

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE MÉRIDA

TESIS

**“Evaluación de la ingestión de Pirodextrinas y
Maltodextrinas Enzimáticamente Resistentes sobre el
estado de saciedad”**

PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS Y
BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA:

LN ENRIQUE EFRAÍN BARBOSA MARTÍN

ASESOR:

DR. ENRIQUE SAURI DUCH

CO-ASESOR:

DR. DAVID BETANCUR ANCONA

MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO

30 DE ENERO DE 2018



DEPENDENCIA: DIV. DE EST. DE POSG. E INV.
No. DE OFICIO: X-520/2017

ASUNTO: AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

MÉRIDA, YUCATÁN A 07 DE DICIEMBRE DE 2017

C. BARBOSA MARTÍN ENRIQUE EFRAÍN
Pasante de Maestría en Ciencias de los
Alimentos y Biotecnología
P r e s e n t e .

De acuerdo al fallo emitido por su asesor el **Dr. Enrique Sauri Duch**, co-asesorado por el Dr. David Abram Betancur Ancona y la comisión revisora integrada por la Dra. Susana Rincón Arriaga y el Dr. Víctor Manuel Toledo López, considerando que cubre los requisitos establecidos en el Reglamento de Titulación de los Institutos Tecnológicos le autorizamos la impresión de su trabajo profesional con la TESIS:

**"EVALUACIÓN DE LA INGESTIÓN DE PIRODEXTRINAS Y MALTODEXTRINAS ENZIMÁTICAMENTE RESISTENTES
SOBRE EL ESTADO DE SACIEDAD"**

ATENTAMENTE
IN HOC SIGNO VINCES

M.C. DANIEL ARCANGEL LOPEZ SAURI
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS
DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

Cp. Archivo
DALs/fja



S. E. P.
INSTITUTO TECNOLÓGICO
DE MÉRIDA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN



DEDICATORIAS

A Gaby, mi madre:

Porque nunca podré agradecerte toda esa vida de lucha, esfuerzos y sacrificios, que ha sido la herencia más valiosa que pudiste darme: Mi fuerza de vida.

A ustedes, Mami Chucha, Christian, Daniel, Cristina y Alan:

Porque gracias a su apoyo, confianza y amor he llegado a ser la persona que soy.

A ti, Rosy:

Porque contigo a mi lado nada es imposible. Por inspirarme todos los días a ser una mejor persona.

¡Muchas gracias! ¡Los amo!

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Enrique Sauri Duch:

Por enseñarme que el amor hacia la profesión es infinito y sin límites. Por dejar en mí un legado de paciencia, respeto, profesionalismo, conocimientos y habilidades.

Al Dr. David Betancur Ancona:

Por todo el apoyo académico y personal. Por depositar nuevamente su confianza en mí, por abrirme tantas puertas y por brindarme incontables experiencias.

A todas aquellas personas que han creído en mí y me han brindado su apoyo.

RESUMEN

El exceso de peso y sus enfermedades asociadas representan serios problemas de salud pública en México. La regulación endógena del consumo de alimentos juega un rol crucial en la aparición de la enfermedad, ya que la ingesta se puede suprimir a través de péptidos intestinales anorexigénicos; como el péptido YY y el péptido similar a glucagón 1 (GLP-1). Las pirodextrinas y Maltodextrinas Enzimáticamente Resistentes (MER) son producto de la modificación del almidón nativo y, debido a que poseen enlaces atípicos indigeribles, pudieran utilizarse como promotores de la secreción de péptidos anorexigénicos. Con base a lo anterior el objetivo del presente trabajo fue evaluar el estado de saciedad post-ingesta de pirodextrinas y MER sintetizadas por piroconversión e hidrólisis enzimática complementaria a partir de almidones no convencionales y caracterizarlas fisicoquímicamente. La metodología consistió en obtener pirodextrinas y MER a partir de rizomas de makal (*Xanthosoma yucatenense*) y semillas de ramón (*Brosimum alicastrum*), para posteriormente caracterizarlas con base a sus particularidades fisicoquímicas: contenido de material indigerible, cambio de color, equivalentes de dextrosa, propiedades de hidratación (absorción de agua, poder de hinchamiento y solubilidad) y propiedades térmicas (temperatura y entalpía de gelatinización). Finalmente se evaluó el efecto agudo del consumo de las mejores pirodextrinas y MER sobre el estado de saciedad en una muestra de adultos sanos, mediante la determinación de la sensación de saciedad y la medición sérica de péptido YY y GLP-1. Los resultados demostraron que los procesos de piroconversión e hidrólisis enzimática complementaria solo fueron efectivos en las muestras de makal. La evaluación del estado de saciedad demostró que la MER inhibió el apetito y generó una mayor secreción de péptido YY, mientras que la pirodextrina produjo mayores respuestas de saciedad e incrementó la liberación de GLP-1.

ABSTRACT

Overweight and its comorbidities represent serious public health problems in Mexico. The endogenous regulation of food intake plays a crucial role in the emergence of the overweight because the intake can be suppressed through anorexic intestinal peptides; such as peptide YY and glucagon-like peptide 1 (GLP-1). Pyrodextrins and Enzymatically Resistant Maltodextrins (ERM) are products of native starch modification. Because they have indigestible atypical bonds, could be used as promoters of anorexigenic peptides secretion. The aim of this study was evaluate the satiety post-intake level of pyrodextrins and ERM synthesized by pyroconversion and complementary enzymatic hydrolysis from unconventional starches and characterize them physicochemically. The methodology consisted in obtaining pyrodextrins and ERM from makal rhizomes (*Xanthosoma yucatenense*) and ramon seeds (*Brosimum alicastrum*). Samples were characterized based on their physicochemical characteristics: indigestible material content, color change, dextrose equivalents, hydration properties (water absorption, swelling power and solubility) and thermal properties (temperature and enthalpy of gelatinization). Finally the acute consumption effect of the best pyrodextrins and ERM on the healthy adult's satiety level was evaluated by determining the satiety sensation and the serum measurements of peptide YY and GLP-1. Results showed that pyroconversion and complementary enzymatic hydrolysis were only effective in the makal samples. Satiety level evaluation showed that ERM inhibited the appetite and generated a greater secretion of peptide YY, while the pyrodextrin produced higher satiety responses and increased the GLP-1 release.

ÍNDICE DE CONTENIDO

I. CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	1
II. CAPÍTULO 2: MARCO TEÓRICO	3
1. EL ALMIDÓN.....	3
1.1. Estructura y composición.....	3
1.2. Propiedades funcionales del almidón y su uso en la industria de alimentos.....	6
1.3. Fuentes no convencionales de almidón.....	8
1.3.1. El ramón (<i>Brosimum alicastrum</i> Swartz).....	8
1.3.2. El makal (<i>Xanthosoma yucatenense</i>).....	10
2. EL ALMIDÓN COMO FUENTE DE MATERIAL INDIGERIBLE.....	11
2.1. Almidón Resistente.....	11
2.2. Pirodextrinas y Maltodextrinas Enzimáticamente Resistentes.....	14
3. FISIOLÓGÍA DE LA SACIEDAD.....	20
3.1. Sistema neuroendócrino regulador de la ingesta de alimentos.....	20
3.2. Efecto del Péptido YY sobre el estado de saciedad.....	23
3.3. Efecto del Péptido Similar al Glucagón Tipo 1 sobre el estado de saciedad.....	24
3.4. Participación de otras hormonas en el mecanismo neuroendócrino de la saciedad.....	25
III. CAPÍTULO 3: JUSTIFICACIÓN	27
IV. CAPÍTULO 4: OBJETIVOS	29
1. GENERAL.....	29
2. ESPECÍFICOS.....	29
V. CAPÍTULO 5: MATERIALES Y MÉTODOS	30
1. ETAPA 1: OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE PIRODEXTRINAS Y MALTODEXTRINAS ENZIMÁTICAMENTE RESISTENTES (MER).....	31
1.1. Fase 1: Obtención de almidones nativos.....	31
1.2. Fase 2: Piroconversión.....	32
1.2.1. Determinación del contenido de almidón resistente (AR).....	33
1.2.1.1. Hidrólisis y solubilización del almidón no resistente.....	33
1.2.1.2. Cuantificación del almidón resistente.....	34
1.2.2. Determinación de cambio de color (ΔE).....	35
1.2.3. Microscopía.....	35
1.3. Fase 3: Hidrólisis enzimática complementaria.....	35
1.3.1. Secado por aspersion.....	36
1.3.2. Determinación de equivalentes de dextrosa (ED).....	36
2. ETAPA 2: EVALUACIÓN FUNCIONAL Y BIOLÓGICA DE LOS MEJORES TRATAMIENTOS.....	37
2.1. Fase 1: Propiedades funcionales de los mejores tratamientos.....	37
2.1.1. Determinación de la Temperatura (T_{GEL}) y Entalpía (ΔH) de gelatinización.....	37
2.1.2. Determinación de las propiedades de hidratación.....	38
2.2. Fase 2: Evaluación del estado de saciedad.....	38
2.2.1. Descripción y selección de la población de estudio.....	38
2.2.2. Metodología general empleada.....	40
2.2.2.1. Análisis sensorial de la saciedad.....	41
2.2.2.2. Análisis bioquímico de la saciedad.....	42
3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS.....	43

VI. CAPÍTULO 6: RESULTADOS Y DISCUSIONES	44
1. PIROCONVERSIÓN	44
1.1. Modelamiento de primer orden	44
1.2. Modelamiento de segundo orden en pirodextrinas de makal	47
1.3. Determinación de cambio de color (ΔE)	52
1.4. Microscopía	54
2. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA COMPLEMENTARIA	55
2.1. Secado por aspersión	56
2.2. Equivalentes de dextrosa (ED)	56
3. CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO	58
4. EVALUACIÓN DE PROPIEDADES DE HIDRATACIÓN	61
5. EVALUACIÓN DEL ESTADO DE SACIEDAD	66
5.1. Sujetos de estudio, tratamientos y alimentos utilizados	66
5.2. Análisis sensorial de la saciedad	68
5.3. Análisis bioquímico de la saciedad	74
VII. CAPÍTULO 7: CONCLUSIONES	79
VIII. CAPÍTULO 8: ANEXOS	80
1. ANEXO 1: CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO	80
2. ANEXO 2: HISTORIA CLÍNICA NUTRIOLÓGICA	82
3. ANEXO 3: ESCALA VISUAL ANÁLOGA	84
IX. CAPÍTULO 9: REFERENCIAS	85

ÍNDICE DE TABLAS

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

Tabla 1.1. Tipos de almidón y sus características.....	12
Tabla 1.2. Tipos de almidón resistente y sus características.....	13
Tabla 1.3. Algunos estudios que respaldan la funcionalidad biológica de las Maltodextrinas Enzimáticamente Resistentes.....	18
Tabla 1.4. Principales mecanismos reguladores de la ingestión de alimentos.....	21

CAPÍTULO 5: MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 5.1. Condiciones experimentales para la piroconversión.....	32
Tabla 5.2. Condiciones experimentales para la hidrólisis enzimática complementaria.....	36

CAPÍTULO 6: RESULTADOS Y DISCUSIONES

Tabla 6.1. Contenidos (%) de almidón resistente en modelo de primer orden.....	44
Tabla 6.2. Análisis de varianza en modelo de primer orden para almidón resistente de makal y ramón.....	46
Tabla 6.3. Contenido (%) de almidón resistente en pirodextrinas de makal en modelo de segundo orden.....	48
Tabla 6.4. Análisis de varianza en modelo de segundo orden para almidón resistente de makal.....	49
Tabla 6.5. Comparación del contenido de AR en distintos almidones pirodextrinizados.....	51
Tabla 6.6. Cambios de color en pirodextrinas de makal y ramón.....	54
Tabla 6.7. Condiciones del secado por aspersión.....	56
Tabla 6.8. Equivalentes de dextrosa en maltodextrinas enzimáticamente resistentes de makal.....	57
Tabla 6.9. Temperaturas (T°_{GEL}) y entalpías (ΔH) de gelatinización en almidones nativos y pirodextrinas estudiadas.....	59
Tabla 6.10. Características de la población de estudio.....	66
Tabla 6.11. Secuenciación de los tratamientos.....	67
Tabla 6.12. Características de los platillos consumidos.....	67

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

Figura 1.1. Organización estructural de los gránulos de almidón.....	5
Figura 1.2. Árbol, corteza, hojas y fruto de ramón (<i>Brosimum alicastrum</i> Swartz).....	9
Figura 1.3. Planta, rizomas y flor de makal (<i>Xanthosoma yucatenense</i>).....	11
Figura 1.4. Principales reacciones químicas durante la pirodextrinización.....	14
Figura 1.5. Metodología para la obtención de Maltodextrinas Enzimáticamente Resistentes.....	16
Figura 1.6. Regulación neuroendócrina del apetito y la saciedad.....	23

CAPÍTULO 5: MATERIALES Y MÉTODOS

Figura 5.1. Esquema metodológico del proyecto.....	30
Figura 5.2. Metodología estandarizada del ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas....	42

CAPÍTULO 6: RESULTADOS Y DISCUSIONES

Figura 6.1. Gráfico de Pareto estandarizado en modelo de primer orden para almidón resistente de makal.....	46
Figura 6.2. Gráfico de Pareto estandarizado en modelo de primer orden para almidón resistente de ramón.....	47
Figura 6.3. Gráfico de Pareto estandarizado en modelo de segundo orden para almidón resistente de makal.....	49
Figura 6.4. Muestras de makal. A: Almidón nativo, B: Pirodextrina del tratamiento 5.....	55
Figura 6.5. Muestras de ramón. A: Almidón nativo, B: Pirodextrina del tratamiento 2.....	55
Figura 6.6. Capacidad de Absorción de Agua de los mejores tratamientos del makal.....	62
Figura 6.7. Poder de Hinchamiento de los mejores tratamientos del makal.....	63
Figura 6.8. Índice de Solubilidad de los mejores tratamientos del makal.....	64
Figura 6.9. Hambre pospandrial generada por los tratamientos estudiados.....	69
Figura 6.10. Consumo prospectivo pospandrial generado por los tratamientos estudiados...	71
Figura 6.11. Saciedad pospandrial generada por los tratamientos estudiados.....	72
Figura 6.12. Plenitud pospandrial generada por los tratamientos estudiados.....	73
Figura 6.13. Concentraciones séricas de PYY ₃₋₃₆ a los 120 minutos del consumo de los tratamientos.....	76
Figura 6.14. Concentraciones séricas de GLP-1 ₇₋₃₆ a los 60 minutos del consumo de los tratamientos.....	76

I. CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

En nuestro país (Gutiérrez et. al., 2012), y específicamente en Yucatán (Gutiérrez et. al., 2013), los datos de la más reciente Encuesta Nacional de Salud y Nutrición reportan cifras crecientes de exceso de peso en la población infantil y adulta. El panorama en Mérida es mucho peor, ya que la prevalencia de exceso de peso en todos los grupos de edad rebasa la media nacional y estatal (Barbosa et. al., 2016). Esta situación se convierte alarmante al tener en cuenta las comorbilidades que conllevan en sí la obesidad y el sobrepeso, como la resistencia a la insulina, diabetes, hipertensión, etc. (Moreno et. al., 2004).

Al ser la elevada ingestión de calorías en la dieta, junto con un estilo de vida sedentario, el principal factor causal del exceso de peso no asociado a patologías (presente en el 95% de los casos) (Moreno et. al., 2004), se hace de suma importancia plantear estrategias de prevención y atención desde esta perspectiva. Es preciso mencionar que el control del consumo de alimentos depende primariamente de factores endógenos y su regulación resulta crucial en la aparición de la enfermedad; ya que a través de mecanismos neuroendócrinos el cuerpo posee la capacidad de suprimir o favorecer la ingesta de alimentos (Raff y Levitzky, 2013).

Pese a que la acción de los diversos mediadores neuroendócrinos es a nivel central (SNC), la estimulación para la liberación de la gran mayoría de ellos se da a nivel gastrointestinal. Por ejemplo, la distensión del tracto digestivo, particularmente del estómago e intestino delgado, a consecuencia del bolo alimenticio, contribuye a finalizar la ingesta de alimentos debido a la secreción entérica de mediadores anorexigénicos como péptido YY (Álvarez, 2002) y GLP-1 (Romero, 2007).

Por otro lado, las pirodextrinas y Maltodextrinas Enzimáticamente Resistentes (MER) son elementos derivados del almidón nativo, los cuales se obtienen por piroconversión (Laurentin et. al., 2005) e hidrólisis enzimática complementaria (Toraya et. al., 2016), respectivamente. Ambos componentes poseen enlaces atípicos indigeribles y características fisicoquímicas particulares que los hacen homólogos a la fibra dietética soluble (FDS); como alta solubilidad y baja viscosidad (Laurentin et. al., 2005). Pese a que existen diversos estudios que demuestran un variado potencial biológico muy similar a dicho tipo de fibra (Kishimoto *et al.*, 2007)

(Kendall et. al., 2008) (Chu *et al.*, 2014), a la fecha existe poca evidencia acerca del efecto que pudieran tener sobre el estado de saciedad.

Con base a todo lo anterior se planteó el presente trabajo de investigación, en el cual se tuvieron a consideración las características fisicoquímicas similares de las pirodextrinas y MER con la FDS. Se hipotetizó que la alta afinidad de las pirodextrinas y MER con el agua pudiera generar un incremento del bolo alimenticio a nivel intestinal, lo que a su vez estimularía al intestino delgado a emitir señalizaciones neuroendócrinas anorexigénicas: liberación de péptidos intestinales y, consecuentemente, sensación de saciedad.

Para el desarrollo del proyecto se emplearon rizomas de makal (*Xanthosoma yucatenense*) y semillas de ramón (*Brosimum alicastrum*), como fuentes de almidones nativos no convencionales para obtener pirodextrinas y MER. Posteriormente las muestras se caracterizaron con base a sus particularidades fisicoquímicas y finalmente se evaluó el efecto del consumo de los mejores tratamientos sobre el estado de saciedad en una muestra de adultos sanos.

Los resultados dejaron en evidencia el potencial de las pirodextrinas y MER como nutraceuticos moduladores de la ingesta de alimentos, por lo que pudieran ser utilizados como promotores de saciedad e inhibidores del apetito. Se recomienda continuar el estudio de las pirodextrinas y MER para dilucidar sus mecanismos fisiológicos específicos, tanto en experimentaciones agudas como crónicas.

II. CAPÍTULO 2: MARCO TEÓRICO

1. EL ALMIDÓN

1.1. Estructura y composición

El almidón forma parte de los carbohidratos que, junto con los lípidos, las proteínas y los ácidos nucleicos, constituyen las cuatro clases principales de biomoléculas (Medina y Camilo, 2008). Homólogo a lo que el glucógeno es para los animales, este carbohidrato es la principal fuente de energía vegetal y se encuentra en las semillas de cereales (maíz, trigo, arroz, sorgo), en tubérculos (papa), en raíces (yuca, batata, arrurruz), en semillas de leguminosas (frijoles, lentejas, guisantes), frutas (bananas, manzanas y tomates verdes), troncos (palma sago) y hojas (tabaco) (Aristizábal et. al., 2007). Las diferentes características del almidón, no sólo la morfología y el tamaño del gránulo, sino también la calidad y la composición que posee, están muy relacionadas con la procedencia de la fuente vegetal y también con el grado de maduración (Peñaranda et. al., 2008).

El almidón está organizado en partículas discretas conocidas como gránulos, cuya morfología, composición química y estructura supermolecular (arreglo relativo de las macromoléculas en el estado sólido), son características de cada especie. La variación del tamaño de los gránulos de almidón varía desde 1 a 100 μm . Los más grandes están presentes en la papa (15 a 100 μm) y los más pequeños en las especies de amaranto (0.8 a 2.5 μm) (Prieto et. al., 2009).

El gránulo de almidón se conforma de dos polímeros de unidades repetitivas de D-glucosa: Amilosa, cadena esencialmente lineal, y amilopectina, que presenta una estructura ramificada. Las diferencias en la proporción entre estas dos moléculas y la forma en que están organizadas dentro de los gránulos, dan lugar a considerables variabilidades entre y dentro de las especies de los gránulos, en el tamaño, forma y propiedades. La estructura granular en la mayoría de los almidones se conforma por 20 – 30% de amilosa, 70 - 80% de amilopectina con un 10 – 12 % de humedad (Wang y Copeland, 2013).

La amilosa es un polímero lineal, que adquiere en el espacio una forma de espiral que consta de moléculas de glucosa unidas por enlaces glucosídicos $\alpha(1-4)$, con un peso molecular promedio

de 10^5 a 10^6 g/ gmol (Peñaranda et. al., 2008). El número de unidades varía entre los diferentes tipos de almidones, encontrándose generalmente entre 1000 unidades de glucosa por molécula de amilosa. En un extremo de la macromolécula la unidad de glucosa contiene el hidroxilo del carbono anomérico libre, por lo cual se llama extremo reductor. En el extremo opuesto, o no reductor, el hidroxilo del carbono anomérico forma parte del enlace glucosídico. La abundancia de hidroxilos otorga propiedades hidrofílicas al polímero, impartándole afinidad por el agua. Sin embargo, debido a su linealidad, los polímeros de la amilosa tienden a agruparse muy estrechamente en forma paralela mediante la formación de puentes de hidrógeno entre los hidroxilos de los polímeros adyacentes, reduciendo así su afinidad por el agua. Este fenómeno de asociación intermolecular entre las moléculas de amilosa es comúnmente llamado retrogradación. La amilosa forma muchos complejos insolubles con un gran número de moléculas orgánicas como alcoholes alifáticos, ácidos monoglicéridos o ácidos grasos lineales. El complejo generalmente precipita cristalizándose lo que permite hacer la separación con la amilopectina (Aristizábal et. al., 2007) (Figura 1.1).

La otra fracción componente del almidón es la amilopectina, la cual es una molécula más grande que la amilosa ya que además de las cadenas lineales $\alpha(1-4)$ posee ramificaciones $\alpha(1-6)$. Está constituida de alrededor de 100 000 moléculas de glucosa, alcanzando un peso molecular comprendido de 10^7 a 10^8 g/mol (Peñaranda et. al., 2008). El gran tamaño y naturaleza ramificada de la amilopectina reduce la movilidad de los polímeros e interfiere su tendencia a orientarse muy estrechamente para permitir niveles significantes de enlaces de hidrógeno. En sus estructuras lineales puede formar también complejos pero, como sus segmentos lineales son cortos, las hélices formadas solo pueden introducir moléculas pequeñas (Aristizábal et. al., 2007) (Figura 1.1).

Los gránulos de almidón usualmente se caracterizan en varias escalas de tamaño (Figura 1.1). En primera instancia se encuentran los gránulos intactos, cuyo tamaño oscila entre 1 – 100 μm , según la fuente botánica. De manera más específica puede identificarse anillos de crecimiento que conforman las regiones alternadas de estructuras cristalinas y amorfas (100 – 500 nm), las cuales pueden apreciarse como estriaciones bajo la luz del microscopio (Wang y Copeland, 2013).

Mediante la aplicación del método de difracción de rayos X, también pueden caracterizarse los anillos de crecimiento a través de la identificación de lamelas cristalinas y amorfas alternadas (Wang y Copeland, 2013).

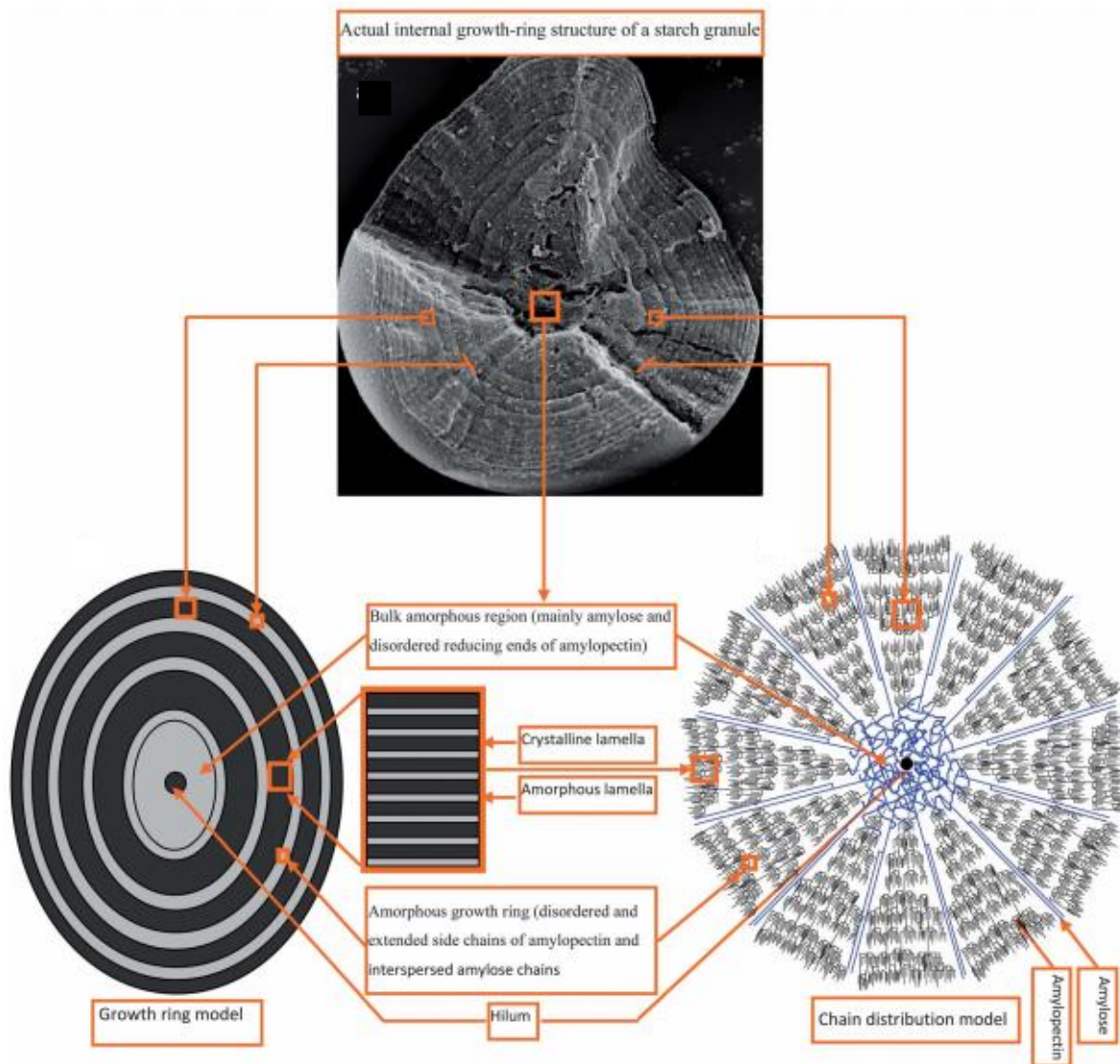


Figura 1.1. Organización estructural de los gránulos de almidón (Wang y Copeland, 2013).

1.2. Propiedades funcionales del almidón y su uso en la industria de alimentos

El almidón es el polisacárido más utilizado como ingrediente funcional en la industria alimentaria (Hernández et. al., 2008) y cuando no ha sufrido algún proceso de modificación química durante su obtención se denomina almidón nativo (Granica et. al., 2010). Los almidones nativos de las diferentes especies de vegetales tienen como característica fundamental que sus propiedades fisicoquímicas y funcionales estarán influenciadas por sus estructuras granular y molecular. Las propiedades más importantes a considerar para determinar la utilización del almidón en la elaboración de alimentos y otras aplicaciones industriales incluyen las fisicoquímicas (gelatinización y retrogradación) y las funcionales (hinchamiento, absorción de agua y solubilidad) (Hernández et. al., 2008).

La gelatinización es un fenómeno que involucra la disociación de las dobles hélices de la estructura de la amilopectina en presencia de agua (arriba del 70 % con base al peso seco de almidón) por efecto de la aplicación de calor (Agama et. al., 2013). Durante este fenómeno se produce la lixiviación de la amilosa y la gelatinización total se produce normalmente dentro de un intervalo más o menos amplio de temperatura, siendo los gránulos más grandes los que primero gelatinizan (Prieto et. al., 2009).

Durante este fenómeno existe una ruptura del orden molecular interno del gránulo de almidón y ocasiona cambios irreversibles en sus propiedades, tales como el incremento del tamaño del gránulo, fusión de la estructura cristalina e incremento de la viscosidad. Los gránulos de almidón son insolubles en agua fría, sin embargo, posterior a la aplicación de temperatura y pérdida de estructura (gelatinización) adquieren la capacidad de absorber agua de manera irreversible (Santos et. al., 2009).

En este mismo sentido, la calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) es una técnica utilizada para medir las propiedades térmicas de algunos materiales y es capaz de establecer la conexión entre temperatura y propiedades específicas de los objetos de estudio. Este método resulta ser el más utilizado para estudiar la gelatinización de los gránulos de almidón, ya que brinda información sobre los rangos de temperatura y sobre la energía (entalpía) involucrada (Gill et. al., 2010).

