la temperatura sobre la actividad del inhibidor de α -amilasa humana

Otro de los parámetros importantes en la determinación de la estabilidad de un compuesto es la temperatura, lo cual podría influir en el almacenamiento del compuesto, o también en el proceso que pudiera seguirse para su posible adición a algún producto para facilitar su adquisición y consumo, tales como productos de extrusión (pastas) o la adición a algún tipo de bebida.

En el Cuadro 8 pueden observarse los resultados obtenidos en un experimento donde se probaron diferentes temperaturas en un intervalo de 25 a 100 °C (pH 6.9 durante 1 hora). El porcentaje de inhibición comprendido entre los 25 a 40 °C no mostró diferencia importante en ninguno de los extractos de las distintas variedades. Por otro lado, a la temperatura de 50 °C se observó en promedio una disminución de aproximadamente el 50% de la actividad inhibitoria en todas las variedades, mientras que a una temperatura 60 °C hay una disminución del 65 % en

promedio en todas las variedades, y finalmente a una temperatura de 100 °C se tiene la inactivación total del inhibidor.

De acuerdo a lo reportado por Le Berre, *et al.* (1997) y Jiang, *et al.* (2008) se demostró que no hubo una diferencia significativa al emplear temperaturas en el rango de 22 a 37 °C encontrándose las siguientes variaciones en el porcentaje de inhibición 22 °C (61%); 30 °C (54 %); 37 °C (64%) y una inactivación total del inhibidor en el rango de 90 a 100°C al pH óptimo de inhibición (4.5) durante 1 hora.

De acuerdo a los valores obtenidos en nuestro experimento se concluye que la variedad más estable a los cambios en la temperatura es Bayo Chileno, seguida por Aluyori, mientras que la que presentó menor estabilidad fue la variedad Cacahuete 72. De acuerdo a lo anterior quedó demostrada la actividad del compuesto con un porcentaje de inhibición elevado a temperatura fisiológica, dando una aproximación de lo que pudiera suceder en el organismo, así como indicios sobre una de las condiciones a las cuales dicho compuesto pudiera ser almacenado posteriormente a su obtención sin provocar un cambio significativo en las capacidad inhibitoria del compuesto.

7.7 Purificación del inhibidor de α -amilasa

Existen algunos reportes de experimentos *in vivo* que indican que el inhibidor de α -amilasa pudiera presentar una mayor actividad y eficacia cuando se utiliza de manera pura (Jiang *et al.*, 2008; Mune-Mune *et al.*, 2011), obteniendo mejores resultados.

Tomando en cuenta las características de la variedad Bayo Chileno en cuanto a su alta actividad inhibitoria así como su baja concentración de lectinas, y mayor estabilidad del compuesto, el extracto proteico de esta variedad se sometió a un proceso de purificación, siguiendo la metodología establecida por Tormo (2004). En la Figura 12 puede observarse el espectro general para la estandarización del proceso de purificación empleando como muestra extracto de la variedad Bayo Chileno.

Cuadro 8. Inhibición de α -amilasa por acción del inhibidor del extracto proteico total a distintas temperaturas

Variedad	Temperatura (°C)	Inhibición de α-amilasa (%)
Azufrasin	25	72.8 \pm 0.60 ^{b,B}
	30	77.3 \pm 0.54 ^{a,A}
	37	76.9 \pm 0.35 ^{b,A}
	40	76.4 \pm 0.56 ^{a,A}
	60	26.1 \pm 0.25 ^{b,C}
	100	0.0 \pm 0.00
Cacahuete 72	25	73.3 \pm 0.61 ^{b,A}
	30	75.0 \pm 2.14 ^{b,A}
	37	71.2 \pm 0.35 ^{d,A}
	40	72.6 \pm 0.82 ^{c,A}
	60	17.2 \pm 1.89 ^{c,B}
	100	0.0 \pm 0.00
Aluyori	25	74.5 \pm 0.86 ^{b,A,B}
	30	78.1 \pm 1.01 ^{b,A}
	37	73.0 \pm 0.39 ^{c,B}
	40	72.9 \pm 0.67 ^{b,c,B}
	60	34.5 \pm 1.28 ^{a,b,C}
	100	0.0 \pm 0.00
Bayo Chileno	25	71.8 \pm 0.98 ^{b,B}
	30	68.8 \pm 0.95 ^{a,B}
	37	78.9 \pm 0.26 ^{a,A}
	40	75.8 \pm 0.24 ^{a,b,A}
	60	37.1 \pm 1.25 ^{a,C}
	100	0.0 \pm 0.00
Negro Otomí	25	81.7 \pm 0.67 ^{a,A}
	30	75.5 \pm 0.45 ^{b,A}
	37	78.9 \pm 0.31 ^{a,A}
	40	76.1 \pm 0.75 ^{a,A}
	60	29.1 \pm 3.08 ^{a,b,B}
	100	0.0 \pm 0.00

Los datos se expresan como la media \pm EE. ^{a-c}. Letras diferentes en cada columna indican diferencia significativa $P \leq 0.05$ con la prueba de Tukey entre la misma temperatura de las distintas variedades.

^{A-E}. Letras diferentes en cada columna indican diferencia significativa $P \leq 0.05$ con la prueba de Tukey entre las temperaturas de la cada variedad.

Las lecturas de las fracciones se hicieron a 280 nm (longitud de onda establecida para la determinación de proteínas), se tomaron fracciones de la muestra con solución amortiguadora de lavado hasta obtener lecturas menores o iguales a 0.01 y posteriormente se procedió a eluir el compuesto de interés empleando una solución de NaCl en solución amortiguadora de formato de sodio a distintas concentraciones hasta obtener lecturas que mostraron la obtención del pico que indicara que el compuesto de interés había quedado fuera de la matriz de la columna. Cada una de las fracciones colectadas corresponden a un volumen de 10 mL, hasta la obtención del pico que correspondería a la proteína de interés.

En el espectro puede observarse que posterior a la adición de la muestra y empleando únicamente solución amortiguadora de formato de sodio se obtuvo la primera fracción, que de acuerdo a los reportes corresponde a las lectinas contenidas en el extracto (Marshall y Lauda, 1975; Le Berre *et al.*, 1997; Ishimoto *et al.*, 2001; Tormo *et al.*, 2004; Jiang *et al.*, 200), lo cual después se confirmó mediante una prueba de hemaglutinación, resultado positiva. Posteriormente, al obtener lecturas menores a 0.01 se procedió a eluir la muestra que quedó o retenida en la matriz de la columna, se empleó un gradiente de concentraciones (0.01, 0.05, 0.1, 0.12, 0.2, 0.3 y 0.5 M) hasta encontrar la concentración NaCl en la solución amortiguadora para obtener el inhibidor. La concentración a la que se alcanzó la elución de la muestra fue a 0.5 M, una concentración mayor a la reportada de 0.15 M (Marshall y Lauda, 1975; Le Berre *et al.*, 1997; Ishimoto *et al.*, 2001; Tormo *et al.*, 2004; Jiang *et al.*, 2008), probablemente debido a las características del extracto al tratarse de una variedad diferente a la que se han obtenido reportes (frijol blanco), esto permitió obtener un pico que indicaba la presencia del compuesto de interés. Se realizaron pruebas de hemaglutinación a las fracciones colectadas alrededor y en el pico mismo, resultando negativas y posteriormente se sometieron a una prueba de actividad del inhibidor encontrándose una inhibición del 73% aproximadamente, indicando así la presencia del inhibidor en el pico obtenido en las fracciones de la 50 a 58 aproximadamente.

