



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE
HIDALGO**

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

ÁREA ACADÉMICA DE QUÍMICA

**DISEÑO DE UNA METODOLOGÍA ESPECTROFOTOMÉTRICA BASADA
EN EL USO DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA PARA LA
DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LIPOXIGENASA
EN CEREALES**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN QUÍMICA EN ALIMENTOS**

P R E S E N T A

RAYBEL MUÑOZ RAMÍREZ

**DIRECTORES DE TESIS:
DR. JOSÉ ANTONIO RODRÍGUEZ ÁVILA
DR. EVA MARÍA SANTOS LÓPEZ**

MINERAL DE LA REFORMA, HGO.

2016



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería
Institute of Basic Sciences and Engineering
Área Académica de Química
Chemistry Department

M. en A. JULIO CÉSAR LEINES MEDÉCIGO
DIRECTOR DE CONTROL ESCOLAR
DE LA U.A.E.H.
Presente:

Por este conducto le comunico que el jurado asignado al pasante de la Licenciatura de Química en Alimentos **Raybel Muñoz Ramírez**, quien presenta el trabajo de investigación **“Diseño de una metodología espectrofotométrica basada en el uso de nanopartículas de plata para la determinación de actividad enzimática de lipoxigenasa en cereales”**, después de revisar el trabajo en reunión de Sinodales, estos han decidido autorizar la impresión del mismo, hechas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación se anotan las firmas de conformidad de los integrantes del Jurado:

| | |
|------------------|---|
| Presidente | Dr. Carlos Andrés Galán Vidal |
| Primer vocal | Dr. José Antonio Rodríguez Ávila |
| Segundo vocal | Dra. María Elena Páez Hernández |
| Tercer vocal | Dra. Eva María Santos López |
| Secretario | Dr. Alfredo Guevara Lara |
| Primer suplente | Dra. Maria Luísa Soares da Silva |
| Segundo suplente | Dra. Esmeralda Rangel Vargas |

Sin otro particular, le envío un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“Amor, Orden y Progreso”
 Mineral de la Reforma, Hidalgo, 17 de junio de 2016

Dra. Maria Luísa Soares da Silva
 Coordinadora Adjunta
 Licenciatura en Química de Alimentos



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería
 Área Académica de Química

Ciudad del Conocimiento
 Carretera Pachuca - Tulancingo km. 4.5
 Colonia Carboneras
 Mineral de la Reforma, Hidalgo, México, C.P. 42184
 Tel. +52 771 7172000 exts. 2200 y 2201, Fax 6502
 aaq_icbi@uaeh.edu.mx



www.uaeh.edu.mx



Este trabajo de investigación se realizó en el laboratorio 1 del Área Académica de Química, en el laboratorio de de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

La investigación se realizó gracias al financiamiento del PROFOCIE 2014 y al CONACYT INFR-2014-227999

Parte de este trabajo ha sido presentado en:

- XXVII Congreso Nacional de Química Analítica (2014) con el trabajo: Evaluación espectrofotométrica de nanopartículas de plata en presencia de agentes oxidantes”
- XXVIII Congreso nacional de química analítica (2015) con el trabajo: “Aplicación de nanopartículas de plata en determinación espectrofotométrica de actividad enzimática de lipoxigenasa en cereales”

Publicado en:

- R. Muñoz, J.A. Rodríguez, M.E. Páez-Hernández, I. Sánchez-Ortega, E.M. Santos. Determination of lipoxygenase activity in cereals grains using a silver nanoparticles assay. *Journal of Chemistry* 2015 (2015) 1-5

El futuro tiene muchos nombres. Para los débiles es lo inalcanzable. Para los temerosos, lo desconocido. Para los valientes es la oportunidad.

Victor Hugo

AGRADECIMIENTOS

A Dios por las bendiciones recibidas y permitirme llegar a esta instancia en su plan de vida para mí

A mi familia por estar siempre conmigo, apoyándome en todos los aspectos, por darme las herramientas necesarias para afrontar la vida, gracias a ellos he llegado a ser quien soy hoy. A mi padre, por su apoyo incondicional, esfuerzo, enseñanzas y paciencia. Mis hermanos Nancy, Norberto, Carmen, Lili, Juan y Pao por su confianza y fe en mí. Mi tía Angelita por su cariño y atención. A Jessica por ser una inspiración, motivarme a culminar y creer en que esto sería posible.

A mi asesor de tesis, Dr. José Antonio Rodríguez Ávila, gracias a su esfuerzo y dedicación ya que no sólo me he aprendido de él cuestiones profesionales sino personales.

A mis compañeros de laboratorio Acela, Isaí, Lupita, Gabi, Paty, Ricardo, Carlos, Lili, Ale, Nancy, así como al Dr. Alfredo Guevara y la Dra. Eva Santos por sus sabios consejos y compañerismo.

Índice

| | |
|---|----|
| 1. ANTECEDENTES | 2 |
| 1.1 Cereales | 2 |
| 1.2 Composición química de los granos de cereal | 4 |
| 1.2.1 Presencia de carbohidratos en cereales | 4 |
| 1.2.2 Presencia de vitaminas y minerales en cereales | 8 |
| 1.2.3 Presencia de proteínas en cereales..... | 9 |
| 1.2.4 Presencia de lípidos en cereales | 10 |
| 1.2.5 Presencia de enzimas en cereales..... | 11 |
| 1.3 Nanopartículas metálicas | 17 |
| 2. OBJETIVOS | 22 |
| 2.1 Objetivo general..... | 22 |
| 2.2 Objetivos particulares. | 22 |
| 3 METODOLOGÍA..... | 24 |
| 3.1 Reactivos, soluciones y equipos..... | 24 |
| 3.2 Síntesis de hidroperóxidos..... | 24 |
| 3.3 Síntesis de AgNPs | 25 |
| 3.4 Evaluación con agentes oxidantes | 25 |
| 3.5 Optimización de la síntesis de AgNPs..... | 25 |
| 3.6 Parámetros de validación analítica y comparación con ensayo de FOX..... | 27 |
| 3.7 Análisis de muestras..... | 29 |
| 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 32 |
| 4.1 Evaluación de la Reacción de AgNPs con agentes oxidantes | 32 |
| 4.2 Parámetros analíticos..... | 36 |
| 4.3 Optimización de síntesis de AgNPs prismáticas | 37 |
| 4.4 Validación de la metodología propuesta | 40 |
| 5. CONCLUSIONES | 45 |
| 6. BIBLIOGRAFÍA..... | 47 |

Antecedentes

1. ANTECEDENTES

1.1 Cereales

Los cereales son el fruto de los cultivos de plantas herbáceas, que pertenecen al orden botánico de las monocotiledóneas. Los principales cultivos de este grupo son el trigo, cebada, avena, centeno, arroz, maíz, sorgo y mijo [1]. Todos los cereales pertenecen a la familia de las gramíneas, se cultivan prácticamente en todas las regiones del mundo siendo el cultivo más representativo en la agricultura ya que el 70% de campos destinado a la siembra está destinado para la producción de cereales [1]. El ciclo de vida típico de una planta de cereales inicia cuando los granos maduros germinan para formar una nueva planta que crece gradualmente y se desarrolla para formar la inflorescencia [2].

El componente principal de la planta de cereal de interés es el grano, el cual se define como fruto en un contexto botánico. Éste fruto comparado con otros productos alimentarios, tiene actividad de agua baja ($a_w=0.35$) lo que permite su almacenamiento por largos periodos de tiempo sin tener que ser procesado (Tabla 1.1) [3].

Tabla 1.1 Actividad de agua de algunos alimentos.

| Alimentos | a_w |
|------------------------------|-------|
| Frutas frescas y ensaladas | 0.97 |
| Verduras | 0.97 |
| Jugos | 0.97 |
| Huevo | 0.97 |
| Carne | 0.97 |
| Queso | 0.95 |
| Pan | 0.94 |
| Mermeladas | 0.86 |
| Frutas secas | 0.73 |
| Miel | 0.70 |
| Huevo en polvo 5% de humedad | 0.40 |
| Galletas, cereales | 0.35 |
| Azúcar | 0.10 |

El fruto del cereal es la cariósida, siendo ésta un tipo aquenio o semilla única sin cubierta. Se caracteriza por ser seco (en comparación a otros frutos). Todos los frutos contienen una o más semillas o granos, para el caso de la cariósida contiene sólo uno. El grano se puede dividir en tres partes principales: germen, endospermo y pericarpio (Figura 1.1), aunque algunos granos después

de la cosecha pueden retener restos florales conocidos como glumas cuya función es proteger el grano de insectos, humedad y mohos durante su desarrollo, sin embargo no se consideran como parte de la cariósida. [1]

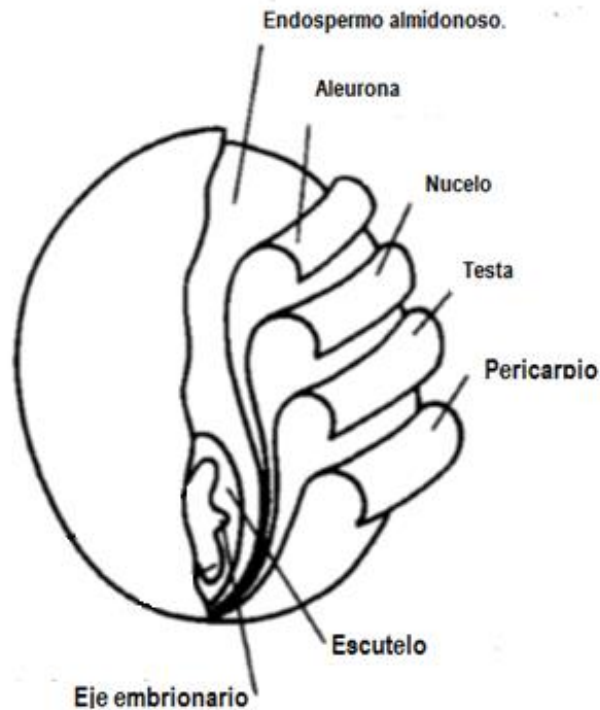


Figura 1.1 Partes que componen al grano de cereal.

Una de las tres partes anatómicas que constituyen al grano es el embrión (o germen). El embrión consiste del eje embrionario y el escutelo. El primero, tiene una función reproductiva y está conectado al endospermo por el escutelo. El escutelo se comporta como un órgano de secreción y absorción dando al eje embrionario los requerimientos nutrimentales cuando la germinación se lleva a cabo. El germen no contiene almidón, sino que se conforma principalmente de lípidos, proteínas, azúcares solubles y cenizas [1].

El componente mayoritario del cualquier grano de cereal es el endospermo, el tejido que contiene el almidón. Se comprende de 2 componentes que son fáciles de distinguir, la mayoritaria es una masa central que se denomina como endospermo almidonoso que consiste en células empaquetadas con nutrientes en forma insoluble, siendo el mayor componente el almidón y en orden de abundancia le siguen las proteínas. Estos nutrientes, carbohidratos y proteínas, pueden

ser movilizados para apoyar el crecimiento del embrión en la germinación. Las paredes del endospermo almidonoso de trigo están compuestas en su mayoría de arabinosilanos, mientras que en cebada predomina el 1-3 p-D glucano, y la celulosa es el componente mayoritario en el caso del arroz [4].

Alrededor del endospermo almidonoso está la aleurona, consiste de una a tres capas de células densas. El número de capas que contiene son tres para cebada y arroz, y una para trigo, maíz, avena, sorgo y centeno. La capa de aleurona sintetiza las enzimas necesarias para descomponer los componentes del endospermo almidonoso durante la germinación. A diferencia del endospermo almidonoso, no contiene almidón, sino que su componente mayoritario son las proteínas (hasta un 20%) [1].

Recubriendo a la aleurona se encuentran restos del nucelo, la sección dentro óvulo en la cual se desarrolla el saco embrionario cuando la germinación se lleva a cabo. De entre los tejidos que comprende la cariósida el último es la tesla; tiene una o dos capas de células dependiendo de la variedad de cereal. En esta sección se acumulan sustancias parecidas al corcho en las células que pueden conferirle color al grano de cereal [1].

Por último, otra protección con la que cuenta el grano después de su cosecha es el pericarpio, esta parte del grano es la minoritaria dado que solo representa del 5 al 7 % del grano se compone de un conjunto de capas celulares: epicarpio, mesocarpio y endocarpio, la principal función de las capas es dar protección a la célula contra agentes externos, aunque el endocarpio a su vez previene que se pierda agua durante la germinación y la dirige, para lo cual tiene células especializadas para ello (cross cells y tuve cells respectivamente) [5].

1.2 Composición química de los granos de cereal

Los granos de cereal presentan una amplia variedad de componentes, sin embargo todos contienen de manera general carbohidratos, proteínas, lípidos, vitaminas y minerales.

1.2.1 Presencia de carbohidratos en cereales

Los carbohidratos son el componente mayoritario de los granos de cereal, alcanzando hasta el 85% del peso total del grano. Se encuentran principalmente como polisacáridos que forman parte de los gránulos de almidón (carbohidrato de reserva) que se localizan en el endospermo, o carbohidratos de las paredes celulares (3-5%). Además de éstos también se encuentran

carbohidratos de bajo peso molecular que comprenden el 2% del peso total del grano, donde destaca la sacarosa como el compuesto predominante [2].