La retrogradación del almidón es un proceso que ocurre cuando las moléculas en los gránulos de almidón gelatinizados comienzan a reasociarse en una estructura ordenada (Rodríguez et. al., 2007). Este ordenamiento se debe a que las moléculas de almidón, tras la gelatinización y posterior almacenamiento, se asocian a manera de cristales formados por las dobles hélices del almidón. Debido a su linealidad las moléculas de amilosa forman dobles hélices (retrogradan) inmediatamente después de la gelatinización. Por su parte, la retrogradación de la amilopectina es más lenta y puede llevar días o semanas debido a su estructura ramificada (Srichuwong y Jane, 2007). En tanto a sus propiedades, el comportamiento reológico de la pasta resultante cambia, siendo evidente el incremento en su firmeza y rigidez. Además, la pérdida de la capacidad de retención de agua y la restauración de la cristalinidad también se presentan durante este “envejecimiento” de la estructura gelatinizada (Rodríguez et. al., 2007).

Como ya se mencionó, los almidones nativos son insolubles en agua por debajo de su temperatura de gelatinización. No obstante, por debajo de este punto, los gránulos pueden absorber agua de manera reversible generando así el hinchamiento. Cuando son calentados progresivamente y se rebasa su temperatura de gelatinización, los gránulos se hinchan irreversiblemente (Prieto et. al., 2009) hasta el punto donde la estructura se fractura y los grupos hidroxilos internos del gránulo se exponen uniéndose a las moléculas de agua. Como resultado directo se genera un incremento gradual de la solubilidad del almidón (Aristizábal et. al., 2007).

Debido a las propiedades antes mencionadas, los almidones nativos tienen una amplia variedad de aplicaciones en los alimentos ya que actúan como adhesivos, ligantes, enturbiantes, formadores de películas, estabilizantes de espumas, agentes antienviejimiento de pan, gelificantes, glaseantes, humectantes, estabilizantes, texturizantes y espesantes. También pueden usarse para aglutinar, desintegrar, expandir o apelmazar, clarificar u opacar, atrapar humedad o repelerla, modificar textura y estabilizar emulsiones. Por la cantidad de usos se considera un ingrediente multifuncional en la industria de alimentos (Granica et. al., 2010), especialmente en la manufactura de las harinas y en la producción de pan (Prieto et. al., 2009).

En ocasiones la estructura nativa del almidón resulta poco eficiente, ya que ciertas condiciones de los procesos tecnológicos, como temperatura, pH y presión, reducen su uso en aplicaciones

industriales al provocar una baja resistencia a esfuerzos de corte, descomposición térmica, alto nivel de retrogradación y sinéresis. Además, algunas dispersiones de almidón nativo, como aquellas obtenidas a partir de raíces y tubérculos, imparten una textura gomosa y cohesiva en aquellos alimentos donde se utilizan como agentes espesantes (Pacheco y Techeira, 2009).

Estas limitaciones se pueden superar modificando la estructura nativa del almidón por métodos químicos, físicos y enzimáticos, los cuales permiten obtener diferentes almidones modificados de acuerdo a las condiciones específicas para cada alimento (Pacheco y Techeira, 2009).

1.3. Fuentes no convencionales de almidón

Las fuentes más importantes para la extracción del almidón son los granos de cereales (maíz, trigo, arroz y sorgo) y tubérculos (papa, yuca, boniato y sagú) (Hernández et. al., 2008). No obstante, se sabe que la producción de almidón no es suficiente para satisfacer la demanda que existe por las diferentes industrias y por ello la tendencia actual es buscar fuentes no convencionales como alternativas (Bello et. al., 1999). Lo deseable es que estos nuevos almidones presenten características fisicoquímicas, estructurales y funcionales específicas, que amplíen la gama de usos en la industria alimenticia (Hernández et. al., 2008).

En este sentido, tanto el fruto del árbol de ramón (*Brosimum alicastrum* Swartz) como el rizoma del makal (*Xanthosoma yucatenense*) pueden ser considerados como fuentes vegetales no convencionales de almidón, con un gran potencial de uso, debido a que presentan propiedades, estructura y composición similares a los almidones comunes.

1.3.1. El ramón (*Brosimum alicastrum* Swartz)

Brosimum alicastrum Swartz, conocido como “ramón” en los estados de Oaxaca, Campeche y Yucatán es un árbol tropical que está adaptado a crecer y regenerarse en situaciones de bosque cerrado y sus plántulas presentan tolerancia a niveles medios de sombra. Se adapta a suelos muy arcillosos, profundos e inundables durante la época de lluvia, así como suelos someros y altamente pedregosos (Pérez et. al., 2012).

Es un árbol perenne de porte mediano a grande de 12 hasta 20 m de altura y con un diámetro a la altura del pecho de hasta 1 m. Sus hojas son ovadolanceoladas de color verde oscuro y brillante en el haz y verde grisáceas en el envés, con dimensiones aproximadas de 2-7.5 cm de ancho por 4-18cm de longitud. Sus frutos son bayas de 2 a 2.5 cm de diámetro, globosas con pericarpio carnoso que presentan coloración verde cuando están inmaduros y verde-amarillentos a anaranjado-rojizo al madurar, con sabor y olor dulces (Figura 1.2). En el estado de Yucatán tiene una distribución natural en la parte central, sur y oriente, ya que forma parte de la composición de la selva baja y mediana subcaducifolia (Morales y Herrera, 2009).

Es muy apreciado por ser un árbol forrajero cuyas hojas son altamente digestibles (> 60%) y que contienen hasta el 13% de proteína. Otro uso importante en la región es como árbol de sombra y ornato (Morales y Herrera, 2009) y su madera se emplea en el medio rural para leña, postes para cercas, estacas, mangos de herramientas y construcción de viviendas (Ascencio et. al., 2015).



Figura 1.2. Árbol, corteza, hojas y fruto de ramón (*Brosimum alicastrum* Swartz)

(Morales y Herrera, 2009).

Su fruto, según un estudio realizado por Pérez y colaboradores (2014), es rico en almidón y con características muy similares al de maíz. Tras realizar el proceso de extracción de este polisacárido, estos autores afirman que ambos almidones poseen cantidades prácticamente iguales de carbohidratos (90.16% y 90.07%, respectivamente), fibra cruda (1.27% y 1.24%, respectivamente) y de lípidos (0.47% y 0.49%, respectivamente). Igualmente encontraron similitudes en los contenidos de amilosa (25.36% y 27.33%, respectivamente) y de amilopectina

(74.64% y 72.67%, respectivamente). De esta manera los resultados del estudio demuestran que el fruto del ramón puede ser aprovechado como un sustituto no convencional de almidón.

1.3.2. El makal (*Xanthosoma yucatenense*)

El makal (*Xanthosoma yucatenense*) es una monocotiledónea conocida en las comunidades rurales mayas como *kukut makal*. Es una planta endémica de México y se encuentra distribuida únicamente en la península de Yucatán (CICY, 2015). Este género de tubérculo pertenece a la familia Araceae y también es conocido como malanga (Terán et. al., 2017).

La planta presenta un tallo acaule con hojas grandes y acorazonadas de 12 a 25 cm. de ancho. Las flores machos están separadas de las hembras por órganos neutros y tienen anteras entrelazadas que se abren en la cúspide. La raíz es un rizoma tuberoso rodeado de tubérculos de menor tamaño, los cuales constituyen la parte comestible (Contreras et. al., 2013) y se consumen en cualquier grado de crecimiento siempre y cuando ya puedan pelarse (Sánchez et. al., 2008). La raíz y las hojas son también utilizadas como forrajeras, especialmente en alimentación de ganado bovino y porcino (CICY, 2015) (Figura 1.3).

Nutritionalmente el tubérculo del makal es rico en carbohidratos (30.9%, b.h.) y posee cantidades limitadas de proteína (1.7%, b.h.), cenizas (1.2%, b.h.), fibra (0.6%, b.h.) y grasa (0.6%, b.h.) (Sánchez et. al., 2008).

En un estudio realizado por Hernández y colaboradores (2008) se demostró que en este rizoma el almidón es abundante y con características similares a los almidones de maíz, papa, yuca, sagú y camote. Particularmente en relación con el almidón de maíz, ambos poseen cantidades análogas de humedad (8.99% y 9.99%, respectivamente), proteínas (0.16% y 0.10%, respectivamente) y carbohidratos (99.28% y 98.93%, respectivamente).

Estructuralmente, estos autores observaron que las cantidades de amilosa (23.6% y 22.7%, respectivamente) y amilopectina (76.4% y 77.3%, respectivamente) fueron similares entre el almidón de makal y de sagú. Morfológicamente encontraron semejanzas entre los almidones de makal, camote y papa. De esta manera, el tubérculo del makal también parece ser una excelente matriz vegetal no convencional para la obtención de almidón y sus derivados.



Figura 1.3. Planta, rizomas y flor de makal (*Xanthosoma yucatenense*)
(CICY, 2015) (Terán et. al., 2017).

2. EL ALMIDÓN COMO FUENTE DE MATERIAL INDIGERIBLE

2.1. Almidón Resistente

Teniendo en cuenta su digestibilidad, existen diversos tipos de almidón cuyas propiedades se relacionan estrechamente con el ámbito fisiológico. En este sentido, Englyst y Hudson (1996) han identificado al almidón digerible (AD) y al almidón resistente (AR) como las dos principales tipologías de este polímero.

El AD, definido como aquel que es susceptible a la hidrólisis y absorción por el intestino delgado humano, puede subclasificarse a su vez en almidón rápidamente digerible (ARD) y en almidón lentamente digerible (ALD). La principal diferencia entre ellos depende del tiempo que requieren para hidrolizarse hasta moléculas de glucosa: el rápidamente digerible demanda 20 minutos mientras que el lento de 20 a 120 minutos (Englyst y Hudson, 1996) (Parada y Rozowski, 2008) (Tabla 1.1).

Por su parte, el AR es aquel que no puede ser hidrolizado *in vivo* por las enzimas digestivas humanas (Shi y Gao, 2011) ni tampoco *in vitro* mediante incubación con α -amilasa y pululanasa (Englyst et. al., 1982); a menos que éste sea adecuadamente disperso con hidróxido de potasio (KOH) o dimetilsufóxido (DMSO) (Berry, 1986).

Ya que no puede ser digerido por el intestino delgado pero sí es material fermentable por la microbiota (Shen et. al., 2011), el AR debe definirse específicamente como aquella fracción del almidón dietético que escapa a la hidrólisis del intestino delgado (Sajilata et. al., 2006). Según su origen, pueden identificarse cuatro tipos de AR (Tabla 1.2) (Nugent, 2005) y debido a sus propiedades antidiabéticas (Shen et. al., 2011), prebióticas (Fuentes et. al., 2011), hipolipidémicas (Yeon et. al., 2012), entre otras, puede ser considerado como un ingrediente funcional que aumenta la calidad de los alimentos.

De los cuatro tipos de AR, los tipos 1 y 2 forman naturalmente parte de ciertos vegetales. El de Tipo 1 se ubica protegido por la pared celular en algunos granos y tubérculos y el de Tipo 2 se encuentra en papas crudas y plátanos verdes. El resto de los almidones resistentes son generados a partir de procesos tecnológicos tanto involuntarios (Tipo 3) como inducidos (Tipo 4) (Nugent, 2005).

Tabla 1.1. Tipos de almidón y sus características.

Tipo de almidón		Ejemplos en alimentos	Hidrolizado y absorbido en el intestino delgado	Tiempo necesario de hidrólisis enzimática para formar glucosa	Respuesta glicémica
Almidón digerible	Rápidamente digerible	Alimentos amiláceos recientemente cocidos	Sí	20 minutos	Corta
	Lentamente digerible	Mayoría de los cereales crudos	Sí	20 – 120 minutos	Larga
Almidón resistente		Granos parcialmente molidos, pan refrigerado, papa y plátano crudos	No	+120 minutos usando KOH ó DMSO	Nula

(Berry, 1986) (Englyst y Hudson, 1996) (Parada y Rozowski, 2008)

Específicamente para el AR Tipo 4, diversas modificaciones químicas tales como repolimerización, entrecruzamiento y sustitución, dan lugar a su formación. Todos estos cambios que puede sufrir el almidón favorecen la indigestibilidad a través de mecanismos específicos. La repolimerización (usando éteres, ésteres o dextrinas con enlaces modificados) da lugar a enlaces que poseen resistencia a la α -amilasa (Fuentes et. al., 2011) y el entrecruzamiento es capaz de disminuir la digestibilidad tanto por una disminución en la susceptibilidad de la enzima (Yeon et. al., 2012) como por la formación de enlaces atípicos (Fuentes et. al., 2011). Por otro lado, las sustituciones químicas aumentan la resistencia enzimática probablemente porque los voluminosos grupos de derivación dificultan estéricamente la formación del complejo enzima – sustrato (Yeon et. al., 2012).

Tabla 1.2. Tipos de almidón resistente y sus características.

Tipo de AR	Descripción	Ejemplos en alimentos
AR 1	Inaccesible físicamente al estar protegido por la pared celular	Granos enteros o parcialmente molidos, tubérculos y pastas
AR 2	Gránulos no gelatinizados que poseen estructura cristalina tipo B	Papas crudas, plátanos verdes y almidones ricos en amilosa
AR 3	Almidón retrogradado	Papas cocidas y enfriadas, pan, cereales y productos alimenticios con tratamiento térmico húmedo prolongado y/o repetido
AR 4	Almidones modificados químicamente debido al entrecruzamiento con reactivos químicos	Alimentos incorporados con almidones químicamente modificados

(Nugent, 2005)

Otra técnica de modificación al almidón es la hidrólisis, la cual es una vía sencilla para producir carbohidratos con propiedades funcionales específicas y que tradicionalmente se ha realizado por catálisis con ácido mineral. Debido a los avances biotecnológicos existen enzimas que permiten una producción controlada y alto rendimiento de productos derivados de la hidrólisis ácida del almidón, como son las maltodextrinas (Antonio et. al., 2009).

2.2. Pirodextrinas y Maltodextrinas Enzimáticamente Resistentes

Existe un tipo de maltodextrinas que se obtienen por síntesis química y que se categorizan dentro del AR de tipo 4 (Rosch et. al., 2015) (Nunes et. al., 2016), ya que poseen la capacidad de resistencia a la hidrólisis por enzimas digestivas (Jochym et. al, 2012). Éstas, denominadas maltodextrinas enzimáticamente resistentes (MER), se sintetizan a partir de almidones nativos mediante la aplicación secuencial de dos procesos principales: piroconversión e hidrólisis enzimática complementaria (Okuma y Kishimoto, 2004) (Toraya et. al., 2016).

El proceso de piroconversión ó pirodextrinización es quizá una de los métodos más antiguos de producción de almidones modificados. Desde el siglo XIX fue utilizado para obtener compuestos adhesivos en estampillas y también para la elaboración de gomas y confites por la industria alimentaria (Laurentin et. al., 2005) (Figura 1.4).

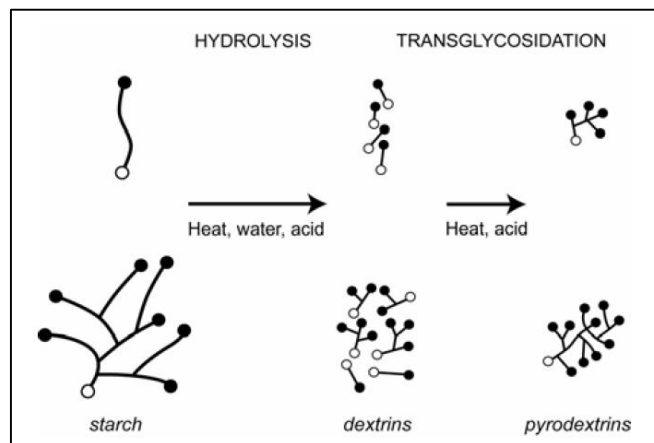


Figura 1.4. Principales reacciones químicas durante la pirodextrinización. Representación esquemática de las reacciones de hidrólisis y transglucosidación para amilosa (arriba) y amilopentina (abajo). Los círculos abiertos y cerrados representan los extremos reductores y no reductores del glucano, respectivamente (Laurentin et. al., 2005).

De manera general, el método consiste en la exposición de almidón nativo a altas temperaturas, durante tiempos prolongados y usando ácido como catalizador. Se realiza en condiciones de baja humedad (Campechano et. al., 2007) e involucra reacciones de hidrólisis, transglucosidación y repolimerización (Figura 1.4) que favorecen la formación de enlaces atípicos indigeribles como 1-2, 1-3 y β -anómeros 1-4 y 1-6 (Laurentin et. al., 2003).

El resultado final, las pirodextrinas, son productos de bajo peso molecular, altamente solubles en agua y que generan poca o ninguna viscosidad (Laurentin et. al., 2005). Además, se ha observado que el contenido de material indigerible obtenido por piroconversión es inversamente proporcional al contenido de enlaces glucosídicos α 1-4. Por ello, las pirodextrinas muestran características similares a la fibra dietética (Wang et. al., 2001).

Según diversos reportes en la literatura, la temperatura, el tiempo y el ácido son los principales factores experimentales a considerar durante la pirodextrinización. En este sentido, Wurzburg (2006) reporta que la temperatura y los tiempos de reacción son variables y dependen principalmente del producto que se desea obtener, del pH ácido al que se expone el almidón y del tipo de almidón nativo que se utiliza.

En tanto a la pérdida de la estructura glucídica, Jochym et. al. (2011) reportan que el proceso de piroconversión mediado solamente por ácidos no incrementa el grado de esterificación. El trabajo de estos autores reveló que el grado de sustitución, expresado como el porcentaje de grupos hidroxilo esterificados, fue solamente del 0.0073% en almidón pirodextrinizado de papa. Sin embargo en este mismo trabajo se reporta un alto grado de hidrólisis, ya que el largo de las cadenas en sus pirodextrinas fue entre 8.2 y 10.4, así como un grado de polimerización de entre 1 y 16,871.

Una vez concluido el proceso de hidrólisis y trasglucosidación del almidón nativo (piroconversión), la solución resultante rica en dextrinas es hidrolizada con amilasas para eliminar los remantes de enlaces digeribles. Este producto posteriormente se filtra, decolora, desioniza, concentra y seca por aspersión (Figura 1.5) (Sungsoo y Samuel, 2009).

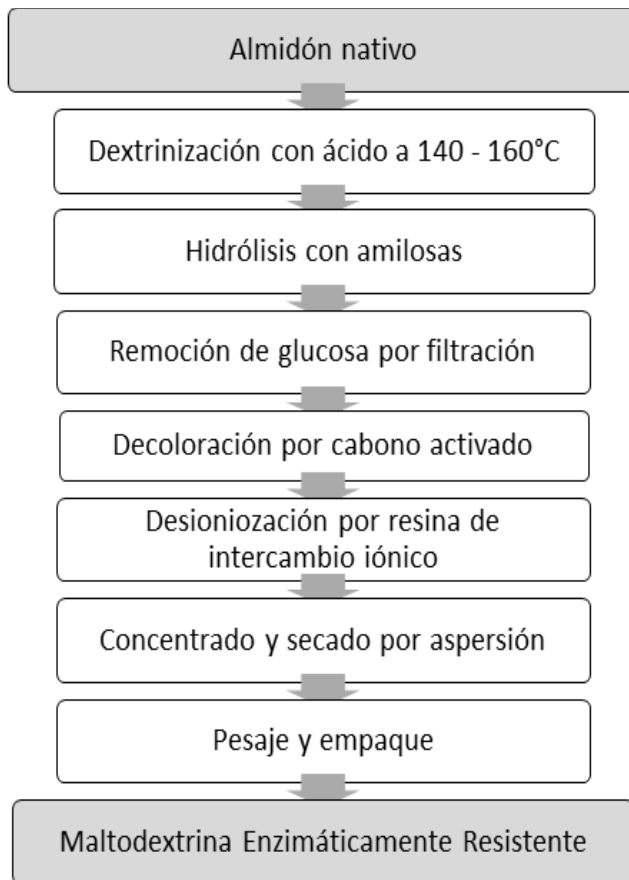


Figura 1.5. Metodología para la obtención de Maltodextrinas Enzimáticamente Resistentes (Sungsoo y Samuel, 2009).

De esta manera, el producto resultante, las Maltodextrinas Enzimáticamente Resistentes (MER), poseen la característica de ser resistentes a cualquier hidrólisis por calor, ácidos o enzimas; incluyendo las del tracto digestivo. Por ello la mayor parte de las MER llegan casi intactas al intestino grueso, donde son fácilmente fermentables por la microbiota (Miyazato et. al., 2010).

Las MER ostentan las propiedades fisiológicas asociadas la fibra dietética soluble y fueron producidas y registradas inicialmente como Fibersol®-2 por Matsutani Chemical Industry Co. en Hyogo, Japón (patente N°5, 620, 873 USP 1997) (Sungsoo y Samuel, 2009)

Poseen un peso molecular promedio de 2000 g/g mol. Sus cadenas se forman de una baja proporción de oligosacáridos con un grado de polimerización (unidades repetidas) de 1-9 y una alta cantidad de polisacáridos con un grado de polimerización de 10 o más. En su estructura no solamente se encuentran enlaces 1-4 y 1-6, como las maltodextrinas convencionales, sino que también se observan enlaces 1-2 y 1-3 formados durante el proceso de dextrinización (Sungsoo y Samuel, 2009).

Existen diversos reportes científicos acerca del efecto fisiológico que poseen las pirodextrinas y maltodextrinas enzimáticamente resistentes; asociándose en gran medida con los efectos ya

conocidos de la fibra, particularmente de la fibra dietética soluble. Estos trabajos están enfocados principalmente a los efectos metabólicos, laxantes y anticancerígenos y cabe mencionar que existe poca evidencia científica que respalde el efecto que puedan tener sobre el estado de saciedad (Tabla 1.3).

Diversos estudios han corroborado la efectividad de la piroconversión para generar material indigerible, el cual que pudiera ser usado como sustituto de fibra dietética en situaciones especiales. En este sentido, se ha comprobado la formación de enlaces atípicos en almidones pirodextrinizados de diversas matrices vegetales; como rizomas (Laurentin et. al., 2003), leguminosas (Campechano et. al., 2007) y cereales (Subpuch et. al., 2014).

En el estudio con pirodextrinas de maíz de Kendall et. al., (2008) se afirma que, además del beneficio de indigestibilidad, estos componentes son capaces de generar respuestas glicémicas e insulínicas posprandiales bajas. Lo anterior pudiera ser coadyuvante para el control de la glicemia en pacientes con diabetes o resistencia a la insulina. Las pirodextrinas también parecen poseer efectos sobre la modulación de la secreción de péptidos gastrointestinales, ya que Nazare et. al., (2011) encontraron que la ingestión de 50 gr de dextrinas genera una disminución en las concentraciones sanguíneas de grelina.

Respecto a las maltodextrinas enzimáticamente resistentes (MER), un trabajo realizado por Kishimoto et. al. (2007) evidenció que la ingesta de MER junto con dietas altas en grasa suprimió la elevación posprandial de triglicéridos en ratas y de triglicéridos, lipoproteínas remanentes e insulina en humanos. Similar a esta línea de investigación, Hira et. al. (2015) demostraron que el consumo crónico de MER en ratas sanas incrementó la secreción y producción de GLP-1, la cual es una incretina que regula positivamente los niveles séricos de glucosa.

En tanto a la reducción de peso corporal, Chu et. al. (2014) manifestaron en un estudio con modelos de 23% y 40% de grasa en la dieta de roedores, que el consumo de 2.07 g/kg de MER mostró un efecto antiobesidad al reducir significativamente la ganancia de grasa corporal.

Tabla 1.3. Algunos estudios que respaldan la funcionalidad biológica de las Pirodextrinas y Maltodextrinas Enzimáticamente Resistentes (MER).

Objetivo	Modelo	Resultados	Referencia
Secreción de péptidos intestinales	Pirodextrinas en Humanos	Disminución de la secreción de grelina	Nazare et. al., 2011.
	Pirodextrinas en Humanos	Disminución posprandial de glucosa e insulina	Kendall et. al., 2008.
		Supresión posprandial de triglicéridos.	Kishimoto et al., 2007.
Metabolismo de lípidos y carbohidratos	MER en Ratas	Aumento de la secreción y producción de GLP-1.	Hira et al., 2015.
		Inhibición de la ganancia de peso corporal en dietas hiperlipídicas.	Chu et al., 2014.
	MER en Humanos	Supresión posprandial de LR e insulina.	Kishimoto et al., 2007.
Disminución de estreñimiento	MER en Humanos	Incremento en la frecuencia defecatoria y en el volumen fecal. Disminución de las sensaciones de evacuación incompleta y de obstrucción fecal.	Inaki et al., 1999 López et al., 2008.
Efecto antitumoral	MER en Humanos	Efecto antitumoral por inhibición celular y apoptosis.	So et al., 2015.
Evaluación de inocuidad	MER en Humanos	Nulidad en pruebas mutagénicas y altas dosis sin efectos adversos observados (crónico y agudo).	Yoshikawa et al., 2013.
Efecto sobre el estado de saciedad	MER en Humanos	Reducción de hambre e incremento de saciedad.	Ye et al., 2015.

Por otro lado, diversos estudios realizados demuestran la utilidad de las MER en el estreñimiento crónico idiopático. Inaki et. al. (1999), en un estudio de ciego simple realizado entre jóvenes con estreñimiento a los que se les administró 9.2 g/día de Fibersol®-2 o placebo, encontraron cambios positivos significativos en la frecuencia defecatoria y en el volumen fecal del grupo experimental.

En este mismo sentido, López et. al. (2008) demostraron que la ingesta de un preparado lácteo con un suplemento de fibra que contenía 20 gramos de fibra soluble (inulina y MER), disminuyó significativamente la sensación de evacuación incompleta y la sensación de obstrucción en la evacuación en humanos.

Respecto al efecto antitumoral de las MER, en un estudio prometedor realizado por So et. al. (2015) se expusieron líneas celulares humanas de cáncer colorrectal (HCT116) al Fibersol-2. Los investigadores demostraron que la MER inhibe significativamente el crecimiento de tumores en dichas células mediante la inducción de apoptosis *in vitro*. De igual manera se observó que la MER previene el crecimiento de tumores sin signos de toxicidad *in vivo*.

En relación a la seguridad de su consumo, el trabajo de Yoshikawa et. al. (2013) indicó que las MER no son mutagénicas y que los niveles sin efectos adversos observados fueron de 10g/kg/peso o más y de 5 g/kg/peso o más para los estudios agudo y subcrónico (90 días), respectivamente. En tanto a la dosis aguda con efecto nulo para diarrea, ésta fue alta tanto para hombres como para mujeres; siendo de 0.8 g/kg peso y más de 1 g/kg peso respectivamente. En este sentido cabe mencionar que la Food and Drug Administration ha categorizado a las MER como “Generalmente Reconocidas como Seguras” (“GRAS”, por sus siglas en inglés) (CFR21, 184-1277) y que la FAO/WHO las ha clasificado como “Seguras”; sin embargo aún no se les ha asignado alguna ingesta diaria aceptada (Cho y Almeida, 2012).

En tanto al efecto promotor de la saciedad, existe un reporte reciente de este potencial en humanos. Ye et. al. (2015) suministraron 0, 5 y 10 gramos de Fibersol®-2 a 19 sujetos adultos sanos y evaluaron indicadores de saciedad tanto subjetivos (escalas visuales análogas) como objetivos (niveles séricos de grelina, colecistokinina, gastrina, péptido YY, polipéptido

inhibidor gástrico y GLP-1). Los autores de este trabajo revelaron que la ingestión de una colación con 10 gr de Fibersol®-2 estimula la secreción de hormonas promotoras de la saciedad.

3. FISIOLÓGÍA DE LA SACIEDAD

3.1. Sistema neuroendócrino regulador de la ingesta de alimentos

La homeostasis nutricional supone el conjunto de procesos fisiológicos implicados en los mecanismos de digestión, absorción de los nutrientes, almacenamiento de los mismos, así como su utilización y consiguiente gasto cuando proceda. Este proceso tiene su inicio con la ingestión de los alimentos y su posterior digestión y absorción de las sustancias nutritivas, donde participan enzimas y hormonas gastrointestinales (Kirsz y Zieba, 2011).

La regulación de dicha ingesta es muy compleja y depende de señales aferentes, integradas por dos impulsos opuestos: el apetito y la saciedad. De manera general, esta búsqueda de alimento y la terminación de la ingesta dependen de diversos mediadores que integran el llamado sistema de regulación neuroendócrina de la alimentación (Malacara, 2004).

En tanto al mecanismo de búsqueda de alimento, se han documentado hormonas que aumentan el apetito y reducen el gasto de energía; como la grelina, la hormona concentradora de la melanina, los andrógenos, los glucocorticoides y la progesterona (Tortora y Derrickson, 2008). De igual forma las aferentes sensoriales tienen una influencia importante en el hambre; ya que tanto el olfato, el sabor y la vista de los alimentos tienen componentes orexigénicos demostrados (Malacara, 2004) (Tabla 1.4).

Existen diversos experimentos que han demostrado la presencia de señales de plenitud y de modificaciones químicas o neuronales que ayudan a terminar de comer cuando el individuo alcanza la saciedad. Por ejemplo, un incremento en los niveles de glucosa, como ocurre después de una comida, disminuye el apetito. De manera similar muchas hormonas como el glucagón, la colecistokinina, el GLP-1 y el Péptido YY actúan indicando saciedad y aumentando el gasto energético (Tortora y Derrickson, 2008) (Tabla 1.4).