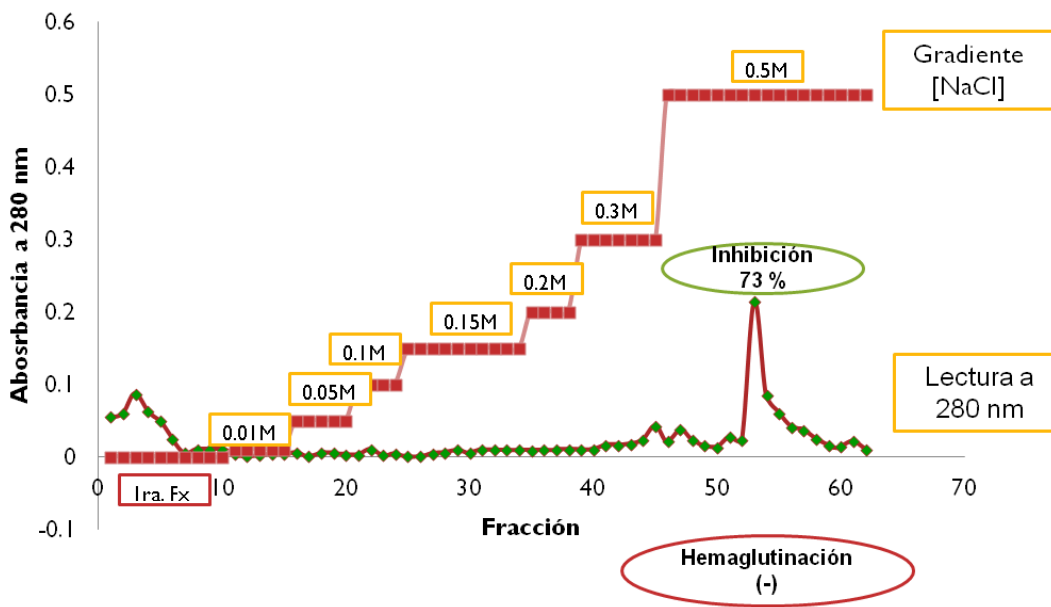


Figura 12. Proceso de purificación del inhibidor de α -amilasa del frijol Bayo Chileno.

Columna de intercambio iónico SP-Sepharose eluida con solución de NaCl 0.01 a 0,5 M en formato de sodio, presentando en las fracciones 0 a 50 una inhibición del 0%, de la fracciones 50 a 60 se muestra una inhibición promedio del 73%

7.7.1 Estandarización del proceso de purificación del inhibidor de α -amilasa

En la Figura 13 se puede observar el espectro obtenido de la purificación del inhibidor de α -amilasa, empleando una solución de elución 0.5 M de NaCl en solución amortiguadora de formato de sodio. Se colectaron fracciones de 4 mL y se graficó la lectura obtenida a una absorbancia de 280 nm. El pico máximo se alcanzó cerca de la fracción número 40, se colectaron y reunieron las fracciones obtenidas en 3 grupos: Fracción 1 (primeras fracciones del pico), fracción 2 (fracciones del pico máximo) y fracción 3 (últimas fracciones del grupo). Se procedió a evaluar la actividad inhibitoria de las 3 fracciones principales, obteniendo porcentajes de inhibición de 46, 71 y 52%, respectivamente. Se realizó también una prueba de hemaglutinación para verificar la ausencia de lectinas en la muestra colectada, resultando negativa para cada una de las fracciones obtenidas.

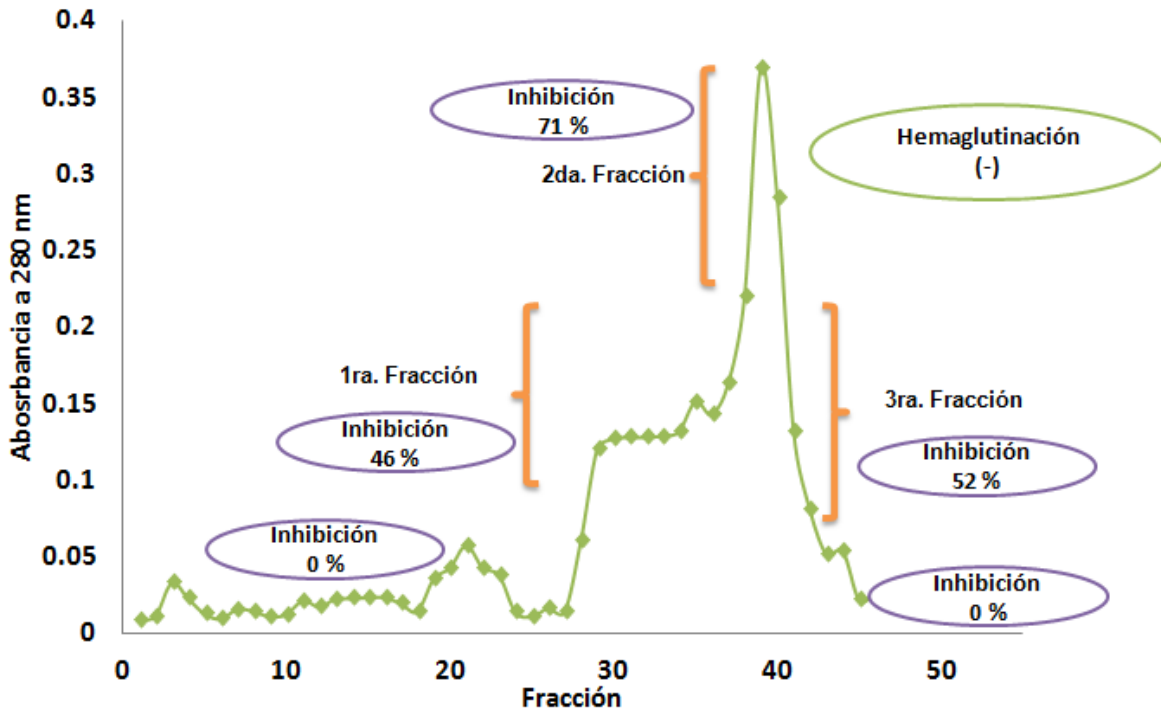


Figura 13. Proceso de purificación estandarizado del inhibidor de α -amilasa

Columna de intercambio iónico SP-Sepharose eluida con solución de NaCl a 0.5 M en formato de sodio, presentando porcentajes de inhibición en las fracciones 27 a 40 de 46,71 y 52%, aproximadamente.

7.8 Electroforesis de las fracciones purificadas

Para confirmar la presencia del inhibidor (previamente mencionado en la Figura 7) se realizó un perfil electroforético de las 3 principales fracciones colectadas (Figura 14). En el carril 1 puede observarse el marcador de peso molecular, en los carriles 2 y 3 la primera fracción colectada, en los carriles 4 y 5 se encuentra la fracción correspondiente al pico máximo (segunda fracción) y finalmente en el carril 6 la fracción correspondiente a la tercera fracción. En los carriles del 2 al 6 puede observarse una banda única de peso molecular aproximado de 58 kDa que correspondería de acuerdo a las características antes descritas por Lee y Whitaker (2002) al peso del inhibidor, mostrándose un poco más concentrada en los carriles 4 y 5 (correspondientes al pico máximo obtenido en la purificación), corroborando así la presencia del inhibidor en el perfil electroforético del extracto proteico total, mostrando la banda obtenida de 58 kDa.