1.2.1.1 Polisacáridos

La función que tengan los polisacáridos en el grano de cereal puede clasificarlos como polímeros de reserva o componentes estructurales. El carbohidrato de reserva de mayor importancia es el almidón, se encuentra en forma de gránulos en las células del endospermo almidonoso del grano pero ausente en las células de la aleurona. En la madurez del grano, se puede encontrar almidón residual en las células de los tejidos del embrión y el escutelo. Los gránulos de almidón presentes en el endospermo del cereal se encuentran en diferentes tamaños y formas, esto depende de la variedad de cereal (Figura 1.2). Los gránulos se desarrollan en una membrana-confinada conocida como plástido (amiloplasto) aunque en la madurez se pierde [2].

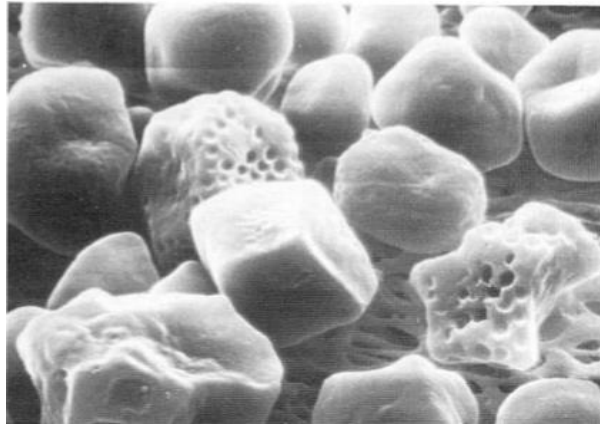


Figura 1.2 Gránulos de almidón por TEM

El almidón es una asociación de dos polisacáridos, amilopectina y amilosa. La amilopectina se encuentra en mayor proporción (70-80% p/p del granulo de almidón). Es un polímero ramificado compuesto solamente de glucosa en enlaces glicosídicos α 1-6, a la cadena lineal. La amilosa, que comprende de un 20 a un 30% de peso de los almidones del cereal, también es un polímero de glucosa pero es escasamente ramificada, los enlaces entre glucosa son α 1-4 glicosídicos [2] (Figura 1.3).

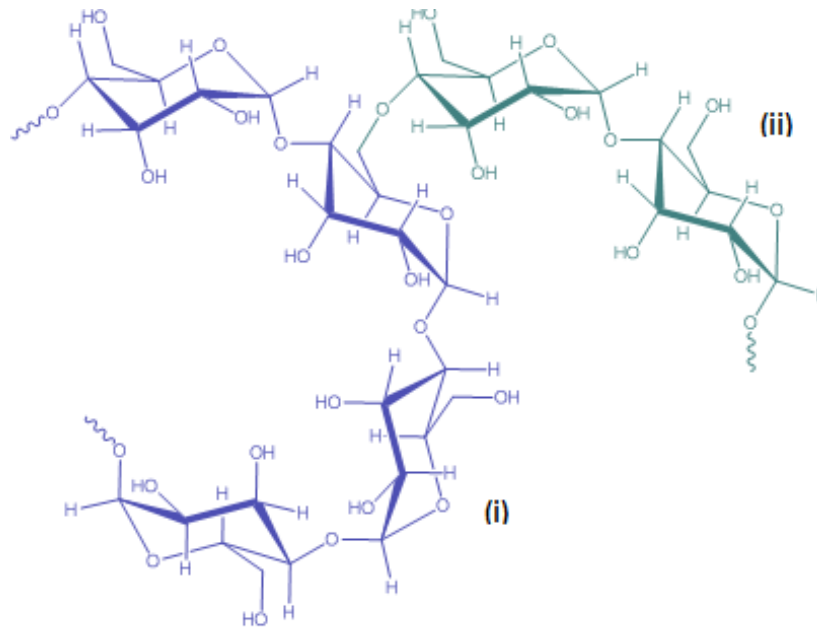


Figura 1.3 Estructura del almidón. (i) Amilosa y (ii) amilopectina

Adicionalmente al almidón, se encuentran los fructanos. Éstos son polímeros de fructosa, consisten en cadenas cortas de fructosa unidas a una sacarosa por enlaces glicosídicos β 2-6. Son formas de almacenamiento de energía menores en granos de cebada y trigo. Se encuentran en el embrión en su desarrollo hasta en un 20% [6].

Otros polisacáridos presentes en los cereales son los constituyentes primarios de las paredes celulares. Dos polisacáridos componen principalmente la pared: los arabinoxilanos y los β -glucanos. Las capas más exteriores contienen mayor cantidad de polisacáridos de este tipo. Los arabinoxilanos (AX) son los que mayor presencia tienen en la pared celular (85-90%). Como en la mayoría de componentes, entre granos de cereal su abundancia difiere, ya que puede representar el 8% en peso (en centeno) o solo el 1.5% (en trigo). Los AX son cadenas lineales de xilosa unidas por enlaces glicosídicos β -1-4 que pueden ser sustituidas por residuos de arabinosa en las posiciones O-2 u O-3. Un componente minoritario de los AX es el ácido ferúlico, el cual está enlazado como un éster a la arabinosa en la posición O-5. Su función principal radica en que su estructura le provee soporte a la pared celular, sin embargo también es fuente de ácido ferúlico y otros ácidos fenólicos los cuales le confieren actividad antifúngica [7] (Figura 1.4).

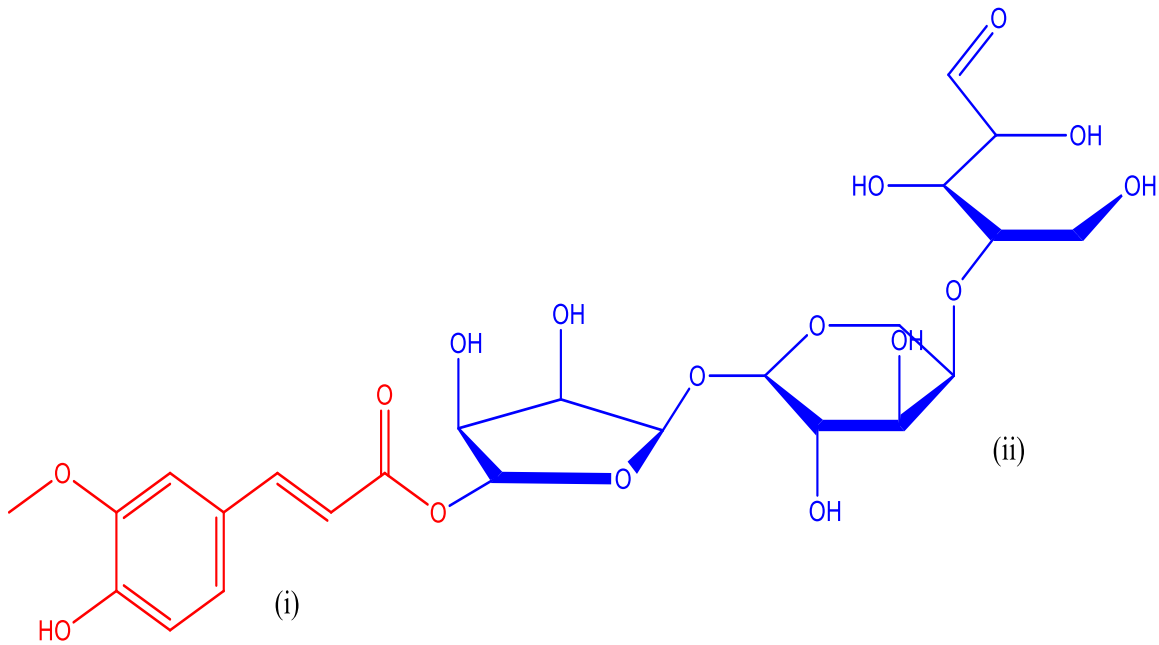


Figura 1.4 Molécula de ácido ferúlico (i) con arabinoxilano (ii).

La presencia de β -glucano es superior en el endospermo y aleurona comparados con otras capas. Son cadenas lineales compuestas únicamente de monómeros de D-glucosa unidos por enlaces glicosídicos de tipo beta tanto 1-3 como 1-4. Es una molécula parcialmente soluble en agua. La presencia del polisacárido es mayor en avena y cebada (hasta 5% p/p en algunas variedades) comparada con los demás cereales [7].

1.2.1.2 Carbohidratos de bajo peso molecular (mono-, di-, y oligosacáridos)

Los granos de cereal maduros contienen pequeñas concentraciones de carbohidratos de peso molecular (aproximadamente 2%) que comprenden a los mono-, di-, y oligosacáridos. La mayoría de estos azúcares solubles se encuentran en el germen. Los principales monosacáridos presentes son la fructosa y glucosa, y el disacárido principal es la sacarosa. Las concentraciones de estos carbohidratos aumentan cuando el grano es malteado o proceso de germinación debido a la hidrólisis enzimática del almidón siendo la maltosa, glucosa, maltotriosa y dextrinas (tanto lineales como ramificadas) los principales productos.

Los carbohidratos de bajo peso molecular son parte de los compuestos que son movilizados de los tejidos de reserva cuando el grano se está desarrollando. Las mayores concentraciones se

encuentran en los tejidos del embrión (trigo: 20%, maíz: 11%), pero están prácticamente ausentes en los tejidos de la capa del pericarpio maduro [2].

1.2.2 Presencia de vitaminas y minerales en cereales

Para el correcto funcionamiento de las enzimas en el metabolismo del grano son necesarios compuestos que unidos a ellas formen una holoenzima (enzima en estado activo) los cuales son llamados coenzimas al ser compuestos orgánicos y cofactores cuando son inorgánicos. Siendo las vitaminas los precursores de las coenzimas y los minerales los cofactores, necesarios para el crecimiento y metabolismo del cereal [8].

Los cereales son considerados una fuente adecuada de ciertas vitaminas y minerales. El germen y la capa de aleurona son las partes anatómicas que contienen las mayores concentraciones en el grano [2].

Los cofactores o vitaminas pueden dividirse en dos grupos en cuanto a su solubilidad. En los cereales las vitaminas hidrosolubles principales son la B1, B2 y la niacina. Durante la molienda disminuyen su concentración y aún más en la cocción y el procesamiento, por lo que a las harinas (de arroz y trigo principalmente) son enriquecidas con estas vitaminas al final del proceso. La vitamina B1 en la forma de tiamina fosfato está relacionada en el metabolismo de la glucosa, en cuanto a la B2 en su forma de nucleótido se encuentra involucrada en reacciones de óxido-reducción. Generalmente las vitaminas hidrosolubles se encuentran en las capas externas del grano [8].

Las vitaminas liposolubles más importantes en el grano de cereal son los tocoferoles (E) y carotenoides (A). Químicamente los tocoferoles son formados por la condensación de una hidroquinona con un diterpeno no cíclico. Son conocidos ocho homólogos, los α -, B-, Γ - y δ - tocoferoles y los α -, B-, Γ - y δ -tocotrienoles. En el trigo la mitad de los tocoferoles se encuentran en el germen [8].

Los carotenoides se dividen en dos grupos: carotenos y xantófilas. Estos se encuentran principalmente en las capas internas del grano como el endospermo pero carente en el germen y el pericarpio [8].

De igual forma los minerales están distribuidos de forma desigual en el grano, con un mayor contenido en las capas externas como pericarpio, aleurona y germen pero en bajas

concentraciones en el endospermo. Estos representan el 1.5 % del grano y disminuye la relación en la molienda. Entre los minerales el fósforo es el que mayor presencia tiene seguido por el potasio, mientras que el calcio, sodio y hierro se encuentran en menor concentración. Algunos de ellos como el fósforo se encuentran tanto en formas inorgánicas (Fosfatos) como en orgánicas (inositol, ácido fítico, etc.) [8].

1.2.3 Presencia de proteínas en cereales

La concentración de proteína varía debido a las condiciones ambientales y del campo durante el desarrollo y crecimiento del grano. Un rango de 8% a 11% es un contenido promedio en los granos. Los factores que afectan el contenido proteico son la fertilización con nitrógeno y la disponibilidad de agua durante el desarrollo [2].

El endospermo almidonoso es el mayor tejido de almacenamiento del grano de cereal que además de resguardar los gránulos de almidón también almacena la mayor cantidad de proteína. Comprende el 14% (p/p) pero debido a que es el componente anatómico más grande de la carióspside contiene el 80% de proteína presente en el grano, aunque no solo aquí se localiza la macromolécula, en el germen y en la capa de aleurona se encuentran en una proporción de 30% y en el pericarpio 7%, sin embargo estos ocupan un menor volumen en el grano. Éste grupo se clasifica en 2 grupos, las prolaminas y globulinas. Las prolaminas son las proteínas de almacenamiento mayoritarias en los cereales, siendo las minoritarias las globulinas, excepto en el arroz y la avena cuyo caso es el contrario [8].