Todos estos mediadores están interconectados y controlados por un amplio número de señales nerviosas periféricas, moléculas y procesos de acción neuroendócrina integrados en el sistema nervioso central (SNC). Ahí mismo, en el SNC, específicamente en el hipotálamo, residen las estructuras responsables del control de las sensaciones de hambre y saciedad en el organismo sano: núcleos lateral, ventromedial, paraventricular y arcuato (Vásquez y Ulate, 2010).

Tabla 1.4. Principales mecanismos reguladores de la ingestión de alimentos.

Mecanismo orexígeno	Mecanismo anorexígeno
Hipoglucemia	Hiper glucemia
Lipidemia	Colecistokinina
Neuropéptido Y	Bombesina
Grelina	Glucagón
Hormona concentradora de melanina	Polipéptido pancreático
Endocannabinoides	Amilina
Andrógenos	Enterostatina
Glucocorticoides	Péptido YY
Progesterona	Leptina
Percepción sensorial de alimentos	Insulina
	GLP-1
	Hormona α -melanocito estimulante

(González y Schmidt, 2012), (Tortora y Derrickson, 2008) (González et. al., 2006).

El núcleo lateral es predominantemente el responsable de la sensación de hambre y el núcleo ventromedial se encarga del manejo y control de la saciedad, durante el proceso de ingestión de alimentos. Son precisamente en estos centros cerebrales donde la información se procesa al integrar los mecanismos que controlan la cantidad de alimentos ingeridos a corto, medio y largo plazo (Badman y Filier, 2005).

Diversos estudios corroboran lo anterior, ya que el daño del núcleo hipotalámico lateral produce anorexia severa y pérdida de peso corporal, en tanto que las lesiones experimentales de los núcleos ventromedial y paraventricular originan hiperfagia y obesidad (González, et. al., 2006).

Además, en años recientes se ha reconocido al núcleo arcuato como el elemento central integrador de las funciones de apetito y saciedad (Malacara, 2004).

Dos tipos de neuronas del núcleo arcuato controlan la ingestión y metabolismo de calorías. Las neuronas orexigénicas estimulan las ganas de comer produciendo y liberando neuropéptido Y (NPY), las cuales envían al cerebro la señal de “comer”. El nivel en sangre del NPY aumenta durante la inanición y es presumiblemente una causa del exceso de peso. Por su parte, las neuronas anorexigénicas de este núcleo producen la hormona estimuladora de los α -melanocitos (α -MSH), formada a partir del precursor polipeptídico proopiomelanocortina (POMC). La liberación de α -MSH activa a una segunda neurona del circuito para inducir al cerebro la instrucción de “parar de comer” (Nelson y Cox, 2009) (Figura 1.6).

Pese a que la acción de los diversos mediadores mencionados es a nivel central (SNC), la estimulación para la liberación de la gran mayoría de ellos se da a nivel gastrointestinal. Por ejemplo, la distensión del tracto digestivo, particularmente del estómago e intestino delgado, a consecuencia del bolo alimenticio, contribuye a finalizar la ingesta de alimentos debido a la secreción entérica de mediadores como péptido YY₃₋₃₆ (Álvarez, 2002) y GLP-1 (Romero, 2007). De manera contraria, la relajación del tracto promueve el hambre debido a la liberación de mediadores como la grelina (Vásquez y Ulate, 2010).

No obstante, la distensión o relajación de estructuras del tubo digestivo no es la única vía secretora de reguladores, ya algunos dependen del tejido adiposo o de componentes nutrimentales específicos de la dieta (Carlo et. al., 2007). Los efectos sobre apetito y saciedad de los mediadores mencionados son controlados a nivel de SNC, puesto que las señales aferentes son procesadas en bulbo raquídeo e hipotálamo (Raff y Levitzky, 2013) (Figura 1.6).

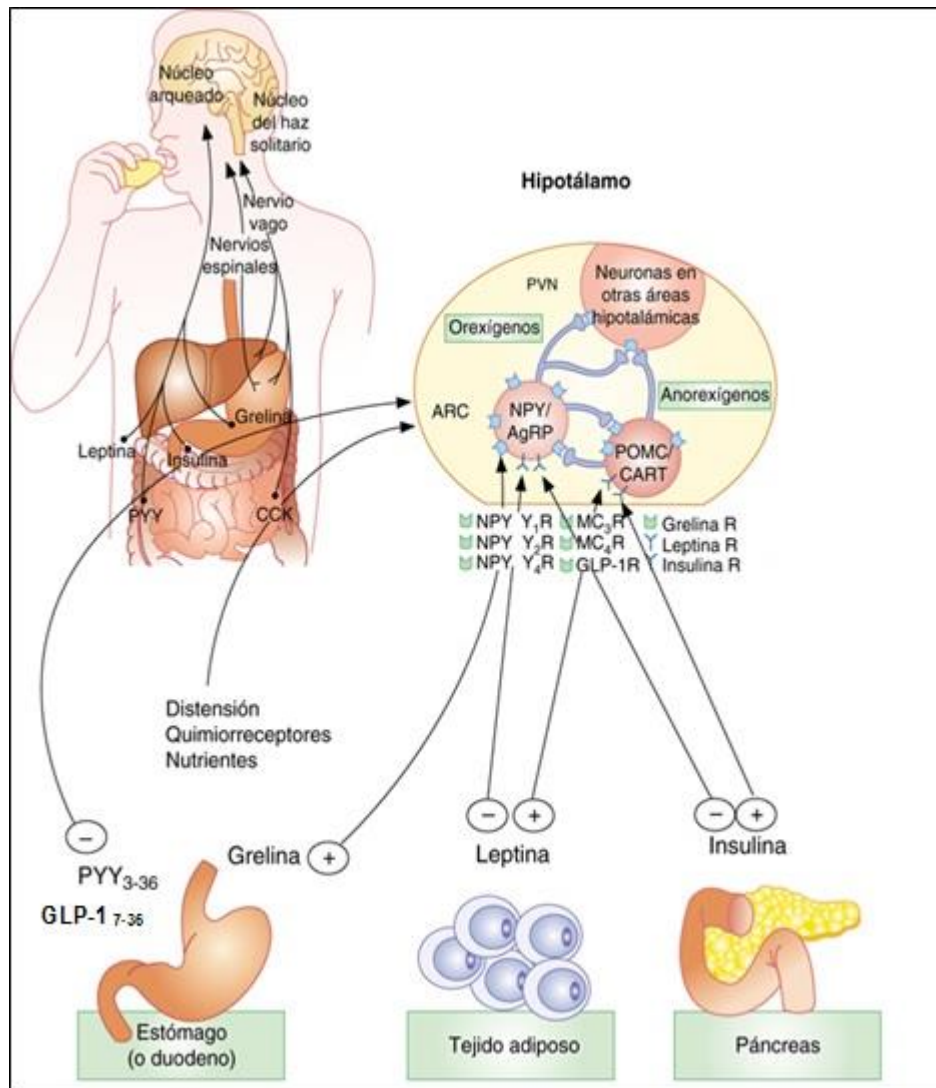


Figura 1.6. Regulación neuroendocrina del apetito y la saciedad (Modificado de Raff y Levitzky, 2013).

3.2. Efecto del Péptido YY sobre el estado de saciedad

El Péptido YY₃₋₃₆ (PYY₃₋₃₆) es una hormona liberada principalmente por las células L del ileon. Se le considera como una de las mayores hormonas gastrointestinales anorexigénicas ya que se ha demostrado que posee la capacidad de reducir la ingestión de alimentos tanto en humano como en animales (Greenberg y Geliebter, 2012). Tras la ingestión de alimentos, las concentraciones de este péptido aumentan y se mantienen hasta 12 horas (Stock et. al., 2005).

Se trata de un péptido de 36 aminoácidos que posee efectos inhibitorios sobre la secreción gástrica ácida, la secreción pancreática exócrina, la motilidad del sistema digestivo, el vaciamiento gástrico y el flujo sanguíneo del sistema gastrointestinal. Además, recientemente se ha reportado que el efecto inhibitor que los ácidos grasos de cadena corta ejercen sobre la motilidad del colon es mediado por este péptido (Dvorkin et. al., 2010).

El mecanismo de acción del PYY₃₋₃₆ difiere de muchas hormonas intestinales ya que parece modular el estímulo nervioso de la célula blanco en lugar de actuar sobre ella misma. Por ejemplo, el PYY₃₋₃₆ disminuye la secreción gástrica ácida y pancreática mediante la depresión del tono colinérgico vagal (Kelley, 1992). Tras su secreción a nivel intestinal, en el SNC, este péptido posee la capacidad de inhibir las neuronas orexigénicas del núcleo arcuato a través de su unión a los receptores Y subtipo 2 presinápticos. De esta manera el PYY₃₋₃₆ tiene el potencial de inhibir la secreción de neuropéptido Y y suprimir la ingestión de los alimentos (Martos y Argente, 2005) (Figura 1.6).

Debido a esta función anorexigénica es que también se le reconoce al PYY₃₋₃₆ como un regulador del peso corporal. En este sentido, Batterham et. al. (2003) demostraron que las concentraciones sanguíneas de PYY₃₋₃₆ se encuentran disminuidas en los sujetos obesos y que su administración sanguínea continua producía en ellos un consumo menor de alimentos.

3.3. Efecto del Péptido Similar al Glucagón Tipo 1 sobre el estado de saciedad

El Péptido Similar al Glucagón Tipo 1 (GLP-1₇₋₃₆) es un neuropéptido producido en el sistema nervioso central y en el intestino delgado, sintetizado a través del gen del preproglucagón. Se ha demostrado que este péptido tiene efectos potentes como sustancia anorexigénica ya que su liberación es capaz de inducir saciedad (Dorantes et. al., 2016).

Se trata de un péptido amidado de 30 aminoácidos producido por neuronas del núcleo del tracto solitario hipotalámico y por las células L ubicadas en el intestino delgado distal y en el colon (Quintanilla et. al., 2010). Posee su receptor (GLP1-R) en el cerebro y en los núcleos hipotalámicos paraventricular y arcuato. En este último, el GLP-1 posee la capacidad de inhibir

la secreción de neuropéptido Y por las neuronas orexigénicas y consecuentemente la ingestión de alimentos (Coniglio et. al., 2004) (Figura 1.6).

Diversos estudios justifican este potencial anorexigénico e incluso se ha demostrado que en sujetos obesos podría existir un descenso de la respuesta posprandial de GLP-1₇₋₃₆. De igual manera existe evidencia que indica la eficacia de esta hormona para disminuir la ingesta energética *ad libitum*, tanto en sujetos obesos como sanos (Moreno et. al., 2004).

Entre los efectos fisiológicos del GLP-1₇₋₃₆ se encuentran el aumento del gasto energético (por incremento de temperatura), la inhibición del vaciamiento gástrico y de la secreción de glucagón, la estimulación de la secreción insulínica y la disminución aguda del consumo de agua y alimentos (Coniglio et. al., 2004).

Debido a que induce la liberación de insulina, este péptido es también reconocido como una incretina que reduce la glucosa sanguínea. Su acción la ejerce a nivel de célula β pancreática y es capaz de secretar insulina después de comer, aun cuando los valores de glucosa se encuentran elevados (Dorantes et. al., 2016).

3.4. Participación de otras hormonas en el mecanismo neuroendócrino de la saciedad

La leptina es una de las adipocinas sintetizada y secretada casi exclusivamente por el tejido adiposo y la cantidad liberada es directamente proporcional a la masa del mismo tejido; algunas células inmunocompetentes y endoteliales también secretan leptina, aunque en menor proporción (Carlo et. al., 2007). La proteína madura comprende una secuencia de 167 aminoácidos con una secuencia señal de 21 aminoácidos y tiene un peso molecular de 16 kD (Almanza et. al., 2008).

Tras su secreción, este péptido circula en sangre y actúa a nivel del SNC, suprimiendo el apetito a través de su acción hipotalámica (Carlo et. al., 2007). La saciedad asociada a la leptina se consigue a través de las interacciones cerebrales que ejerce sobre diferentes moléculas en el núcleo arcuato. Tales moléculas son las de tipo anorexigénicas derivadas de células secretoras de proopiomelanocortina (POMC), como la α -MSH (Almanza et. al., 2008) (Figura 1.6).

La Colecistokinina (CCK) es un octapéptido liberado tanto por las células duodenales endócrinas en respuesta a diversos estímulos alimentarios (principalmente ácidos grasos y aminoácidos), como por neuronas entéricas. Sus efectos principales son la estimulación de la secreción enzimática del páncreas y de la contracción de la vesícula biliar. Su administración exógena suprime las contracciones antrales y duodenales del estómago, produciendo en consecuencia un enlentecimiento del vaciamiento estomacal. (Lorenzo et. al., 2008).

La CCK fue el primer péptido gástrico identificado como un factor de la saciedad, ya que la contracción pilórica que produce inhibe el vaciamiento gástrico, produce su distensión y genera consecuentemente la sensación de saciedad (Palma e Iriarte, 2010). Otra vía de acción de la CCK se da tras la distensión del intestino delgado, la cual activa receptores de estiramiento que generan señales vagales hacia el núcleo del tracto solitario (bulbo raquídeo). Éste, finalmente, hace relevo hacia el núcleo ventromedial hipotalámico para generar la respuesta de saciedad (González et. al., 2006).

Por otro lado, la grelina es el ligando del receptor GHSR (Growth Hormone Secretagogue Receptor), cuya activación en el hipotálamo también provoca la liberación de la hormona de crecimiento por la hipófisis. Sin embargo este péptido parece ser más importante en la regulación del apetito que en la de la hormona de crecimiento por su capacidad para inducir la liberación del neuropéptido Y, al estimular neuronas hipotalámicas orexigénicas. La grelina, incluida entre los péptidos gastrointestinales, estimula el consumo de alimentos y su administración crónica en ratas causa obesidad (Vásquez y Ulate, 2010).

Las células que sintetizan la grelina se ubican a lo largo del tracto gastrointestinal, con una mayor densidad en el fondo gástrico. Los niveles plasmáticos de grelina aumentan durante el ayuno e inmediatamente antes de las comidas, y caen dentro de una hora posterior al consumo de alimentos; lo que ha sugerido que la grelina está involucrada en la inducción del apetito (Vásquez y Ulate, 2010).

III. CAPÍTULO 3: JUSTIFICACIÓN

Hoy en día el exceso de peso y sus enfermedades asociadas representan serios problemas de salud pública que comienzan a mostrar prevalencias epidémicas. En México más del 70% de la población adulta y más del 30% de la población escolar presentan esta condición. En Yucatán su prevalencia en adultos es próxima a la media nacional, pero en los niños escolares es cercana al 45%.

Los principales factores causales para el desarrollo del sobrepeso y la obesidad son, por una parte, la adopción de un estilo de vida sedentario y, por otra, un consumo desmedido de nutrimentos. Por ello la regulación del consumo de alimentos juega un rol crucial en la aparición de la enfermedad, ya que a través de mecanismos neuroendócrinos el cuerpo posee la capacidad de suprimir la ingesta (al inhibir el apetito y producir saciedad).

El estudio de la regulación del consumo de alimentos ha llevado hasta la caracterización de mediadores que actúan en el sistema nervioso central, estimulando neuronas orexigénicas o anorexigénicas hipotalámicas. Pese a su efecto a nivel central, algunos mediadores anorexigénicos, tales como Péptido YY₃₋₃₆ y GLP-1, se secretan en el tracto gastrointestinal como respuesta a la distensión de estructuras anatómicas. Por ello, aquellos alimentos (o nutrimentos) que generen un mayor aumento en el volumen del bolo favorecerán la secreción precoz de estos péptidos y pudiera ser utilizado como agente saciante.

En la literatura científica existen diversos reportes sobre el efecto funcional y fisiológico que supone el consumo de pirodextrinas y maltodextrinas enzimáticamente resistentes. Teniendo en cuenta que estos derivados del almidón se comportan de manera similar a la fibra dietética soluble, resulta entonces relevante estudiar qué efectos tendrían sobre propiedades funcionales como retención de agua, para poder utilizarlos en estudios de regulación del apetito y saciedad.

Pese a que el maíz ha sido considerado comúnmente como la principal fuente de almidón para la obtención de pirodextrinas y maltodextrinas enzimáticamente resistentes, existen otras matrices vegetales que podrían utilizarse para la síntesis de estos compuestos. Dos opciones regionales y no convencionales son el fruto ramón o el rizoma del makal.

Por todo lo anterior, el presente trabajo de investigación plantea la obtención de pirodextrinas y maltodextrinas enzimáticamente resistentes a partir de fuentes vegetales no convencionales, para evaluar el efecto sobre el estado de saciedad posterior a su consumo; midiendo tanto indicadores sensoriales como cambios hormonales séricos.

IV. CAPÍTULO 4: OBJETIVOS

1. GENERAL

Evaluar el estado de saciedad post-ingesta de Pirodextrinas y Maltodextrinas Enzimáticamente Resistentes (MER) sintetizadas por piroconversión e hidrólisis enzimática complementaria a partir de almidones no convencionales y caracterizarlas fisicoquímicamente.

2. ESPECÍFICOS

- Evaluar el efecto de la cantidad de ácido, temperatura y tiempo de reacción necesarios para la obtención de Pirodextrinas a partir de almidón de Ramón (*Brosimum alicastrum* Swartz) y de Makal (*Xanthosoma yucatenense*).
- Evaluar el efecto de la relación enzima-sustrato y tiempo de hidrólisis enzimática sobre el contenido de azúcares simples residuales de las Pirodextrinas de Makal (*Xanthosoma yucatenense*), para la obtención de Maltodextrinas Enzimáticamente Resistentes (MER).
- Seleccionar las mejores Pirodextrinas y MER obtenidas, mediante de pruebas de cuantificación de material indigerible, cambio de color, microscopía y equivalentes de dextrosa.
- Determinar el perfil funcional de las mejores Pirodextrinas y MER obtenidas, mediante pruebas de calorimetría diferencial de barrido, absorción de agua, poder de hinchamiento y solubilidad.
- Determinar el estado de saciedad posterior a la ingestión de las mejores Pirodextrinas y MER obtenidas, mediante la evaluación de indicadores sensoriales y de cambios hormonales de péptidos anorexigénicos séricos (Péptido YY₃₋₃₆ y GLP-1).

V. CAPÍTULO 5: MATERIALES Y MÉTODOS

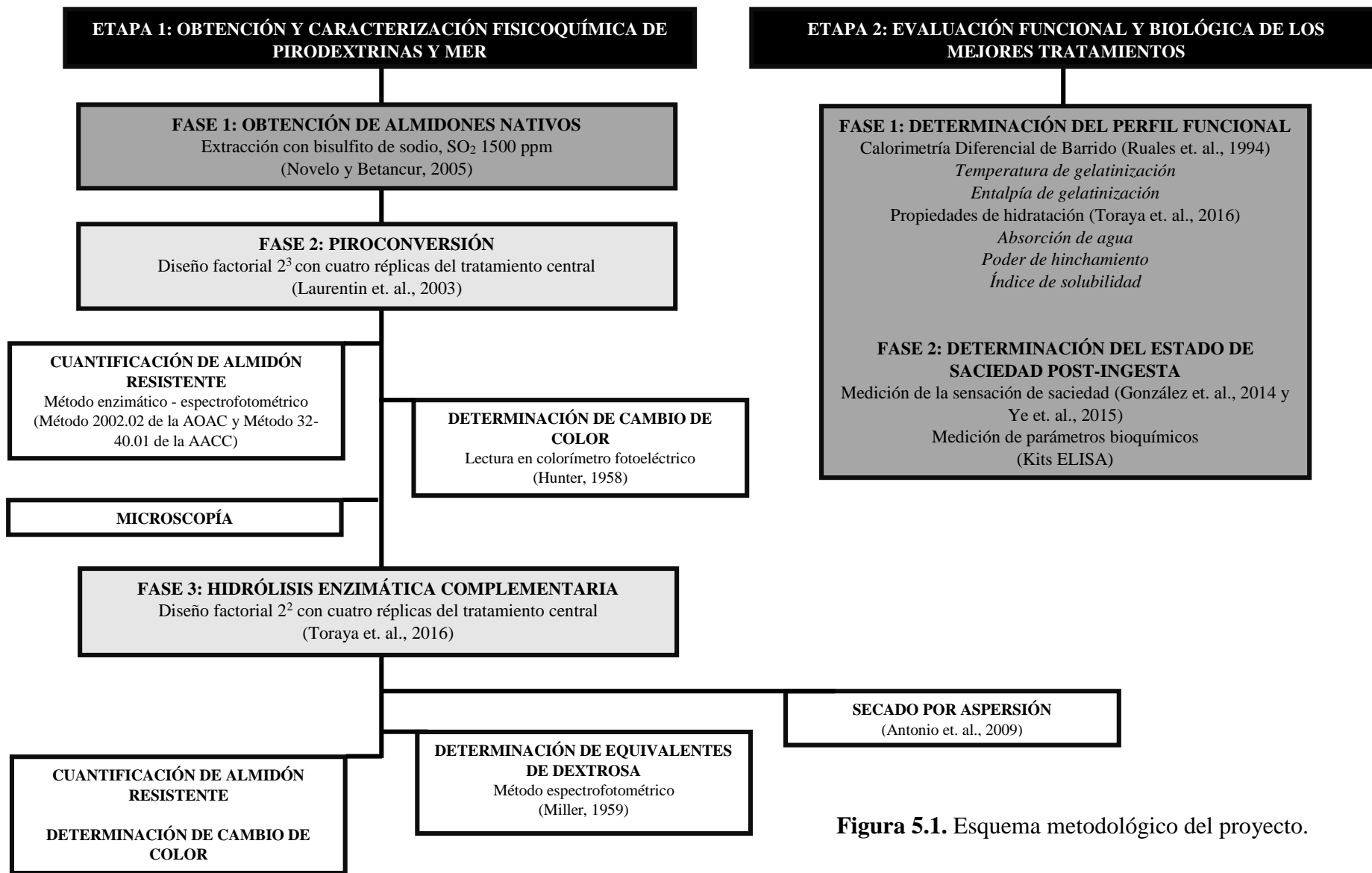


Figura 5.1. Esquema metodológico del proyecto.

De manera general, la metodología del proyecto se divide en dos etapas principales. La primera consiste en la obtención y caracterización parcial de las pirodextrinas y MER, mientras que la segunda abarca su evaluación funcional y biológica. La etapa 1 se divide a su vez en tres fases principales (Obtención de los almidones nativos, Piroconversión e Hidrólisis enzimática complementaria) y en cada una de ellas se incluyen métodos de caracterización (Figura 5.1).

1. ETAPA 1: OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA DE PIRODEXTRINAS Y MALTODEXTRINAS ENZIMÁTICAMENTE RESISTENTES (MER)

1.1. Fase 1: Obtención de almidones nativos

El almidón nativo aislado del fruto de ramón fue proporcionado por el Instituto Tecnológico Superior de Calkiní del Estado de Campeche (ITESCAM). Para su extracción se siguieron los lineamientos de la técnica descrita por Betancur et. al. (2001), la cual consiste en una separación del almidón en medio alcalino (pH 10) usando bisulfito de sodio (0.1% p/v).

Para la obtención del almidón nativo de makal se utilizaron rizomas adquiridos en la localidad de Kimbilá, Yucatán y se procesaron con base al método establecido por Novelo y Betancur (2005), realizando algunas modificaciones. Los rizomas fueron pelados y cortados en cubos de 3 cm de lado y se remojaron durante 30 minutos en una solución de bisulfito de sodio (1500 ppm de SO_2) en relación 1:3 (p/v). Para reducir el tamaño de partícula los cubos se molieron en una licuadora Oster 465-42 y la masa resultante se diluyó en bisulfito de sodio (1500 ppm de SO_2) en relación 1:1 (v/v). Para eliminar el excedente de material mucilaginoso se centrifugó 2 veces a 2500 rpm durante 12 minutos en una centrífuga Mistral 3000i, desechando en cada caso los sobrenadantes. El precipitado se diluyó nuevamente con bisulfito de sodio (1500 ppm de SO_2) en relación 1:1 (v/v), se filtró en malla 80 para eliminar la fibra y el filtrado se dejó sedimentar a 4°C durante 24 horas. Posteriormente, tras la separación de fases, el sobrenadante se eliminó por sifoneo mientras que el precipitado se lavó con agua destilada y se centrifugó a 2500 rpm en una centrífuga Mistral 3000i durante 12 minutos. El almidón obtenido se secó en un horno de convección Fisher Scientific a 55°C durante 24 horas, se maceró (malla 100) y finalmente se almacenó hasta su uso posterior.

1.2. Fase 2: Piroconversión

Los almidones nativos se modificaron químicamente (en experimentos individuales) mediante el proceso de pirodextrinización definido por Laurentin et. al. (2003), siguiendo un diseño factorial 2^3 con cuatro réplicas del tratamiento central (Tabla 5.1) que se explica mediante un modelo de primer orden. Los factores y sus correspondientes niveles fueron: concentración de almidón/HCl 2.2 M (80/1 y 160/1 p/v), temperatura (90 y 110 °C) y tiempo de reacción (1 y 3 horas). Se colocaron 15 g de almidón nativo (B.S.) en una caja Petri y se adicionó HCl 2.2 M con base a la relación establecida para cada tratamiento. El ácido se dispersó en el almidón y se dejó reaccionar en desecador por 16 horas. Finalmente las cajas petri se colocaron en un horno de convección Fisher Scientific a la temperatura y durante el tiempo correspondiente a las condiciones de cada tratamiento.

Tabla 5.1. Condiciones experimentales para la piroconversión.

Tratamiento	Factores y niveles		
	Almidón:HCl 2.2 M	Temperatura (°C)	Tiempo de reacción (min)
1 (Factorial)	160:1 (-1)	90 (-1)	60 (-1)
2 (Factorial)	80:1 (+1)	90 (-1)	60 (-1)
3 (Factorial)	160:1 (-1)	110 (+1)	60 (-1)
4 (Factorial)	80:1 (+1)	110 (+1)	60 (-1)
5 (Factorial)	160:1 (-1)	90 (-1)	180 (+1)
6 (Factorial)	80:1 (+1)	90 (-1)	180 (+1)
7 (Factorial)	160:1 (-1)	110 (+1)	180 (+1)
8 (Factorial)	80:1 (+1)	110 (+1)	180 (+1)
9 (Central)	120:1 (0)	100 (0)	120 (0)
10 (Central)	120:1 (0)	100 (0)	120 (0)
11 (Central)	120:1 (0)	100 (0)	120 (0)
12 (Central)	120:1 (0)	100 (0)	120 (0)
13 (α , axial)	53:1 (1.68179)	100 (0)	120 (0)
14 (α , axial)	187:1 (-1.68179)	100 (0)	120 (0)
15 (α , axial)	120: 1 (0)	117 (1.68179)	120 (0)
16 (α , axial)	120: 1 (0)	83 (-1.68179)	120 (0)
17 (α , axial)	120: 1 (0)	100 (0)	221 (1.68179)
18 (α , axial)	120: 1 (0)	100 (0)	19 (-1.68179)

Puntos axiales: $\alpha = (2^n)^{1/4}$, n=número de variables independientes. En este caso $(2^3)^{1/4} = 1.683$

Con base al análisis estadístico, posteriormente fue necesario aplicar experimentos adicionales para pasar a un modelo de segundo orden y así describir adecuadamente los datos. Se incluyeron seis puntos axiales para sumar un total de 18 tratamientos (Tabla 5.1).

Las pirodextrinas obtenidas en cada tratamiento se maceraron en mortero, se tamizaron en malla 80 y se almacenaron en desecador. Para seleccionar el mejor tratamiento se utilizaron como variables de respuesta el contenido de almidón resistente (AR) y la diferencia de color (ΔE) de cada uno con respecto al almidón nativo. Se determinó como mejor pirodextrina aquella donde el AR fue mayor y la ΔE menor, con base en el análisis estadístico.

1.2.1. Determinación del contenido de almidón resistente (AR)

1.2.1.1. Hidrólisis y solubilización del almidón no resistente

Se realizó con base a los lineamientos descritos en el Kit de Almidón Resistente de Megazyme® (Método 2002.02 de la AOAC y Método 32-40.01 de la AACC). Para la hidrólisis se contempló amiloglucosidasa (AMG) diluida a 300 U/mL (Solución 1) y una mezcla de α -Amilasa pancreática con AMG 300 U/mL (Solución 2). La solución 1 se preparó con 2 mL de AMG 3300 U/mL diluida en 22 mL de buffer de maleato de sodio 0.1 M, pH 6 y la solución 2 se preparó con 1 g de α -Amilasa pancreática (en solución con 100 mL de buffer maleato de sodio 0.1 M, pH 6) más 1 mL de AMG 300 U/mL.

Se pesaron 100 mg de cada muestra (b.s.) en tubos de vidrio con tapa y se agregaron 4 mL de la solución 2. Los tubos, cerrados herméticamente y mezclados previamente en vortex, se colocaron horizontalmente en un baño de agua New Brunswick Scientific R76 con agitación (200 golpes/min) a 37°C durante 16 horas. Posteriormente se agregaron 4 mL de etanol al 99% agitando vigorosamente en vortex, se centrifugó en un equipo Hettich EBA20 (3000 rpm, 10 min, T° ambiente) y cuidadosamente se decantó el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en 2 mL de etanol al 50% mezclando en vortex y seguidamente se agregaron otros 6 mL de etanol al 50%. La mezcla se centrifugó nuevamente (3000 rpm, 10 min, T° ambiente), decantando los sobrenadantes. Los lavados con etanol al 50% y la posterior centrifugación se repitieron una vez más.