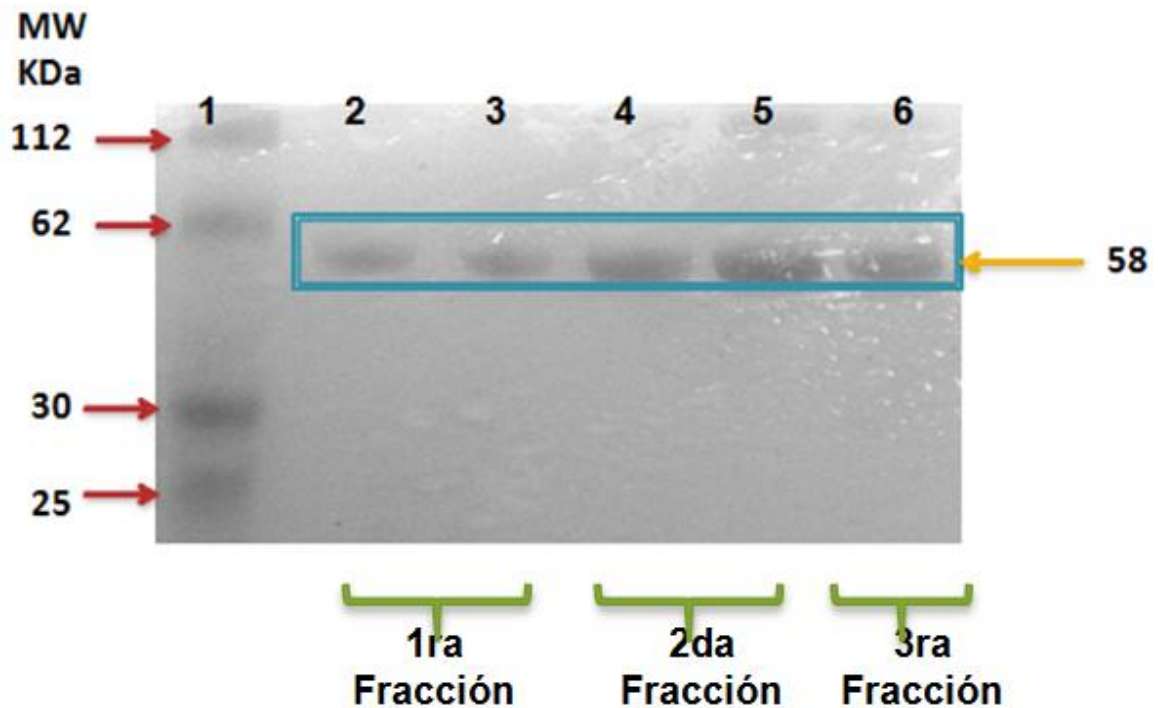


Figura 14. Perfil electroforético de las fracciones purificadas del inhibidor de α -amilasa de la variedad Bayo Chileno

El rendimiento obtenido del inhibidor purificado fue de 950 mg del inhibidor por kilogramo de frijol, representando aproximadamente el 7% de la proteína total, siendo ambos valores ligeramente menores a lo reportado en la literatura donde se indica que por cada kilogramo de frijol blanco se obtiene aproximadamente 1 g del inhibidor representando aproximadamente el 11 % de la proteína total (Kusaba, *et al.*, 2000; Jiang *et al.*, 2008). Esto pudiera deberse a que se trata de una variedad de frijol diferente en cuanto a cultivo y producción y de igual manera las condiciones bajo las cuales se obtuvo el purificado fueron diferentes al emplear una solución más concentrada de NaCl para la elución del compuesto de la columna.

7.9 Efecto hipoglucemiante del inhibidor en el extracto y purificado a distintas dosis

Al observar las características y alta capacidad inhibitoria del compuesto contenido en el extracto, se decidió evaluar en un estudio *in vivo* el extracto proteico total y determinar el efecto que éste pudiera tener sobre la disminución de glucosa en sangre. Esto implica un menor gasto favorecido por la obtención de un extracto que puede tener un efecto similar al compuesto purificado, sin el costo que éste último requiere para su procesamiento.

De acuerdo a lo reportado por Layer *et al.*, 1986; Tormo, 2004 y Jiang *et al.*, 2008, la dosis establecida del inhibidor para este tipo de estudios es de 50 mg del inhibidor/kg de peso corporal. Teniendo en cuenta esta información se optó por emplear distintas concentraciones (5, 15, 25 y 50 mg del inhibidor/kg de peso corporal) para elaborar una curva dosis-respuesta donde podría observarse el comportamiento de las mismas sobre los niveles de glucosa en el organismo. En todos los experimentos el sustrato a evaluar fue el almidón a una dosis de 2 mg/kg de peso corporal, empleandose como control positivo el inhibidor comercial acarbosa a una concentración de 1 mg/kg de peso (dosis recomendada) y como control negativo solución salina.

7.9.1 Efecto hipoglucemiante del extracto proteico total de la variedad Bayo Chileno

En la Figura 15 puede observarse la curva dosis respuesta del inhibidor contenido en el extracto proteico total de la variedad Bayo Chileno. La curva azul fuerte corresponde al control negativo, es decir, únicamente la solución de almidón más solución salina, donde puede observarse que el pico hiperglicémico se presenta a los 60 minutos, alcanzando una concentración aproximada de glucosa de 118 mg/dL. La curva verde corresponde al control positivo que es la solución de acarbosa donde puede observarse que el pico hiperglicémico se ve disminuido en comparación con el grupo tratado con la solución de almidón, alcanzando un valor máximo de 101 mg/dL entre los 45 y 60 minutos aproximadamente.

En lo que respecta a los tratamientos empleando distintas dosis del inhibidor: la curvas naranja y azul claro corresponden a la concentración del 5 y 15 mg/kg y

puede observarse una ligera disminución respecto al control negativo, con una concentración de glucosa de 113 mg/dL y 107 mg/dL respectivamente, manteniendo ambas los niveles de glucosa estables hasta llegar a las concentraciones de glucosa basales alrededor de los 80 mg/dL a un tiempo aproximado de 180 minutos, sin embargo no se alcanzaron los niveles obtenidos con el inhibidor comercial (acarbose). Las curvas roja y morada corresponden a las concentraciones del inhibidor de 25 y 50 mg/kg de peso, respectivamente, puede observarse de igual manera una disminución hasta alcanzar niveles similares a los obtenidos con la curva de acarbose con concentraciones de glucosa de 102 y 101 mg/dL, manteniendo los niveles estables hasta llegar a las concentraciones basales de aproximadamente 80 mg/dL.

Como puede observarse no existe diferencia estadística significativa entre las dosis de 25 y 50 mg/kg, obteniéndose un efecto similar en ambas curvas, y de igual manera no se observa diferencia estadística en comparación con la curva de acarbose respecto al pico hiperglicémico que se obtiene en cada una de ellas a lo largo del tiempo. Mostrando así una considerable disminución de los niveles de glucosa al administrar el tratamiento empleando el inhibidor.

7.9.2 Efecto hipoglucemiante del inhibidor en el extracto proteico total de la variedad Cacahuate 72 (C. 72)

Se realizó una comparación del efecto que puede tener el inhibidor contenido en el extracto proteico total de la variedad Cacahuate 72 que presento mayor inestabilidad en los análisis *in vitro* contra el extracto de la variedad Bayo Chileno que resultó más estable, para determinar si efectivamente pudiera existir una diferencia al emplearlos a nivel fisiológico.

En la Figura 16 puede observarse la curva dosis respuesta del inhibidor contenido en el extracto proteico total de la variedad Cacahuate 72. La curva azul fuerte corresponde al control negativo, donde el pico hiperglicémico se presenta en un tiempo de 60 minutos, alcanzando una concentración aproximada de glucosa de 120 mg/dL. La curva verde corresponde al control positivo que es la solución de

acarbosa donde puede observarse que el pico hiperglicémico se ve disminuido en comparación con el formado únicamente con la solución de almidón, alcanzando un valor máximo de 99 mg/dL entre los 60 minutos aproximadamente.

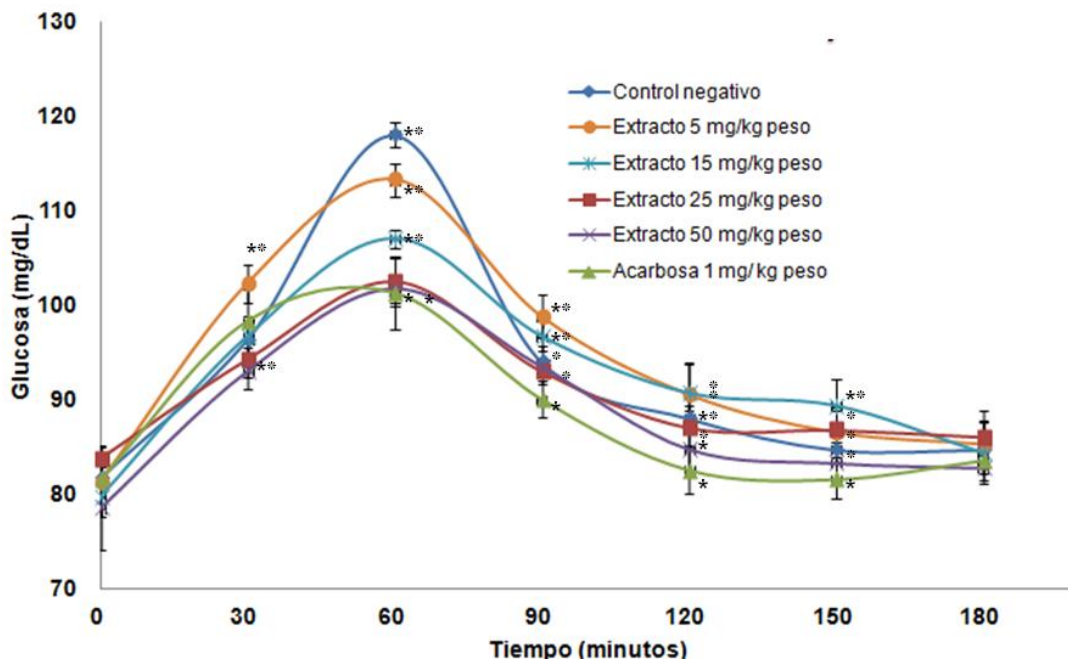


Figura 15. Efecto hipoglucémico del extracto proteico total de la variedad Bayo Chileno evaluado en ratas sanas

Se presentan los datos obtenidos del análisis hipoglucemiante del extracto proteico total de Bayo Chileno \pm EE. *, * Indica diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) con respecto al control negativo y positivo, respectivamente, analizados con la prueba de Dunnett.