Las prolaminas son insolubles en agua o soluciones diluidas de sales pero solubles en mezclas de alcohol-agua, tienen un gran contenido de prolina y glutamina las cuales juntas comprenden de un 30 a un 70% los de aminoácidos presentes en estas proteínas, aunque su contenido de lisina y triptófano es prácticamente nulo. A las prolaminas se les ha dado un nombre trivial basado en su nombre genérico en latín, como secalina (centeno), zeína (maíz) u hordeína (cebada), con excepción del gluten la proteína del trigo que se clasifica en dos, gliadinas que son proteínas monoméricas y fácilmente solubles en mezclas agua-alcohol, mientras que las gluteninas consisten en polímeros estabilizados por puentes disulfuro [2].

Las globulinas son proteínas insolubles en agua pero solubles en soluciones salinas. Son las proteínas mayoritarias en cereales como el trigo y la avena donde pueden alcanzar hasta el 80% de las proteínas totales y a su vez en su mayoría se encuentran en la capa de aleurona y en el

embrión. Las globulinas de estos cereales tienen una secuencia de aminoácidos muy parecida a las globulinas 7S presentes en leguminosas y plantas dicotiledóneas, por lo que pueden ser consideradas como sus homologas al tener estructuras y propiedades similares. Las proteínas 7S están almacenadas en cuerpos proteicos y su única función parece ser la de reserva de nitrógeno dado que no se ha encontrado alguna función en el desarrollo del grano [9].

1.2.4 Presencia de lípidos en cereales

Entre las macromoléculas que componen al grano de cereal, los que menos presencia tienen son los lípidos que representan el 3% de la carióspside (dependiendo del cereal el contenido de lípidos se encuentra entre 1.7 a 7% en los granos) [11].

Los lípidos de los cereales se originan a partir de membranas, organelos y esferosomas; estos tienen diferentes estructuras químicas. Se encuentran en mayor concentración en el embrión o germen, en menor grado en la capa de aleurona y en el endospermo está prácticamente ausente. Los cereales tienen una composición de ácidos grasos similar, en el que el ácido graso mayoritario es el linoleico (39-69%), mientras que el oleico y palmítico constituyen el 11-36% y 18-28% respectivamente. Los triglicéridos son los lípidos más abundantes y como componentes minoritarios se encuentran los fosfolípidos, glicolípidos y terpenoides [4].

Los triglicéridos (triacilgliceroles, TG) se encuentran depositados en las esferosomas (gotas de aceite) delimitados por una monocapa. La disposición en la que se encuentran los ácidos grasos en la molécula de glicerol es generalmente: ácidos grasos saturados en las posiciones C-1 y C-3, mientras que los ácidos grasos insaturados se encuentran comúnmente en C-2 [10].

Las mayores concentraciones de TG se encuentran en la capa de aleurona y en el escutelo, pero en cuanto a cantidad el embrión provee más TG. En el endospermo almidonoso de avena, trigo, maíz y arroz se han reportado la presencia de pequeñas cantidades de triglicéridos.

Los factores principales del uso ubicuo de los granos de cereales son su valor nutrimental, su fácil cosecha y su estabilidad en el almacenamiento. Los granos limpios, sanos y sin daños no tienen problemas en su almacenamiento pero el daño y la ruptura del tejido puede dar como resultado una mezcla de componentes celulares e iniciar reacciones de degradación. La degradación de lípidos en granos de cereal está asociada con la pérdida de calidad funcional en material “crudo” o con cambios indeseables en las propiedades organolépticas de productos [10].

La descomposición de lípidos en granos de cereal y en sus productos derivados se debe a las reacciones que involucran a reactivos como: enzimas, presencia de iones metálicos o la luz. Las vías más comunes de la degradación de lípidos (enzimáticas y no enzimáticas) son las reacciones hidrolíticas y oxidativas o una combinación de ambas.

La hidrólisis enzimática degrada el triglicérido que genera ácidos grasos libres, los cuales son más susceptibles a reacciones de oxidación. La rancidez puede ser producida por una reacción hidrolítica o como resultado de la reacción con oxígeno [10].

1.2.5 Presencia de enzimas en cereales

La mayoría de las proteínas de las fracciones de albuminas y globulinas son proteínas metabólicas, mayormente enzimas o inhibidores de enzimas. Muchas de estas enzimas se encuentran en la capa de aleurona y en el embrión para hidrolizar y sintetizar componentes necesarios durante la germinación a partir de carbohidratos y proteínas. También se encuentra distribuido en el endospermo. Nutritionalmente contienen una mejor composición de aminoácidos que las proteínas de reserva, principalmente por su mayor contenido en lisina, aunque se encuentran en mucha menor proporción. [4]

La mayoría de enzimas que hidrolizan las moléculas de reservas de los granos (carbohidratos, lípidos y proteínas) al momento de la germinación proveen los nutrientes (generalmente monómeros de las macromoléculas) necesarios para que se lleve a cabo. A su vez son sintetizadas de nuevo en el escutelo y en la capa de aleurona. Entre las enzimas degradadoras de carbohidratos se encuentran las α y β – amilasas, enzimas desramificantes, celulasas, β -glucanasas y glucosidasas [4].

Las amilasas son enzimas que hidrolizan los polisacáridos en gránulos de almidón. Se clasifican en endohidrolasas (α -amilasa), estas atacan los enlaces glicosídicos α 1-4 de amilosa dentro de las moléculas del polisacárido y produce una mezcla de dextrinas con pequeñas cantidades de maltosa y oligosacáridos, y en exohidrolasas (β -amilasa), que atacan los enlaces glicosídicos α -1-4 cerca del final de la cadena (finales no reductores) de las cadenas de amilosa la cual produce maltosa, ambas trabajan a un pH de 5; además ninguna puede hidrolizar el enlace glicosídico 1-6 de la amilopectina, para esta hidrólisis las enzimas desramificantes están presentes. Ambos tipos de amilasas existen en múltiples formas, también llamadas isoenzimas con diferentes propiedades físicas y químicas [4].

La β -glucanasa es importante en el procesamiento de cebada debido a que las paredes celulares están compuestas de un 70% de β -glucanos, existen dos isoenzimas una hidroliza los enlaces β -1-3 y la otra los enlaces β -1-4 produciendo así oligosacáridos de 3 o 4 unidades glicosídicas.

Las enzimas que hidrolizan proteínas son llamadas proteinasas, proteasas o peptidasas. Éstas atacan el enlace peptídico entre los aminoácidos e incluyen tanto las endo como las exopeptidasas. Las últimas son divididas en carboxipeptidasas cuando actúan sobre el grupo carboxil terminal y aminopeptidasas cuando atacan al grupo amino terminal. Las enzimas proteolíticas más importantes son las peptidasas ácidas, las cuales existen en múltiples formas teniendo tanto endo como exotipos con un pH de actividad óptimo entre 4.2 y 5.5. A su vez se pueden clasificar basados en su mecanismo catalítico como serino-, metalo-, aspartico- y serinopeptidasas [4].

Las enzimas que catalizan la liberación de ácidos grasos libres (FFA) mediante la hidrólisis de los enlaces éster de los triacilglicéridos, son conocidas como lipasas. Aunque, entre las lipasas existen enzimas que difieren en sus mecanismos de acción como en su especificidad. A su vez estas enzimas pueden convertir en mono-, di-glicéridos los triacilglicéridos. La actividad de la lipasa es muy importante dado que los ácidos grasos insaturados libres son más susceptibles a la rancidez oxidativa que los triglicéridos. La actividad varía entre cereales siendo la avena y el mijo los que tienen mayor actividad de lipasa [10].

Las enzimas liberadoras de ácidos grasos presentes en cereales se pueden dividir en dos grandes grupos, las trigliceril lipasas que hidrolizan triglicéridos en una interfase aceite-agua y no hidrolizan lípidos en solución. Es diferente a las demás estereasas debido a que los sustratos que hidrolizan no son solubles en agua [10].

En contraste el segundo grupo las acil hidrolasas (LAH) actúan en las formas micelares y monodispersas de los lípidos y no hidrolizan las formas insolubles lipídicas (triglicéridos). Ej. fosfolipasas A y B, lisofosfolipasa, galactolipasa, monoglicerido-lipasa. Estas catalizan la desacilación, liberando FFA de una gama de lípidos, que incluyen a mono y diacilfosfolípidos y galactolípidos, mono- y diglicéridos y ácidos grasos de ésteres fenólicos de cadena larga. Las enzimas reciben su nombre de la especificidad del sustrato al que atacan [10].

La fitasa es una estereasa que hidroliza el ácido fitico a inositol y ácido fosfórico libre. La hidrólisis (incluso parcial) es deseable desde un punto de vista nutricional dado que los productos tienen

una gran actividad quelante de cationes como el zinc, calcio y magnesio. La complejación de estos iones con ácido fítico se ve reducida [4].

Las enzimas oxidativas son una de los grupos más importantes que se relacionan con la rancidez. La lipoxigenasa (LOX, lipoxidasa o caroteno oxidasa) es una enzima que se encuentra en los granos de cereales e inicia la descomposición de lípidos en alimentos. El término "lipoxigenasa" cubre una amplia gama de enzimas que catalizan la peroxidación por oxígeno de ácidos grasos poliinsaturados que contienen fracciones cis, cis-1,4 pentadieno. El producto es un hidroperóxido de ácido graso con grupos dieno conjugados y que tiene el grupo hidroperóxido localizado en al final o al inicio del grupo pentadieno original. Los sustratos más comunes para La LOX en alimentos son los ácidos linoleico y linolénico [10].

Con el ácido linoléico pueden ser formados dos isómeros que se representan en la Figura 1.5.

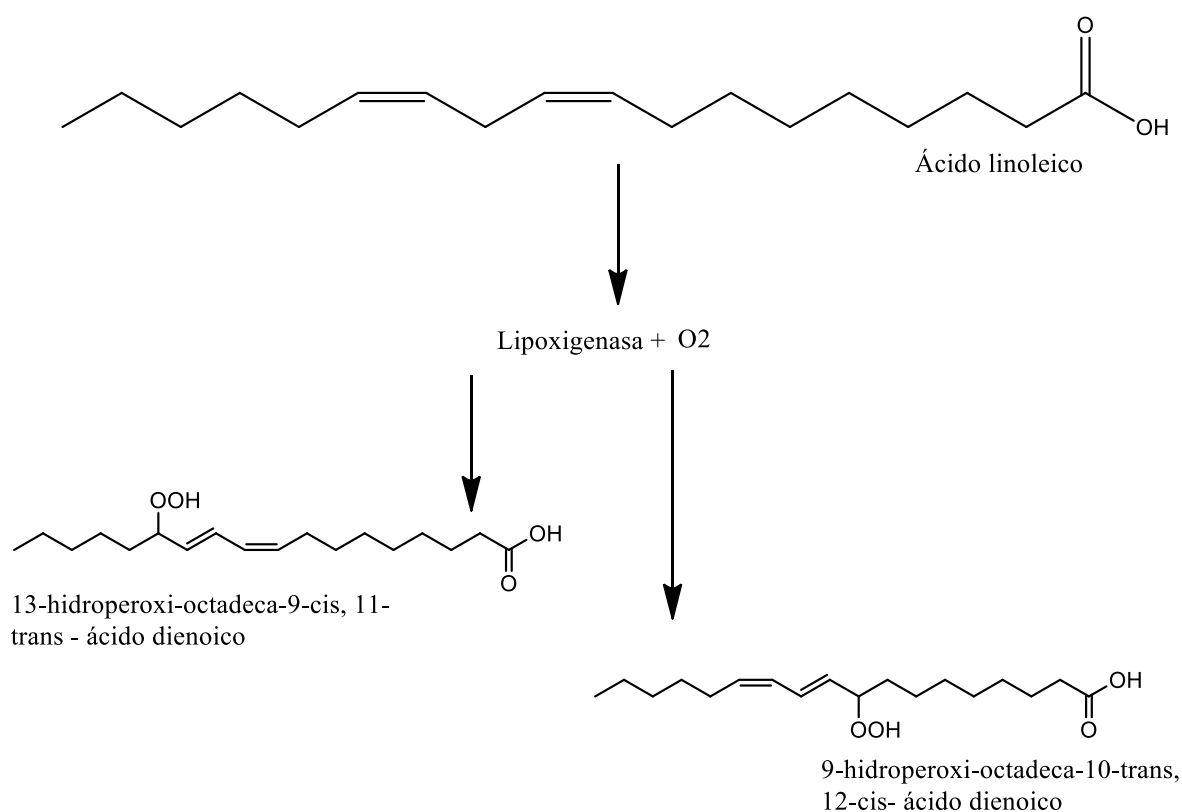


Figura 1.5 Oxidación enzimática de ácido linoleico por lipoxigenasa y mediada por oxígeno.

La LOX cataliza reacciones esteroespecíficas formando dos isómeros de ácido graso peroxidados ópticamente activos. La enzima presenta un átomo de hierro en su estructura y su peso molecular es de aproximadamente 10^5 Daltons. Generalmente la LOX muestra una mayor actividad con ácidos grasos libres, respecto a cuándo se encuentran como di- y triglicéridos que contienen ácidos grasos poliinsaturados. Aunque la LOX cataliza reacciones en sistemas aerobios, la enzima se encuentra activa en la ausencia de O_2 y cataliza la extracción de un radical $H\cdot$ de los ácidos grasos [10].