1.2.1.2. Cuantificación del almidón resistente

Los precipitados se disolvieron con 2 mL de KOH 2M, agitando magnéticamente durante 20 minutos en un baño de agua-hielo a 10°C. A la mezcla homogénea se le agregaron 8 mL de buffer de acetato de Na 1.2 M, pH 3.8 bajo agitación magnética. Inmediatamente después se agregaron 100 µL de AMG (3300 U/mL) y la muestra se incubó en baño de agua New Brunswick Scientific R76 a 50 °C durante 30 minutos, con mezclado cada 10 minutos en vortex. Concluida la hidrólisis se transfirió todo el contenido en un matraz volumétrico de 100 mL, se ajustó el volumen con agua destilada y se mezcló correctamente.

Posteriormente se tomó una alícuota de la solución (10 mL) y se centrifugó en un equipo Hettich EBA20 a 3000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. Del sobrenadante se transfirió otra alícuota (100 µL) a tubos de vidrio, se adicionaron 3 mL de reactivo enzimático GOPOD y se incubó en baño de agua a 50°C durante 20 minutos. Finalmente se midió la absorbancia de la solución en un espectrofotómetro Agilent Technologies Cary 60 UV-Vis a 510 nm contra el blanco de reactivos (100 µL de buffer de acetato de sodio 0.1 M pH 4.5 más 3 mL de reactivo enzimático GOPOD).

El contenido de AR se estimó considerando la absorbancia del estándar de glucosa (100 µL de D-glucosa [1 mg/mL] más 3 mL de reactivo enzimático GOPOD), mediante la siguiente ecuación:

$$\% AR = (Abs\ muestra) \left(\frac{F}{W} \right) (90)$$

Donde:

- Abs muestra = Absorbancia de la muestra a 510 nm.
- F = Concentración del estándar / Absorbancia del estándar = 100 / Absorbancia del estándar
- W = Peso seco de la muestra = (Peso) (100 – humedad) / 100

1.2.2. Determinación de cambio de color (ΔE)

Tanto el color como la ΔE se establecieron utilizando la escala de Hunter (1958). Utilizando un colorímetro fotoeléctrico BYK – Gardner 6805, el color se identificó en tres atributos: L (blanco = 100, negro = 0), a (rojo = positivo, verde = negativo) y b (amarillo = positivo, azul = negativo). La diferencia de color se estimó tomando como estándares los colores presentados por los almidones nativos de ramón y makal. Los tres atributos (L, a y b) se relacionaron entre sí usando la siguiente ecuación:

$$\Delta E = \sqrt{\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2}$$

1.2.3. Microscopía

Debido a los bajos rendimientos de AR obtenidos en el ramón posterior al proceso de piroconversión, se sospechó de una resistencia del gránulo a la hidrólisis. Para poder justificar lo anterior se realizaron observaciones de los gránulos (nativos y mejores pirodextrinas) en microscopio.

Para ello se preparó una solución de almidón, o pirodextrina en su caso, al 0.5% (p/v). La observación se hizo en un microscopio óptico OMAX 14000 KPA y las imágenes se procesaron con el programa OMAX Toup View 3.7. Por la diferencia en el tamaño de los gránulos, las muestras de makal se observaron en objetivo de 40x mientras que las de ramón en 100x.

1.3. Fase 3: Hidrólisis enzimática complementaria

Para eliminar los remanentes de enlaces digeribles y así obtener las MER, se realizó una hidrólisis complementaria usando α -amilasa (Sigma A-3306); de acuerdo al método descrito por Toraya et. al. (2016). Este procedimiento se llevó a cabo únicamente con la mejor pirodextrina de Makal ya que en las muestras de Ramón se obtuvieron bajos contenidos de AR.

Se utilizó un diseño factorial 2^2 , con cuatro réplicas del tratamiento central. Los factores y sus niveles fueron: concentración enzima-sustrato B.S. (0.1 y 0.05 %, v/v) y tiempo de reacción (10 y 30 minutos) (Tabla 5.2). La pirodextrina se colocó en una suspensión de agua (20% p/v) y se ajustó a pH 6 usando NaOH 1N. Posteriormente se incubó a 95°C en un baño de agua New

Brunswick Scientific R76 y se colocó la enzima a las concentraciones y tiempos respectivos. Concluida la hidrólisis, se inactivó la enzima a 120°C durante 15 minutos en un horno de convección Fisher Scientific. Por último, el concentrado se secó por aspersion y se tamizó en una malla 80. Como variable respuesta se utilizó el número de equivalentes de dextrosa para establecer el mejor tratamiento.

Tabla 5.2. Condiciones experimentales para la hidrólisis enzimática complementaria.

Tratamiento	Factores y niveles	
	Enzima (%)	Tiempo de reacción (min)
1	0.05	10
2	0.1	10
3	0.05	30
4	0.1	30
5	0.075	20
6	0.075	20
7	0.075	20
8	0.075	20

1.3.1. Secado por aspersion

Para obtener las MER en polvo, el concentrado obtenido en la hidrólisis complementaria se secó en un equipo Spry Dryer SD-05 Lab Plant. Se tomaron como referencia las condiciones propuestas por Antonio et. al. (2009) para adecuar el procedimiento a la muestra de estudio.

1.3.2. Determinación de equivalentes de dextrosa (ED)

Esta determinación se realizó en todos los tratamientos de hidrólisis complementaria para poder seleccionar la MER más adecuada. Con base en la metodología descrita por Miller (1959), 1 gr de MER (b.s.) se disolvió en 100 ml de agua destilada y de ahí se tomó una alícuota de 1 ml. Posteriormente se adicionó 1.5 ml del reactivo ácido 3, 5-dinitrosalicílico (DNS), se mezcló con ayuda de un vortex y se calentó a ebullición durante 15 minutos. Finalmente cada tubo se enfrió

en un baño de agua a temperatura ambiente y se procedió a su lectura a 550 nm en un espectrofotómetro Agilent Technologies Cary 60 UV-Vis. La curva de calibración se realizó a partir de soluciones de glucosa (0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/ml) tratadas de la misma manera que las muestras y se realizó un blanco con agua destilada. El contenido de azúcares reductores directos se cuantificó por interpolación de los valores de absorbancia de las muestras, con respecto a la curva estándar.

El resultado se expresó como porcentaje con base al total de muestra utilizada en base seca y se determinó como la mejor MER aquella cuyo valor de ED fue menor a 20, con base al análisis estadístico. Una vez definida la mejor MER, se determinó su contenido de almidón resistente y su cambio de color con base a las técnicas previamente descritas.

2. ETAPA 2: EVALUACIÓN FUNCIONAL Y BIOLÓGICA DE LOS MEJORES TRATAMIENTOS

2.1. Fase 1: Propiedades funcionales de los mejores tratamientos

2.1.1. Determinación de la Temperatura (T_{GEL}) y Entalpía (ΔH) de gelatinización

Según el método descrito por Ruales y Nair (1994), se pesó 1 mg de muestra (b.s.) en charolas de aluminio, se hidrataron con agua destilada (1:3 p/v) y se sellaron herméticamente. Posterior a 24 horas de reposo, las muestras se escanearon en un calorímetro DSC-6 Perkin Elmer aplicando las siguientes condiciones:

- Flujo de calentamiento: 10°C/min
- Rampa de temperatura: 30 - 130 °C
- Flujo N₂: 20 mL/min

Utilizando el software Pyris, se determinó tanto la temperatura de gelatinización (T°_{GEL}) como la entalpía de gelatinización (ΔH).

2.1.2. Determinación de las propiedades de hidratación

Se realizaron con base a la metodología descrita por Toraya et. al. (2016). En un tubo de centrífuga de 50 ml previamente tarado se añadieron 40 ml de una suspensión de muestra (b.s.) al 1 % (p/v). Posteriormente el tubo fue colocado en un baño de agua New Brunswick Scientific R76 a temperatura constante (30, 60, 70, 80 ó 90 °C), proporcionando agitación para mantener la suspensión uniforme durante 30 min. Transcurrido el tiempo se retiró el tubo del baño y se centrifugó en un equipo Hermle Z300 a $2121 \times g$ durante 15 min. Por último, el sobrenadante se recuperó y el gel resultante se pesó. La capacidad de absorción de agua se calculó con base a la siguiente ecuación:

$$\text{Capacidad de absorción de agua} = \frac{\text{Peso de los gránulos hinchados}}{\text{Peso de la muestra B.S.}}$$

Del sobrenadante recuperado anteriormente se tomaron 10 ml y se colocaron en un crisol a peso constante. Posteriormente los crisoles se secaron en un horno Fisher Scientific a 120 °C durante 4 horas y, transcurrido el tiempo, se enfriaron y registraron sus pesos. Los cálculos de poder de hinchamiento y solubilidad se realizaron de acuerdo a las siguientes fórmulas:

$$\text{Poder de hinchamiento} = \frac{\text{Peso de los gránulos hinchados}}{(\text{Peso de la muestra B.S.})(100 - \% \text{ Solubilidad})}$$

$$\text{Indice de solubilidad (\%)} = \left(\frac{\text{Peso del almidón soluble}}{\text{Peso de la muestra B.S.}} \right) (400)$$

2.2. Fase 2: Evaluación del estado de saciedad posterior a la ingestión de los mejores tratamientos

2.2.1. Descripción y selección de la población de estudio

El estudio fue conducido de acuerdo con los lineamientos de la Declaración de Helsinki (AMM, 2013) y todos los participantes expresaron su inclusión voluntaria firmando una carta de consentimiento informado (Anexo 1). Se contó con la colaboración de 11 sujetos sanos, cuyas

edades oscilaron entre los 21 y 30 años. Las variables antropométricas y clínicas que se utilizaron para describirlos se enlistan a continuación:

- Sexo (hombre/mujer)
- Edad (años)
- IMC (kg/m^2)
- Peso (kg)
- Talla (m)
- Circunferencia de cintura (cm)
- Masa grasa corporal (%)
- Masa muscular corporal (%)
- Presión arterial sistólica (mm de Hg)
- Presión arterial diastólica (mm de Hg)

Para la medición del peso corporal y de los porcentajes de grasa y músculo se empleó un monitor de composición corporal con cuatro electrodos Omron HBF-514C. La talla se determinó utilizando un estadímetro de pared Seca 206, para la cintura se empleó una cinta ergonómica Seca 201 y la presión arterial se midió con ayuda de un baumanómetro aneroide Hergom.

Los participantes fueron seleccionados mediante la aplicación de una Historia Clínica Nutriológica (Anexo 2), la cual reveló la condición actual de salud y enfermedad, así como los hábitos (dietéticos y deportivos) de los participantes. Con base a lo anterior, los criterios de selección fueron los siguientes:

Criterios de inclusión

- Tener entre 19 y 35 años.
- Tener IMC entre 18.5 – 29.9 kg/m^2 .
- Aceptar voluntariamente a participar en el experimento (Anexo 1).
- No padecer trastornos gastrointestinales ni endócrinos (Anexo 2).
- Poseer el hábito de colación matutina (Anexo 2).
- Realizar actividad física nula, leve o moderada (Anexo 2).

Criterios de exclusión

- Ser fumador habitual (Anexo 2).
- Ser consumidor actual de medicamentos y/o de suplementos a base de fibra (Anexo 2).
- Ser deportista de alto rendimiento (Anexo 2).
- Estar embarazada o ser madre lactante (Anexo 2).
- Estar en período menstrual (Anexo 2).

Criterios de eliminación

- Presentar intolerancia a los tratamientos y/o a los alimentos evaluados.
- Presentar lesiones graves por la punción venosa.
- Exclusión voluntaria del experimento.

2.2.2. Metodología general empleada

Se llevó a cabo siguiendo las metodologías propuestas por González et. al. (2014) y Ye et. al. (2015), realizando algunas modificaciones. Se realizó un estudio de tipo simple ciego cruzado, aleatorizado y prospectivo en las Instalaciones del Instituto Tecnológico de Mérida. Se probaron 4 tratamientos en total: Control positivo (MER comercial, Fibersol-2®), Control negativo (Agua), Tratamiento 1 (Pirodextrina 5) y Tratamiento 2 (MER 1).

Para cada participante la aplicación de los tratamientos se realizó al azar y de manera semanal; teniendo así diferentes tratamientos en la misma sesión experimental y cuatro sesiones en total. Además de las cuatro sesiones experimentales, se realizó una reunión previa para la toma de variables antropométricas y para el levantamiento de los instrumentos diagnósticos antes mencionados.

En los días cuando se realizó la experimentación se recomendó que el desayuno de los participantes sea a las 7:00 horas y que conste de platillos ligeros (quesadillas, sándwiches, hot cakes, etc) que no rebasen las 600 kcal. De igual manera se confirmó que 24 horas previas al experimento no hayan bebido alcohol o realizado actividad física excesiva.

Cada día de sesión experimental los voluntarios fueron citados a las 10:30 horas y, tras 10 minutos de reposo, se levantó la primera Escala Visual Análoga (EVA) (Anexo 3). En este mismo tiempo se realizó la primera toma de muestra sanguínea (Tiempo 0'). Posteriormente se les pidió que ingieran una colación estandarizada compuesta de leche entera y cereal no azucarado, acompañada de su tratamiento correspondiente (15 g b.s. de muestra disueltos en 250 ml de agua). A partir de que finalizaron el consumo de su colación, se contaron 60 minutos y se volvió a levantar otra EVA y se realizó otra toma de muestra sanguínea (Tiempo 60'). Este procedimiento se repitió en los tiempos 120' y 180'. Durante el curso del experimento los participantes podían beber solamente 200 ml de agua y no podían dormir o realizar actividad física.

Para la toma de muestras de sangre se contó con la colaboración de un médico (Cédula profesional 8929811) y un químico farmacobiólogo (Cédula profesional 4518706) quienes colocaron catéteres 18G Punzocat o realizaron punciones venosas, según la tolerancia de los voluntarios. Se tomaron 5 mL aproximadamente de sangre de las venas basílica, cefálica y/o antecubital en cada uno de los tiempos establecidos (0', 60', 120' y 180'). Posteriormente la sangre se depositó en tubos de 13 x 100 mm con gel separador de suero BD Vacutainer® y se centrifugó en un equipo Centra CL2 Thermo IEC a 2,800 $\times g$ a 4°C durante 10 minutos. Las alícuotas de suero recuperadas se almacenaron en ultracongelación a -80°C hasta su posterior análisis.

2.2.2.1. Análisis sensorial de la saciedad

El apetito se valoró a través de las sensaciones de hambre, saciedad, plenitud y consumo prospectivo mediante el uso de Escalas Visuales Análogas. Estas herramientas han sido ampliamente utilizadas en estudios clínicos para evaluar las sensaciones subjetivas (dolor, calidad de vida y hambre) y se componen por una línea de 100 mm en cuyos extremos se valoran las sensaciones extremas: “No del todo” y “Extremadamente” (Whybrow et. al., 2006) (Anexo 3). Sobre esta línea y con base a la sensación planteada en cada caso, el voluntario indicó la intensidad de su percepción.

2.2.2.2. Análisis bioquímico de la sociedad

A partir de las muestras de suero colectadas en cada tiempo del experimento, se midieron las concentraciones de Péptido YY₃₋₃₆ y GLP-1₇₋₃₆ mediante el método de inmunoabsorción ligado a enzimas. Para lo anterior se utilizaron kits de inmunoensayo específicos de cada péptido (Phoenix Pharmaceuticals, Inc. Números de catálogo EK-059-02 y EK-028-11, respectivamente). Para ambas hormonas se utilizó una curva de calibrado (0.01, 0.1, 1, 10 y 100 ng/ml de péptido estándar respectivo), siguiendo las indicaciones de uso proporcionadas por el fabricante (Figura 5.2).

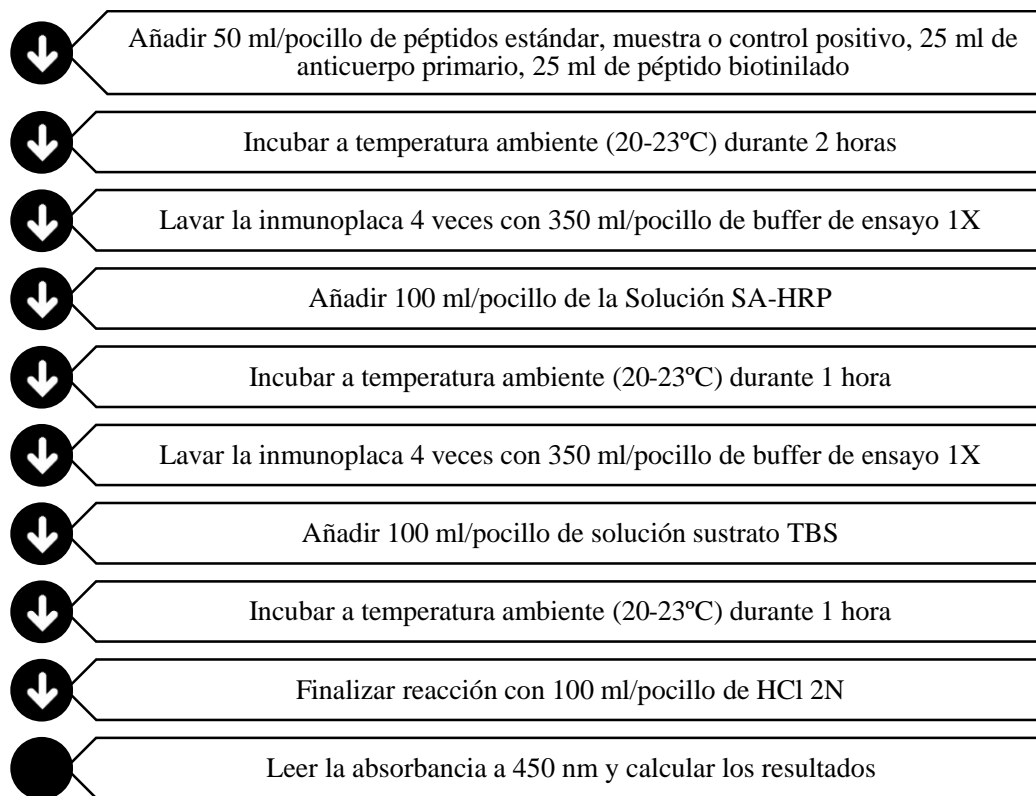


Figura 5.2. Metodología estandarizada del ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas.

3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Los resultados obtenidos fueron analizados mediante análisis de varianza (95% de nivel de confianza), según los métodos reportados por Montgomery (2011). La prueba de Duncan se aplicó para determinar las diferencias entre las medias de los tratamientos.

Los ANOVA's realizados en la Etapa 1 y 2 de este proyecto se realizaron con ayuda el programa estadístico StatGraphics Centurion. Para el análisis sensorial de la Etapa 2 fue necesario calcular Áreas Bajo la Curva, para lo cual se utilizó el programa GraphPad Prism 6. Para el modelamiento de la curva sigmoide obtenida en la cuantificación sérica de péptidos se utilizó complementariamente el programa Origin Pro 8.

VI. CAPÍTULO 6: RESULTADOS Y DISCUSIONES

1. PIROCONVERSIÓN

1.1. Modelamiento de primer orden

Para el proceso de piroconversión se utilizó un método factorial con la intención de modelar el comportamiento de los datos. El objetivo de utilizar el modelamiento fue también para poder explicar o comprender la relación de los factores involucrados en la pirodextrinización. Tal como se explicará más adelante, se siguieron modelos de primer y segundo orden con base al análisis estadístico.

La formación de almidón resistente (AR) a través del proceso de piroconversión fue más efectiva en el almidón de makal que en el de ramón; puesto que se observaron rangos de 46.19 – 84.73% y de 0 – 6.14%, respectivamente. Se determinaron como mejores tratamientos la pirodextrina 5 de makal y la 2 de ramón, ya que sus valores de AR fueron estadísticamente mayores al obtenido en el resto de los tratamientos (Tabla 6.1).

Tabla 6.1. Contenidos (%) de almidón resistente en modelo de primer orden.

Tratamiento	Factores y niveles			% AR	
	Almidón:Ácido (HCl 2.2 M)	Temperatura (°C)	Tiempo (Minutos)	Pirodextrin a de Makal	Pirodextrina de Ramón
1 (Factorial)	160:1 (-1)	90 (-1)	60 (-1)	68.99 ^h	5.59 ^e
2 (Factorial)	80:1 (+1)	90 (-1)	60 (-1)	73.43 ⁱ	6.14 ^f
3 (Factorial)	160:1 (-1)	110 (+1)	60 (-1)	66.14 ^g	0.00 ^a
4 (Factorial)	80:1 (+1)	110 (+1)	60 (-1)	53.06 ^c	3.67 ^b
5 (Factorial)	160:1 (-1)	90 (-1)	180 (+1)	84.73 ^j	4.42 ^c
6 (Factorial)	80:1 (+1)	90 (-1)	180 (+1)	72.45 ⁱ	4.48 ^c
7 (Factorial)	160:1 (-1)	110 (+1)	180 (+1)	63.56 ^f	4.55 ^c
8 (Factorial)	80:1 (+1)	110 (+1)	180 (+1)	46.19 ^b	5.30 ^d
9 (Central)	120:1 (0)	100 (0)	120 (0)	59.95 ^e	4.42 ^c
10 (Central)	120:1 (0)	100 (0)	120 (0)	59.86 ^e	4.58 ^c
11 (Central)	120:1 (0)	100 (0)	120 (0)	58.83 ^{d,e}	4.35 ^c
12 (Central)	120:1 (0)	100 (0)	120 (0)	56.67 ^d	4.35 ^c
Nativo	-	-	-	5.69 ^a	7.22 ^g

^{a-h} Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

Las condiciones experimentales de almidón/ácido, temperatura y tiempo de reacción para la pirodextrina 5 de makal fueron 160:1, 90°C y 180 minutos. En el ramón las mejores condiciones fueron 80:1, 90°C y 60 minutos de reacción (Tabla 1.7).

En esta primera aproximación de los contenidos de AR se siguió un modelo de primer orden y los valores de R^2 revelaron que los modelos describieron el 87.43 y el 99.59% de la variabilidad en el porcentaje de AR, para el almidón de makal y de ramón, respectivamente. Las ecuaciones que explican el comportamiento del AR en relación a los factores fueron las siguientes:

$$\begin{aligned} \mathbf{AR\ Makal} = & 63.6592 - 4.78675 * \mathit{Relación\ Almidón/Ácido} - 8.83075 * \mathit{Temperatura} + \\ & 0.66625 * \mathit{Tiempo} - 2.826 * \mathit{Relación\ Almidón/Ácido} * \mathit{Temperatura} - 2.627 * \mathit{Relación} \\ & \mathit{Almidón/Ácido} * \mathit{Tiempo} - 3.025 * \mathit{Temperatura} * \mathit{Tiempo} + 1.55475 * \mathit{Relación} \\ & \mathit{Almidón/Ácido} * \mathit{Temperatura} * \mathit{Tiempo} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \mathbf{AR\ Ramón} = & 4.32633 + 0.63025 * \mathit{Relación\ Almidón/Ácido} - 0.8905 * \mathit{Temperatura} + \\ & 0.41875 * \mathit{Tiempo} + 0.47575 * \mathit{Relación\ Almidón/Ácido} * \mathit{Temperatura} - 0.427 * \mathit{Relación} \\ & \mathit{Almidón/Ácido} * \mathit{Tiempo} + 1.12625 * \mathit{Temperatura} * \mathit{Tiempo} - 0.305 * \mathit{Relación} \\ & \mathit{Almidón/Ácido} * \mathit{Temperatura} * \mathit{Tiempo} \end{aligned}$$

El análisis de varianza del diseño factorial dejó en claro que el tiempo (C) y la interacción almidón/ácido * temperatura * tiempo (ABC) no afectaron significativamente ($p > 0.05$) el rendimiento de AR. Contrariamente, la relación almidón/ácido (A), la temperatura (B) y las interacciones dobles de los factores (AB, AC y BC) sí afectaron el rendimiento ($p < 0.05$). Por su parte, en el análisis del ramón se evidenció que todos los factores y sus interacciones mostraron efectos significativos ($p < 0.05$) (Tabla 6.2).

Las figuras 6.1 y 6.2 muestran los gráficos de Pareto con los factores y sus efectos correspondientes en los tratamientos de makal y ramón, respectivamente. En el caso del makal puede observarse que todos los factores y sus interacciones estadísticamente significativos (A,

B, AB, AC y BC) inciden negativamente en el rendimiento. Es por esto que las constantes de dichos factores en la ecuación son negativos y, por ello, para alcanzar el mayor rendimiento es necesario usar los niveles inferiores (o negativos) de cada factor. Las constantes negativas en la ecuación del comportamiento del ramón son B, AC y ABC, mismas que también corresponden a los factores que influyen negativamente en el rendimiento.

Tabla 6.2. Análisis de varianza en modelo de primer orden para almidón resistente de makal y ramón.

Factor / Interacción	Valor de <i>p</i>	
	Makal	Ramón
A: Relación Almidón/Ácido	0.0030	0.0005
B: Temperatura	0.0005	0.0002
C: Tiempo	0.3043	0.0016
AB	0.0135	0.0011
AC	0.0165	0.0015
BC	0.0112	0.0001
ABC	0.0632	0.0040
Falta de ajuste	0.0045	0.0945

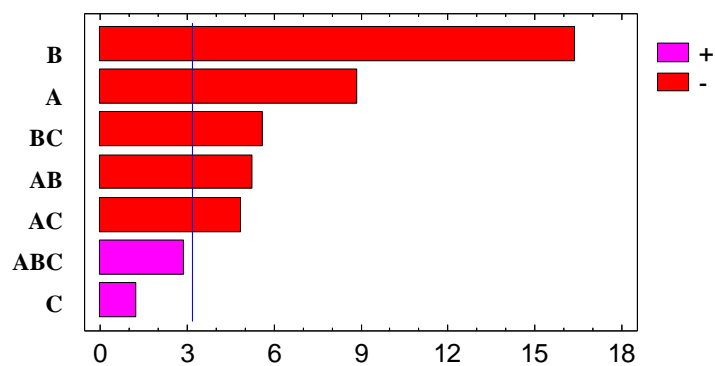


Figura 6.1. Gráfico de Pareto estandarizado en modelo de primer orden para almidón resistente de makal.

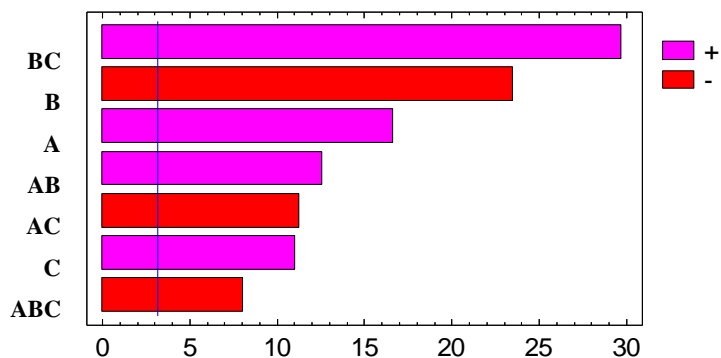


Figura 6.2. Gráfico de Pareto estandarizado en modelo de primer orden para almidón resistente de ramón.

Debido a que el valor de p para la falta de ajuste en la tabla de ANOVA del almidón de makal fue de 0.0045 (Tabla 6.2), se puede aseverar que existe falta de ajuste estadísticamente significativa. Esto indica que el modelo no resulta adecuado para describir los datos observados y es necesario emplear un modelo de orden más complejo. En el caso del ramón, el valor de p (0.0945) reveló que el modelo sí es adecuado para describir las observaciones y no será necesario continuar con la experimentación.

1.2. Modelamiento de segundo orden en pirodextrinas de makal

Utilizando las estimaciones de StatGraphics Centurion se aplicó un modelo de segundo orden, agregando así seis puntos axiales ($\alpha = [2n]^{1/4}$, donde n = número de variables independientes; en este caso: $[2^3]^{1/4} = 1.683$) (Montgomery, 2011). Una vez definidos estos tratamientos complementarios, se procedió a cuantificar su contenido de almidón resistente (Tabla 6.3).

El porcentaje significativamente mayor de AR se continuó observando en el tratamiento 5 factorial (84.738%) y el porcentaje de la variabilidad en los contenidos de AR fue menor ($R^2 = 77.4231\%$). El análisis de varianza reveló que los factores que no influyeron significativamente ($p > 0.05$) en el rendimiento de AR fueron el tiempo, la interacción (Relación almidón / ácido)² y la interacción triple (C, AA y ABC, respectivamente) (Tabla 6.4) (Figura 6.3). La ecuación que describe su comportamiento en relación a los factores evaluados fue la siguiente:

$$AR\ Makal = 58.8165 - 5.6072 * Relación\ almidón / ácido - 4.87899 * Temperatura - 0.427411 * Tiempo + 0.820701 * Relación\ almidón / ácido^2 - 2.826 * Relación\ almidón / ácido * temperatura - 2.627 * Relación\ almidón / ácido * tiempo + 2.88086 * temperatura^2 - 3.025 * temperatura * tiempo + 3.46052 * tiempo^2 + 1.55475 * Relación\ almidón / ácido * temperatura * tiempo$$

Tabla 6.3. Contenido (%) de almidón resistente en pirodextrinas de makal en modelo de segundo orden.