En lo que respecta a los tratamientos empleando distintas dosis del inhibidor en la curva naranja corresponden a la concentración del 5 mg/kg, puede observarse que no presenta disminución significativa respecto al pico hiperglicémico con una concentración de glucosa de 119 mg/dL, y de igual manera sucede a través del tiempo, retardando la absorción sin disminuir los niveles de glucosa. Las curvas color azul claro, roja y morada corresponden a las concentraciones 15, 25 y 50 mg/kg de peso, puede observarse que no hay diferencia estadística significativa entre los 3 tratamientos al llegar al pico hiperglicémico, sin embargo se presenta una ligera reducción alcanzando una concentración de glucosa 114, 112 y 109 mg/dL.

A través del tiempo para los 3 tratamientos se observa que se retarda la absorción de glucosa a lo largo de 180 minutos, tiempo, donde sólo algunos tratamientos (acarbosea y extracto 5 mg/kg peso) alcanzan niveles basales alrededor de 80 mg/dL de glucosa. Mientras que el resto permanece un poco por encima de estos. Esto indica que no existe una disminución en la liberación de glucosa por acción del compuesto, ya que, aunque se tiene una disminución del pico hiperglicémico la concentración de glucosa se mantiene elevada y es absorbida a lo largo del tiempo.

7.9.3 Efecto hipoglucemiante del inhibidor purificado de la variedad Bayo Chileno

En la Figura 17 puede observarse la curva dosis respuesta del inhibidor purificado de la variedad Bayo Chileno. La curva azul fuerte corresponde al control negativo, el pico hiperglicémico se presenta en un tiempo de 60 minutos, alcanzando una concentración aproximada de glucosa de 121 mg/dL. La curva verde corresponde al control positivo que es la solución de acarbosea donde puede observarse que el pico hiperglicémico se ve disminuido en comparación con el formado únicamente con el control negativo, alcanzando un valor máximo de 101 mg/dL entre los 45 y 60 minutos aproximadamente.

En lo que respecta a los tratamientos empleando distintas dosis del inhibidor: las curvas naranja y azul claro corresponden a la concentración del 5 y 15 mg/kg y puede observarse una ligera disminución respecto al control negativo, con una concentración máxima de glucosa de 116 y 113 mg/dL respectivamente. Se observa también a través del tiempo un efecto similar al obtenido con el extracto proteico de la variedad Cacahuete 72. Con esta se observó un retraso en la absorción de glucosa presentando niveles más altos que los obtenidos en la curva de control negativo manteniendo ambas los niveles de glucosa estables hasta llegar a las concentraciones de glucosa basales alrededor de los 80 mg/dL a un tiempo aproximado de 180 minutos. Sin embargo no se logran alcanzar los niveles obtenidos al emplear el inhibidor comercial.

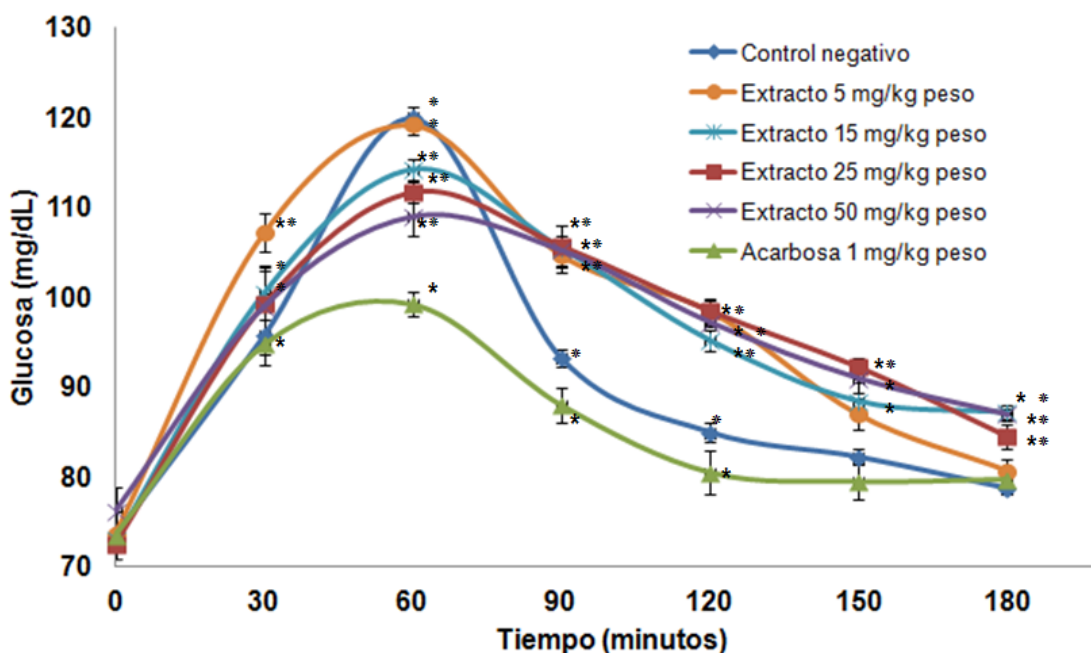


Figura16. Efecto hipoglucemiante del extracto proteico total de la variedad Cacahuete 72 (C. 72) evaluado en ratas sanas

Se presentan los datos obtenidos del análisis hipoglucemiante del extracto de la variedad C.72 \pm EE. *, * indica diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) con respecto al control negativo y positivo, respectivamente, analizados con la prueba de Dunnett.

Las curvas roja y morada corresponden a las concentraciones del inhibidor de 25 y 50 mg/kg de peso, puede observarse de igual manera una disminución hasta alcanzar niveles ligeramente menores a los obtenidos con la curva de acarbosa, con concentraciones de glucosa de 100 y 99 mg/dL respectivamente. Como puede observarse no hubo diferencia estadística significativa entre las dosis de 25 y 50 mg/kg, obteniéndose un efecto similar en ambas curvas. Sin embargo nuevamente se observa un retardo en la absorción de glucosa en a partir de 90 minutos y hasta llegar a los 180 minutos, presentando una diferencia marcada respecto a la curva que se obtiene con acarbosa comercial, hasta llegar finalmente a las concentraciones basales de aproximadamente 80 mg/dL

Esto indica que en los tratamientos correspondientes a 5 y 15 mg del inhibidor/kg de peso sólo se presenta una ligera disminución en la liberación de glucosa por acción del compuesto, ya que, aunque se tiene una disminución

considerable del pico hiperglicémico la concentración de glucosa se mantiene alta y es absorbida a lo largo del tiempo.

7.9.4 Efecto hipoglucemiante del extracto proteico e inhibidor purificado de la variedad Bayo Chileno

Tomando en cuenta los resultados anteriores y observando que el compuesto contenido tanto en el extracto proteico total como el inhibidor purificado de la variedad Bayo Chileno fueron los que presentaron mejores resultados respecto a la concentración de glucosa liberada al torrente sanguíneo, considerando además, que no hubo diferencia estadística en las curvas obtenidas para las concentraciones de 25 y 50 mg/kg (que resultaron ser las dosis apropiadas para éste ensayo al compararlas contra el efecto del inhibidor comercial), se realizó otro ensayo donde fueron comparadas las dosis de 25 mg/kg del inhibidor contenido en el extracto proteico total, así como, del compuesto purificado.