La remoción esteroespecífica del átomo de hidrógeno del carbono del grupo pentadieno es el primer paso para el proceso catalítico, lo cual sigue de un rearrreglo del radical dieno a un estado más estable como dieno conjugado cis, trans y finalmente bajo condiciones aeróbicas, oxígeno molecular se une a un átomo de carbono final del grupo dieno para formar un radical hidroperoxi que extrae un átomo de hidrógeno para formar el hidropéroxido (HP) [10].

Los hidropéroxidos presentan valores de potenciales de óxido-reducción alrededor de 1.7 V (respecto al electrodo normal de hidrógeno). El potencial redox está relacionado a la concentración de los agentes oxidante y reductor a través de la ecuación de Nernst [11].

$$E = E^0 + \frac{0.059}{n} \log \frac{[\text{Oxidante}]}{[\text{Reductor}]}$$

Donde E^0 es igual al potencial estándar (suponiendo que el potencial redox del sistema H_2-H^+ es cero) y n es el número de electrones de intercambio. Para el caso de hidropéroxidos el valor $E^0=1.7$ V denota que son oxidantes fuertes al igual que el Ce^{4+} ($E^0=1.72V$), el $Cr_2O_7^{2-}$ ($E^0=1.36V$) y el MnO_4^- ($E^0=1.69V$). Dada la importancia de la LOX y sus propiedades redox del producto generado, se han desarrollado metodologías analíticas para medir la actividad enzimática mediante el uso de cromóforos sensibles a los compuestos involucrados en la reacción [10].

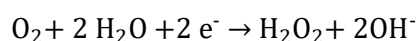
1.2.5.1 Medición de actividad enzimática de LOX

La importancia del estudio de la lipoxigenasa en cereales radica en que su actividad enzimática está relacionada con la degradación de lípidos presentes o rancidez enzimática, lo que genera una disminución en la calidad nutricional así como generación de malos olores tras la descomposición de los hidropéroxidos. El contenido de HP está asociado por tanto al estado de rancidez en el que se encuentran los productos alimentarios.

Considerando la reacción generalizada de formación de hidroperóxidos, se han diseñado cuatro estrategias para desarrollar metodologías analíticas capaces de medir la actividad enzimática de la lipoxigenasa [10]:



Una primera propuesta de determinación de actividad de LOX se basa en la cuantificación del oxígeno molecular consumido durante la oxidación lipídica. La cuantificación se basa en una medición de la señal catódica mediante polarografía asociada a la reacción:



La metodología se aplicó al análisis de lipoxigenasa en soya encontrándose límites de detección de hidroperóxidos de 7.7 μM y un rango lineal de 0.02 a 0.20 mM utilizando ácido linoleico como sustrato [12]. Una limitante del método es el uso de electrodos de mercurio, donde la agitación del medio da como resultado mediciones erróneas debido a que se licúa el oxígeno atmosférico incrementando la señal [13].

Debido a las limitantes que presenta el método descrito, se desarrolló un ensayo para la determinación espectrofotométrica del dieno conjugado en el hidroperóxido generado. La formación del dieno conjugado permite incrementar la absorbancia a 234 nm, este incremento es usado para la cuantificación del producto de reacción a través de la ecuación de Lambert y Beer, donde los HP de ácido linoleico tienen un coeficiente de absorptividad molar (ϵ) de 25,000 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [14].

Este método es utilizado principalmente para la síntesis y estandarización de HP, sin embargo en muestras reales no se aplica debido a la interferencia de los componentes de la matriz analítica. La estandarización se realiza utilizando de igual manera a los ácidos linoleico o araquidónico, aunque el último es más costoso y menos estable [15]. Una aplicación esta asociadas el análisis de las variedades de trigo *Xionyan* y *Chinese spring* encontrándose valores de actividades de 2000 y 4000 $\text{U min}^{-1} \text{mg}^{-1}_{\text{proteína}}$, respectivamente [16].

Debido a las limitaciones de este método, se ha propuesto una separación previa de los componentes por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC-UV). La metodología modificada se ha aplicado en muestras de biomasa de cepas de *Penicillium* encontrándose actividades de 31.1 nmoles de dieno producido por minuto por miligramo de muestra, siendo el ácido linoleico el sustrato de la enzima. La ventaja de esta metodología es poder separar los isómeros 9 y 13 producidos en la reacción [17]. Los límites de detección alcanzados son de 4.9 μM con un intervalo lineal de 0.02-0.2 mM [18].

Debido a que las metodologías anteriores no son capaces de cuantificar la actividad enzimática de lipoxigenasa a concentraciones menores se ha ampliado la investigación en determinaciones colorimétricas. Estas se dividen en dos, el uso de sustratos cromofóros que se decoloran por reacciones de co-oxidación ó reacciones colorimétricas que involucran a los hidroperóxidos generados. La primera metodología generalmente se aplica al análisis de isoenzimas de LOX que tienen una mayor actividad de co-oxidación, para ello se emplean pigmentos como el β -caroteno (figura 1.6) o crocina (figura 1.7) que al interactuar con la enzima produce una coloración. Weber *et al* aplicaron esta metodología para determinar la actividad de lipoxigenasa de soya, para lo cual se registró la disminución de absorbancia en el intervalo de 440-480 nm, se construyendo las respectivas curvas de calibración en un intervalo lineal de 1 a 10 μM [19]. Sin embargo, la reacción carece de estequiometría y no se recomienda su uso para determinar actividad enzimática [10].

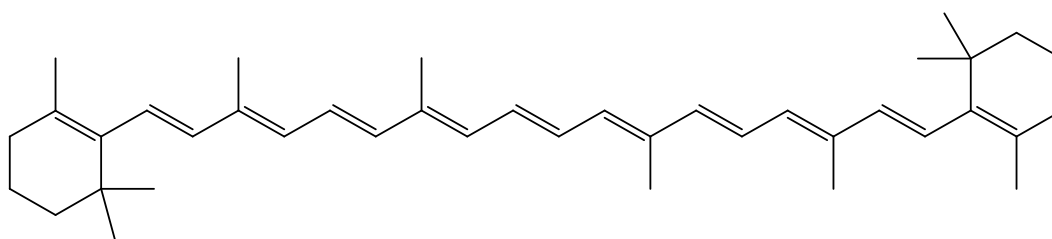


Figura 1.6. Estructura del β -Caroteno

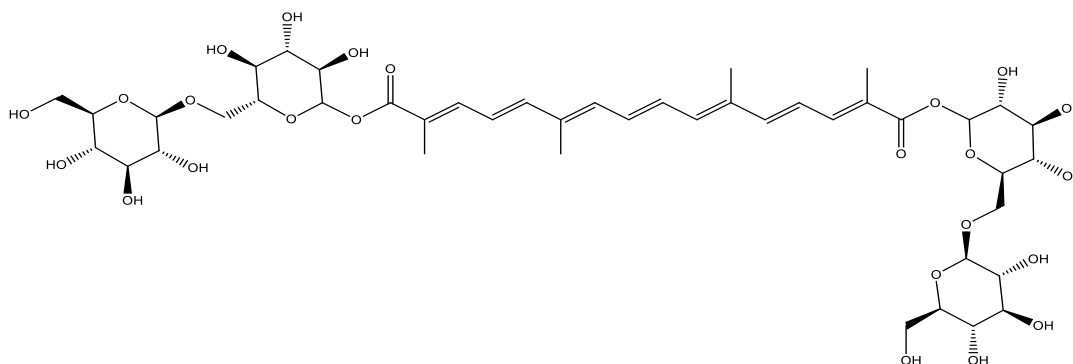
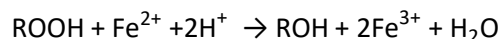


Figura 1.7. Estructura de la crocina.

Los métodos más empleados son los que se basan en el potencial de oxidación de los HP generados. Uno de los primeros métodos emplea soluciones saturadas de KI, donde los hidroperóxidos oxidan el ion I^- a I_2 , el cual forma un complejo azul con almidón determinado espectrofotométricamente a 470 nm. Sin embargo la absorptividad molar del complejo almidón- I_2 es dependiente de la longitud de onda y del tipo de almidón a utilizarse por lo que debe ser calculada antes de realizar cualquier ensayo. [20].

Haciendo uso de las propiedades redox de los productos existe a su vez el ensayo de naranja de xilenol (FOX). La metodología se basa en la cuantificación de los hidroperóxidos tras la oxidación del Fe^{2+} a Fe^{3+} , siendo el último capaz de complejarse con el naranja de xilenol [21]. En esta metodología presenta límites de cuantificación en el orden de decimas de μM . El bajo límite de detección ha permitido su aplicación al análisis de LOX en muestras de arroz [21], cebada y malta [22].



Las nanopartículas metálicas son una alternativa atractiva debido a sus características espectroscópicas, estabilidad y propiedades redox. Es por ello que es posible utilizarlas como compuestos cromóforos sensibles a los HP.

1.3 Nanopartículas metálicas

Las nanopartículas debido a sus propiedades ópticas y eléctricas han sido utilizadas en diversas áreas como la catálisis [23], microbiología [24], y detecciones biológicas [25] y químicas [26]. Una de las características más importantes de nanopartículas (NPs) metálicas de Au y Ag es su

resonancia de superficie de plasmón localizada (LSPR) la cual se refiere a la oscilación colectiva de los electrones conductores de las NPs metálicas cuando su frecuencia se iguala con la radiación electromagnética incidente. Como resultado de este fenómeno son producidas fuertes bandas de absorción o un incremento en la intensidad de dispersión de la radiación a ciertas longitudes de onda. La LSPR de las NPs está relacionada con el tamaño, forma, composición, distancia entre partículas y la constante dieléctrica del medio [27].

Debido a estas propiedades ópticas, las soluciones coloidales de estas NPs tienen altos coeficientes de absorptividad y diferentes colores en la región visible del espectro de acuerdo a su grado de agregación. Por lo tanto, una metodología bien diseñada entre el analito y las NPs presentes permite el cambio de color de las NPs permitiendo una detección espectrofométrica del analito de interés. Estos métodos de detección basados en NPs han sido de interés en los últimos años, no solo por su excelente funcionamiento analítico exhibido en términos de selectividad y sensibilidad sino también por su simplicidad y bajo costo ya que no requiere instrumentación costosa o compleja [27]. Su aplicación en determinaciones espectrofotométricas se ha basado en dos principios, la agregación de las nanopartículas y sus propiedades óxido-reducción.

La agregación de las nanopartículas metálicas ha sido de gran interés en el área de la biodetección de células carcinogénicas y de ADN [28] así también en la determinación de iones metálicos como, Hg^{2+} , Cu^{2+} , Ag^+ , Pb^{2+} , Cr^{3+} , Co^{2+} , Mn^{2+} alcanzándose límites de detección en el orden de μM [28-29]. De manera general (Figura 1.8) se modifican las superficies metálicas con antígenos o agentes de reconocimiento, al estar en contacto con el analito se agrupan las NPs produciéndose un cambio en el espectro UV-Vis que se asocia a la concentración del compuesto de interés.

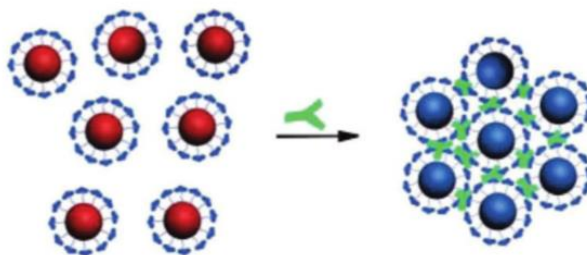


Figura 1.8 Agregación de nanopartículas metálicas en presencia de antígeno.

Bajo el segundo principio las NPs de mayor interés son las de plata, debido a su potencial redox ($E^0_{Ag}=0.79V$), por lo que reaccionan con mayor facilidad comparadas con las AuNPs ($E^0_{Au}=1.69V$). Gracias a ello, es posible determinar especies con propiedades oxidantes debido a que la morfología y el tamaño de las AgNPs se altera al reaccionar. Como consecuencia la señal analítica en el espectro UV-Vis se abate y desplaza. Cabe destacar que las AgNPs tienen menor precio y mayores coeficientes de extinción que las de AuNPs.

Bajo este concepto, se han diseñado métodos de análisis como la determinación de iones yoduro en presencia de tiosulfato. Las AgNPs triangulares tienden a tener un máximo de absorbancia a los 666 nm, en el incremento de tiosulfato la señal se desplaza a los 427 nm. Los ángulos de las AgNPs triangulares se corroen por la presencia de $S_2O_3^{2-}$ dando como producto al $[Ag(S_2O_3)_2]^{3-}$, mientras que las AgNPs forman discos de menor tamaño de partícula. Cuando se adicionan los iones I^- al medio, se inhibe parcialmente la corrosión y se observa un abatimiento de la señal analítica y un desplazamiento a longitudes de onda mayores como consecuencia de la formación de $AgI \downarrow$ sobre las AgNPs (Figura 1.9). El método propuesto permite cuantificar al ión yoduro en un intervalo lineal de 0.001 a 1 μM [30].