Tratamiento	Condiciones experimentales			% AR
	Almidón:HCl 2.2 M	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	
1 (Factorial)	160:1 (-1)	90 (-1)	60 (-1)	68.99 ^{h,i,j}
2 (Factorial)	80:1 (+1)	90 (-1)	60 (-1)	73.43 ^k
3 (Factorial)	160:1 (-1)	110 (+1)	60 (-1)	66.14 ^{g,h}
4 (Factorial)	80:1 (+1)	110 (+1)	60 (-1)	53.06 ^{c,d}
5 (Factorial)	160:1 (-1)	90 (-1)	180 (+1)	84.73 ^l
6 (Factorial)	80:1 (+1)	90 (-1)	180 (+1)	72.45 ^{j,k}
7 (Factorial)	160:1 (-1)	110 (+1)	180 (+1)	63.56 ^{f,g}
8 (Factorial)	80:1 (+1)	110 (+1)	180 (+1)	46.19 ^b
9 (Central)	120:1 (0)	100 (0)	120 (0)	59.95 ^{e,f}
10 (Central)	120:1 (0)	100 (0)	120 (0)	59.86 ^{e,f}
11 (Central)	120:1 (0)	100 (0)	120 (0)	58.83 ^e
12 (Central)	120:1 (0)	100 (0)	120 (0)	56.67 ^{d,e}
13 (α, axial)	53:1 (1.68179)	100 (0)	120 (0)	49.62 ^{b,c}
14 (α, axial)	187:1 (-1.68179)	100 (0)	120 (0)	72.38 ^{j,k}
15 (α, axial)	120: 1 (0)	117 (1.68179)	120 (0)	68.02 ^{h,i}
16 (α, axial)	120: 1 (0)	83 (-1.68179)	120 (0)	65.63 ^{g,h}
17 (α, axial)	120: 1 (0)	100 (0)	221	65.15 ^{g,h}
18 (α, axial)	120: 1 (0)	100 (0)	(1.68179)	71.79 ^{i,j,k}
			19 (- 1.68179)	
Nativo	-	-	-	5.69 ^a

^{a-l} Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

Tabla 6.4. Análisis de varianza en modelo de segundo orden para almidón resistente de makal.

Factor / Interacción	Valor de <i>p</i>
A: Relación Almidón/Ácido	0.0009
B: Temperatura	0.0013
C: Tiempo	0.3762
AA	0.1513
AB	0.0135
AC	0.0165
BB	0.0067
BC	0.0112
CC	0.0040
ABC	0.0632
Falta de ajuste	0.0071

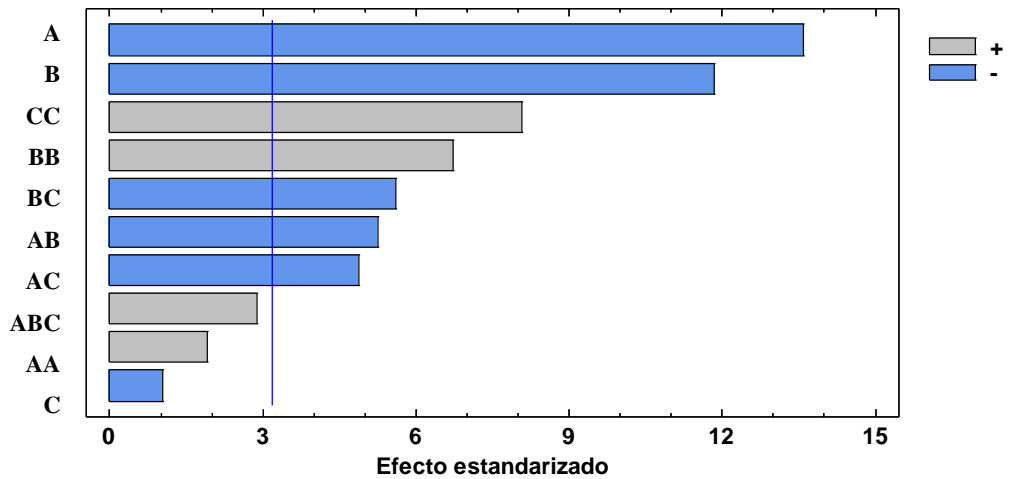


Figura 6.3. Gráfico de Pareto estandarizado en modelo de segundo orden para almidón resistente de makal.

La prueba de falta de ajuste ($p=0.0071$) (Tabla 6.4) manifestó que este modelo de segundo orden tampoco representa adecuadamente los datos y por ello se podría continuar la experimentación hacia un modelamiento de tercer orden. Sin embargo el alto contenido de material indigerible

obtenido justifica el no extender el proceso de piroconversión a un modelamiento de orden mayor. Por ello, pese a que no se obtuvo un rendimiento óptimo, el porcentaje de piroconversión alcanzado es significativamente alto (84.73%) en comparación con el almidón nativo de makal (5.69%). Es por esto que a pesar de poder seguir con el modelamiento, se decidió detener el experimento en este punto y continuar con la caracterización de la pirodextrina obtenida en el tratamiento 5 de makal.

En la literatura científica existen estudios que reportan el contenido de AR de diversos almidones piroconvertidos. Particularmente con el makal, los resultados de este trabajo revelan un rendimiento mucho mayor de AR en comparación con otros tubérculos e incluso con otras fuentes vegetales pirodextrinizadas (Tabla 6.5).

Toraya et. al. (2016) reportan un contenido de AR de 45.98% en almidón de Yuca (*Manihot esculenta*) empleando las mismas condiciones de piroconversión que se utilizaron en el presente estudio del makal. De manera similar a lo observado en el presente trabajo, estos autores encontraron que los factores que afectaron negativamente el rendimiento fueron la relación almidón/ácido, la temperatura y la interacción temperatura * tiempo. Por su parte, Jochym et. al. (2012) reportan valores de AR entre 18.6 y 67.4% tras la piroconversión de almidón de papa (*Solanum tuberosum*) utilizando diversos ácidos catalizadores.

Orozco y Betancur (2004) revelan un contenido óptimo de 49.49% así como una influencia positiva de todos los factores involucrados en la piroconversión de almidón de frijol lima (*Phaseolus lunatus*). Campechano et. al. (2007) revelan rendimientos de AR similares (47.5 – 62.7%) utilizando igualmente almidones nativos de dos variedades de frijol (*Phaseolus lunatus* y *Vigna unguiculata*).

Por otro lado, en el almidón pirodextrinizado del fruto de *Parkia biglobosa* se ha reportado un contenido de 46.3% de AR (Sankhon et. al., 2013) y en el de arroz (*Oryza sativa*) una proporción menor (22.26 – 27.14%) (Subpuch et. al., 2014).

Laurentin et. al. (2003) pirodextrinizaron diversos almidones (yuca, malanga, lenteja, maíz, sagú y sorgo) y confirman que dicho procedimiento ocasiona una disminución significativa del

almidón disponible e incrementa las fracciones indigeribles. Estos autores explican que el incremento del AR se explica por la formación de dextrinas transglucosidadas resistentes al ataque amilolítico.

Tabla 6.5. Comparación del contenido de AR en distintos almidones pirodextrinizados.

Fuente vegetal	Condiciones	Material indigerible (%)	Referencia
<i>Manihot esculenta</i>		55.7	
<i>Xanthosoma sagittifolium</i>		60	
<i>Lens esculenta</i>	A:HCl: 549.4:1, 140°C, 3 horas	55.1	Laurentin et. al., (2003)
<i>Zea mays</i>		62.2	
<i>Canna edulis</i>		65.2	
<i>Sorgum bicolor</i>		41.8	
<i>Phaseolus lunatus</i>	A:HCl: 160:1, 90° C, 1 hora	49.49	Orozco y Betancur (2004)
<i>Phaseolus lunatus</i>	A:HCl: 40:1, 140° C, 3 horas	47.5	Campechano et. al., (2007)
<i>Vigna unguiculata</i>	A:HCl: 40:1, 140° C, 3 horas	62.7	
	HCl 0.1% Ácido cítrico 0.1%, 130°C, 3 horas	19.7 – 22.2	
<i>Solanum tuberosum</i>	HCl 0.1% Ácido tartátrico 40%, 130°C, 2 horas	18.6 – 67.4	Jochym et. al., (2012)
<i>Parkia biglobosa</i>	A:HCl: 80:1, 110° C, 3 horas	46.3	Sankhon et. al., (2013)
<i>Oryza sativa</i>	HCl 0.5%, Ácido cítrico 0.5%, 130° C, 1 – 3 horas	22.36 – 27.14	Subpuch et. al., (2014)
<i>Manihot esculenta</i>	A:HCl: 160:1, 90° C, 3 horas	45.98	Toraya et. al., (2016)
<i>Brosimum alicastrum</i>	A:HCl: 80:1, 90° C, 1 hora	6.14	Fuente propia
<i>Xanthosoma yucatanense</i>	A:HCl: 160:1, 90° C, 3 horas	84.73	Fuente propia

A:HCl = Relación Almidón/Ácido clorhídrico.

También hacen hincapié en que el uso de catalizadores ácidos como HCl son necesarios para la piroconversión efectiva a temperaturas inferiores a los 200°C. Según ellos, esta dextrinización térmica conduce a la formación de 1,6-anhidro-D-glucosa (deshidratación intramolecular) y de enlaces atípicos indigeribles como 1-2, 1-3 y β -anómeros 1-4 y 1-6 (Laurentin et. al., 2003).

Este proceso de piroconversión involucra la fragmentación y re-arreglo de las cadenas de amilosa y amilopectina, usualmente en presencia del agente ácido catalizado. De esta manera los almidones piroconvertidos son el resultado de la combinación de dos reacciones consecutivas: hidrólisis y una posterior transglucosidación (Laurentin, 2005). Es precisamente esta transglucosidación la que favorece la formación de enlaces atípicos y, consecuentemente, el alto contenido de almidón resistente observado en este trabajo.

1.3. Determinación de cambio de color (ΔE)

El cambio de color (ΔE) se consideró como otra variable de respuesta para poder seleccionar el mejor tratamiento de pirodextrinización. Teniendo en cuenta que los tratamientos en donde se obtuvo un mayor contenido de AR fueron el 5 y el 2 para las pirodextrinas de makal (Tabla 6.3) y ramón (Tabla 6.1), respectivamente, se consideró particularmente el cambio de color en estas muestras.

La pirodextrina del tratamiento 5 de makal tuvo un ΔE de 3.74, el cual fue significativamente menor ($p < 0.05$) a la mayoría de los tratamientos y solamente se detectó similitud estadística ($p > 0.05$) con los tratamientos 2 y 14. En la pirodextrina del tratamiento 2 de ramón el cambio de color (2.539) fue estadísticamente igual ($p > 0.05$) a los tratamientos 3, 4, 6 y 8 (tabla 6.6).

El análisis de varianza indicó que en las pirodextrinas de makal ningún factor tuvo efectos significativos ($p < 0.05$) sobre el cambio de color. En el ramón se demostró que los factores que tuvieron efectos significativos ($p < 0.05$) sobre el ΔE fueron el tiempo así como las interacciones relación almidón/ácido * temperatura y temperatura * tiempo.

Los bajos cambios de color observados en las mejores pirodextrinas de makal y ramón revelan que no hubo variación en comparación con sus almidones nativos. Esto resulta positivo al tener en cuenta los altos cambios de color reportados para otras muestras de almidones modificados.

Tabla 6.6. Cambios de color en pirodextrinas de makal y ramón.

Tratamiento	ΔE	
	Makal	Ramón
<i>Modelo de primer orden</i>		
1	2.24 ^b	0.96 ^b
2	3.33 ^c	2.53 ^{c,d,e}
3	10.51 ^d	3.26 ^e
4	13.99 ^e	2.62 ^{d,e}
5	3.74 ^c	1.33 ^b
6	5.14 ^f	2.20 ^{b,c,d}
7	12.84 ^g	1.38 ^b
8	20.13 ^h	1.51 ^{b,c}
9	8.18 ⁱ	1.49 ^b
10	8.24 ⁱ	1.49 ^b
11	8.41 ⁱ	1.04 ^b
12	8.25 ⁱ	1.10 ^b
<i>Modelo de segundo orden</i>		
13	8.51 ⁱ	
14	3.16 ^c	
15	10.55 ^d	
16	2.24 ^b	
17	4.46 ^j	
18	1.90 ^k	
Nativo	0 ^a	0 ^a

^{a-k} Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

Los bajos cambios de color mostrados por las pirodextrinas obtenidas en el presente estudio parecen responder a las condiciones del tratamiento, específicamente a la temperatura y al ácido. En relación a esto, diversos estudios sobre piroconversión evidencian el posible efecto de condiciones extremas sobre altos cambios de color. Por ejemplo la pirodextrina óptima del almidón de frijol lima (*Phaseolus lunatus*), reportada por Orozco y Betancur (2004) mostró un ΔE de 18.86. Estos autores afirman que cuando la piroconversión se realiza aplicando condiciones extremas (alta concentración de ácido, alta temperatura y tiempo de calentamiento prolongado) se pueden obtener almidones no digeribles con cambios de color mayores.

Laurentin et. al. (2003) coinciden con lo anterior y además aseguran que cuanto mayor es la concentración del catalizador ácido, mayor será la diferencia de color debido a la naturaleza sensible de los carbohidratos al pardeamiento. En este mismo sentido, Campechano et. al. (2007) obtuvieron pirodextrinas del almidón de frijol caupí (*Vigna unguiculata*) y, utilizando temperaturas de hasta 140°C, encontraron valores de ΔE altos; entre 16.60 y 30.64.

Por otro lado, y de manera similar al presente estudio, Toraya et. al. (2016) obtuvieron un bajo ΔE (1.89) en su pirodextrina de yuca (*Manihot esculenta*), lo cual puede asociarse a que también utilizaron una temperatura menor (90°C) en su tratamiento óptimo. Por lo tanto puede concluirse que para obtener pirodextrinas con bajos cambios de color es necesario utilizar temperaturas y niveles de ácido bajos.

1.4. Microscopía

Para corroborar la presencia de gránulos intactos que sustentarían la resistencia del almidón de ramón a la piroconversión, se observaron en microscopio las muestras de los almidones nativos y de las pirodextrinas.

En el caso del makal se observó que el proceso de pirodextrinización sí fue efectivo ya que hidrolizó gran parte de los gránulos. De igual manera se observó que tanto en la muestra nativa como en la pirodextrina la estructura granular es más voluminosa que en el ramón (Figura 6.4). En el almidón de ramón se corroboró la hipótesis de la estructura granular resistente, ya que los gránulos se observaron prácticamente intactos en la muestra pirodextrinizada. (Figura 6.5).

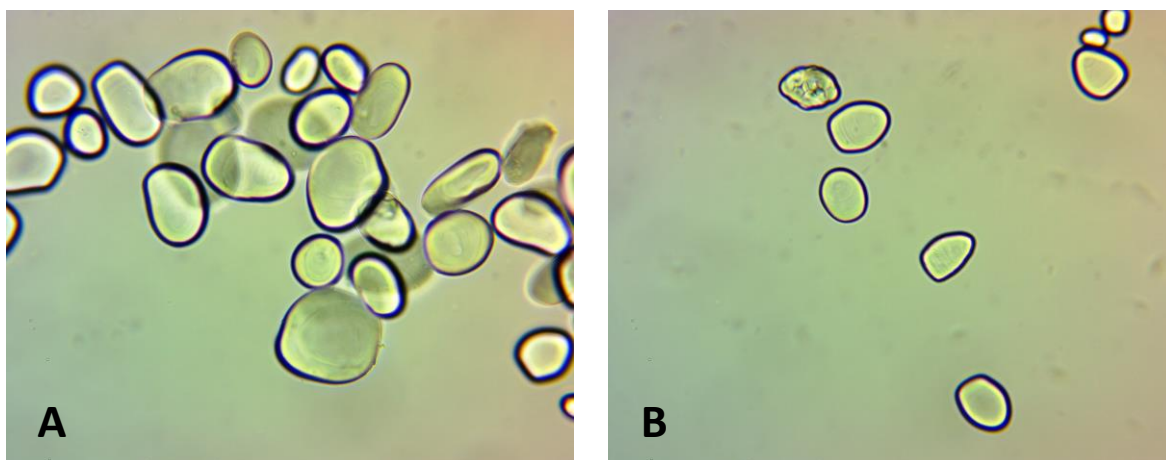


Figura 6.4. Muestras de makal. A: Almidón nativo, B: Pirodextrina del tratamiento 5.

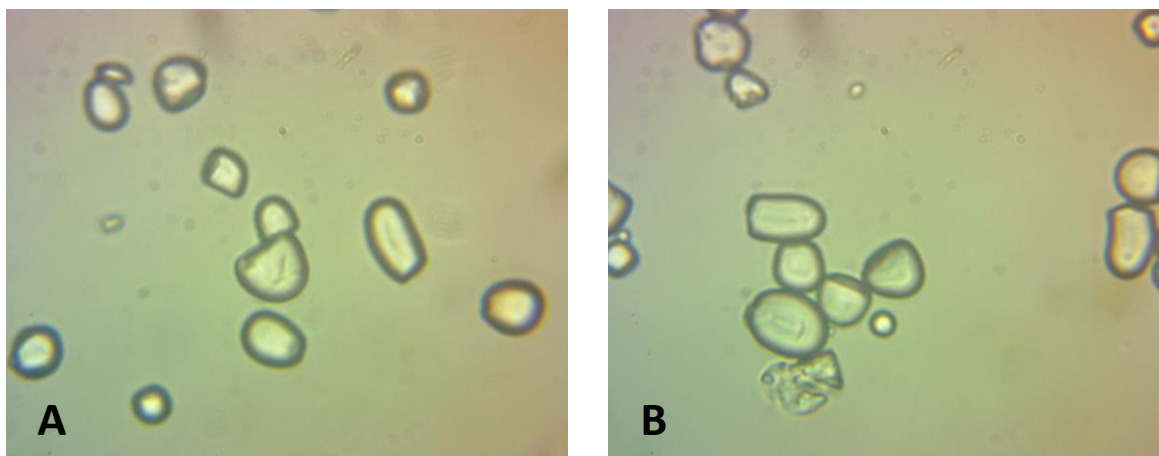


Figura 6.5. Muestras de ramón. A: Almidón nativo, B: Pirodextrina del tratamiento 2.

2. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA COMPLEMENTARIA

Mientras que en el makal fue posible alcanzar un rendimiento de 84.738% de almidón resistente en el mejor tratamiento de pirodextrinización, en el ramón se obtuvo 6.148%. Debido a esto se optó por continuar el estudio utilizando únicamente la pirodextrina 5 de makal.

En dicha muestra se ejecutó la hidrólisis complementaria para disminuir el contenido de fracciones digeribles, utilizando un método factorial 2^2 con cuatro réplicas del tratamiento central (Tabla 6.8). Al utilizar amilasa como agente hidrolizante, este método asegura la permanencia de glúcidos enzimáticamente resistentes y el desdoble de los carbohidratos digeribles. Es este residuo de carbohidratos hidrolizados el que sirve de indicador para estimar los equivalentes de dextrosa y, consecuentemente, definir a la muestra como maltodextrina o no.

2.1. Secado por aspersión

Debido a que cada tratamiento de la hidrólisis se realizó en medio húmedo fue necesario aplicar un método de secado adecuado para posteriormente estimar los equivalentes de dextrosa. Inicialmente se utilizó liofilización pero por el alto contenido de carbohidratos fue difícil obtener un secado completo. Posteriormente se probó secado por aspersión en un equipo Spry Dryer SD-05 Lab Plant, siendo este más apropiado para la obtención de pirodextrina deshidratada. Las condiciones utilizadas se enlistan en la Tabla 6.7.

Tabla 6.7. Condiciones del secado por aspersión.

Parámetro	Valores
Temperatura de entrada	135 °C
Temperatura de salida	80 – 90 °C
Diámetro de boquilla de alimentación	0.75 mm
Velocidad de flujo de aire de secado	62 m ³ /hr
Velocidad de flujo de bomba	560 mL/hr

2.2. Equivalentes de dextrosa (ED)

Se determinaron los equivalentes de dextrosa (ED) en cada tratamiento de la hidrólisis complementaria previamente secado. El análisis de varianza indicó que existieron diferencias estadísticas significativas entre ellos ($p < 0.05$) y la post prueba de Duncan ($p < 0.05$) reveló que los tratamientos homogéneos fueron el 2, 4 y los centrales. Destacó el tratamiento 1 factorial ya que mostró un ED menor a los demás (Tabla 6.8).

Tabla 6.8. Equivalentes de dextrosa en maltodextrinas enzimáticamente resistentes de makal.

Tratamiento	Factores y niveles		Equivalentes de dextrosa (%)
	Enzima (%)	Tiempo de reacción (min)	
1 (Factorial)	0.05	10	13.89 ^a
2 (Factorial)	0.1	10	36.56 ^b
3 (Factorial)	0.05	30	24.24 ^c
4 (Factorial)	0.1	30	33.85 ^b
5 (Central)	0.075	20	36.18 ^b
6 (Central)	0.075	20	35.70 ^b
7 (Central)	0.075	20	38.03 ^b
8 (Central)	0.075	20	32.29 ^b

^{a-c} Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

El ED se define como el porcentaje de azúcares reductores de un hidrolizado calculado como glucosa en base seca. En consecuencia, el ED del almidón es cero y el de la glucosa es 100 (Vidal, 2010). Una aplicación útil de este parámetro es para definir las maltodextrinas ya que para ser denominadas como tal no deben poseer más del 20% de azúcares reductores; es decir, tener un ED menor de 20 (Antonio et. al., 2009).

Para fines de este estudio el ED se empleó para determinar la mejor maltodextrina enzimáticamente resistente (MER) de la hidrólisis complementaria. De esta manera, debido a que mostró un ED menor a 20 y estadísticamente inferior ($p < 0.05$) al resto de los tratamientos (Tabla 6.8), se seleccionó la MER correspondiente al tratamiento 1. A esta muestra se le determinó nuevamente su contenido de AR y su ΔE , observando que, tal como se esperaba, incrementó a $90.73\% \pm 2.9$ su material indigerible y a 4.24 ± 0.15 su cambio de color.

Se han producido maltodextrinas a partir de otros tubérculos y en ellas se reportan valores de ED similares a los del presente trabajo. En este sentido, Antonio et. al. (2009) reportan maltodextrinas generadas por vía enzimática a partir de malanga (*Colocasia esculenta*) con ED de entre 15.12% y 17.48%. De manera similar, Montañez et. al. (2002) hidrolizaron enzimáticamente almidón de papa (*Solanum tuberosum*) y alcanzaron valores entre 6.10% y 19.10% de ED.

En la literatura existen diversos estudios que evidencian el efecto de los factores involucrados en la hidrólisis complementaria de pirodextrinas sobre su grado de hidrólisis. El trabajo de Jochym et. al. (2012) particularmente parece revelar la sinergia entre ácidos catalizadores para incrementar el grado de polímeros hidrolizados. Estos investigadores encontraron que la utilización de ácido clorhídrico en combinación con ácido tartárico produce MER de papa (*Solanum tuberosum*) con un grado de ED mayor, que al utilizar ácido clorhídrico con ácido cítrico. Los valores de ED reportados en su estudio fueron de 29% y 16%, respectivamente, lo que contrasta con el ED de 13.89% obtenido en la MER de makal. Esta situación puede deberse a que en el presente estudio solamente se utilizó un ácido catalizador (ácido clorhídrico).

De igual manera parece ser que la concentración de enzima y el tiempo de reacción son claves para obtener bajos grados de hidrólisis y, consecuentemente, bajos contenidos de ED. En este sentido, el trabajo de Toraya et. al. (2016) propone dos métodos de hidrólisis para conseguir ED en MER de yuca (*Manihot esculenta*) de entre 25.45% y 48.82%. En el primer experimento los autores usaron niveles altos (0.05 – 0.1 % de enzima y 10 – 30 minutos de hidrólisis) y obtuvieron altos ED. En el segundo método alcanzaron bajos ED, pero aplicaron niveles menores de hidrólisis (0.01 – 0.05 % de enzima y 5 – 15 minutos de hidrólisis).

Finalmente estos autores concluyen que pese a que sus mejores MER rebasan el rango permitido de ED para maltodextrinas, usar niveles todavía más bajos podría ser técnicamente inviable. También es preciso señalar que sus resultados discrepan con el presente trabajo, ya que en las MER de makal se utilizaron las condiciones altas que ellos reportan pero alcanzando menor ED.

3. CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO

Se determinaron las temperaturas (T°_{GEL}) y la entalpías de gelatinización (ΔH) de los mejores tratamientos de makal (pirodextrina y MER). De igual manera se decidió escanear la pirodextrina óptima de ramón para complementar la justificación de su bajo rendimiento de material indigerible.

En tanto a las mejores pirodextrinas de makal (tratamiento 5 factorial) y de ramón (tratamiento 2 factorial), fue posible observar que las T°_{GEL} fueron diferentes ($p < 0.05$) entre ellas pero

similares a las reportadas para sus almidones nativos respectivos (Hernández et. al., 2008) (Pérez et. al., 2014). En tanto a la ΔH , se evidenció que las pirodextrinas estudiadas poseen valores inferiores a lo reportado para su almidón nativo correspondiente (Hernández et. al., 2008) (Pérez et. al., 2014) (Tabla 6.9). En tanto a la mejor MER de makal (tratamiento 1 factorial), no fue posible detectar en ella los valores de T°_{GEL} ni de ΔH .

Lo anterior parece indicar que el proceso de pirodextrinización no modifica la temperatura de gelatinización pero sí disminuye la energía necesaria para alcanzar esta condición. No obstante, pese a que la ΔH disminuye en ambos casos, se observa que en la pirodextrina de ramón es más alta (16.63 J/g) que la alcanzada en el makal (12.23 J/g) (Tabla 6.9). Precisamente aquí puede radicar la justificación de los bajos rendimientos de material indigerible en las muestras de ramón, puesto que la alta ΔH sustenta la presencia de los gránulos nativos resistentes observados en la muestra pirodextrinizada (Figura 6.5-B). Esta resistencia granular puede deberse a las fuerzas de enlace entre las dobles hélices que forman los cristales de amilosa en ciertos almidones nativos, las cuales dan lugar a estrechos puentes de hidrógeno dentro de la molécula de almidón (Aristizábal et. al., 2007).

Otro aspecto detectado fue que el almidón nativo de ramón posee una ΔH mayor que su pirodextrina, suponiendo así una mayor resistencia a los procesos físicos que a los enzimáticos. Esto debido a que la muestra nativa al ser solo sometida al calor del calorímetro produce un valor relativamente elevado de ΔH pero, tras ser hidrolizada con calor más ácido durante la pirodextrinización, la ΔH se reduce notablemente (Tabla 6.9).

Tabla 6.9. Temperaturas (T°_{GEL}) y entalpías (ΔH) de gelatinización en almidones nativos y pirodextrinas estudiadas.

	Makal		Ramón	
	Almidón nativo (Hernández et. al., 2008)	Pirodextrina	Almidón nativo (Pérez et. al., 2014)	Pirodextrina
T°_{GEL} ($^{\circ}C$)	78.4	77.11 ^a	83.05	81.28 ^b
ΔH (J/g)	14.9	12.23 ^a	21.42	16.63 ^b

^{a-b} Letras diferentes en la misma fila indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

Los cambios observados en las pirodextrinas y la nula respuesta detectada en la MER de makal parecen responder a la estructura granular fragmentada por los diversos procesos de hidrólisis. Debido a que en la MER, además de la piroconversión, existe un tratamiento enzimático complementario, podemos suponer que posee gránulos altamente desordenados que no fueron capaces de mostrar las transiciones térmicas valoradas (T°_{GEL} y ΔH).

Específicamente, la reducción registrada en la ΔH puede deberse a que la hidrólisis ácida en condiciones de poca humedad ataca principalmente las regiones superficiales del almidón nativo (Subpuch et al., 2014), alterando así su estructura granular característica (Sankhon et al., 2013). De esta manera, es probable que la piroconversión produjo un gránulo parcialmente fragmentado que demandó una menor energía para alcanzar la pérdida total de su estructura (gelatinización). Otro aspecto que puede sustentar la diferencia de las ΔH de pirodextrinas y MER en relación a sus nativos, es el hecho de que los almidones con estructura de tipo B (principalmente tubérculos) tratados térmicamente poseen una reducida estabilidad térmica que genera menores entalpías en los estudios de calorimetría diferencial de barrido (Lim et al., 2002).

Según Sankhon et al. (2013), la disminución de la entalpía observada en las pirodextrinas también puede atribuirse a que en la piroconversión existe una transformación parcial de la zona cristalina interna en una fase amorfa (debido a la hidrólisis). Por lo tanto, debido a que según ellos las regiones amorfas se funden más fácilmente, fue posible observar una menor demanda de energía.

Lim et al. (2002) coinciden con lo anterior y además afirman que los cambios inducidos por el tratamiento térmico ocurren primordialmente en las regiones amorfas del gránulo y tienen efectos limitados sobre las cristalinas. Ya que son precisamente estas zonas cristalinas las involucradas en el fenómeno de gelatinización (Campechano et al., 2007), es probable que por eso no se hayan observado diferencias tan marcadas entre las T°_{GEL} registradas para las pirodextrinas y sus almidones nativos.