En la Figura 18 puede observarse la curva dosis respuesta del inhibidor contenido en el extracto proteico total, así como del inhibidor purificado de la variedad Bayo Chileno.

La curva azul corresponde al control negativo, el pico hiperglicémico se presenta en un tiempo de 60 minutos, alcanzando una concentración aproximada de glucosa de 122 mg/dL. La curva morada corresponde al control positivo que es la solución de acarbosa donde puede observarse que el pico hiperglicémico se ve disminuido en comparación con el formado únicamente con el control negativo, alcanzando un valor máximo de 103 mg/dL entre los 45 y 60 minutos aproximadamente. En lo que respecta a los tratamientos, las curvas roja y verde corresponden a extracto e inhibidor purificado respectivamente, puede observarse que no existe diferencia significativa al llegar al pico hiperglicémico, de igual manera una disminución en los niveles de glucosa a lo largo del tiempo hasta alcanzar niveles similares a los obtenidos con la curva de acarbosa, con concentraciones de glucosa de 102 y 100 mg/dL respectivamente.

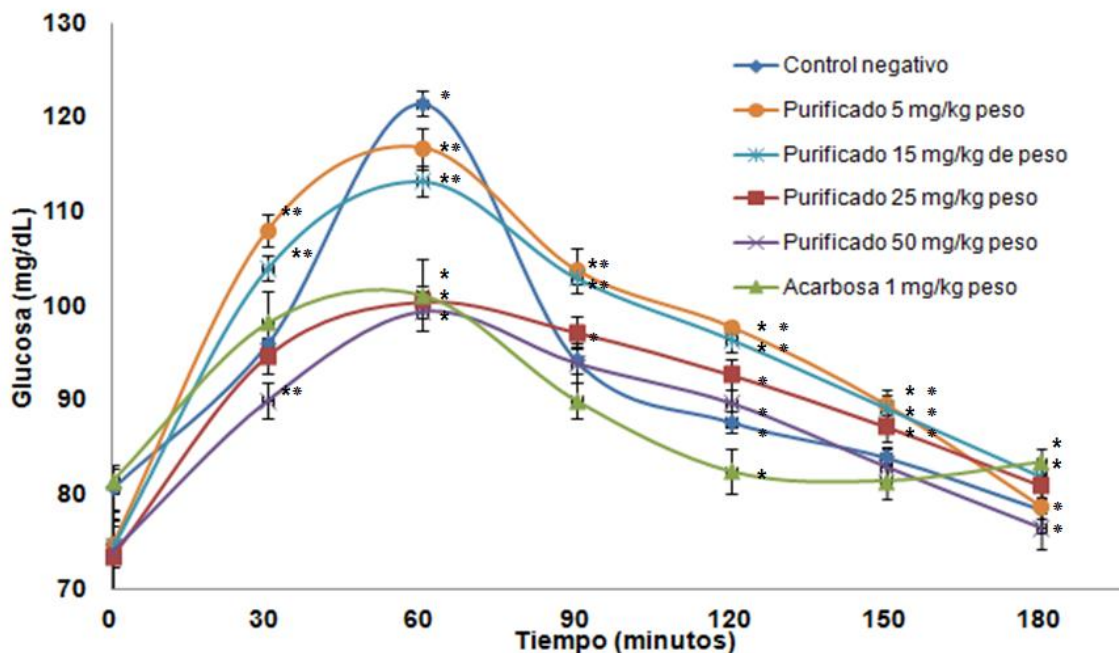


Figura 17. Efecto hipoglucémico del inhibidor purificado de la variedad Bayo Chileno evaluado en ratas sanas

Se presentan los datos obtenidos del análisis hipoglucemiante del inhibidor purificado de la variedad Bayo Chileno \pm EE, *,* Indica diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) con respecto al control negativo y positivo, respectivamente, analizados con la prueba de Dunnett.

Por otro lado durante el experimento se observó que el extracto proteico total sigue una trayectoria similar a la del inhibidor comercial, a pesar de que a lo largo del tiempo el extracto muestra valores un poco más elevados que la acarbosa, dichos valores se mantienen estables y similares a los del compuesto purificado hasta alcanzar una concentración cercana a los niveles basales alrededor de 82 mg/dL. En tanto para el inhibidor purificado se presenta el pico hiperglicémico una concentración de glucosa menor a la determinada para el control positivo de aproximadamente 100 mg/dL, a pesar de que puede observarse nuevamente un retardamiento en la absorción de glucosa a lo largo del tiempo (de los 90 a los 180 minutos) a los 180 minutos se alcanzan niveles basales con concentraciones de glucosa alrededor de 80 mg/dL.

De acuerdo a los resultados obtenidos anteriormente se puede decir que el tratamiento que mostró los mejores resultados en cuanto a la disminución de glucosa

en el torrente sanguíneo fue el obtenido con el extracto proteico de la variedad Bayo Chileno con una dosis de 25 mg/kg de peso, que es una dosis menor de acuerdo a lo anteriormente reportado (50 mg/kg de peso) Tormo (2004) para ser empleado como un tratamiento en los distintos estudios. Permitiendo con ello la obtención del inhibidor bajo un procedimiento que es más económico en menor tiempo.

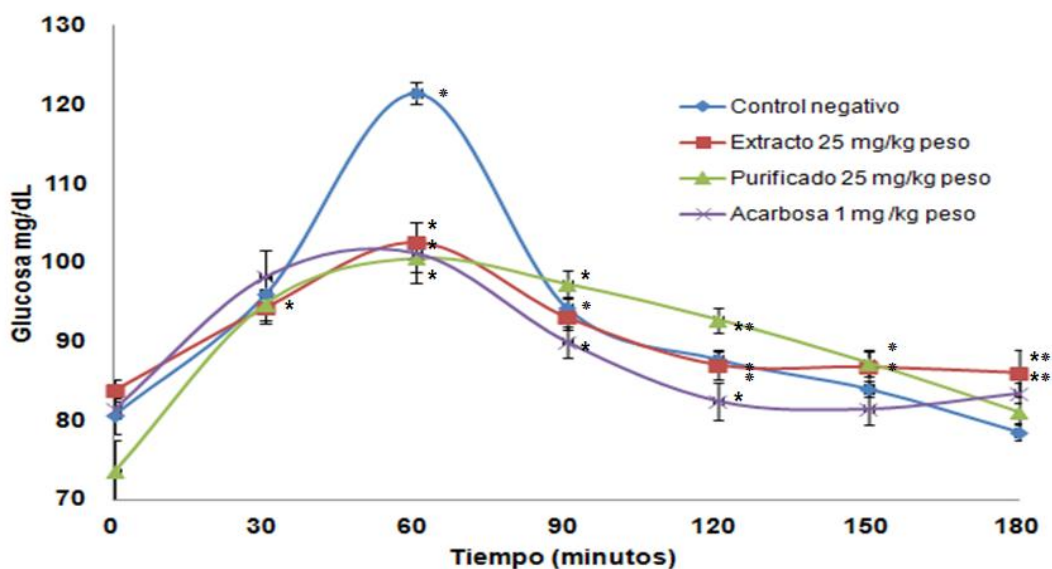


Figura 18. Efecto hipoglucémico evaluado en ratas sanas del extracto proteico total de la variedad Bayo Chileno, así como el inhibidor purificado empleando 25 mg inhibidor/kg peso corporal