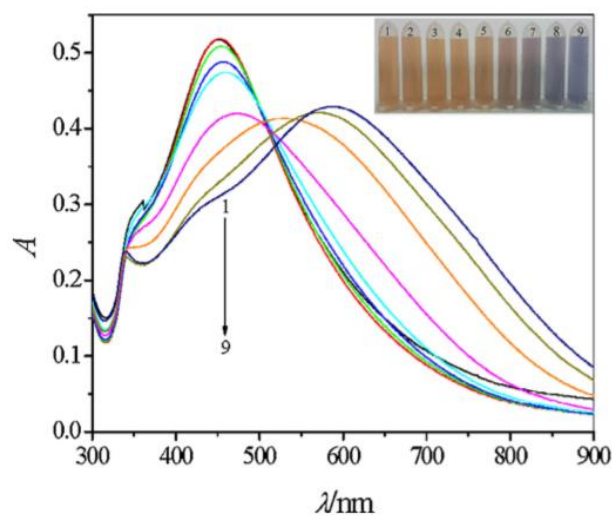


Figura 1.9 Espectros UV-vis de AgNPs en presencia de $I^-/ S_2O_3^{2-}$. Concentraciones de I^- : 0.0-1.0 mM (espectros 1-9), respectivamente.

Las formas en las que las AgNPs existen son nanocubos, nanoprismas, nanodiscos, nanovarillas, nanocables y nanocristales y cuyos tamaños varían de 1 a 100 nm. Esta amplia gama de formas y

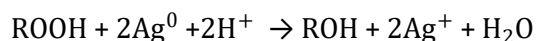
tamaños dan como resultado una absorción a determinada longitud de onda diferente para cada una de ellas (Figura 1.10) [30-31].



Figura 1.10 Morfología, color y máximo de absorción en UV-vis de AgNPs [31].

Las condiciones de síntesis son un parámetro crítico al desarrollar una metodología para el análisis de muestras, ya que las diferentes formas de AgNPs pueden tener diferentes propiedades. Se han desarrollado varias metodologías que permiten controlar el tamaño de las AgNPs tal como la ablación con laser, la irradiación de electrones o descomposición térmica de la masa seguida por una condensación [32]. La formación de AgNPs de igual forma puede ser asistida por agentes oxidantes como el MnO_4^- , o agentes reductores como el NaBH_4 [33] o SO_3^{2-} [34], por procesos fotoquímicos como irradiación de luz UV-Vis (foto-estimulación) y por procedimientos electroquímicos [35].

En cereales la lipoxigenasa da lugar a la formación de hidroperóxidos, los cuales tienen un potencial redox elevado que permite que reaccionen con las AgNPs de manera espontánea. Es por ello, que en el presente trabajo se evalúa el uso de las AgNPs en la determinación de hidroperóxidos para relacionar dicha concentración con la actividad enzimática de lipoxigenasa en muestras de cereales.



Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general.

Diseñar una metodología espectrofotométrica mediante el uso de nanopartículas de plata (AgNPs) para la determinación de actividad enzimática de lipoxigenasa en cereales.

2.2 Objetivos particulares.

1. Evaluar el uso de AgNPs en la determinación de agentes oxidantes como el KMnO_4 , H_2O_2 e hidroperóxidos de ácido linoleico mediante el cambio anisotrópico de las nanopartículas de plata.
2. Optimizar la síntesis de AgNPs mediante la variación de la concentración de los reactivos involucrados en la reacción.
3. Diseñar y validar una metodología de análisis de actividad de lipoxigenasa en cereales a través de la evaluación de los parámetros analíticos, la precisión y exactitud.

Metodología

3 METODOLOGÍA

3.1 Reactivos, soluciones y equipos.

Todas las soluciones fueron preparadas disolviendo el reactivo de interés en agua desionizada (18.0 M Ω cm) proporcionada por un sistema Mili-Q (Milipore, Bedford, MA, USA).

Los reactivos empleados como: ácido ascórbico, ácido linoleico, lipoxigenasa de *Glycine max* (soya), borohidruro de sodio, citrato de sodio tribásico, nitrato de plata y Tween 20 fueron obtenidos de Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Por otra parte el TRIS (trihidroximetilaminometano) y la solución de amoníaco (28-30%) pertenecen a J. T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA). Como interferentes se evaluaron el almidón, maltosa, sacarosa y glucosa (Sigma Aldrich) en concentraciones de 1-3% (w/w). Las muestras de cereal (cebada, arroz y trigo) fueron adquiridas en comercios locales de Pachuca de Soto (Hidalgo, México).

La detección espectrofotométrica se realizó en un espectrofotómetro UV-Vis Perkin Elmer Lambda 40 (Suiza), con una celda de cuarzo de 1.0 cm de paso óptico.

3.2 Síntesis de hidroperóxidos.

Los agentes oxidantes empleados en la evaluación de las AgNPs fueron KMnO₄, H₂O₂ e hidroperóxidos sintetizados a partir de ácido linoleico. La síntesis de hidroperóxidos se realiza vía enzimática mediante la siguiente metodología. Se pesan 0.0286 g de ácido linoleico, se añaden 23.5 μ L de amoníaco (28 %) y 75.6 μ L de agua. La mezcla se incuba en baño maría (60 °C) durante 30 minutos o hasta que la solución se clarifique. Posteriormente se añaden 200 μ L de Tween 20, se afora la mezcla a 25.0 mL con una solución tampón de Tris (0.1 M, pH 6.6). Una vez preparado el sustrato, 1.0 ml de la solución se mezcla con 4.0 mL de buffer de boratos (0.1 mM) y 20 μ L de una solución de lipoxigenasa de soya (*Glicine max*) que contiene 412 unidades enzimáticas. Los hidroperóxidos generados son cuantificados a 245 nm hasta observar un valor constante de la absorbancia. La reacción se detiene aforando a 10 mL con metanol y se determina la concentración utilizando el valor de $\epsilon=25000 \text{ cm}^{-1}\text{mol}^{-1}$ [21]. (Los espectros fueron obtenidos en un equipo Perkin Elmer modelo Lambda 40).

Con la finalidad de evidenciar la formación de hidroperóxidos se obtiene el espectro de ¹H-RMN de la materia de partida y del producto de reacción. Para ello se coloca una muestra de 10 mg de ácido linoleico disuelto en 500 μ L de una solución de carbonato de sodio 0.1 M preparada en agua desionizada que contenía 412 UE lipoxigenasa de soya. Transcurrida media hora acidifica la

muestra con HCl 1.0 M y se realiza la extracción del producto con 500 μL de CDCl_3 . La fase orgánica se separa y se seca con Na_2SO_4 antes de transferirse al tubo de resonancia para su análisis de ^1H -RMN Jeol eclipse 400 (Estados Unidos).

3.3 Síntesis de AgNPs

Las AgNPs evaluadas en el presente trabajo son sintetizadas en dos etapas según la metodología propuesto por Roh *et al* [33]. En una primera etapa se obtiene una dispersión de semillas de AgNPs; para ello se preparan 25 mL de una solución que contiene AgNO_3 (0.72 mM) y citrato de sodio (0.68 mM). Posteriormente se adicionan 0.6 mL de NaBH_4 (0.1 M) dejando en agitación durante 10 min hasta que la solución se torna de color amarillo, lo cual indica que se han formado las AgNPs denominadas semillas.

En la segunda etapa se mezclan 10.0 mL de agua con 0.05 g de citrato de sodio, 250 μL de una dispersión de semillas de AgNPs, 60 μL de AgNO_3 (0.018 M) y 150 μL de ácido ascórbico (0.1 M). La mezcla se torna color azul a los 5 min de agitación, tiempo en el que se forman las AgNPs utilizadas en éste trabajo [33].

3.4 Evaluación con agentes oxidantes

En la evaluación de la reacción de las AgNPs con agentes oxidantes se realiza adicionando soluciones de KMnO_4 , H_2O_2 e hidroperóxidos de ácido linoleico a diferentes concentraciones. Se preparan tres sistemas independientes de 10 mL de la dispersión de AgNPs a las cuales se adiciona de manera sucesiva 100 μL de KMnO_4 (0.032 mM), H_2O_2 (0.1 M) e hidroperóxidos de ácido linoleico (13.34 μM). Transcurridos 2 min, se obtiene el espectro UV-Vis de 380 a 1000 nm en un equipo Perkin Elmer.

Con la finalidad de evaluar la morfología de las AgNPs se adquieren las micrográficas en un microscopio electrónico de transmisión (JEOL JEM-101, Estados Unidos).

3.5 Optimización de la síntesis de AgNPs

Una vez seleccionadas las AgNPs, se utilizó un diseño central compuesto para estudiar las variables de síntesis de las AgNPs. El diseño de superficie de respuesta es un conjunto de técnicas avanzadas de diseño de experimentos que ayudan a entender mejor y optimizar la respuesta. La metodología del diseño de superficie de respuesta suele utilizarse para refinar los modelos después de determinar los factores críticos utilizando los diseños factoriales, especialmente si se sospecha que

existe curvatura en la superficie de respuesta. Los diseños centrales compuestos pueden ajustarse a diversos modelos matemáticos.

Las variables de control incluidas fueron: las concentraciones de ácido ascórbico (AA), de ión plata ($[Ag^+]$) y de semillas de AgNPs. La variable de salida fue la absorbancia obtenida 752 nm (U. A.). La superficie de respuesta se obtiene utilizando un nivel de significación (α) de 1.68. El nivel α se define como la distancia de cada punto axial desde el centro de un diseño central compuesto. Un diseño de 3 factores tiene un valor de 1.68. Los niveles seleccionados para ser optimizados de cada una de las variables de control, se presentan en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1 Niveles de significancia de variables en un diseño compuesto central.

| Factores | Niveles | | | | |
|----------------------------------|---------|------|------|-------|-------|
| | -1.68 | -1 | 0 | 1 | 1.68 |
| $[AgNPs]_{semillas}$ (μM) | 14.0 | 16.0 | 18.0 | 20.0 | 22.0 |
| $[Ag^+]$ (μM) | 54.0 | 68.6 | 90.0 | 111.4 | 126.0 |
| [AA] mM | 1.0 | 1.2 | 1.5 | 1.8 | 2.0 |

La superficie de respuesta y la ecuación de la misma se obtienen a partir del análisis de los datos experimentales de la matriz de diseño, mediante el programa Minitab 15.1.

Las condiciones óptimas encontradas se describen a continuación en la Figura 3.1

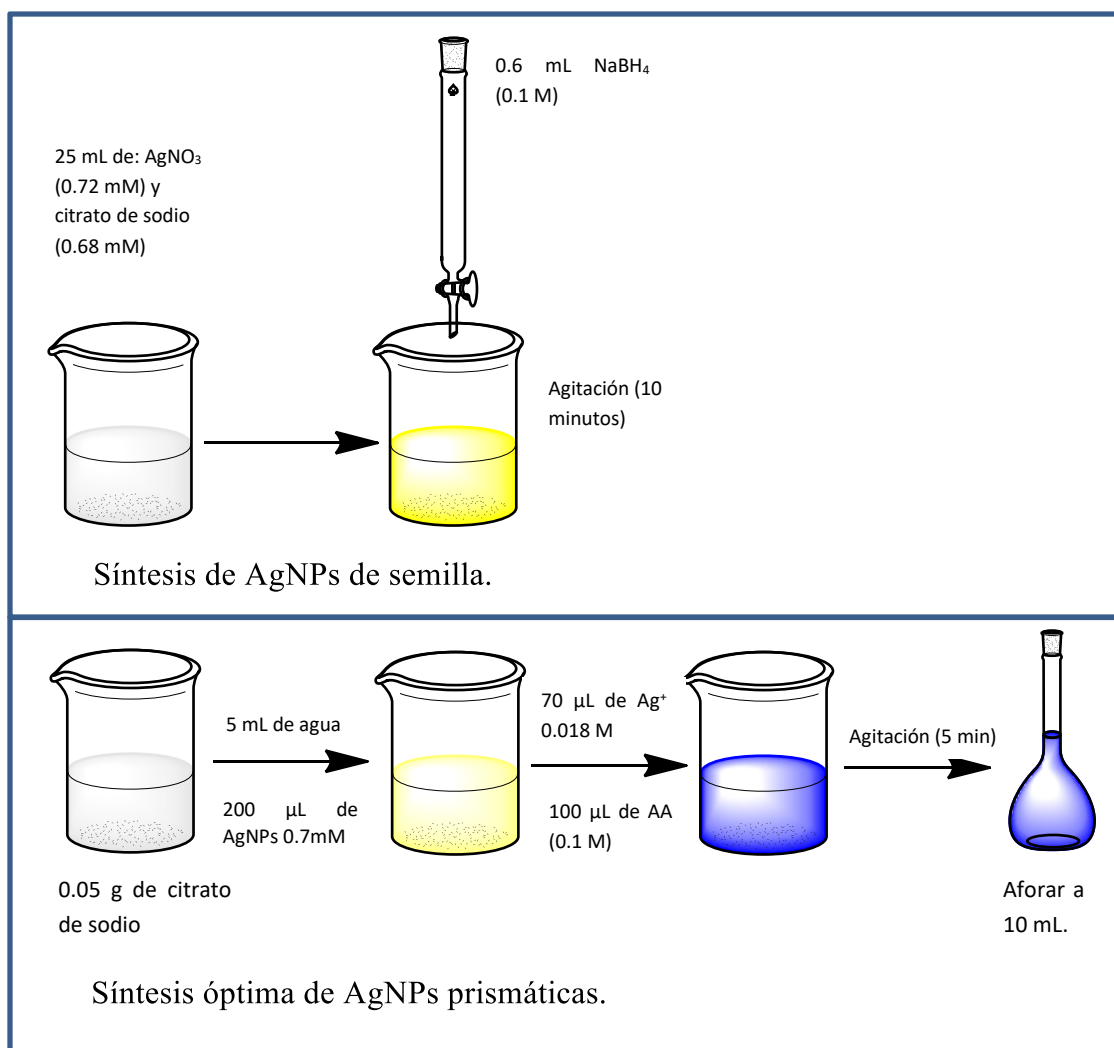


Figura 3.1. Síntesis óptima de AgNPs prismáticas.