En la piroconversión documentada para el almidón de frijol lima (*Phaseolus lunatus*) se observan dichos fenómenos, puesto que prácticamente no se apreciaron cambios en la T°_{GEL}

(81.6°C y 80.2°C) pero sí una disminución notoria de la ΔH (7.6 J/g) en relación a su nativo (10.4 J/g) (Campechano et. al., 2007). El estudio de piroconversión en frijol africano (*Parkia biglobosa*) también secunda lo anterior al reportar una disminución marcada de la ΔH posterior al proceso de pirodextrinización; de 13.93 J/g para el nativo hasta 8.81 J/g para su pirodextrina. No obstante, esta pirodextrina sí mostró una disminución mucho más drástica en su temperatura de gelatinización (72.4 °C) respecto a su nativo (89.6 °C) (Sankhon et. al., 2013). En tanto a la MER, en el trabajo de Toraya et. al. (2016) también se obtuvieron resultados similares al presente trabajo ya que su maltodextrina resistente tampoco mostró respuesta térmica alguna en el termograma respectivo. Los autores igualmente asocian esta situación a la fracción cristalina remanente.

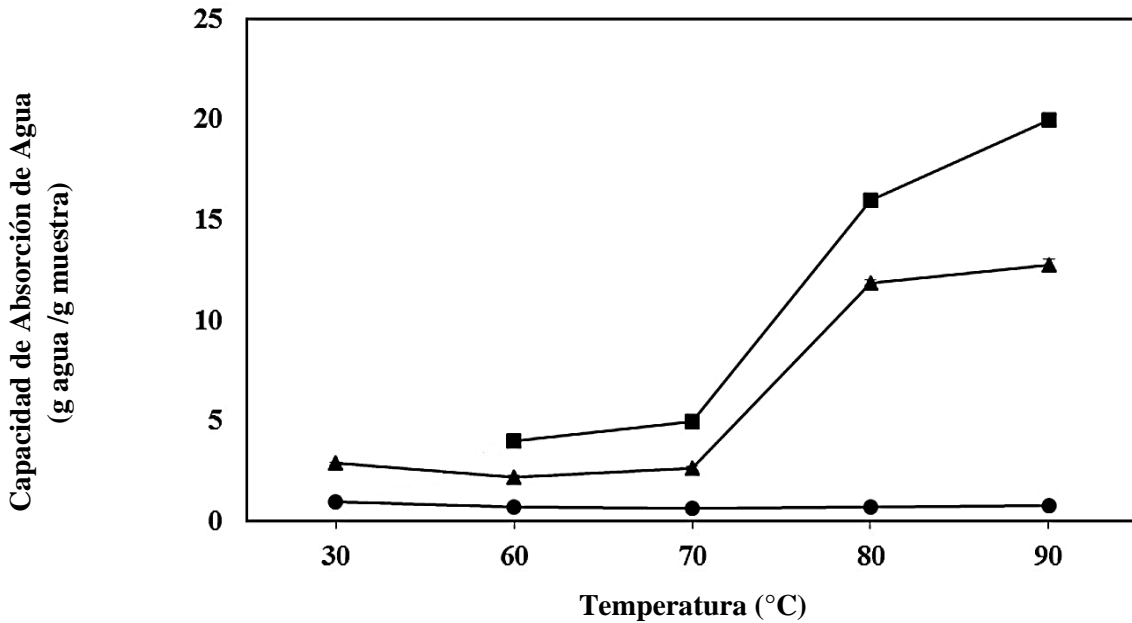
4. EVALUACIÓN DE PROPIEDADES DE HIDRATACIÓN

El perfil de propiedades de hidratación se realizó solamente sobre los mejores tratamientos derivados del almidón de makal (pitodextrina 5 y MER 1). Los resultados demostraron que la capacidad de absorción de agua (CABA) fue mayor en la pirodextrina de makal, alcanzando sus valores máximos a partir de los 80°C. La MER mostró valores de absorción de agua muy bajos y prácticamente sin diferencias estadísticas en las temperaturas evaluadas. En relación al almidón nativo, la CABA presentó valores más altos que las muestras de estudio desde temperaturas iniciales (Hernández et. al., 2008) (Figura 6.6).

En la pirodextrina no se observó diferencia estadística ($p>0.05$) en el poder de hinchamiento (PH) registrado a temperaturas tempranas (30, 60 y 70°C). No obstante, a partir de los 80°C se detectó un incremento estadístico ($p<0.05$) en los valores. Esta misma tendencia se reportó para el almidón nativo de makal, pero con valores mucho mayores; 2, 6, 23 y 30 g de agua / g muestra para 60, 70, 80 y 90°C, respectivamente (Hernández et. al., 2008). En el caso de la MER se determinó que la muestra no poseía la capacidad de hinchar los gránulos (Figura 6.7).

Respecto al índice de solubilidad (IS), en el caso de la pirodextrina se demostró un incremento significativamente diferente ($p<0.05$) y gradual conforme se aumentó la temperatura. Igualmente se evidenció que los datos del IS posterior a los 80°C fueron similares entre la pirodextrina y el almidón nativo, siendo la solubilidad de la pirodextrina mayor desde

temperaturas iniciales. En la MER se observó el máximo IS en todas las temperaturas evaluadas (Figura 6.8).



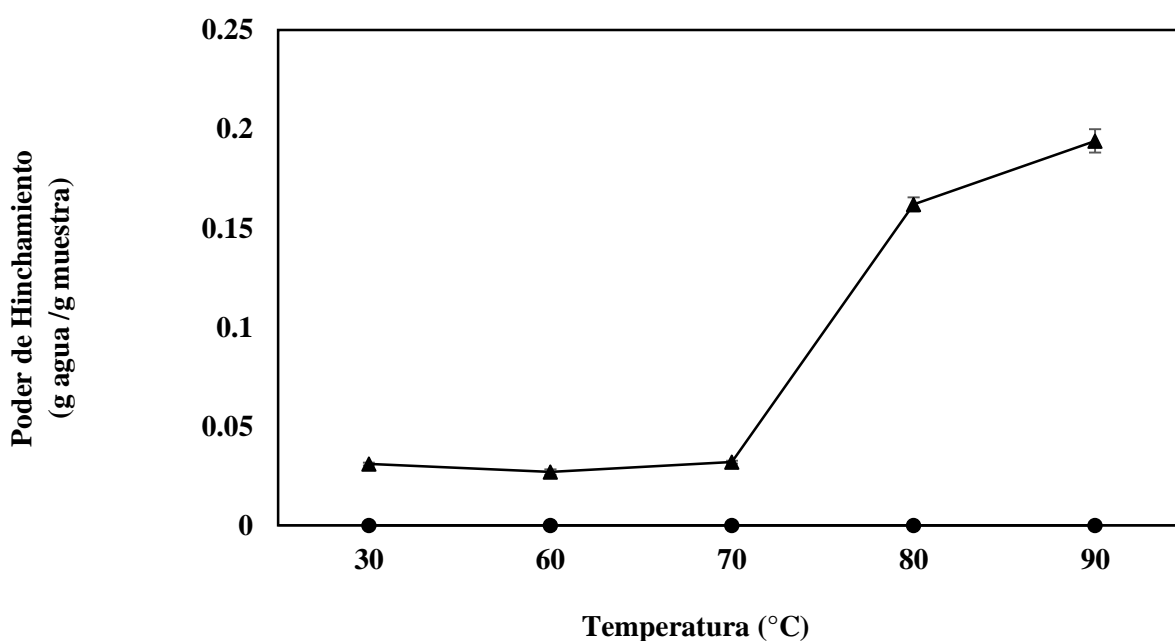
(▲) Pirodextrina	2.89 ^b	2.24 ^a	2.65 ^{a,b}	11.88 ^c	12.75 ^d
(●) MER	0.99 ^c	0.74 ^{a,b}	0.64 ^a	0.72 ^{a,b}	0.81 ^{b,c}
(■) Almidón Nativo	ND	4	5	16	20

Figura 6.6. Capacidad de Absorción de Agua de los mejores tratamientos del makal.

ND = No Determinado. ^{a-d} Letras diferentes en la misma fila indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

El aumento gradual observado en la CABA de la pirodextrina se debió principalmente al incremento de temperatura. Lo anterior debido a que tras la aplicación de calor y conforme se alcanzó la T°_{GEL} , las moléculas vibraron rompiendo los puentes de hidrógeno intermoleculares de las zonas amorfas de los gránulos (Pineda et. al., 2010). Esto muy probablemente generó una exposición de grupos hidroxilos, los cuales finalmente interaccionaron con el agua e incrementaron gradualmente la CABA (Ríos et. al., 2016).

Por otro lado, la escasa absorción de agua evidenciada en la MER parece deberse al doble tratamiento hidrolizante que sufrió esta muestra ya que según Ulbrich et. al. (2015) en las muestras hidrolizadas y de baja humedad ($a_w < 0.2$) existe la pérdida de sitios de sorción disponibles. Esto causado por la eliminación de carbohidratos en las regiones no muy ordenadas, a algunos reordenamientos en el umbral entre regiones amorfas y cristalinas, así como a la cristalización de fragmentos lineales cortos principalmente de amilopectina degradada molecularmente.



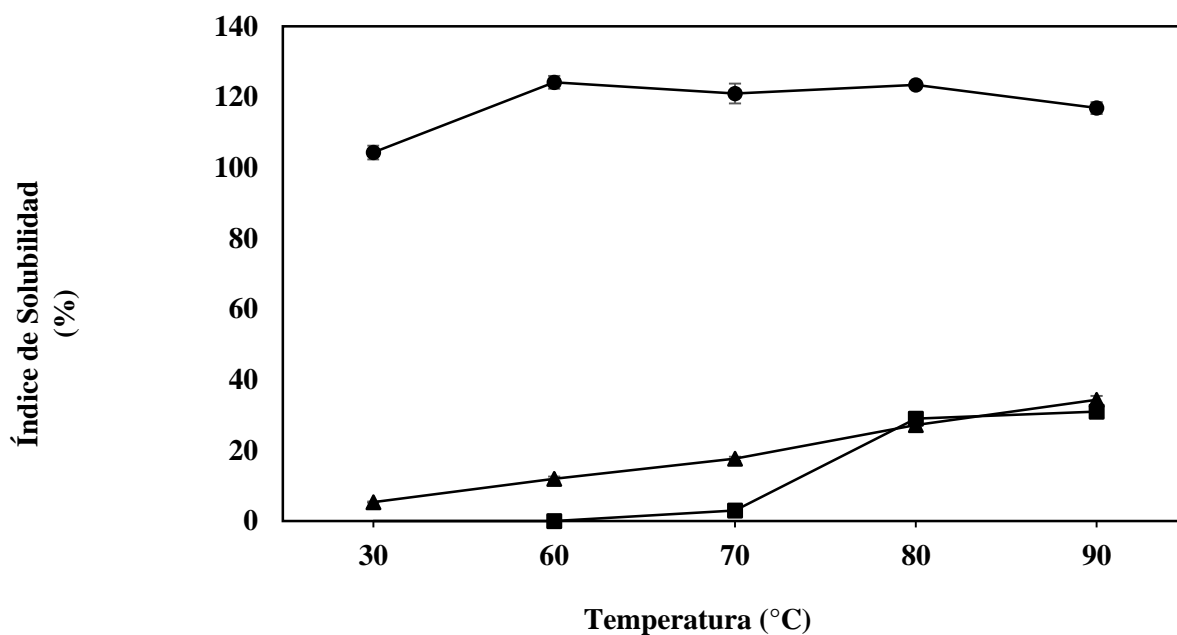
(▲) Pirodextrina	0.03 ^a	0.02 ^a	0.03 ^a	0.16 ^b	0.19 ^c
(●) MER	0	0	0	0	0

Figura 6.7. Poder de Hinchamiento de los mejores tratamientos del makal.

^{a-c} Letras diferentes en la misma fila indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

La pérdida del orden amorfo al alcanzar la T°_{GEL} descrita anteriormente para la pirodextrina pudo provocar también el hinchamiento (aumento de volumen) observado, puesto que la estructura se encontró parcialmente expuesta y el agua difundió más fácilmente hacia el interior

(Aristizábal et. al., 2007). Por esto mismo fue posible detectar el incremento abrupto del PH en la pirodextrina a partir de los 80°C, ya que su T°_{GEL} determinada fue de 77.11°C. De manera similar que en la CABA, la MER no mostró PH probablemente porque la hidrólisis extensiva generó una pérdida de carbohidratos en las regiones no muy ordenadas (Ulbrich et. al., 2015), lo que produjo una estructura abierta, muy inestable e incapaz de embeber agua.



(▲) Pirodextrina	5.33 ^a	11.97 ^b	17.63 ^c	27.17 ^d	34.34 ^e
(●) MER	104.28 ^a	124.15 ^b	120.99 ^b	123.47 ^b	116.87 ^b
(■) Almidón Nativo	ND	0	3	29	31

Figura 6.8. Índice de Solubilidad de los mejores tratamientos del makal.

ND = No Determinado. ^{a-e} Letras diferentes en la misma fila indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

La justificación de la baja absorción de agua y bajo poder de hinchamiento que mostró la pirodextrina, en relación a su nativo, se encuentra en la reorganización que sufre la estructura como consecuencia de la piroconversión. En relación a esto, diversos estudios de microscopía

electrónica de barrido justifican que la pirodextrinización parece hacer más compactas, densas y reticuladas ciertas estructuras granulares remanentes. Lo anterior a razón de un incremento en el reordenamiento del gránulo que promueve nuevas interacciones internas (Parker y Ring, 2001) (Sankhom et. al., 2013). Una de estas interacciones es la formación ordenada de dobles hélices de amilopectina entre cadenas hidrolizadas adyacentes (Subpuch et. al., 2014).

Por ello se puede suponer que la estructura parcialmente compacta y cristalina de la pirodextrina permitió una menor interacción y, por ende, una menor absorción de agua que su nativo. Esta misma reticulación asociada a la amilopectina puede ser también la responsable del menor PH de la pirodextrina en relación al almidón nativo, ya que esto pudo limitar la difusión de agua hacia el interior de la estructura.

La razón del mayor IS (así como del menor PH) de la MER en comparación con la pirodextrina puede asociarse al proceso de hidrólisis complementaria, por la acción específica de la amilasa. Ya que esta enzima hidroliza preferencialmente las regiones amorfas (Bonilla et. al., 2014), pudieron fragmentarse los remanentes de amilosa y amilopectina de la pirodextrina y entonces la estructura hidrolizada de la MER resultante (dextrinas) fue mucho más afín con el medio acuoso. Aristizábal et. al. (2007) además aseguran que cuando la temperatura de la suspensión es superior a la T°_{GEL} , los puentes de hidrógeno internos continúan destruyéndose haciendo que las moléculas de agua empiecen a anexarse a los hidroxilos liberados; generando así un incremento progresivo de la solubilidad.

De esta manera puede suponerse que la estructura hidrolizada de la MER fue incapaz de retener agua, ya que más bien se encontraba completamente solubilizada y dispersa. Por ello fue posible observar en la MER valores nulos de absorción de agua e hinchamiento y máximos porcentajes de solubilidad.

5. EVALUACIÓN DEL CONSUMO DE LAS MEJORES PIRODEXTRINAS Y MALTODEXTRINAS ENZIMÁTICAMENTE RESISTENTES SOBRE EL ESTADO DE SACIEDAD

5.1. Sujetos de estudio, tratamientos y alimentos utilizados

La evaluación se llevó a cabo en 11 voluntarios adultos sanos (Tabla 6.10), todos ellos estudiantes del Instituto Tecnológico de Mérida. Se siguieron los lineamientos de la Declaración de Helsinki (Asociación Médica Mundial, 2013) y todos los participantes expresaron su inclusión voluntaria firmando una carta de consentimiento informado (Anexo 1).

La asignación de los tratamientos se realizó al azar con la finalidad de que en cada sesión experimental se evalúe uno diferente y se evite cualquier tipo de sesgo (Tabla 6.11). Los tratamientos evaluados fueron: Fibersol-2® como control positivo, maltodextrina enzimáticamente resistente (MER) de makal #1, pirodextrina de makal #5 y agua como control negativo.

Tabla 6.10. Características de la población de estudio ($n = 11$).

Característica	Valor
Género (Masculino/Femenino)	5/6
Edad (años)	24.4 ± 3.5
Circunferencia de cintura (cm)	86.5 ± 12.8
Peso (kg)	65.2 ± 11.8
Talla (m)	1.6 ± 0.09
IMC (kg/m ²)	24.1 ± 2.4
Grasa (%)	31.1 ± 6.8
Músculo (%)	30.9 ± 5.7
Presión arterial sistólica (mm Hg)	103.6 ± 6.7
Presión arterial diastólica (mm Hg)	70 ± 7.7

Tabla 6.11. Secuenciación de los tratamientos.

Sujeto de estudio	Sesiones experimentales			
	1	2	3	4
1	C	D	B	A
2	A	C	D	B
3	C	B	A	D
4	A	C	B	D
5	C	B	A	D
6	A	D	B	C
7	C	B	A	D
8	B	D	C	A
9	B	D	A	C
10	D	A	B	C
11	B	A	C	D

A: Fibersol-2®, B: MER, C: Pirodextrina, D: Agua.

En tanto a los alimentos, la colación (tiempo 0') consistió en leche semidescremada acompañada con hojuelas de maíz sin azúcar. Los ingredientes, el tamaño de la porción así como el aporte calórico de cada platillo se desglosan en la Tabla 6.12.

Tabla 6.12. Características de los platillos consumidos.

Característica	Leche con hojuelas de maíz
Porción	240 ml de leche semidescremada 30 gr de hojuelas de maíz no azucaradas
Kcal	226.7
Proteínas (gr)	9.6
Lípidos (gr)	4.4
Carbohidratos (gr)	36.9

5.2. Análisis sensorial de la saciedad

Se aplicaron escalas visuales análogas (EVA) durante los tiempos 0', 60', 120' y 180' para poder determinar la sensación de saciedad generada por los diferentes tratamientos. Se utilizaron estas herramientas ya que han demostrado ser instrumentos de medida reproducibles y sensibles a la manipulación experimental en los estudios de validación de hambre/saciedad (Clark y Slavin, 2013). Para fines de este trabajo, las EVA's empleadas incluyeron la valoración de cuatro indicadores sensoriales a través de cuatro interrogantes: Hambre (¿Cuánta hambre tienes?), consumo prospectivo (¿Cuánto crees que puedas comer?), saciedad (¿Cómo de satisfecho te sientes?) y plenitud (¿Cómo de lleno te sientes?).

La evolución posprandial (hasta 180 minutos) de los indicadores sensoriales se evaluó mediante el análisis en los diferentes tiempos y se determinó el área bajo la curva (AUC). El AUC se calculó de forma geométrica siguiendo el método trapezoidal y utilizando el programa estadístico GraphPad Prism 6. Inicialmente los datos fueron normalizados, tomando como referencia las puntuaciones referidas en el tiempo 0'.

En tanto al hambre los resultados revelaron que el agua generó una respuesta estadísticamente mayor ($p < 0.05$) al resto de los tratamientos y que tanto la pirodextrina como el Fibersol-2® produjeron los menores valores ($p < 0.05$) a nivel posprandial. No obstante, el hambre inducida por la pirodextrina no mostró diferencia ($p > 0.05$) en relación a la MER (Figura 6.9). La valoración del consumo prospectivo (estimación de cuánto alimento más se puede ingerir) concluyó que el agua fue el tratamiento que produjo una respuesta mayor ($p < 0.05$). Las respuestas generadas por el Fibersol-2®, la MER y la pirodextrina fueron menores a la del agua y además estadísticamente iguales ($p > 0.05$) (Figura 6.10). La evaluación de la sensación de saciedad evidenció que no hubieron diferencias estadísticas ($p > 0.05$) entre las respuestas generadas por el Fibersol-2®, la MER y el agua. La pirodextrina resultó ser el tratamiento que indujo una sensación de saciedad estadísticamente mayor ($p < 0.05$) (Figura 6.11). Esta misma situación se replicó en la percepción de llenado, puesto que la muestra que generó una sensación de plenitud mayor ($p < 0.05$) fue la pirodextrina (Figura 6.12).

Para fines de discusión se agruparán los indicadores evaluados en dos principales rubros: Indicadores de apetito: hambre y consumo prospectivo; e indicadores de satisfacción: saciedad y plenitud. En el primer grupo destacó el agua como el tratamiento que mostró las respuestas significativamente diferentes y más altas. En relación a esto Gerstein et. al. (2004) aclara que pese a que algunos estudios reconocen al agua como un agente promotor de la saciedad, el efecto realmente depende del incremento de volumen que genera al asociarse con otros nutrientes (principalmente fibra y proteína). Por ello se puede concluir que el agua generó mayores respuestas, tanto de hambre como de consumo prospectivo, ya que se administró sin la incorporación de ningún nutriente.

Las percepciones inducidas por el Fibersol-2®, la MER y la pirodextrina en los dos indicadores de apetito fueron menores a la del agua y prácticamente iguales entre ellas; la única diferencia estadística se observó en la sensación de hambre entre el Fibersol-2® y la MER. Esta menor respuesta observada en los tres tratamientos positivos puede encontrar su justificación en dos de las principales características de dichos de compuestos: Resistencia a la digestión intestinal y solubilidad.

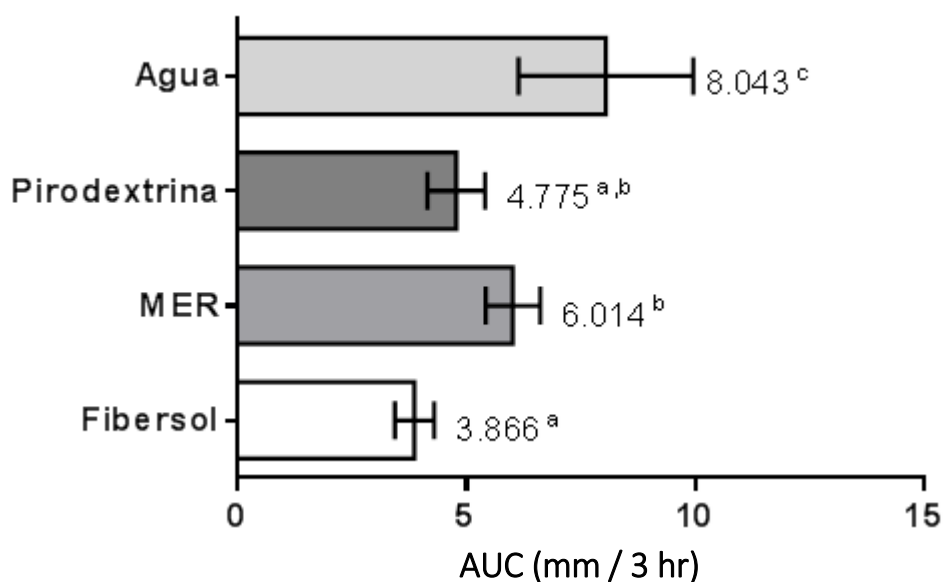


Figura 6.9. Hambre posprandial generada por los tratamientos estudiados.

^{a-c} Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

Tanto el Fibersol-2® (Cho y Almeida, 2012), como la pirodextrina (Laurentin et. al., 2005) y la MER (Toraya et. al., 2016) son dextrinas que poseen una estructura correspondiente a la fibra soluble por los enlaces atípicos e indigeribles que poseen y por su capacidad para formar puentes de hidrógeno con el agua. En este sentido, Slavin y Green (2007) afirman que, debido a su capacidad de incrementar el bolo y de retardar la fase intestinal de digestión y absorción, las fibras solubles se reconocen como agentes inhibidores del hambre. Este potencial de aumentar el bolo pudiera verse reflejado en los resultados obtenidos para la capacidad de retención de agua de la pirodextrina y de la MER, ya que la proporción de incremento de peso húmedo en ellas fue de 1:3 y 1:1, respectivamente (Figura 6.6).

Monsivais et. al. (2011) describen además al índice glicémico (IG) como otro elemento determinante en la restricción del hambre y del consumo prospectivo y que pudo estar asociado a los tres tratamientos positivos. Estos autores afirman que los estímulos provocadores de una baja glicemia posprandial (bajo IG) están asociados con puntuaciones de apetito y consumo energético más bajos, que los estímulos isoenergéticos que inducen una mayor respuesta glicémica. En este mismo sentido, tanto en la pirodextrina como en la MER se puede suponer un bajo IG en función a su alto contenido de almidón resistente (Tabla 6.3) y a su bajo equivalente de dextrosa (Tabla 6.8), respectivamente. El estudio realizado por Kendall et. al. (2008) secunda esta hipótesis ya que comprobó una menor respuesta glicémica e insulínica posprandial en dextrinas solubles y enzimáticamente resistentes obtenidas de maíz. Brouns et. al. (2007) también confirman dicha suposición ya que establecieron un IG de 58 en su maltodextrina retrograda resistente a la digestión. El Fibersol-2® como tal se ha asociado con un bajo IG (Okuma y Kishimoto, 2004), por lo que en los tres tratamientos pudiera confirmarse esta asociación entre el bajo IG y la inhibición del apetito.

Además de lo anterior, Nazare et. al. (2011) detallan en una investigación, otra vía que justifica la supresión del hambre por parte de las dextrinas enzimáticamente resistentes. Estos investigadores descubrieron que la ingestión de una colación acompañada con 50 gr de dextrina resistente disminuyó la concentración sérica de grelina. Debido a que esta hormona es la encargada de estimular el apetito (Vásquez y Ulate, 2010), pudiera suponerse que los tres

tratamientos positivos del presente trabajo inhibieron indirectamente el hambre; ya que a la vez impidieron la secreción de grelina.

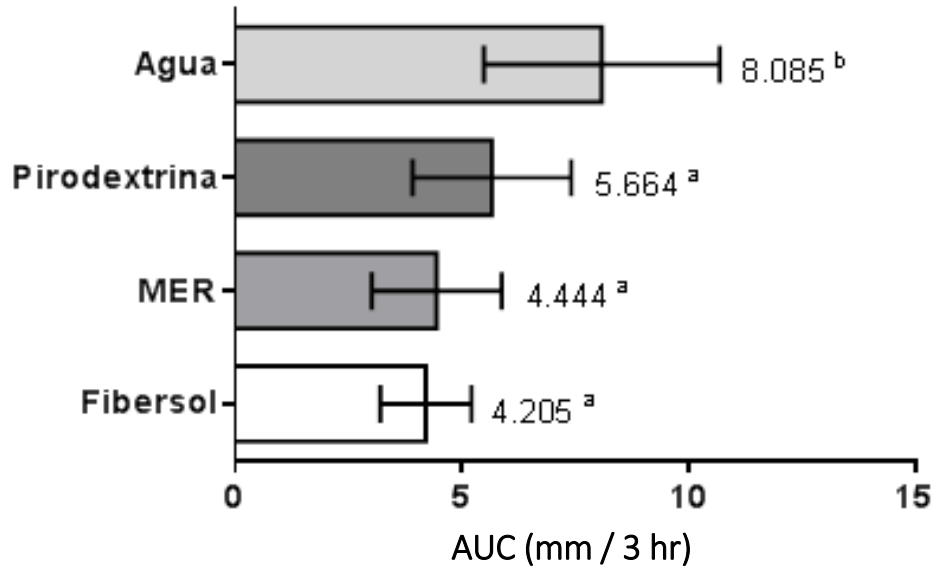


Figura 6.10. Consumo prospectivo posprandial generado por los tratamientos estudiados.

^{a-b} Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

En relación a los indicadores de satisfacción, los resultados revelaron como mejor agente inductor de saciedad y plenitud a la pirodextrina. Estadísticamente no se encontraron diferencias en el resto de los tratamientos en los dos indicadores evaluados. En relación a esto, Tan et. al. (2016) mencionan que las fibras con altas capacidades de retención de agua pueden incrementar la distensión gástrica debido a la expansión de su volumen hasta ocho veces en el estómago. Según dichos autores esto favorece la sensación de saciedad probablemente por una señal vagal de plenitud. Burton et. al. (2017) coinciden con lo anterior y además afirman que la alta capacidad de retención de agua de ciertas fibras solubles retrasa la tasa de digestión y absorción de nutrimentos, a la vez que favorece la liberación de hormonas reguladoras de la ingestión de alimentos. Todo lo anterior cobra relevancia al tener en cuenta los resultados de las propiedades de hidratación del presente estudio, ya que la muestra que mostró mayores valores de retención de agua (Figura 6.6) e hinchamiento (Figura 6.7) fue precisamente la pirodextrina.