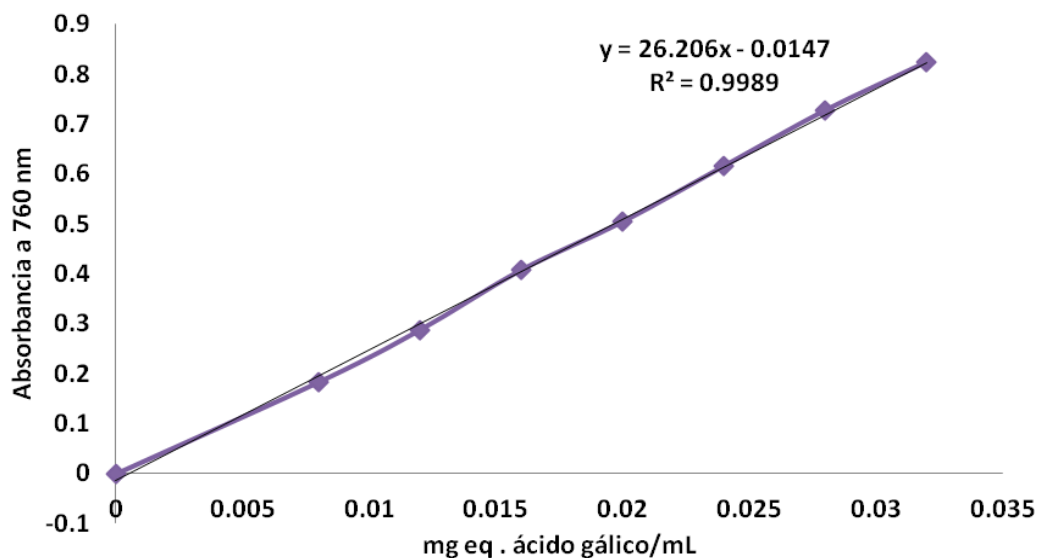
*Se presentan los datos obtenidos del análisis hipoglucemiante del extracto proteico total y el inhibidor purificado de Bayo Chileno en dosis de 25 mg/kg \pm EE. *,* Indica diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) con respecto al control negativo y positivo, respectivamente, analizados con la prueba de Dunnett.

8. CONCLUSIONES

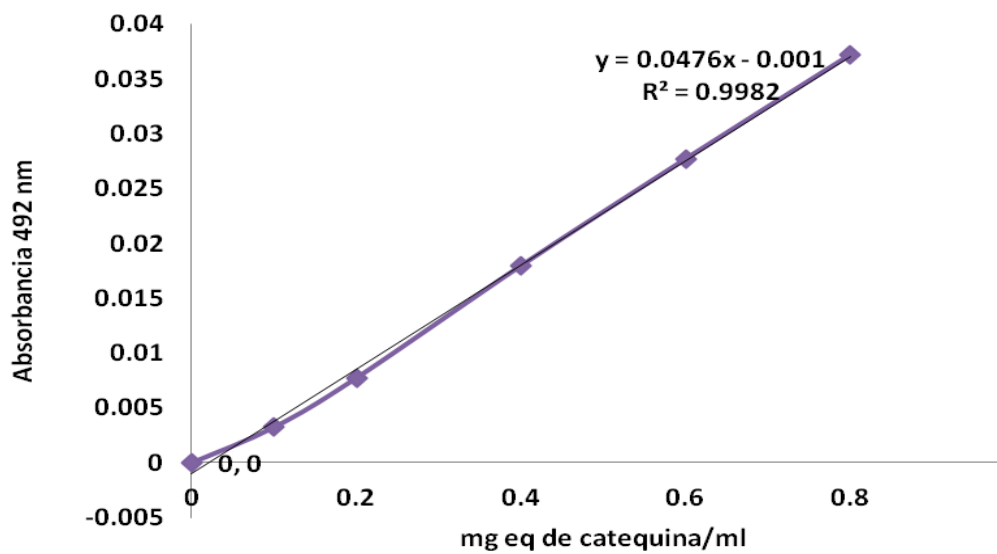
- ❖ Las variedades Bayo Chileno, Negro Otomí, Azufrasin, Cacahuate 72 y Aluyori presentaron la mayor actividad inhibitoria de α -amilasa, a pesar de haber una disminución considerable en la concentración de los compuestos fenólicos.
- ❖ En el extracto proteico total, no se encontró correlación entre la concentración de fenoles, taninos condensados o antocianinas con el porcentaje de inhibición de α -amilasa en las variedades analizadas.
- ❖ Las condiciones de extracción para las harinas de frijol permiten la pre-purificación de un extracto proteico total, favoreciendo la eliminación de fitohemaglutininas (lectinas).
- ❖ En las pruebas de estabilidad del inhibidor bajo diferentes condiciones de pH y temperatura, la variedad más inestable fue la del frijol Cacahuate 72, mientras que Bayo Chileno presentó las mejores propiedades en el extracto proteico de frijol.
- ❖ El efecto observado en los análisis *in vitro* fue similar al mostrado en los estudios *in vivo* en cuanto a la estabilidad de la variedad Bayo Chileno y la variedad menos estable Cacahuate72, obteniéndose mejores resultados con la primera.
- ❖ En los estudios *in vivo* se demostró que no hay diferencia significativa entre el inhibidor contenido en el extracto y el compuesto purificado, siendo el extracto la alternativa más viable para la aplicación de este compuesto.
- ❖ No se observó diferencia significativa entre las dosis de 25 y 50 mg/kg mostrando éstas dos el mayor efecto inhibitorio; así, la dosis de 25 mg/kg es la más recomendable.

9. ANEXOS

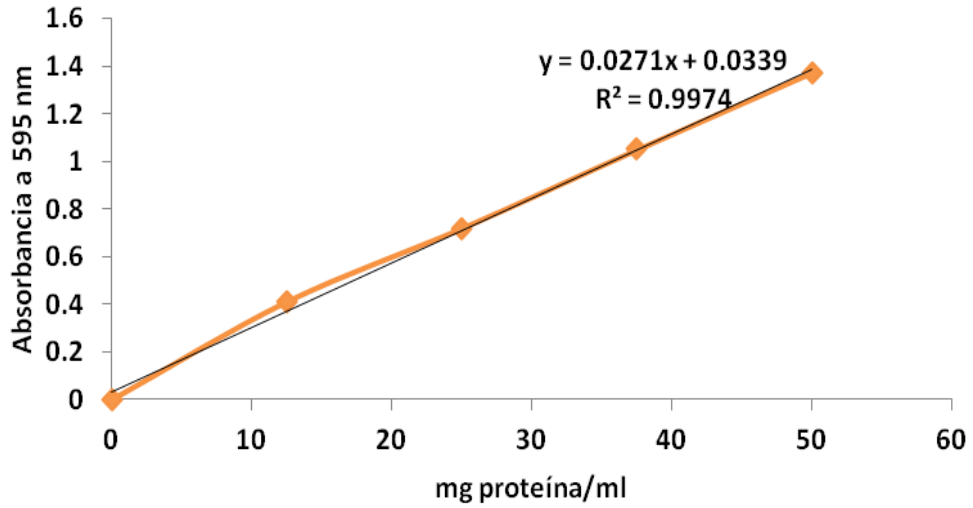
Curva calibración para la determinación de fenoles totales (mg eq. ácido gálico/mL)



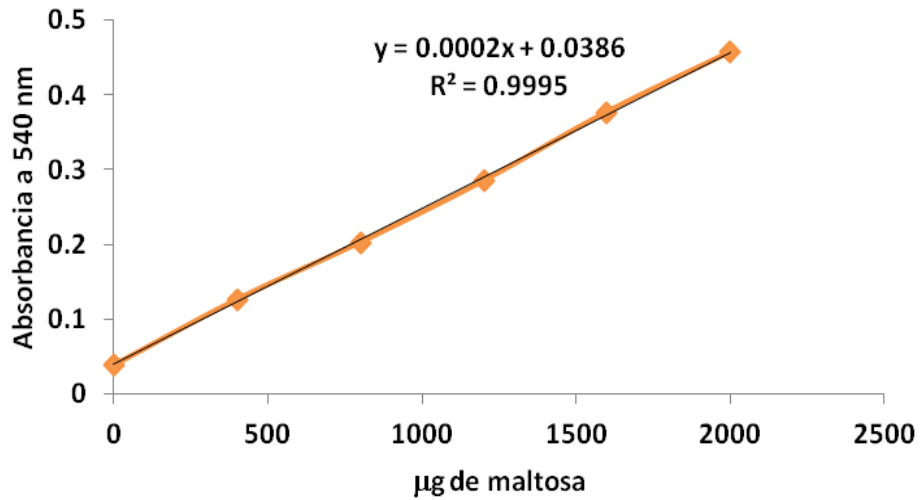
Curva calibración para la determinación de taninos condensados