De esta forma se garantizan las concentraciones óptimas de AgNPs ($14.0 \mu\text{M}$), Ag^+ ($126 \mu\text{M}$) y ácido ascórbico (1.0 mM) en el sistema final.

3.6 Parámetros de validación analítica y comparación con ensayo de FOX.

La validación de un método analítico es el proceso por el cual se establece mediante estudios de laboratorio, que sus características de funcionamiento satisfacen los requerimientos para las aplicaciones analíticas destinadas. Los parámetros que comprenden la validación son el intervalo lineal, límites de detección y cuantificación, la precisión (expresada como repetibilidad y

reproducibilidad) y la exactitud. La metodología empleada para la validación es la recomendada por la IUPAC [36]

El intervalo lineal se define como la sección útil de cuantificación de un analito. De manera general se utiliza un ajuste mediante mínimos cuadrados con la finalidad de obtener la ecuación de la recta donde la Respuesta=Ordenada \pm Sensibilidad analítica [Concentración]. La diferencia de cuadrados de la respuesta experimental y la ajustada permite calcular de desviación estándar de ajuste (Se).

El límite de detección se define como la concentración mínima que puede ser detectada en un instrumento. La IUPAC define éste valor como:

$$\text{LOD} = \frac{3.29\text{Se}}{\text{Sensibilidad analítica}}$$

El límite de cuantificación se define como la concentración mínima que puede ser determinada, el valor se determina a partir de la siguiente expresión:

$$\text{LOD} = \frac{10\text{Se}}{\text{Sensibilidad analítica}}$$

Por tanto, el intervalo lineal está definido a partir del LOQ hasta la concentración máxima donde se tiene una línea recta, donde la linealidad se evalúa a través del valor de r^2 . El intervalo que debe ser comprendido debe utilizar al menos 5-6 soluciones estándar en donde se incluya del 80 al 120% de la concentración esperada de analito.

La precisión expresa el grado de concordancia entre resultados individuales cuando el método se aplica repetidamente a múltiples muestras de una muestra homogénea. Desde un punto de vista estadístico, la precisión mide la dispersión de los resultados entorno al valor promedio, independientemente si este es o no el valor verdadero. Este parámetro está compuesto de la repetitividad y reproducibilidad. La primera es la precisión obtenida en las mejores circunstancias (mismo analista y muestras en un día) y la segunda en condiciones adversas (días distintos, diferentes laboratorios). En el presente trabajo, se prepara una solución estándar de HP (3.4 μM) y se analiza por triplicado en tres días diferentes. El análisis de la desviación estándar relativa (DER)

del mismo día está asociado a la repetitividad, mientras que la DER de las nueve medidas se relaciona a la reproducibilidad.

La exactitud de un método analítico es la cercanía de los resultados experimentales obtenidos por dicho método a uno aceptado como verdadero [37]. Una alternativa para obtener la exactitud es comparar los resultados del método propuesto con los obtenidos utilizando una técnica de referencia establecida mediante una prueba t de comparación de medias.

La metodología propuesta (AgNPs) se contrastó con el ensayo con naranja de xilenol (ensayo de FOX), el cual consiste en la oxidación de Fe^{2+} a Fe^{3+} por la reacción con los hidroperóxidos generados de la reacción enzimática. El complejo con Fe(III)-naranja de xilenol en medio ácido absorbe en un intervalo de 540 a 600 nm [21]. El reactivo de FOX consiste en una solución que contiene $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.25 mM), ácido perclórico (0.22 M), naranja de xilenol (37.5 μ M) en metanol:agua (9:1). Para cada análisis, 1.0 mL del reactivo es mezclado con 1 mL de buffer de Tris (pH 6.6, 0.01M), 25 μ L de linoleato de amonio (10.2 mM) y 25 μ L de extracto acuoso de cereal. Tras 5 min de reacción, la absorbancia se mide a 560 nm. Los hidroperóxidos de ácido linoleico generados fueron determinados por interpolación en la curva de calibración usando estándares en las mismas concentraciones que el ensayo con AgNPs. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

3.7 Análisis de muestras

Para el análisis de LOX en muestras de cereales se descascarillaron 1.2 g de diferentes cereales (arroz, cebada y trigo) y se extrajo la enzima lipoxigenasa moliendo cada cereal con 8 mL de solución amortiguadora de Tris (0.1 M, pH 6.6) con Tween 20 al 0.1% (v/v). El extracto se transfiere a tubos de microcentrifuga, realizándose la separación por 15 min a 6000 rpm. La fase líquida se recolectó y se determinó el contenido de proteína por el método de Bradford.

La actividad enzimática de la lipoxigenasa se determinó utilizando la dispersión de AgNPs de mayor tamaño. 10.0 mL de la dispersión se mezclan con 2.0 mL de linoleato de amonio sintetizado previamente y 70 μ L de extracto acuoso de cereal. Transcurridos 12 min de reacción, se obtiene el espectro en la región visible (380-1000 nm). Los hidroperóxidos generados se cuantifican mediante interpolación en la curva de calibración.

La carbohidratos principales contenidos en cereales (almidón, glucosa, maltosa, sacarosa) se evaluaron como interferentes midiendo el efecto en la señal analítica cuando están presentes en

suspensiones de AgNPs que contenían hidroperóxidos en una concentración cercana a la esperada de 3.0 μM y el compuesto potencialmente interferente al 1% (p/v). Se considera un interferente potencial cuando el valor de la absorbancia se modifica $\pm 5\%$.

Resultados y discusión

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Evaluación de la Reacción de AgNPs con agentes oxidantes

Las soluciones de KMnO_4 y H_2O_2 fueron preparadas a partir del reactivo analítico. Los hidroperóxidos de ácido linoleico se sintetizaron a partir de la reacción enzimática con lipoxigenasa de soya (*Glycine max*). Para verificar la formación de hidroperóxidos se realizó un estudio mediante ^1H -RMN.

La Figura 4.1 muestra la estructura del ácido linoleico, en cuyo respectivo espectro de resonancia ^1H -RMN (Fig. 4.2), pueden observarse las siguientes señales (Tabla 4.1):

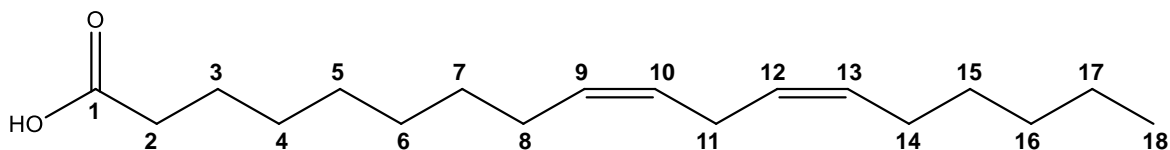
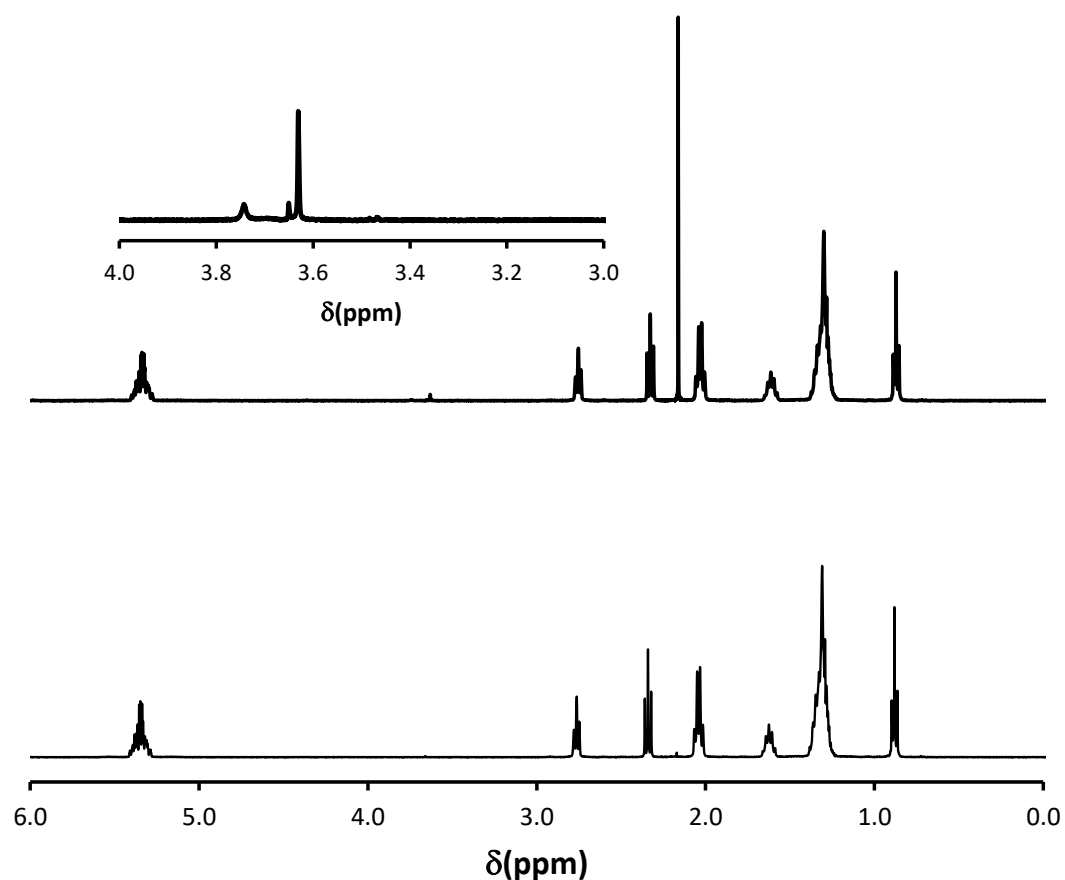


Figura 4.1 Estructura química del ácido linoleico.

Tabla 4.1. Asignación de señales de protón en el espectro ^1H -NMR de ácido linoleico.

| Estructura | Valores de desplazamiento (ppm) |
|--|---------------------------------|
| CH_3 - (Metilo C_{18}) | 0.9 (t) |
| $-\text{CH}_2-$ (Metilenos C_{4-7} y C_{15-17}) | -1.3 (m) |
| $-\text{CH}_2-$ (Metileno C_3) | 1.6 (q) |
| $-\text{CH}_2-$ (Metileno alílico C_8 y C_{14}) | 2.1 (dt) |
| $-\text{CH}_2-$ (Metileno de grupo acilo C_2) | 2.3 (t) |
| $-\text{CH}_2-$ (Metileno dialílico C_{11}) | 2.8 (t) |
| $-\text{CH}=\text{CH}-$ (Vinílicos, C_{9-10} y C_{12-13}) | 5.7 (m) |



4.2 Espectro $^1\text{H-NMR}$ de hidroperóxido de ácido linoleico y ácido linoleico.

El espectro del compuesto obtenido de la reacción enzimática presenta un perfil similar al espectro de resonancia al del ácido linoleico. Sin embargo se observa una señal obtenida a 3.7 ppm (Figura 4.2) que se atribuye al equilibrio dinámico que presentan los hidroperóxidos de acuerdo a la Figura 4.3 [38]. Dicha señal corresponde al protón presente en las posiciones en las que se encuentran los carbonos alílicos 8 y 14 en el ácido graso en los que se forman un ciclo de 5, en la que 2 carbonos alílicos se unen a un grupo hidroperóxido, lo que confirma la presencia de los hidroperóxidos.