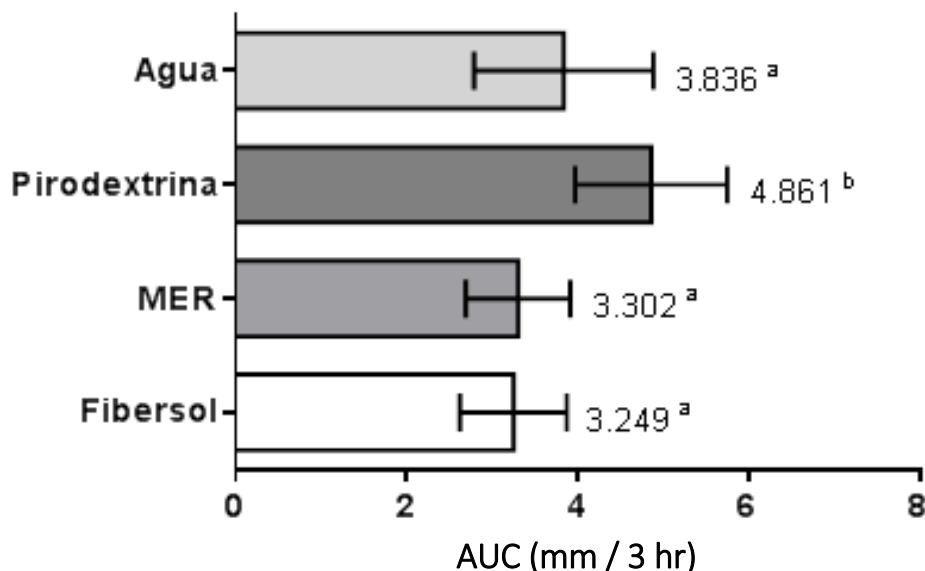


Figura 6.11. Saciedad pospandrial generada por los tratamientos estudiados.

^{a-b} Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

Cabe mencionar que existen numerosos reportes que indican que la sensación de saciedad se atribuye principalmente a fibras solubles viscosas, sobre las no viscosas (Hoad et. al., 2004). En tanto a esto se sabe que las fibras altamente viscosas generan un estado de saciedad temprana incluso a dosis bajas (Slavin y Green, 2007), tanto en humanos como en animales (Tan et. al., 2016). Sin embargo los resultados del presente trabajo indicaron lo contrario ya que la pirodextrina, quien se comporta como fibra soluble y es escasamente viscosa (Laurentin et. al., 2005), fue el tratamiento que presentó un incremento estadístico de la saciedad. Wanders et. al. (2011) reportan un comportamiento similar al obtenido en este estudio, ya que en su revisión bibliográfica sobre los efectos de la fibra dietética en apetito, consumo calórico y peso corporal identifican a las dextrinas resistentes poco viscosas como agentes inductores de saciedad.

Pese al alcance agudo de presente proyecto, existe evidencia científica que respalda la inducción de saciedad a partir del consumo de dextrinas solubles, poco viscosas y resistentes bajo un efecto crónico. En este sentido, Guérin et. al. (2011) aseveran que ácidos grasos de cadena corta

(principalmente butirato), producidos como consecuencia de la fermentación colónica de dichas dextrinas, ejercen un efecto promotor del estado de saciedad y plenitud. La justificación a lo anterior se encuentra en el trabajo de Zhou et. al. (2006), donde se documentó la capacidad del butirato para favorecer la expresión de genes codificantes de dos de los principales péptidos intestinales moduladores de saciedad: PYY y GLP-1. Por lo anterior se recomienda continuar la investigación de pirodextrinas y MER sobre la liberación de PYY y GLP-1, bajo modelos de periodicidad crónica.

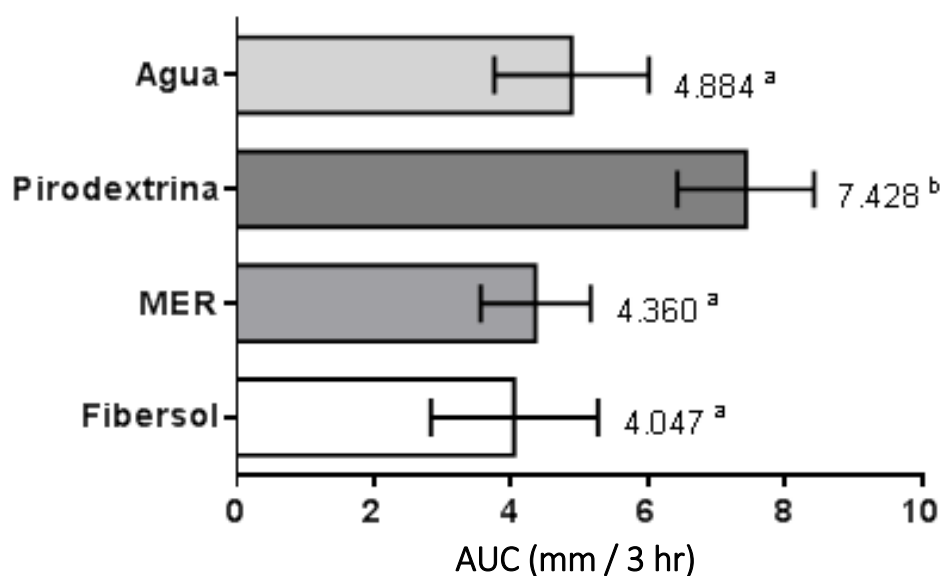


Figura 6.12. Plenitud posprandial generada por los tratamientos estudiados.

^{a-b} Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

Son diversos los estudios que secundan los resultados de este trabajo en relación a la generación de saciedad temprana y/o inhibición del hambre. Por ejemplo, Willis et. al. (2009) estudiaron el efecto sobre la saciedad, el consumo prospectivo y otros indicadores sensoriales de muffins adicionados con Hi Maize®. Estos investigadores comprobaron que hasta 8 gr de este almidón resistente, no viscoso, soluble y comercial generaba una sensación de saciedad y de plenitud estadísticamente mayor posterior a los 180 minutos de consumo. Por otro lado, Guérin et. al. (2011) evaluaron el efecto de Nutriose®, una dextrina poco viscosa, soluble y comercial, y

evidenciaron la disminución del hambre a partir del día 5 con una dosis de 24gr/día y del día 7 con dosis de 14g/día y 18g/día. Ye et. al. (2015) probaron el efecto agudo (4 horas) de 10 gr Fibersol-2®, una maltodextrina enzimáticamente resistente comercial, y también encontraron que generó saciedad prolongada, sensación de plenitud y disminución de hambre.

5.3. Análisis bioquímico de la saciedad

Para la medición de los niveles séricos de PYY₃₋₃₆ y de GLP-1₇₋₃₆ se realizaron pruebas de inmunoensayo enzimático “competitivo” con inmunoplasmas pre-recubiertas de anticuerpos secundarios. La cuantificación de cada hormona se realizó por interpolación de los valores de absorbancia obtenidos de las muestras con respecto a su curva estándar (0.01 – 100 ng/mL).

Las curvas de calibración fueron de tipo sigmoidea inversa y se obtuvieron trazando las concentraciones conocidas en escala logarítmica (Eje X) y su correspondiente absorbancia en escala linear (Eje Y). Tanto en la curva estándar de Péptido YY₃₋₃₆ como de GLP-1₇₋₃₆, el coeficiente de determinación (R²) estableció que el modelamiento describió el 99.9% en la variabilidad y la ecuación que describió el comportamiento fue la siguiente:

$$Y = A1 + \frac{(A2-A1)}{1+10^{(LOGx0-X)(p)}}$$

Donde:

A1 = 0.319 para curva PYY y 0.37018 para curva GLP-1

A2 = 2.0754 para curva PYY y 1.83746 para curva GLP-1

LOGx0 = -0.288 para curva PYY y -0.18975 para curva GLP-1

p = -1.373 para curva PYY y -1.22556 para curva GLP-1

En tanto al Péptido YY (PYY₃₋₃₆), no se observó diferencia estadística ($p < 0.05$) en sus niveles séricos a los tiempos 0', 60' y 180' posteriores a la ingestión de los tratamientos. Al minuto 120 fue posible determinar que el agua produjo un descenso significativo en los niveles de esta hormona y que el Fibersol-2® y la MER produjeron los niveles más altos. El efecto sobre el PYY₃₋₃₆ sanguíneo a este mismo tiempo fue estadísticamente igual entre el agua y la pirodextrina y entre ésta última y la MER (Figura 6.13). Un escenario similar se observó en los niveles de

GLP-1₇₋₃₆, solo que las diferencias estadísticas ($p < 0.05$) entre tratamientos se detectaron al minuto 60 posprandial. En este tiempo el agua produjo la menor secreción de GLP-1₇₋₃₆, en tanto que la pirodextrina y el Fibersol-2® generaron su mayor liberación. La MER indujo una secreción estadísticamente igual a los tres tratamientos restantes (Figura 6.14).

El PYY₃₋₃₆ es una hormona intestinal que se libera a los 15 minutos posteriores a la ingestión de los alimentos y que alcanza sus picos máximos en sangre a los 60 – 120 minutos posprandiales (Neary y Batterham, 2009). Es uno de los péptidos clave en la regulación del consumo de alimentos, debido a su efecto conocido sobre la inhibición del hambre (Batterham et. al., 2007). Los resultados de este estudio comprueban dichas aseveraciones ya que fue posible detectar diferencias estadísticas en sus niveles séricos justamente a los 120 minutos posteriores a la ingestión de los tratamientos (Figura 6.13). Además resulta relevante mencionar que a este tiempo los tratamientos que indujeron su mayor liberación fueron el Fibersol-2® y la MER, mismos que mostraron una disminución estadística del hambre en el estudio sensorial (Figura 6.9). Estos dos tratamientos, junto con la pirodextrina, fueron también los que provocaron una menor intención de consumo de alimentos (Figura 6.10).

El GLP-1₇₋₃₆ es también reconocido como un poderoso agente modulador de la ingesta de alimentos, el cual presenta dos fases secretoras posprandiales: la primera a los 15-20 minutos y la segunda a los 60 – 120 minutos (Romero, 2007). Fue precisamente en la segunda fase de secreción (a los 60 minutos) donde se observaron diferencias significativas en las concentraciones sanguíneas de esta hormona (Figura 6.14); siendo la pirodextrina y el Fibersol-2® los tratamientos que provocaron una mayor liberación. Relacionando estos resultados con los obtenidos en la evaluación sensorial, la pirodextrina fue la muestra que indujo una mayor liberación de GLP-1₇₋₃₆ al minuto 60 y que además generó mayores puntuaciones en los dos indicadores de satisfacción: saciedad (Figura 6.11) y plenitud (Figura 6.12).

Con base a lo anterior se puede concluir que el Fibersol-2® y la MER fueron los tratamientos que inhibieron estadísticamente el apetito (debido a su capacidad de inducir una mayor secreción de PYY₃₋₃₆) y que la pirodextrina incrementó significativamente la sensación de saciedad y plenitud (por su capacidad de incrementar la liberación de GLP-1₇₋₃₆).

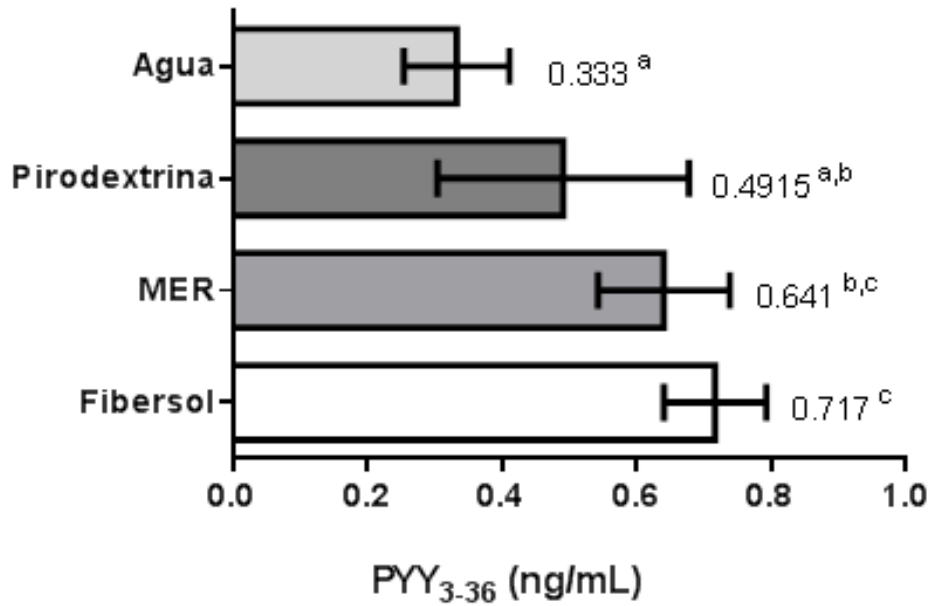


Figura 6.13. Concentraciones séricas de PYY₃₋₃₆ a los 120 minutos del consumo de los tratamientos. ^{a-c} Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

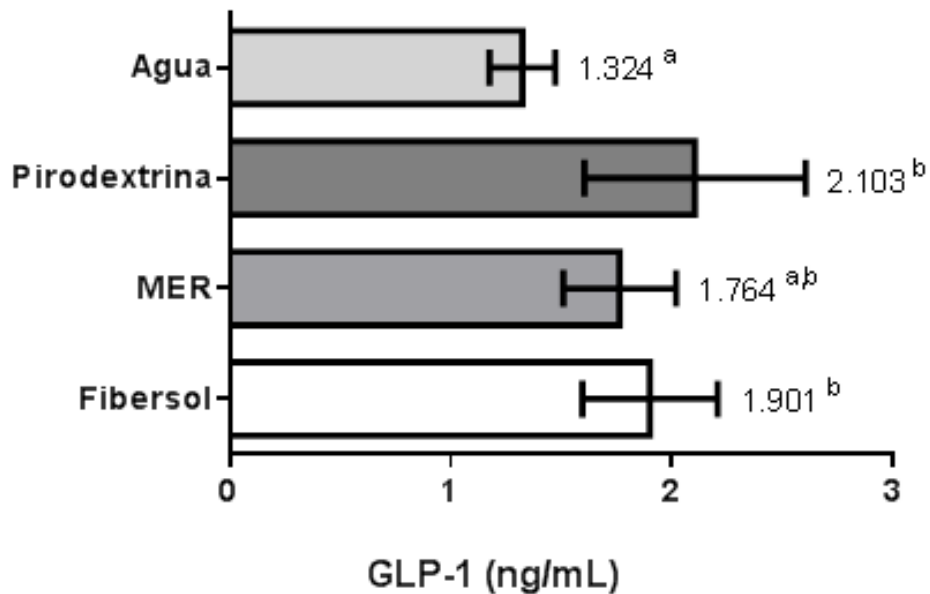


Figura 6.14. Concentraciones séricas de GLP-1₇₋₃₆ a los 60 minutos del consumo de los tratamientos. ^{a-b} Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

Pese a que se reconoce a los lípidos y a los carbohidratos absorbibles como los nutrimentos mayormente implicados en la liberación de PYY₃₋₃₆ (Helou et. al., 2008) y GLP-1₇₋₃₆ (De Silva y Bloom, 2012), el presente trabajo identifica también a las dextrinas resistentes como elementos nutrimentales moduladores. Es por eso que fue posible detectar efectos similares entre la pirodextrina, la MER y el Fibersol-2®, ya que las tres muestras son dextrinas enzimáticamente resistentes (Laurentin et. al., 2005) (Toraya et. al., 2016) (Cho y Almeida, 2012).

Se pueden mencionar diversos aspectos que justificarían las secreciones de los péptidos intestinales de estudio. Por un lado, se sabe que la estimulación directa del duodeno favorece la liberación tanto del PYY₃₋₃₆ (Álvarez et. al., 2002) como del GLP-1₇₋₃₆ (Romero, 2007), por lo que puede afirmarse que a mayor estimulación de esta estructura se generaría mayores secreciones. Teniendo en cuenta la capacidad de retención de agua de la pirodextrina y de la MER, es de suponerse que a nivel intestinal las muestras aumentaron su volumen (1:3 y 1:1, respectivamente) (Figura 6.6), incrementaron la estimulación del duodeno y consecuentemente produjeron mayores secreciones de los péptidos que el control negativo. Por el tiempo del experimento (180') es que se discute solo la participación del duodeno como estructura secretora neuroendócrina, puesto que la liberación tanto del PYY₃₋₃₆ como del GLP-1₇₋₃₆ se da principalmente hasta que el quimo llega a nivel de íleon y colon varias horas después (De Silva et. al., 2011).

Considerando particularmente la característica de indigestibilidad en las muestras, existe otro mecanismo que pudiera explicar los niveles de GLP-1₇₋₃₆ y PYY₃₋₃₆ detectados en el presente estudio. Esta vía de secreción la explican Seeley et. al. (2015) en una revisión científica, donde abordan la capacidad que tiene el quimo no digerido para secretar péptidos intestinales como GLP-1₇₋₃₆. Los autores exponen que la presencia de material no digerido a nivel intestinal indica la necesidad de aumentar la capacidad de absorción del intestino delgado y que el incremento postprandial de GLP-1₇₋₃₆ resultaría ser un intento de aumentar dicha absorción. Este mecanismo igualmente aplicaría para el PYY₃₋₃₆, ya que según Liu et. al. (1996) este péptido también es un potente agente pro-absortivo a nivel intestinal.

Pese a que la ingestión tanto de pirodextrina como de la MER se hizo de manera aguda, es importante mencionar el beneficio que pudiera suponer su ingestión de manera crónica como

parte de una dieta habitual. Lo anterior a razón de que diversos trabajos relacionan el consumo crónico de almidón resistente y derivados con la expresión de genes codificantes para PYY₃₋₃₆ y GLP-1₇₋₃₆. Esto ya que los ácidos grasos de cadena corta producidos durante su fermentación tienen la capacidad de modular la expresión génica a nivel de íleon, ciego y colon (Keenan et. al. 2006) (Zhou et. al., 2006) (Zhou et. al., 2008).

Resultados similares a los obtenidos en el presente trabajo se han observado en diversos estudios, tanto con animales como con humanos, acerca el efecto de almidones y dextrinas solubles resistentes sobre indicadores bioquímicos de saciedad. Adam et. al. (2015) encontraron una correlación estadística entre la ingestión de fibra soluble y el incremento sérico de PYY₃₋₃₆ y GLP-1₇₋₃₆ en ratas. En otro estudio de corte similar, Keenan et. al. (2006) definen en su trabajo la asociación significativa entre el consumo de almidón resistente y el incremento sérico de los mismos péptidos. Verhoef et. al. (2011) también describen este efecto, ya que comprobaron que la ingestión de oligofructosa (fibra soluble) produjo una secreción significativamente mayor de PYY₃₋₃₆ y GLP-1₇₋₃₆ en ratas. Ye et. al. (2015) administraron 10 gr de Fibersol-2® y encontraron incrementos séricos significativos de PYY₃₋₃₆ y GLP-1₇₋₃₆ en adultos sanos a partir de los 60 minutos posprandiales, tal como se observó en el presente estudio.

Los resultados presentados en este trabajo de investigación suponen una alternativa para la regulación de la ingestión de alimentos. Tanto en la evaluación sensorial como bioquímica se comprobó el efecto agudo (hasta 180 minutos) que tiene la ingestión de pirodextrinas y MER para favorecer la secreción de dos péptidos moduladores del apetito: PYY₃₋₃₆ y el GLP-1₇₋₃₆. También se discutió el efecto crónico que pudieran generar las muestras de estudio sobre las mismas hormonas. Debido a que tanto el PYY₃₋₃₆ como el GLP-1₇₋₃₆ son reconocidos como agentes anti-obesogénicos por los efectos bioquímicos que generan (Romero, 2007) (Karra et. al., 2009) (De Silva et. al., 2011), se recomienda continuar el estudio de las pirodextrinas y MER para dilucidar sus mecanismos fisiológicos específicos implicados en apetito y saciedad.

VII. CAPÍTULO 7: CONCLUSIONES

- Con el proceso de pirodextrinización se alcanzaron rendimientos de 84.738 y 6.148% de AR y cambios de color de 3.742 y 2.539 para las pirodextrinas de makal y ramón respectivamente, obtenidas en las mejores condiciones estudiadas.
- La microscopía evidenció que el gránulo del almidón de ramón es resistente a la pirodextrinización, ya que su estructura granular permanece similar al almidón nativo.
- En el makal, la hidrólisis enzimática complementaria y los equivalentes de dextrosa indicaron a la maltodextrina enzimáticamente resistente del tratamiento 1 como la más adecuada.
- Las mejor condición de hidrólisis de la pirodextrina de makal fue una concentración de amilasa de 0.05% durante 10 minutos, para obtener equivalentes de dextrosa de 13.9%
- La capacidad de absorción de agua y el poder de hinchamiento mostraron dependencia con la temperatura de gelatinización, siendo mayores en la pirodextrina de makal.
- El índice de solubilidad en la pirodextrina mostró un incremento gradual conforme a la temperatura y los máximos valores se obtuvieron para la maltodextrina enzimáticamente resistente.
- La evaluación del estado de saciedad demostró que el Fibersol-2® y la MER fueron los tratamientos que inhibieron estadísticamente los indicadores de apetito (debido a su capacidad de inducir una mayor liberación de PYY₃₋₃₆) y que la pirodextrina incrementó significativamente la sensación de saciedad y plenitud (por su capacidad de incrementar la liberación de GLP-1₇₋₃₆).

VIII. CAPÍTULO 8: ANEXOS

1. ANEXO 1: CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO



PROYECTO DE INVESTIGACIÓN: Evaluación de la ingestión de Pirodextrinas y Maltodextrinas Enzimáticamente Resistentes sobre el estado de saciedad

FORMATO 1. CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Estimado(a) Señor/Señora:

El Instituto Tecnológico de Mérida está realizando el proyecto de investigación (en colaboración con la Universidad Autónoma de Yucatán) denominado: “Efecto de la ingestión de Pirodextrinas y Maltodextrinas Enzimáticamente Resistentes sobre el estado de saciedad”. El objetivo del estudio es determinar el estado de saciedad posterior a la ingestión de Maltodextrinas Enzimáticamente Resistentes (MER) obtenidas a partir de makal (*Xanthosoma yucatanense*), mediante la valoración de la sensación de saciedad y de parámetros bioquímicos. El estudio se está realizando en las instalaciones del Laboratorio de Instrumentación Analítica del Instituto Tecnológico de Mérida y del Laboratorio de Ciencia de los Alimentos de la Universidad Autónoma de Yucatán.

Si usted acepta participar en el estudio, ocurrirá lo siguiente:

Procedimientos:

- Le haremos una evaluación diagnóstica para conocer su estado actual de salud y nutrición, a través del levantamiento de una historia clínica y de la toma de datos antropométricos (peso, talla, % grasa, % músculo, % agua, presión arterial y circunferencia de cintura).
- Le haremos una evaluación diagnóstica sobre sus actitudes frente a las comidas, mediante el instrumento “Cuestionario de Tres Factores de la Alimentación”.
- Le haremos una medición de su estado de saciedad, mediante la aplicación de dos evaluaciones. La primera será a través de la toma de muestras sanguíneas (15 mL) para la valoración de sus niveles séricos de hormonas de saciedad (Péptido YY₃₋₃₆ y GLP-1₇₋₃₆). La segunda evaluación será para conocer su percepción de su estado de saciedad y se realizará a través de la aplicación de Escalas Visuales Análogas. La medición se realizará para valorar el efecto de la ingestión de almidón resistente de makal (*Xanthosoma yucatanense*) sobre el estado de saciedad y tendrá una duración de 4 días (5 horas por día). Cabe aclarar que todas las tomas y mediciones serán realizadas por personal capacitado (nutriólogo, médico y químico farmacobiólogo).

Beneficios:

- Usted no recibirá un beneficio directo por su participación en el estudio. Sin embargo, si usted acepta participar, estará colaborando con el Instituto Tecnológico de Mérida para generar nuevos conocimientos sobre tratamientos alternativos para el control del peso corporal y para la prevención de enfermedades crónicas no transmisibles.

Confidencialidad:

- Toda la información que usted nos proporcione para el estudio será de carácter estrictamente confidencial, será utilizada únicamente por el equipo de investigación del proyecto y no estará disponible para ningún otro propósito. Usted quedará identificado(a) con un número y no con su nombre. Los resultados de este estudio serán publicados con fines científicos, pero se presentarán de tal manera que no podrá ser identificado(a).

Riesgos Potenciales/Compensación:

- Los riesgos potenciales que implican su participación en este estudio son mínimos. Si alguna de las preguntas le hicieran sentir un poco incómodo(a), tiene el derecho de no responderla. Al realizar la toma de muestras de sangre existe el riesgo de que ocurra un pequeño moretón o pequeño dolor en el momento. Cabe aclarar que todo el material que se utilizará será nuevo y desechable. En el remoto caso de que ocurriera algún daño como resultado de la investigación, usted no recibirá ningún pago por participar en el estudio, y tampoco implicará algún costo para usted.

La participación en este estudio es absolutamente voluntaria. Usted está en plena libertad de negarse a participar o de retirar su participación del mismo en cualquier momento. Su decisión de participar o de no participar no afectará de ninguna manera la forma en cómo le tratan en los servicios que reciba por parte del Instituto Tecnológico de Mérida.

En caso de tener alguna pregunta, comentario o preocupación con respecto al proyecto, por favor comuníquese con el responsable:

- Nombre: Enrique Barbosa Martín.
- Teléfono: 9991 05 76 65.
- Correo electrónico: enrique.barbosa89@hotmail.com

Si usted acepta participar en el estudio, le entregaremos una copia de este documento que le pedimos sea tan amable de firmar:

Nombre:

Firma:

Contacto (Correo y/o número):

Fecha (Día / Mes / Año):

2. ANEXO 2: HISTORIA CLÍNICA NUTRIOLÓGICA



PROYECTO DE INVESTIGACIÓN: Evaluación de la ingestión de Pirodextrinas y Maltodextrinas Enzimáticamente Resistentes sobre el estado de saciedad

FORMATO 2. HISTORIA CLÍNICA NUTRIOLÓGICA

DATOS GENERALES

- Nombre:
- Edad:
- Sexo:
- Teléfono:
- Correo:
- Fecha:

INDICADORES CLÍNICOS

ANTECEDENTES PERSONALES PATOLÓGICOS

1. De la siguiente lista, subraya las enfermedades que presentas hoy y/o en la semana inmediata anterior y/o de manera frecuente:
 - Diarrea
 - Estreñimiento
 - Gastritis
 - Úlcera (esofágica, gástrica, intestinal)
 - Náuseas
 - Pirosis
 - Vómito
 - Colitis
2. ¿Tu dentadura es completa? De no ser así, menciona las piezas faltantes:
3. ¿Padeces alguna enfermedad diagnosticada, del sistema digestivo, nervioso u hormonal?:
4. ¿Tomas algún medicamento? (Cuál, dosis, desde cuándo):
5. ¿Te han practicado alguna cirugía? (Cuál, cuándo):

ANTECEDENTES HEREDOFAMILIARES

1. De la siguiente lista, subraya las enfermedades que presenten tus familiares directos:
 - Obesidad
 - Diabetes
 - Hipertensión arterial
 - Cáncer
 - Hipercolesterolemia / Hipertrigliceridemia

ANTECEDENTES PERSONALES NO PATOLÓGICOS

1. Actividad física/Ejercicio (Tipo, frecuencia, duración, desde cuándo):
2. Consumo de alcohol (Frecuencia y cantidad):
3. Consumo de tabaco (Frecuencia y cantidad):
4. Consumo de café (Frecuencia y cantidad):

SIGNOS CLÍNICOS

1. Aspecto General (Cabello, ojos, piel, uñas, labios, encías, etc.):
2. Presión Arterial (Hora, brazo derecho):

ASPECTOS GINECOLÓGICOS

1. ¿Actualmente estás embarazada?:
2. ¿Actualmente estás lactando?:

INDICADORES BIOQUÍMICOS

Menciona los análisis bioquímicos (con sus valores) que te hayan realizado en los últimos seis meses:

INDICADORES DIETÉTICOS

- ¿Cuántas comidas haces al día? Incluyendo colaciones y platos fuertes:
- ¿Quién prepara tus alimentos?:
- ¿Comes entre comidas? ¿Qué?:
- ¿Has modificado tu alimentación en los últimos 6 meses (trabajo, estudio, o actividad) (Porqué, cómo)?:
- ¿Cómo consideras tu apetito (bueno, malo, regular)?:
- ¿Qué alimentos y guisos son tus preferidos?:
- ¿Qué alimentos y guisos no te agradan y/o no acostumbras consumir?:
- ¿Eres alérgico o intolerante a algún alimento o ingrediente alimentario (Cuál)?:
- ¿Tomas algún suplemento y/o complemento (Cuál, porqué)?:
- ¿Tu consumo varía cuando estás triste, nervioso o ansioso (Cuál, cómo)?:
- ¿Agregas sal a la comida ya preparada?:
- ¿Qué grasa utilizas en casa para preparar tu comida?:
- ¿Has utilizado medicamentos para bajar de peso (Cuáles)?:
- ¿Cuántos vasos de agua natural consumes al día?:

RECORDATORIO DE 24 HORAS

Hora	Lugar	Ocasión	Platillo/Alimentos/bebidas	Ingredientes/cantidades

3. ANEXO 3: ESCALA VISUAL ANÁLOGA

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN: Evaluación de la ingestión de Pirodextrinas y Maltodextrinas Enzimáticamente Resistentes sobre el estado de saciedad

ESCALA VISUAL ANÁLOGA

Nombre:

Sesión: 1 2 3 4

Tiempo: 0' 60' 120' 180'

En cada pregunta, marque con una X sobre la línea la sensación que usted perciba.

1. ¿Cuánta hambre tienes?

No estoy
hambriento
en
absoluto



Nunca me
he sentido
tan
hambriento

2. ¿Cómo de satisfecho te sientes?

Estoy
completamente
vacío



No puedo
comer ni
un bocado
más

3. ¿Cómo de lleno te sientes?

En
absoluto
lleno



Completamente
lleno

4. ¿Cuánto crees que puedas comer?