Curva de calibración para la cuantificación de proteína



Curva de calibración para la determinación de la actividad inhibitoria



10. Referencias bibliográficas

- Abdel-Aal, E. S. M., Hucl, P. 1999. A rapid method for quantifying total anthocyanins in blue aleurone and purple pericarp wheats. *Cereal Chem.* 76: 350-354.
- Acosta-Gallegos, J.A. y Pérez Herrera, P. 2000. Situación del cultivo de frijol común en México. Producción e investigación. *Prog. de Frijol del INIFAP.*
- Aguilar-Salinas, C. A., Olaiz, G., Valles, V., Ríos Torres, J.M. Gómez Pérez, F.J. Rull, J. A., Rojas, R., Franco, A. and Sepulveda, J. 2001. High prevalence of low HDL cholesterol concentrations and mixed hyperlipidemia in a Mexican nationwide survey. *J. Lipid Res.* 42: 1298–1307.
- Aguilar-Salinas, C.A., Velásquez-Monroy, O., Gomez-Perez, F.J., Gonzalez-Chavez, A., Lara-Esqueda, A., Molina-Cuevas, V. 2003. Characteristics of the patients with type 2 diabetes in México: results from a large population-based, nation-wide survey. *Diab. Care.* 26:2021-2026
- Aguilar-Salinas, C.A., Rojas, R., Gomez-Perez, F.J., Valles, V., Rios-Torres, J.M., Franco, A. 2004. High prevalence of the metabolic syndrome in Mexico. *Arch. Med. Res.* 35:76-81.
- Aguirre Santos, E.A. y Gómez-Aldapa, C.A. 2012. Evaluación de las características fisicoquímicas en la especie de frijol *Phaseolus vulgaris* L. de las variedades Pinto Saltillo, Bayo CVictoria y Negro San Luis. XII Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos.
- Allende-Arrarás, G., Acero-Godínez, M.G., Padilla-Ramírez, J. S. y Mayek-Pérez, N. 2006. Comportamiento agronómico y características físico-químicas del grano de frijol en Aguascalientes, México. *Rev. Fitotec. Mex.* 89-93.
- Arroyo-Bros, J. y Caixás-Pegragós, A. 2007. Antidiabéticos orales: opciones y prioridades terapéuticas. Unidad de Diabetes, Endocrinología y Nutrición. Hospital de Sabadell. Barcelona, España.
- Bakkalbai, E.I. Mentés, O. and Artik, N., 2009. Food Ellagitannins – Occurrence, Effects of Processing and Storage. Department of Food Engineering, Faculty of Engineering, Ankara University, Diskapi Campus, Diskapi, 06110 Ankara, Turkey.

- Barrett, K., Brooks, H., Boitano, S. y Barman, S., 1995. Ganong's Review of Medical Physiology. Ed. 12. Section V. Gastrointestinal Function. *Digest. & Absortion.* 383-393.
- Bradford, M.M. 1976: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254
- Celleno, L., Tolaini, M.V., D'Amore, A., Perricone, N.V. and Preuss, H.G. 2007. A dietary supplement containing standardized *Phaseolus vulgaris* extract influences body composition of overweight men and women. *Int. J. Med. Sci.* 4:45–52.
- Chiasson, J.L., Josse, R.G., Gomis, R., Hanefeld, M., Karasik, A. and Laakso M, 2002. Acarbose for prevention of type 2 diabetes mellitus: the STOP-NIDDM randomised trial. *Lancet.* 15:2072-2077
- Chokshi, D. 2006. Toxicity studies of blockal, a dietary supplement containing Phase 2 starch neutralizer (Phase 2), a standardized extract of the common white kidney bean (*Phaseolus vulgaris*). *Int. J. Toxicol.* 25:361–371.
- Córdova-Villalobos, J.A., Barriguete-Meléndez, J.A., Lara-Esqueda, A., Simón-Barquera, M., Rosas-Peralta, M., Hernández-Ávila, M.; León-May, M., Aguilar-Salinas, C., 2008. Las enfermedades crónicas no transmisibles en México: Sinopsis epidemiológica y prevención integral. *Salud Pú. Méx.* Vol. 50, no. 5.
- De Mejía, E.G.; Guzmán-Maldonado, S.H.; Acosta-Gallegos, J.A.; Reynoso-Camacho, R.; Ramírez-Rodríguez, E.; Pons-Hernández, J.L.; González-Chavira, M.M.; Castellanos, J.Z. and Kelly, J.D. Effect of Cultivar and Growing Location on the Trypsin Inhibitors, Tannins, and Lectins of Common Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) Grown in the Semiarid Highlands of Mexico. 2003. *J. Agric. Food Chem.* 51, 5962–5966
- De Oliveira, A. C., Vidal, B. D., Sgarbieri, V. C. Lesions of intestinal epithelium by ingestion of bean lectins in rats. **1989.** *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*, 35, 315-322.

- DeFronzo, R.A.,1999. Pharmacologic therapy for type 2 diabetes mellitus. *Ann. Intern. Med.* 131:281-303.
- Deshpande S. S., Cheryan, M. 1987. Determination of phenolic compounds of dry beans using vanillin, redox and precipitation assays. *J Food Sci.* 52: 332-334.
- Díaz-Batalla, L., Widholm J. M., Fahey G C Jr, Castaño-Tostado, E., Paredes-López, O. 2006. Chemical components and health implications in wild and cultivated Mexican common bean seeds (*Phaseolus vulgaris L.*). *J Agric Food Chem.* 54: 2045-2052.
- Dirección General Adjunta de Planeación Estratégica y Análisis Sectorial. Monografía Frijol. Financiera Rural. Junio 2009.
- Federación Mexicana de Diabetes (FMD). 2011. Diabetes en México. <http://www.accu-chek.com.mx/mx/vida/diabetesenmexico.html>
- Fisiología Gastrointestinal-Fisiología I. Facultad de Medicina, U.A.E.M.; Capítulo 62. Generalidades del aparato digestivo. http://www.angelfire.com/linux/medicina/documentos/Gastro_07.pdf
Fecha de Consulta, 14 Mayo de 2011 a las 5:00 pm.
- Ganong, W.F., 1995. Review of Medical Physiology. Section V. Gastrointestinal Function. Lange Medical Publications. 12 Ed.
- García-Luna, P.P. y López-Gallardo, G., 2007. Evaluación de la absorción y metabolismo intestinal. *Nutric. Hosp.* 22:5-13.
<http://www.med.unne.edu.ar/catedras/bioquimica/glucemia.html>
- Guyton, A.C. y Hall, J.E., 1998. Tratado de Fisiología Médica. Cap. 65, Fisiología Gastrointestinal, IX Edición, Pp. 904.
- Guzmán-Maldonado S. H., Paredes-López O.,1998. Functional products of plant indigenous to Latin America, quinoa, common beans and botanicals. Functional Foods: Biochemical and processing Aspects. Mazza G (ed.), Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster PA. 293-328.
- Hernández-Cruz, P., Pérez, E., Martínez, L., Ortiz, B. y Martínez, G., 2005. Las lectinas vegetales como modelo de estudio de las interacciones proteína-carbohidrato. Departamento de Bioquímica, UNAM. *REB* 24 (1): 21-27.