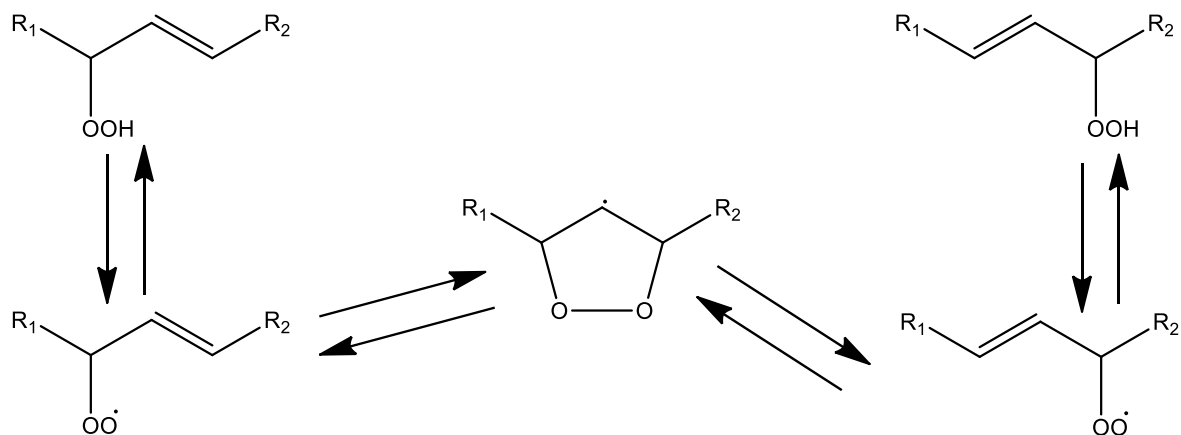


Figura 4.3 Formación de un ciclo de 5 miembros, que une 2 carbonos alílicos a un hidroperóxido.

Una vez seleccionados los agentes oxidantes a evaluarse, se obtuvieron los espectros en la región visible de los dos tipos de AgNPs sintetizadas. Las AgNPs de menor tamaño exhibieron un máximo de absorbancia a los 395 nm (Fig. 4.4.a) y las prismáticas a los 625 nm (Fig. 4.4.b). Estos cambios en el espectro visible, se deben a la resonancia de plasmón característica de cada sistema de nanopartículas. Un aumento en el máximo de longitud de onda, se asocia a un incremento en el tamaño de las AgNPs [33], por lo que se puede predecir que las partículas observadas a 625 nm tienen un mayor tamaño debido a la formación de una película de Ag^0 sobre las nanopartículas de semilla iniciales.

Debido a que los ácidos grasos tienen altos valores de absorptividad molar a 395 nm, estos pueden ser una potencial interferencia en la metodología de análisis propuesta [33]. Para evitar el efecto matriz que se pueda presentar han sido seleccionadas las AgNPs prismáticas para ser evaluadas en presencia de los agentes oxidantes elegidos.

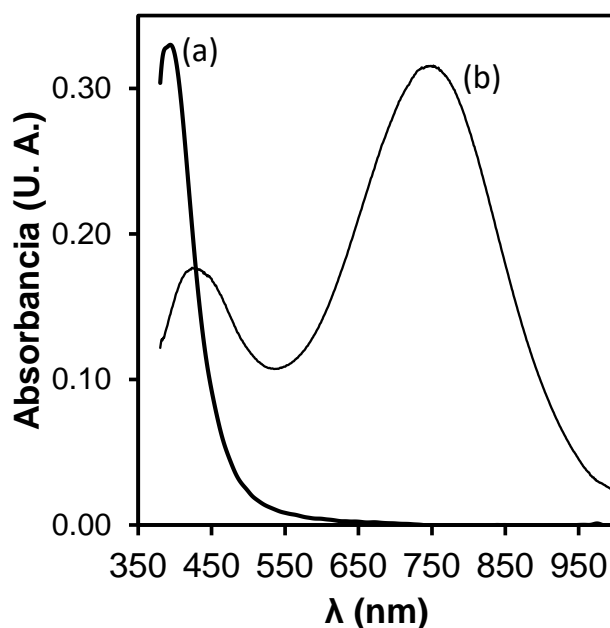


Figura 4.4. Espectros UV-Vis de AgNPs (a) de semillas y (b) prismáticas.

Con la finalidad de evaluar el comportamiento de las AgNPs prismáticas ante agentes redox, 3 sistemas independientes de nanopartículas de plata fueron caracterizados espectrofotométricamente en presencia de KMnO_4 (0.032 mM), H_2O_2 (0.1 M) e hidroperóxidos de ácido linoleico (13.34 μM). La Figura 4.5 muestra los espectros de las AgNPs de mayor tamaño (4.5.a) en presencia de agentes oxidantes. En todos los casos se observa una disminución de la señal como consecuencia de la formación de Ag^+ . Para el caso del KMnO_4 (4.5.b) se observa un desplazamiento a una longitud de onda de 742 nm, además de la permanencia de la señal de 440 nm, lo que se atribuye a la presencia de una mezcla de AgNPs. Respecto al efecto de H_2O_2 (4.5.c), se observa una pérdida de las partículas de menor tamaño. En el caso de la presencia de hidroperóxidos (4.5.d), la concentración de estos es menor, por lo que el efecto es menos marcado, observándose un abatimiento de la señal y un ligero desplazamiento de la misma.

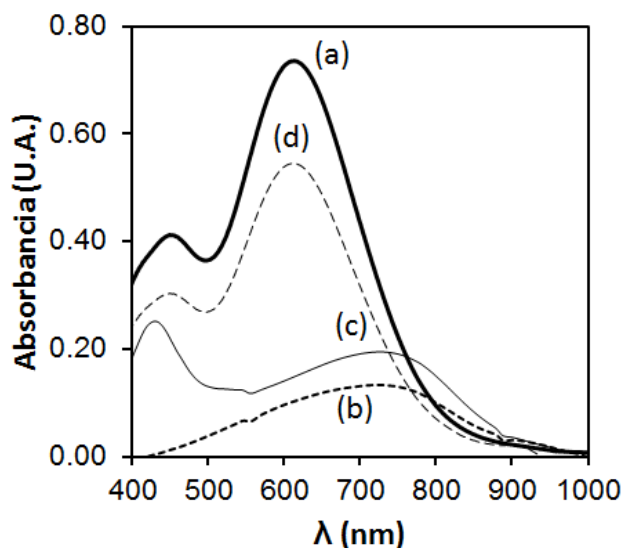


Figura 4.5. Espectros UV-Vis de AgNPs (a) en presencia de agentes oxidantes: (c) KMnO_4 , (b) H_2O_2 y (d) hidroperóxidos.

4.2 Parámetros analíticos

Debido al decaimiento de la señal en presencia de agentes oxidantes, se determinaron los parámetros analíticos para los diferentes agentes oxidantes, los cuales se presentan en la Tabla 4.2 a partir de los resultados se puede observar que la metodología propuesta presenta una mayor sensibilidad hacia la reacción con hidroperóxidos.

Tabla 4.2 Parámetros de regresión de las líneas de calibrado, señal (U.A.) vs concentración de agentes oxidantes (mM).

| Parámetro | Agente oxidante | | |
|--|--------------------|------------------------|---------------------------|
| | KMnO_4 | H_2O_2 | Hidroperóxidos |
| Raíz cuadrada de la varianza residual, s_e | 0.003 | 0.003 | 0.066 |
| Ordenada en el origen, $b_0 \pm ts(b_0)$ | -0.003 ± 0.007 | 0.005 ± 0.008 | 0.01 ± 0.02 |
| Pendiente, $b_1 \pm ts(b_1)$ | 0.109 ± 0.015 | 0.015 ± 0.001 | 45.15 ± 3.20 |
| Intervalo lineal (mM) | 0.27-0.70 | 3.54-15.00 | $1.5-55.0 \times 10^{-3}$ |
| Límite de detección (mM) | 0.09 | 1.18 | 0.5×10^{-3} |

Los cambios morfológicos de las AgNPs preparadas fueron analizados por microscopía eléctrica de transmisión. La Figura 4.6 muestra la imagen obtenida de nanopartículas de semilla, en ella se puede observar una morfología esférica con diámetros de 18 a 25 nm (Figura 4.6.a). A su vez una

micrografía de AgNPs en presencia de KMnO_4 revela que existe una mezcla de AgNPs de diferentes tamaños que oscilan entre 19 a 93 nm siendo las de mayor tamaño las AgNPs prismáticas sintetizadas en la segunda etapa (Figura 4.6.b).

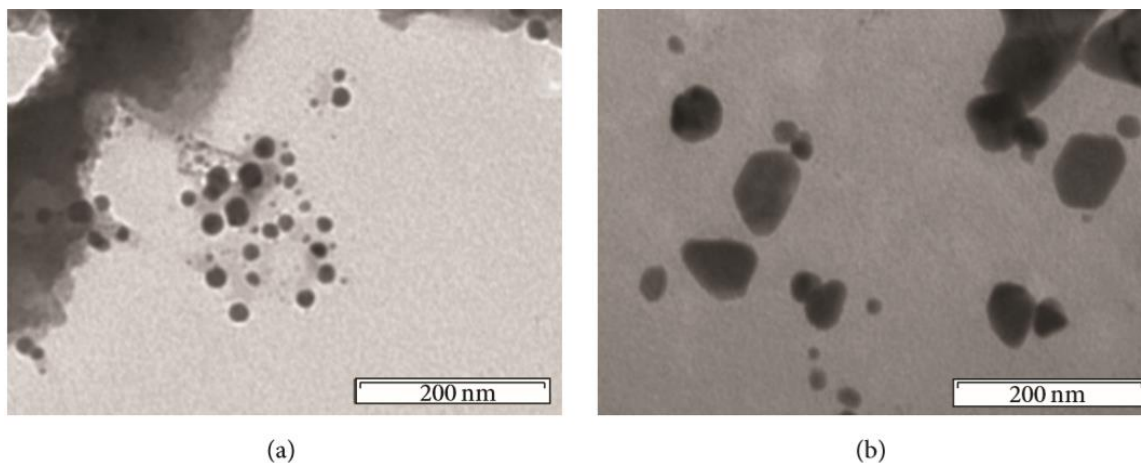


Figura 4.6. Micrografías obtenidas por microscopía electrónica de transmisión que muestran el cambio en la morfología de las AgNPs. (a) AgNPs de semilla y (b) prismáticas.

4.3 Optimización de síntesis de AgNPs prismáticas

Con la finalidad de mejorar la repetitividad y la sensibilidad analítica de la metodología, se utilizó un diseño central compuesto para estudiar las variables de síntesis y como contribuyen en el sistema. Las variables de control seleccionadas fueron: las concentraciones de nanopartículas de semilla ($[\text{AgNPs}]$), ión plata ($[\text{Ag}^+]$) y ácido ascórbico ($[\text{AA}]$). Las variables elegidas están relacionadas con la agregación de nanopartículas. Como variable de salida se utilizó el valor de máxima absorbancia obtenida en el espectro visible. Se empleó un diseño de 3 factores con un valor de significancia ($\alpha = 1.7$).

La matriz experimental utilizada para la optimización se muestra en la Tabla 4.3. Todos los experimentos fueron realizados aleatoriamente.

Tabla 4.3 Matriz de diseño y respuestas del diseño central compuesto.

| [AgNPs]_{semilla} μM | [Ag⁺] μM | [AA] mM | Resp. (U.A.) |
|---|--|----------------|---------------------|
| -1.0 | -1.0 | -1.0 | 0.717 |
| 1.0 | -1.0 | -1.0 | 0.501 |
| -1.0 | 1.0 | -1.0 | 1.080 |
| 1.0 | 1.0 | -1.0 | 0.884 |
| -1.0 | -1.0 | 1.0 | 0.580 |
| 1.0 | -1.0 | 1.0 | 0.634 |
| -1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.043 |
| 1.0 | 1.0 | 1.0 | 0.896 |
| -1.7 | 0.0 | 0.0 | 0.545 |
| 1.7 | 0.0 | 0.0 | 0.777 |
| 0.0 | -1.7 | 0.0 | 0.422 |
| 0.0 | 1.7 | 0.0 | 1.048 |
| 0.0 | 0.0 | -1.7 | 0.872 |
| 0.0 | 0.0 | 1.7 | 0.660 |
| 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.734 |
| 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.806 |
| 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.696 |
| 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.766 |
| 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.919 |
| 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.807 |

Las fuentes que contribuyen a la varianza del sistema incluyen la regresión y el error residual. La prueba de falta de ajuste muestra que los datos se pueden asociar a algún modelo matemático ($p > 0.05$). La suma de cuadrados de la regresión incluye el uso de los modelos lineales, cuadrático e interacciones. La Tabla 4.4 muestra los resultados obtenidos de las sumas de cuadrados, encontrándose que el modelo lineal explica el 75% de los datos, por lo que se elige como el más adecuado para explicar el comportamiento del sistema ($p < 0.05$).

Tabla 4.4 Análisis de varianza de respuesta.

| Fuente | Grados de libertad | Suma de cuadrados | P |
|-----------------------|--------------------|-------------------|-------|
| Regresión | 9 | 0.508 | 0.013 |
| Lineal | 3 | 0.478 | 0.001 |
| Cuadrática | 3 | 0.014 | 0.776 |
| Interacción | 3 | 0.017 | 0.720 |
| Error residual | 10 | 0.12335 | |
| Falta de ajuste | 5 | 0.094 | 0.115 |
| Puro error | 5 | 0.030 | |
| Total | 19 | 0.63173 | |

La ecuación que describe la superficie de respuesta es:

$$\text{Absorbancia} = 0.762 - 0.008 [\text{AgNPs}] + 0.185 [\text{Ag}^+] - 0.028 [\text{AA}]$$

El análisis de la varianza de los resultados demuestra de manera adicional que la concentración de Ag^+ es la variable con un efecto mayor en la señal ($p < 0.05$). Las superficies de respuesta a concentraciones fijas de ión plata $[\text{Ag}^+]$ de 54.0 y 126.0 μM se muestran en la Figura 4.7.