Nada en
absoluto



Mucho

IX. CAPÍTULO 9: REFERENCIAS

1. Adam C, Williams P, Garden K, Thomson L y Ross A. Dose-dependent effects of a soluble dietary fibre (pectin) on food intake, adiposity, gut hypertrophy and gut satiety hormone secretions in rats. *Plos One*, 10(1), 1-14.
2. Agama Edith, Juárez Erika, Evangelista Silvia, Rosales Olga y Bello Luis. (2013). Características del almidón de maíz y relación con las enzimas de su biosíntesis. *Agrociencia*, 47(1), 01-12.
3. Almanza Julio, Blancas Gerardo, García Rebeca, Alarcón Francisco y Cruz Miguel. (2008). Leptina y su relación con la Obesidad y la Diabetes tipo 2. *Gaceta Médica de México*, 144(6), 535-542.
4. Álvarez M, Borque M, Martínez J, Aparicio E, Hernández C, Cabrerizo L y Fernández J. (2002). Peptide YY secretion in morbidly obese patients before and after vertical banded gastroplasty. *Obesity Surgery*, 12(2002), 324-327.
5. Antonio C, Bello L, Martínez C, Montañez J, Jiménez J y Vivar M. (2009). Producción enzimática de maltodextrinas a partir de almidón de malanga (*Colocasia esculenta*). *CyTA – Journal of Food*, 7(3), 233-241.
6. Anderson, R. A, Conway, H.F., Pfeifer, V.F., Griffin, E.L. (1969). Gelatinization of corn grits by roll and extrusion cooking. *Cereal Science Today*, 14, 4-12.
7. Aristizábal Johanna, Sánchez Teresa y Mejía Danilo. (2007). Guía técnica para producción y análisis de almidón de Yuca. *Boletín de Servicios Agrícolas de la FAO*, 163, 33-44.
8. Ascencio Ada, Martín Rodolfo, Tucuch Jorge, Valdez Jorge, Huchim Emy, Andrade Silvia, Gámez Josué, Larqué Alfonso. (2015). Gall (*Trioza rusellae* Tuthill) insect identification in *Brosimum alicastrum* Swartz leaves in Yucatán, Mexico. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 21(1), 123-132.
9. Asociación Médica Mundial (2013). Declaración de Helsinki de la AMM: Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos. Acceso el 02 de enero de 2015. Disponible en: <https://www.wma.net/es/policias-post/declaracion-de-helsinki-de-la-amm-principios-eticos-para-las-investigaciones-medicas-en-seres-humanos/>
10. Badman M y Filier J. (2005). The gut and energy balance: Visceral allies in the obesity wars. *Science*, 307, 1909-1014.
11. Barbosa E, Fajardo I, Sosa F, et al. (2016). Estudio poblacional sobre el estado de salud y nutrición de habitantes de la ciudad de Mérida, México. *Revista Española de Nutrición Humana y Dietética*, 20(3): 208-215.
12. Batterham R, Cohen M, Ellis S, Le Roux C, Withers D, Frost G, Ghatei M, Bloom S. (2003). Inhibition of food intake in obese subjects by peptide YY3-36. *The New England Journal of Medicine*, 349, 941-948.
13. Batterham R, Rosenthal J, Zelaya F, Barker G, Withers D y Williams S. (2007). PYY modulation of cortical and hypothalamic brain areas predicts feeding behaviour in humans. *Nature*, 450(7166), 106–109.
14. Bello P, Paredes L. (1999). El almidón: Lo comemos pero no lo conocemos. *Ciencia: Revista de la Academia Mexicana de Ciencias*, 50(3), 29-33.
15. Berry C. (1986). Resistant starch: Formation and measurement of starch that survives exhaustive digestion with amylolytic enzymes during the determination of dietary fibre. *Journal of Cereal Science*, 4(1986), 301-314.
16. Betancur D, Chel L, Guerrero R, Camelo G y Ortiz D. (2001). Physicochemical and functional characterization of baby lima bean (*Phaseolus lunatus*) starch. *Starch/Stärke*, 53(5), 219-226.
17. Bonilla J, Hoyoc J, Villada H. (2014). Modificación enzimática de almidón de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) para el desarrollo de películas flexibles. *Biocología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 12(1), 134-143.

18. Brouns F, Arrigoni E, Langkilde A, Verkooijen I, Fassler C, Andersson H, Kettlitz B, Van Nieuwenhoven M, Philipsson H y Amadio R. (2007). Physiological and metabolic properties of a digestion-resistant maltodextrin, classified as Type 3 Retrograded Resistant Starch. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(4), 1574-1581.
19. Burton B, Liyanage D, Rahman S y Edirisinghe I. (2017). Ratios of soluble and insoluble dietary fibers on satiety and energy intake in overweight pre- and postmenopausal women. *Nutrition and Healthy Aging*, 4(2), 157-168.
20. Campechano E, Corona A, Chel L y Betancur D. (2007). Effect of pyrodextrinization on available starch content of Lima bean (*Phaseolus lunatus*) and Cowpea (*Vigna unguiculata*) starches. *Food Hydrocolloids*, 21, 472-479.
21. Carlo A, Pyrski M, Loudes C, Faivre-Baumann A, Epelbaum J, Williams L y Meyerhof W. (2007). Leptin sensitivity in the developing rat hypothalamus. *Endocrinology*, 148(12), 6073-6082.
22. Centro de Investigación Científica de Yucatán. (2015). Flora Digital: Península de Yucatán. Acceso el 01 de diciembre de 2015. Disponible en: http://www.cicy.mx/sitios/flora%20digital/ficha_virtual.php?especie=111.
23. Cho S, Almeida N. (2012). *Dietary Fiber and Health*. EEUU: Tylor and Francis Group.
24. Chu HF, Pan MH, Ho CT, Tseng YH, Wang WW y Chau CF. (2014). Variations in the efficacy of resistant maltodextrin on body fat reduction in rats fed different high-fat models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(1), 192-197.
25. Clark M y Slavin J. (2013). The effect of fiber on satiety and food intake: A systematic review. *Journal of the American College of nutrition*, 32(3), 200-211.
26. Coniglio R, Dahinten E, Boeri M, Lebrun F, Monsalve A. (2004). Alteraciones en el eje hipotálamo-tejido adiposo y su relación con el riesgo para la aterosclerosis coronaria. *Medicina*, 64(2), 155-162.
27. Contreras L, Caso L, Aliphath M, Mariaca R. (2013). Manejo de los agroecosistemas en la comunidad lacandona de Nahá, Chiapas. *Etnobiología*, 11(3), 34-44.
28. De Silva A y Bloom S. (2012). Gut hormones and appetite control: A focus on PYY and GLP-1 as therapeutic targets in obesity. *Gut and Liver*, 6(1), 10-20.
29. De Silva A, Salem V, Long C, Makwana A, Newbould R, Rabiner E, Ghatei M, Bloom S, Matthews P, Beaver J y Dhillon W. (2011). The gut hormones PYY3-36 and GLP-17-36 amide reduce food intake and modulate brain activity in appetite centers in humans. *Cell Metabolism*, 14(5), 700-706.
30. Dorantes A, Martínez C, Ulloa A. (2016). *Endocrinología clínica de Dorantes y Martínez (5ª ed.)*. México: Editorial El Manual Moderno, p. 567.
31. Dvorkin M, Cardinali D, Iermoli R. (2010). *Bases fisiológicas de la práctica médica (14a ed.)*. Argentina: Editorial Médica Panamericana, p. 584.
32. Englyst H y Hudson G. The classification and measurement of dietary carbohydrates. *Food Chemistry*, 57(1), 15-21.
33. Englyst H, Wiggins H y Cummings H. (1982). Determination of the non-starch polysaccharides in plant foods by gas – liquid chromatography of constituent sugars as alditol acetates. *The Analyst*, 107(1272), 307-318.
34. Fuentes E, Sánchez E, Sendra E, Sayas E, Navarro C, Fernández J, Pérez J. (2011). Resistant starch as prebiotic: A review. *Starch/Stärke*, 63(7), 406-415.
35. Gerstein D, Woodward G, Evans A, Kelsey K y Drewnowski A. (2004). Clarifying concepts about macronutrients' effects on satiation and satiety. *Journal of the American Dietetic Association*, 104(7), 1151-1153.
36. Gill P, Moghadam T, Ranjbar B. (2010). Differential Scanning Calorimetry Techniques: Applications in biology and nanoscience. *Journal of Biomolecular Techniques*, 2010(21), 167-193.
37. González C, López B, Rico M, Sánchez E, Ruiz M, Gil A, Mesa M. (2014). An enriched, cereal-based bread affects appetite ratings and glycemic, insulinemic, and gastrointestinal hormone responses in healthy adults in a randomized, controlled trial. *Journal of Nutrition*, 145(2), 231-238.

38. González E y Schmidt J. (2012). Regulación de la ingesta alimentaria y del balance energético; factores y mecanismos implicados. *Nutrición Hospitalaria*, 27(6), 1850-1859.
39. González M, Ambrosio K y Sánchez S. (2006). Regulación neuroendócrina del hambre, la saciedad y el mantenimiento del balance energético. *Investigación en Salud*, 8(3), 191-200.
40. Granica A, Romero A, Cerón M y Prieto L. (2010). Características funcionales de almidones nativos extraídos de clones pemisorios de papa (*Solanum tuberosum* L. subespecie andigena) para la industria de alimentos. *Alimentos Hoy*, 19(21).
41. Greenberg J, Geliebter A. (2012). Coffee, hunger and Peptide YY. *Journal of the American College of Nutrition*, 31(3), 160-166.
42. Guérin L, Pochat M, Reifer C, Cho S y Miller L. (2011). The soluble fiber Nutriose induces a dose-dependent beneficial impact on satiety over time in humans. *Nutrition Research*, 31(9), 665-672.
43. Gutiérrez J, Rivera J, Shamah T, Villalpando S, Franco A, Cuevas L, et al. (2012). Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Resultados Nacionales. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública.
44. Gutiérrez J, Rivera J, Shamah T, Oropeza C, Hernández M. (2013). Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Resultados por entidad Federativa: Yucatán. Instituto Nacional de Salud Pública.
45. Helou N, Obeid O, Azar S y Hwalla N. (2008). Variation of postprandial PYY3-36 response following ingestion of differing macronutrient meals in obese females. *Annals of Nutrition & Metabolism*, 52(2008), 188-195.
46. Hernández M, Torruco J, Chel L y Betancur D. (2008). Caracterización fisicoquímica de almidones de tubérculos cultivados en Yucatán, México. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 28(3), 718-726.
47. Hira T, Ikee A, Kishimoto Y, Kanahori S y Hara H. (2015). Resistant maltodextrin promotes fasting glucagon-like peptide-1 secretion and production together with glucose tolerance in rats. *British Journal of Nutrition*, 114(1), 34-42.
48. Hoad C, Rayment P, Spiller R, Marciani L, de Celis B, Traynor C, Mela D, Peters H y Gowland P. (2004). In vivo imaging of intragastric gelation and its effect on satiety in humans. *The Journal of Nutrition*, 134(9), 2293-2300.
49. Hunter, R. (1958). Photoelectric color differences meter. *Journal of the Optical Society of America*, 48(12), 985-995.
50. Inaki M, Fujii S y Lino H. (1999). Effects of the administration of soft drink containing indigestible dextrin on defecation frequency and fecal characteristics of Japanese healthy female volunteers. *Journal of Nutritional Food*, 2(1), 44-51.
51. Jochym K, Kapusniak J, Barczynska R, Slizewska K. (2012). New starch preparations resistant to enzymatic digestion. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2012(92), 886-891.
52. Karra E, Chandarana K y Batterham R. (2009). The role of peptide YY in appetite regulation and obesity. *The Journal of Physiology*, 587(Pt1), 19-25.
53. Keenan M, Zhou J, McCutcheon K, Raggio A, Bateman H, Todd E, Jones C, Tulley R, Melton S, Martin R y Hegsted. (2006). Effects of resistant starch, a non-digestible fermentable fiber, on reducing body fat. *Obesity*, 14(9), 1523-1534.
54. Kelley, W. 1992. *Medicina Interna*. Volumen 1. Argentina: Editorial Médica Panamericana, p. 482.
55. Kellow N, Coughlan M y Reid C. (2014). Metabolic benefits of dietary prebiotics in human subjects: a systematic review of randomized controlled trials. *British Journal of Nutrition*, 111(2014), 1147-1161.
56. Kendall C, Estefahani A, Hoffman A, Evans A, Sanders L, Josse A, Vidgen E y Potter S. (2008). Effect of novel maize-based dietary fibers on postprandial glycemia and insulinemia. *Journal of the American College of Nutrition*, 27(6), 711-718.
57. Kirsz K y Zieba D. (2011). Ghrelin-mediated appetite regulation in the central nervous system. *Peptides*, 32(11), 2256-2264.
58. Kirsz K y Zieba D. (2012). The discovery of neuromedin U and its pivotal role in the central regulation of energy homeostasis. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 16(66), 196-203.

59. Kishimoto Y, Oga H, Tagami H, Okuma K, & Gordon D. (2007). Suppressive effect of resistant maltodextrin on postprandial blood triacylglycerol elevation. *European Journal of Nutrition*, 46(3), 133-138.
60. Laurentin A. (2005). Pirodextrinas de almidón. Producción, digestibilidad y fermentación colónica. *Memorias del Instituto de Biología Experimental*, 4: 221-224.
61. Laurentin A, Cárdenas M, Ruales J, Pérez E, Tovar J. (2003). Preparation of indigestible pyrodextrins from different starch sources. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51, 5510-5515.
62. Lim S, Han J, Lim H, BeMiller J. (2002). Modification of starch by dry heating with ionic gums. *Cereal Chemistry*, 79(5), 601-606.
63. Liu C, Aloia T, Adrian T, Newton T, Bilchik A, Zinner M, Ashley S y McFadden D. (1996). Peptide YY: a potential proabsorptive hormone for the treatment of malabsorptive disorders. *The American Surgeon*, 62(3), 232-236.
64. López J, Martínez A, Luque A, Pons J, Vargas A, Iglesias J, Hernández M y Villegas J. (2008). Efecto de la ingesta de un preparado lácteo con fibra dietética sobre el estreñimiento crónico primario idiopático. *Nutrición Hospitalaria*, 23(1), 12-19.
65. Lorenzo P, Moreno A, Lizasoain I, Leza J, Moro M y Portolés A. (2008). *Farmacología básica y clínica* (Vol. 18). España: Editorial Médica Panamericana, p. 588.
66. Malacara Juan. (2004). Mecanismos regulatorios de la ingestión de alimentos ¿al fin un tratamiento a la vista? *Revista de Endocrinología y Nutrición*, 12(4), 188-198.
67. Martos G, Argente J. (2005). Bases neuroendócrinas y moleculares de la obesidad. *Revista Española de Pediatría Clínica e Investigación*, 61(2), 99-105.
68. Medina J y Camilo J. (2008). Caracterización morfológica del gránulo de almidón nativo: Apariencia, forma, tamaño y su distribución. *Revista de Ingeniería. Universidad de los Andes*, (27), 56-62.
69. Miller G. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426-428.
70. Miranda P, Marrugo Y y Montero P. (2013). Caracterización Funcional del Almidón de Fríjol Zaragoza (*Phaseolus Lunatus* L.) y cuantificación de su Almidón Resistente. *Tecno. Lógicas*, 30, 17-32.
71. Miyazato S, Nakagawa C, Kishimoto Y, Tagami H, Hara H. (2010). Promotive effects of resistant maltodextrin on apparent absorption of calcium, magnesium, iron and zinc in rats. *European Journal of Nutrition*, 49(3), 165 – 171.
72. Monsivais P, Carter B, Christiansen M, Perrigue M y Drewnowski A. (2011). Soluble fiber dextrin enhances the satiating power of beverages. *Appetite*, 56(2011), 9-14.
73. Montañez J, Barragán B y Cruz M. (2002). Propiedades fisicoquímicas de las maltodextrinas a partir del punto crioscópico de sus soluciones. *Información Tecnológica*, 13(3), 77-81.
74. Montgomery, D. (2011). *Diseño y análisis de experimentos* (2da ed.). México: Limusa Wiley.
75. Morales Edgar y Herrera Luis. (2009). *Ramon (Brosimum alicastrum Swartz)*. Protocolo para su Colecta, Beneficio y Almacenaje. Comisión Nacional Forestal. Departamento de Conservación y Restauración de Ecosistemas Forestales. México.
76. Moreno B, Monereo S, Álvarez J. (2004). *La obesidad en el tercer milenio*. 3a ed. Argentina: Editorial Médica Panamericana, p 67.
77. Mossman T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65, 55–63.
78. Nazare J, Sauvinet V, Normand S, Guérin L, Gabert L, Désage M, Wils D y Laville M. (2011). Impact of a resistant dextrin with a prolonged oxidation pattern on day-long ghreline profile. *Journal of the American College of Nutrition*, 30(1), 63-72.
79. Neary M y Batterham R. (2009). Peptide YY: Food for thought. *Physiology & Behavior*, 97(2009), 616-619.
80. Nelson David y Cox Michael. (2009). *Lehninger. Principios de bioquímica* (Vol. 5). España: Ediciones Omega, p.963.

81. Novelo C y Betancur D. (2005) Chemical and functional properties of Phaseolus lunatus and Manihot esculenta starch blends. *Starch/Stärke*, 57(9), 431-441.
82. Nugent A. (2005). Health properties of resistant starch. *Nutrition Bulletin*, 30(1), 27-54.
83. Nunes F, Lopes E, Moreira A, Simoes J, Coimbra M y Domingues R. (2016). Formation of type 4 resistant starch and maltodextrins from amylose and amylopectin upon dry heating: A model study. *Carbohydrate Polymers*, 141(2016), 253-262.
84. Okuma K y Kishimoto. (2004). Effects of resistant maltodextrin on metabolism of glucose and lipids. En *Dietary Fibre: Bio-active carbohydrates for food and feed*. Eds. Van der Kamp J, Asp N, Miller J y Schaafsma G. Wageningen. The Netherlands: Academic Publishers, 219-230.
85. Orozco T y Betancur D. (2004). Indigestible starch of P. lunatus obtained by pyroconversion: Changes in physicochemical properties. *Starch/Stärke*, 56(6), 241-247.
86. Pacheco Emperatriz y Techeira Nora. (2009). Propiedades químicas y funcionales del almidón nativo y modificado de ñame (*Dioscorea alata*). *Interciencia*, 34(4), 280-285.
87. Palma José e Iriarte Jorge. (2010). Regulación del apetito, bases neuroendócrinas e implicaciones clínicas. *Medicina Clínica*, 139(2), 70-75.
88. Parada J y Rozowski J. (2008). Relación entre la respuesta glicémica del almidón y su estado microestructural. *Revista Chilena de Nutrición*, 35(2), 84-92.
89. Parker R y Ring S. (2001). Aspects of the physical chemistry of starch. *Journal of Cereal Science*, 34(1), 1-7.
90. Peñaranda O, Perilla J y Algecira N. (2008). Revisión de la modificación química del almidón con ácidos orgánicos. *Ingeniería e Investigación*, 28(3), 47-52.
91. Pérez E, Moo V, Estrada R, Ortíz A, May L, Ríos C y Betancur D. (2014). Isolation and characterization of starch obtained from *Brosimum alicastrum* Swartz Seeds. *Carbohydrate Polymers*, 101(2014), 920-927.
92. Pérez Sergio, Orantes Carolina, Garrido Eduardo y Cruz Jorge. (2012). Diferencias en crecimiento y desarrollo de plántulas de mojú (*Brosimum alicastrum* Swartz) en condiciones de vivero. *Lacandonia*, 6(2), 51-57.
93. Pineda P, Coral D, Arciniegas M, Rorales A, Rodríguez M. (2010). Papel del agua en la gelatinización del almidón de maíz: Estudio por calorimetría diferencial de barrido, 6(11), 129-141.
94. Prieto Judith, Rubio Carmen, Román Alma, Méndez María, González César y Prieto Francisco. (2009). Degradación física del almidón de cebada (*Hordeum sativum* Jess). Correlación entre la gelatinización y el tamaño de gránulos. *Multiciencias*, 9(2), 115-125.
95. Quintanilla C, Zúñiga S. (2010). El efecto de la incretina y su participación en la diabetes mellitus tipo 2. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 48(5), 509-520.
96. Raff H y Levitzky M. (2013). *Fisiología médica: Un enfoque por aparatos y sistemas* (1ª ed.). EEUU: Editorial MC Graw Hill.
97. Ríos K, González E, Segura M, Ramírez M, López J, López I y Betancur D. (2016). Physicochemical and nutritional characterization of starch isolated from *Colocasia antiquorum* cultivated in Oaxaca, Mexico. *Journal of Chemistry*, 2016, 1-7.
98. Rodríguez E, Sandoval A y Fernández A. (2007). Evaluación de la retrogradación del almidón en harina de yuca precocida. *Revista Colombiana de Química*, 36(1), 13-30.
99. Romero A. (2007). Polipéptido insulínico dependiente de glucosa y péptido semejante al glucagón tipo 1: Acciones fisiológicas e implicaciones en la diabetes tipo 2 y la obesidad. *Revista de Endocrinología y Nutrición*, 15(3), 156-164.
100. Rosch C, Venema K, Gruppen H y Schols H. (2015). Characterisation and in vitro fermentation of resistant maltodextrins using human faecal inoculum and analysis of bacterial enzymes present. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 6(1), 46-53.
101. Ruales J y Nair B. (1994). Properties of starch and dietary fiber in raw and processed quinoa (*Chenopodium quinoa*, Willd) seeds. *Plant Foods for Human Nutrition*, 45(3), 223-246.

102. Sajilata M, Singhal R y Kulkarni P- (2006). Resistant starch – A review. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 5(1), 1-17.
103. Sánchez Martín, Ruiz Edgar y Alvarado David. (2008). Búsqueda, colecta y caracterización agromorfológica de cultivares de macal (*Xanthosoma violaceum*) procedentes del suroccidente de Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala. Dirección General de Investigación.
104. Sankhon A, Yao W, Amadou I, Wang H, Qian H y Sangare M. (2013). Effect of pyrodextrinization, crosslinking and Heat-Moisture Treatment on in vitro formation and digestibility of resistant starch from African Locust Bean (*Parkia biglobosa*). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 12(2), 173-179.
105. Santos L, Bonomo R, Fontan R, Santos W, Silva A. (2009). Gelatinization temperature and acid resistance of jackfruit seed starch. *Cyta – Journal of Food*, 7(1), 1-5.
106. Seeley R, Chambers A y Sandoval D. (2015). The role of gut adaptation in the potent effects of multiple bariatric surgeries on obesity and diabetes. *Cell Metabolism*, 21(3), 369-378.
107. Shen L, Keenan M, Raggio A, Williams C y Martin R. (2011). Dietary-resistant starch improves maternal glycemic control in Goto-Kakizaki rat. *Molecular Nutrition & Food Research*, 55(10), 1499-1508.
108. Shi M y Gao Q. (2011). Physicochemical properties, structure and in vitro digestion of resistant starch from waxy rice starch. *Carbohydrate Polymers*, 84(2011), 1151-1157.
109. Slavin J y Green H. (2007). Dietary fibre and satiety. *Nutrition Bulletin*, 32(1), 32-42.
110. So E, Ouchi M, Cuesta S, Olson S, Reif D, Shimomura K, Ouchi T. (2015). Tumor suppression by resistant maltodextrin, Fibersol-2. *Cancer Biology and Therapy*, 16(3), 460-465.
111. Srichuwong S, Jane J. (2007). Physicochemical properties of starch affected by molecular composition and structures: A review. *Food Science and Biotechnology*, 16(5), 663-674.
112. Stock S, Lechner P, Wong A, Ghatei M, Kieffer T, Bloom S, Chanoine J. (2005). Ghrelin, Peptide YY, Glucose-Dependent Insulinotropic Polipeptide and hunger responses to a mixed meal in anorexic, obese and control female adolescents. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 90(4), 2161-2168.
113. Subpuch Natthanan, Huang Tzo y Suwannaporn Prisana. (2014). Enzymatic digestible starch from pyrodextrinization to control the release of tocopheryl acetate microencapsulation in simulated gut model. *Food Hydrocolloids*, 53, 1-7.
114. Sungsoo Susan y Samuel Priscilla. (2009). Fiber ingredients. *Food Applications and Health Benefits* (Vol. 1). E.E.U.U.: Taylor & Francis Group.
115. Tan C, Wei H, Zhao X, Xu C, Zhou Y y Peng J. (2016). Soluble fiber with high water-binding capacity, swelling capacity, and fermentability reduces food intake by promoting satiety rather than satiation in rats. *Nutrients*, 8(10), 615-630.
116. Terán S, Rasmussen C y May O. (2017). Las plantas de la milpa entre los mayas: Tubérculos y raíces. Universidad Autónoma de Yucatán. Acceso el 05 de octubre de 2017. Disponible en: http://www.mayas.uady.mx/exposiciones/exp_044444.html.
117. Tortora Gerard y Derrickson Bryan. (2008). Principios de anatomía y fisiología humanas (Vol. 11). México: Editorial Médica Panamericana.
118. Toraya Rocío, Segura Maira, Chel Luis y Betancur David. (2016). Effects of pyroconversion and enzymatic hydrolysis on indigestible starch content and physicochemical properties of cassava (*Manihot esculenta*) starch. *Starch/Stärke*, 68(2016), 1-9.
119. Ulbrich M, Natan C y Floter E. (2015). Water binding properties of acid-thinned wheat, potato, and pea starches. *Starch/Stärke*, 67(5-6), 438-447.
120. Vásquez Moisés y Ulate Guido. (2010). Regulación del peso corporal y del apetito. *Acta Médica Costarricense*, 52(2), 79-89.
121. Verhoef S, Meyer D y Westerterp K. (2011). Effects of oligofructose on appetite profile, glucagon-like peptide 1 and peptide YY3-36 concentrations and energy intake. *British Journal of Nutrition*, 106(11), 1757-1762.

122. Vidal C. (2010). El ñame espinoso (*Dioscorea rotundata* Poir.): una opción en la producción de jarabes edulcorantes intermedios para la industria alimentaria. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 2010(2), 19-28.
123. Wanders A, Van Den Borne J, Graaf C, Hulshof T, Jonathan M, Kristensen M, Mars M, Schols H y Feskens E. (2011). Effects of dietary fibre on subjective appetite, energy intake and body weight: A systematic review of randomized controlled trials. *Obesity Reviews*, 12(2011), 724-739.
124. Wang J, Kozłowski R y Delgado G. (2001). Enzyme resistant dextrins from high amylose corn mutant starches. *Starch/Stärke*, 53(1), 21-26.
125. Wang S y Copeland L. (2013). Molecular disassembly of starch granules during gelatinization and its effect on starch digestibility: A review. *Food & Function*, 4(11), 1564-1580.
126. Whybrow S, Stephen J, Stubbs R. (2006). The evaluation of an electronic visual analogue scale system for appetite and mood. *European Journal of Clinical Nutrition*, 2006(60), 558-560.
127. Willis H, Eldridge A, Beiseigel J, Thomas W y Slavin J. (2009). Greater satiety response with resistant starch and corn bran in human subjects. *Nutrition Research*, 29(2009), 100-105.
128. Wurzburg O. (2006). Food polysaccharides and their applications. En: *Food polysaccharides and their applications*. Eds. Stephen A, Phillips G y Williams P. Florida, USA: Taylor & Francis Group, 88-118.
129. Ye Z, Arumugam V, Haugabrooks E, Williamson P, Hendrich S. (2015). Soluble dietary fiber (Fibersol-2) decreased hunger and increased satiety hormones in humans when ingested with a meal. *Nutrition Research*, 35(5), 393-400.
130. Yeon K, Yoo S, Gyu H. (2012). The effect of chemically modified resistant starch, RS type-4, on body weight and blood lipid profiles of high fat diet-induced obese mice. *Starch/Särke*, 64, 78-85.
131. Yoshikawa Y, Kishimoto Y, Tagami H y Kanahori S. (2013). Assessment of the safety of hydrogenated resistant maltodextrin: reverse mutation assay, acute and 90-day subchronic repeated oral toxicity in rats, and acute no-effect level for diarrhea in humans. *Journal of Environmental Science and Health*, 38(3), 459-470.
132. Zhou J, Hegsted M, McCutcheon L, Keenan M, Xi X, Raggio A y Martin R. (2006). Peptide YY and Proglucagon mRNA expression patterns and regulation in the gut. *Obesity*, 14(4), 683-689.
133. Zhou J, Martin R, Tulley R, Raggio A, McCutcheon K, Shen L, Colby S, Tripathy S, Hegsted M y Keenan M. (2008). Dietary resistant starch upregulates total GLP-1 and PYY in a sustained day-long manner through fermentation in rodents. *American Journal of Physiology: Endocrinology & Metabolism*, 295(2008), 1160-1166.
134. Zieba D, Amstalden M y Williams G. (2005). Regulatory roles of leptin in reproduction and metabolism: a comparative review. *Domestic Animal Endocrinology*, 29(1), 166-185.
135. Zieba D, Kirsz K, Molik E, Romanowicz K y Wojtowicz A. (2011). Effects of orexigenic peptides and leptin on melatonin secretion during different photoperiods in seasonal breeding ewes: an in vitro study. *Domestic Animal Endocrinology*, 40(30), 139-146.