- Herzing, K. H., Bardocz, S., Grant, G., Nustede, R., Folsch, U. R., Pusztai, A.. 1997. Red kidney bean lectin is a potent cholecystodin releasing stimulus in the rat inducing pancreatic growth. *Gut* . 41, 333-338.
- Hollenbeck, C.B. 1983. Effects of a commercial starch blocker preparation on carbohydrate digestion and absorption: in vivo and in vitro studies. *Ame. J. Clin. Nutr.* 38:498–503.
- Harikumar, K.B., Jesil, A.M., Sabu, M.C. and Kuttan, R. 2005. A preliminary assessment of the acute and subchronic toxicity profile of Phase 2: an α -amylase inhibitor. *Int. J. Toxicol.* 24:95–102.
- Huttings, J.H. 1999. Food Color and Appearance. 2nd ed. Gaithersburg, Md.:Aspen Publishers, Inc.
- Iniestra-González, J. J., Ibarra-Pérez, F. J., Gallegos-Infante, J. A., Rocha-Guzmán, N. E., González-Laredo, R. F., 2005. Factores antinutricios y actividad antioxidante en variedades mejoradas de frijol común (*Phaseolus vulgaris*). *Agrociencia*. 39: 603-610.
- Ishimoto, M. and Chrispeels, M.J.1996. Protective mechanism of the Mexican bean weevil against high levels of α -amylase inhibitor in the common bean. *Plant Physiology* 111:393-401.
- Ishimoto, M. Yamada, T. and Hattori, K. 2001. Purification and characterization of two α -amylase inhibitors from seed of tepary bean (*Phaseolus acutifolius* A. Gray). *Phytochemistry*. 58: 59-66.
- Jain, N.K., Boivin, M., Zinsmeister, A.R. & DiMagno, E.P., 1991. The ileum and carbohydrate-mediated feedback regulation of postprandial pancreaticobiliary secretion in normal humans. *Pancreas* 6, 495–505.
- Jiang, B., Obiro, W.C. and Zhang, T. 2008. The nutraceutical role of the *Phaseolus vulgaris* α -amylase inhibitor. *Br. J. Nutr.* 100:1-12.
- Kilpatrick, D.C., Green, C. and Yap, .PL. 1983. Lectin content of slimming pills. *Br.Med.J.* 22:286, 305.
- Kusaba-Nakayama, M., Ki, M., Iwamoto, M., Shibata, R., Sato, M. and Imaizumi, K. 2000. CM3, one of the wheat α -amylase inhibitor subunits, and binding of

- IgE in sera from Japanese with atopic dermatitis related to wheat. *Food Chem. Toxicol* 38: 179–185.
- Layer, P., Zinsmeister, A.R. and DiMagno, E.P. 1986. Effects of decreasing intraluminal amylase activity on starch digestion and postprandial gastrointestinal function in humans. *Gastroenterology* 91, 41–48.
- Le Berre-Anton, V., Bompard-Gilles, C. Payan, F. and Rougé, P. 1997. Characterization and functional properties of the α -amylase inhibitor (α -AI) from kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds. *Biochim. Biophys.* 1343: 31-40.
- Lee SC, Gepts PL & Whitaker JR (2002) Protein structures of common bean (*Phaseolus vulgaris*) α -amylase inhibitors. *J Agric Food Chem* 50, 6618–6627.
- Lebovitz, H.E., 1997. Alpha-Glucosidase inhibitors. *Endocrinol. Metab.Clin.* 26:539-51.
- Marshall, J. and Lauda, C.M., 1975. Purification and properties of phaseolamin, an inhibitor of α -amylase, from the kidney bean, *Phaseolus vulgaris*. *J. Biol. Chem.* 250: 8030-8037.
- Marzo, F., Alonso, R., Urdaneta, E., Arricibita, F.J. and Ibanez, F. 2002. Nutritional quality of extruded kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L. var. Pinto) and its effects on growth and skeletal muscle nitrogen fractions in rats. *J. Anim. Sci.* 80:875–879.
- Meiss, D.E. and Ballerini, R. 2003. Effectiveness of Phase 2e, a natural α -amylase inhibitor, for weight loss: a randomized double-blind, placebo-controlled study Presented at Scripps Clinic Natural Supplements in Evidence-Based Practice Conference, 18 January 2003. La Jolla, CA: Scripps Clinic
- Mora, A., Aragón, D.M. and Ospina G.; 2009. Oxidative stress characterization in streptozotocin-diabetic wistar rats. *Vitae*.16:311-319.
- Moreno, J., Altabella, T. and Chrispeels, M.J. 1990. Characterization of α -amylase inhibitor, a lectin-like protein in the seeds of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant. Physiol.* 92:703–709.

- Mune-Mune, M.A.; Minka, S.R. and Lape-Mbome, I., 2011. Nutritional potential of bambara bean protein concentrate. *Pakistan J. Nut.* 10: 112-119.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). 2011 a. Obesidad, Nota descriptiva N°311
- Organización Mundial de la Salud (OMS). 2011 b. Diabetes, Nota descriptiva N°312.
- Ou,S., Kwok, K., Li, Y., Fu, L., 2001. In vitro study of possible role of dietary fiber in lowering postprandial serum glucose. *J. Agricult. Food. Chem.* 49:1026-1029.
- Revista de Endocrinología y Nutrición. ¿Qué es la obesidad? Sociedad Mexicana de Nutrición y Endocrinología, A.C. Vol. 12. Suplemento 3.
- Paredes-López, O. y Valverde, M.E. 2006. Los recursos nutracéuticos y medicinales que Mesoamérica le ha dado al mundo, *Avance y Perspectiva (CINVESTAV)*, 25: 65-73.
- Reyes-Rivas, E., Padilla-Bernal, L. E., Pérez-Veyna, O., López-Jáquez, P. 2008. Historia, Naturaleza y Cualidades alimentarias del frijol. *Rev Inves Cient.* 4: 1–21.
- Reynoso-Camacho, R., Ríos-Ugalde, M., Torres-Pacheco, J., Acosta-Gallegos, J.A., Palomino-Salinas, C., Ramos-Gómez, M., González-Jasso, E. y Guzmán-Maldonado, H. 2007. El consumo de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) y su efecto sobre el cáncer de colon en ratas Sprague-Dawley. *Agric. Téc. Méx.* 33: 43-52.
- Rosales-Serna R., Kohashi-Shibata, J., Acosta-Gallegos, J. A., Trejo-López, C. , Ortiz-Cereceres, J. and J. D. Kelly. 2004. Biomass distribution, maturity acceleration and yield in drought-stressed bean cultivars. *Field Crops Res.* 85: 203-211.
- Saura-Calixto, F., Goni, I., Manas, E., and Abia, R. (1991). Klason lignin, condensed tannins and resistant protein as dietary fibre constituents: Determination in grape pomaces. *Food Chem.*, 39: 299-309.
- Secreciones en el tubo digestivo. Bucal, 2011. Biblioteca Digital de la Universidad de Chile. Sistema de Servicios de Información y Bibliotecas, SISIB. Citado el 30 de Mayo de 2011. A las 12:30 p.m. http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias_quimicas_y_farmaceuticas/steinera/parte06/03a.html

- Secretaría de Salud. 2007. Dirección General de Información en Salud. Diez Principales Causas de Mortalidad en Hombres y Mujeres, 2007. Consultada el 30 de Mayo de 2011. A las 4:00 p.m. http://sinais.salud.gob.mx/descargas/xls/diezprincausasmort2007_CNEGySR
- Serrano J, Goñi I. 2004. Papel del frijol negro *Phaseolus vulgaris* en el estado nutricional de la población guatemalteca. Arch Lat Nutr. 54: 36-44.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R. M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of FolinCiocalteu reagent. Methods Enzymol. 299:152-178
- Tapia-Vildósola, L.P., 2008. Alimentación sana y su relación con la obesidad: Percepción de escolares por estratos económicos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Nutrición. Universidad Veracruzana.
- Tormo, M.A., Gil-Exojo, I., Romero de Tejada, A. and Campillo, J. E. 2004. Hypoglycaemic and anorexigenic activities of an α -amylase inhibitor from white kidney beans (*Phaseolus vulgaris*) in Wistar rats. Br. J. Nutr. 92:785-90.
- Udani ,J., Hardy, M. and Madsen, D.C., 2004. Blocking carbohydrate absorption and weight loss: a clinical trial using Phase 2 brand proprietary fractionated white bean extract. Altern. Med. Rev. 9, 63–69.
- Xu, B. and S. Chang, 2009. Total phenolic, phenolic acid, anthocyanin, flavan-3-ol and flavonol profiles and antioxidant properties of pinto and black beans (*Phaseolus vulgaris* L.) as affected by thermal processing. J. Agric. Food Chem., 57: 4754-4764.
- Yusuf S, Reddy S, Ounpuu S, Anand S., 2001. Global burden of cardiovascular diseases: part I: general considerations, the epidemiologic transition, risk factors, and impact of urbanization. Circulation. 104:2746-2753.
- Zeng H, Locatelli M, Bardelli C, Amoruso A, Coisson J D, Travaglia F, Arlorio M, Brunelleschi S. 2011. Anti-inflammatory properties of clovamide and Theobroma cacao phenolic extracts in human monocytes: evaluation of respiratory burst, cytokine release, NF- κ B activation, and PPAR γ modulation. J Agric Food Chem. 59:5342-50.