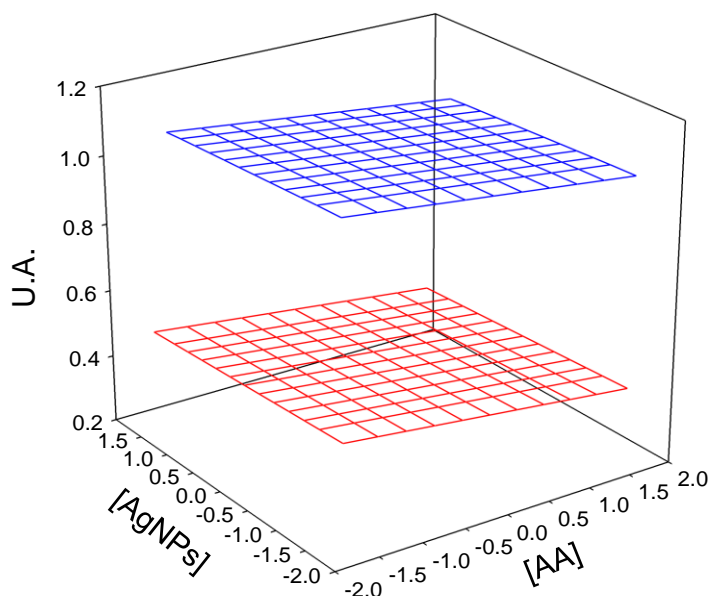


Figura 4.7: Superficie de respuesta óptima (como altura de respuesta, U. A.) a -1.7 (54.0 μM , en rojo) y 1.7 (126.0 μM , en azul)

Las concentraciones seleccionadas como óptimas fueron de [AgNPs] (14.0 μM), [Ag^+] (126 μM) y [AA] (1.0 mM). Bajo estas condiciones la ecuación predice una señal de 1.187 U. A. (a 752 nm), muy cercana al valor experimental (1.145 U. A.). Los resultados indican que al disminuir las concentraciones de AgNPs de semilla y AA se incrementa la altura de la señal. Este efecto es congruente con la influencia de [Ag^+] en la formación de AgNPs prismáticas, donde a [AA] superiores a 1.0 mM se induce la agregación de AgNPs a través de interacciones carga-carga, inestabilizando la partícula que produce una precipitación de Ag^0 [34].

4.4 Validación de la metodología propuesta

Una vez establecidas las concentraciones óptimas para la síntesis de AgNPs prismáticas, se construye una curva de calibración. De manera inicial se sintetizan enzimáticamente hidroperóxidos de ácido linoleico, cuantificando su concentración a 245 nm, utilizando un valor del coeficiente de absorptividad molar (ϵ) de $25 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. La disolución oxidante obtenida se adiciona en volúmenes de 500 μL a 10 mL del sistema de AgNPs, con la finalidad de obtener hidroperóxidos en el intervalo de concentración de 1.0 a 5.0 μM .

Los espectros correspondientes se muestran en la Figura 4.8, en ella se observa un abatimiento de la señal analítica como resultado de la reacción de HP con las AgNPs.

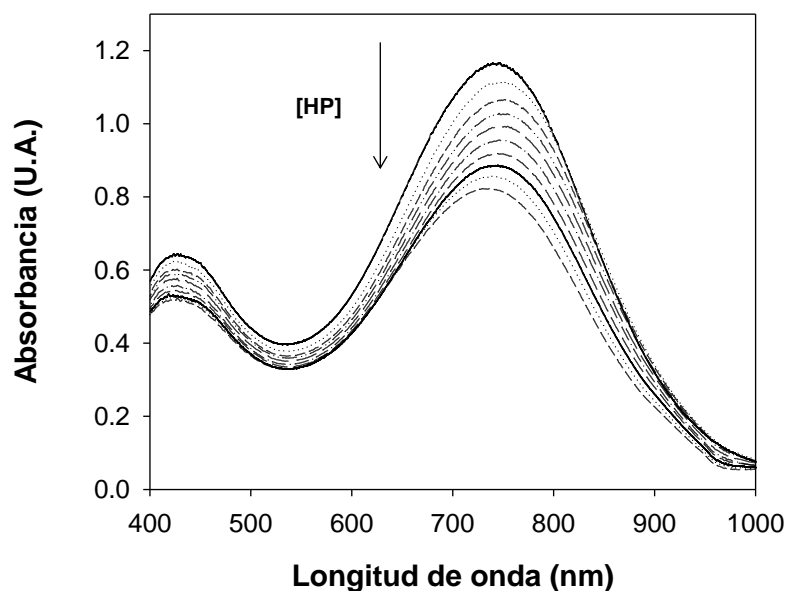


Figura 4.8 Espectros UV-Vis de AgNPs prismáticas en presencia de hidroperóxidos de ácido linoleico a diferentes concentraciones

Los parámetros de ajuste mediante mínimos cuadrados de la señal obtenida a 752 nm, se presentan en la Tabla 4.5.

Tabla 4.5. Parámetros de regresión de las líneas de calibrado, señal (U.A.) vs concentración de HP (μM).

| Parámetro | Valor |
|---|---------------------------------------|
| Raíz cuadrada de la varianza residual, s_e | 0.012 |
| Ordenada en el origen, $b_0 \pm ts(b_0)$ (Abs) | 0.024(± 0.034) |
| Pendiente, $b_1 \pm ts(b_1)$, (Abs μM^{-1}) | -0.118(± 0.009) |
| Intervalo lineal (μM) | 1.02-5.20 |
| Límite de detección (μM) | 0.34 |
| Coefficiente de correlación (r^2) | 0.9903 |

La precisión se define como concordancia (grado de dispersión) entre una serie de mediciones obtenidas de muestreos múltiples de la misma muestra bajo condiciones preestablecidas. La precisión se expresa como repetitividad y reproducibilidad. De manera ideal estos valores se determinan a partir del análisis de muestras dopadas, sin embargo en el análisis la fracción acuosa de los cereales se observa un decremento en la señal conforme pasan los días. Dicho comportamiento se asocia a la disminución de la actividad enzimática.

Debido al comportamiento observado se determina de manera inicial la reproducibilidad (expresada como % desviación estándar relativa). Su determinación requiere la medición de un analito en condiciones adversas, para ello se emplearon 9 sistemas independientes de AgNPs a los que se le adicionan hidroperóxidos con una concentración final de 3 μM . El valor de %DER es de 4.3, el cual es menor al 5%.

El método propuesto fue usado para determinar actividad enzimática de lipoxigenasa en granos de cereales. Con el objetivo de evaluar la repetitividad y la exactitud de la metodología propuesta se realizó el análisis de la actividad enzimática por triplicado el mismo día. La Tabla 4.6 muestra los resultados obtenidos que incluyen la media de 3 determinaciones de actividad enzimática de cada cereal por la metodología de naranja de xilenol y la propuesta, e incluye el porcentaje de desviación estándar relativa entre muestras. De esta forma se determina que en la metodología propuesta el porcentaje no es superior al 5%. De manera simultánea se determina la actividad

mediante el ensayo FOX. Las desviaciones estándar relativas de ambas metodologías se compararon usando una prueba *t*. Los valores de la *t* fueron a su vez comparados contra un valor crítico para 4 grados de libertad a un nivel de confianza del 95% ($t_{critica}= 2.78$). No se encontró diferencia significativa entre los resultados obtenidos por lo que la metodología es aplicable a este tipo de muestras.

Tabla 4.6 Actividad enzimática de lipoxigenasa en cereales (media y %DER, n=3) determinado con el ensayo con nanopartículas de plata y con la metodología con naranja de xilenol

| Actividad enzimática ($\mu\text{M}_{\text{hidroperóxidos}} \text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}_{\text{proteína}}$) | | | |
|---|--------------------------|-------------------|---------------------------|
| Muestra | AgNPs prismáticas | Ensayo FOX | <i>t</i> calculada |
| Arroz | 0.08 (3.38) | 0.07 (5.53) | 2.19 |
| Cebada | 1.32 (2.60) | 1.31 (2.28) | 0.27 |
| Trigo | 0.07 (3.11) | 0.08 (3.78) | 2.41 |

Los azúcares reductores y los polisacáridos pueden interferir en los análisis debido a sus propiedades redox y formación de complejos de inclusión, por lo que son evaluados como interferentes en el método propuesto. Para ello se parte de una solución estándar de HP (X conce) a la cual se le adicionan los interferentes en una concentración del 1% (p/v). La selección de estos interferentes y la concentración evaluada, se realizó de acuerdo al contenido de los carbohidratos elegidos en muestras de cereales (p/p), considerando que los compuestos elegidos son solubles en la fase acuosa utilizada durante la extracción de la LOX [2]. El análisis de interferentes arroja que en ninguno de ellos afecta la señal en más de un 5%, por lo que no interfieren en la concentración evaluada. (Tabla 4.7).

| Interferente | A a 698 nm | % de interferencia |
|---------------------|-------------------|---------------------------|
| Estándar | 0.859 | |
| Almidón | 0.860 | 0.04 |
| Glucosa | 0.865 | 0.60 |
| Maltosa | 0.828 | 3.56 |
| Sacarosa | 0.820 | 4.64 |

Conclusiones

5. CONCLUSIONES

1. Los resultados obtenidos demuestran la capacidad de las AgNPs para determinar agentes oxidantes a través del abatimiento de la señal analítica producida por la oxidación de las nanopartículas.
2. El método propuesto presenta una mayor sensibilidad hacia el análisis de hidroperóxidos de ácido linolénico que a otros agentes oxidantes, lo que permite aplicar las AgNPs en el análisis de sistemas más complejos.
3. Se desarrolló un sistema de análisis espectrofotométrico basado en el uso de AgNPs en la determinación de la actividad enzimática de LOX, lo que es de importancia en la industria alimentaria para el control de la oxidación de lípidos en alimentos.
4. La aplicación de AgNPs con máximos de absorbancia en 740 nm, permite disminuir el efecto matriz que se presenta cuando se utilizan semillas de AgNPs.
5. El método fue aplicado a muestras reales, encontrándose que la precisión y exactitud son similares a los valores que ofrecen otras técnicas de análisis más complejas.

Bibliografía

6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Kent, N. L., Evers, A. D., Technology of cereals, Pergamon, Cuarta edición, 1994.
- [2] Henry, R. J., Kettlewell, P. S., 1996, Cereal Grain Quality, Primera Edición, Chapman & Hall.
- [3] Badui, S. D., 2006, Química de los alimentos, Cuarta edición, Pearson Education.
- [4] Gobbeti, M, Gänzle, M., 2013, Handbook of sourdough Biotechnology, Springer, New York, USA.
- [5] Liu, K., Rosentrater, K. A., 2012, Distiller Grains. Production, properties and utilization, CRC Press, Florida, USA.
- [6] Pollock, C. J., Cairns, A. J. Fructan metabolism in grasses and cereal, *Annual Review of plant physiology*, 42 (1991) 77-101.
- [7] Cui, S. W., Wang, Q. Cell wall polysaccharides in cereals: chemical structures and functional properties, *Structural chemistry*, 20 (2009) 291-297.
- [8] Serna-Saldivar, S. Cereal grains. Properties, Processing, and Nutritional Attributes, CRC Press, Florida, USA, 2010.
- [9] Shewry, P. R., Halford, N. G., 2001, Cereal seed storage proteins: structures, properties, and role in grain utilization, *Journal of experimental botany* 53 (2001) 947- 958.
- [10] Barnes, P. J., Lipids in cereal technology, Academy Press, Buckinghamshire, UK 1983.
- [11] Harris, D. C., 2007, Análisis químico cuantitativo, Tercera edición (sexta edición original), Editorial Reverté.
- [12] Hochkoepler, A., Palmieri, S., Polarographic measurement of oxygen uptake using lipoxygenase in reverse micelles, *Biotechnology and bioengineering*, 36 (1990) 672-677.
- [13] Sanders, T. H. Pattee, H. E., 1975, Lipoxygenase isozymes of peanut, *Lipids*, 10, (1975) 681-685.
- [14] Frankel, E. N. Lipid Oxidation, Woodhead publishing in food science, Philadelphia, USA. 2012 Segunda Edición.
- [15] Gökmen, V., Bahceci, S., Acar, J., Characterization of crude lipoxygenase extract from green pea using a modified spectrophotometric method, *European food research and method*, 215 (2002) 42-45.

-
- [16] Geng, H., Xia, X., Zhang, L., Qu, Y., He, Z. Development of Functional Markers for a Lipoyxygenase Gene TaLox-B1 on Chromosome 4BS in Common Wheat, *Crop Science* 52 (2012) 568-576.
- [17] Perraud, X., Kermasha, S., Characterization of Lipoyxygenase Extracts from *Penicillium* sp. *JAACS* 77 (2000) 335-342.
- [18] Schoemaker, M., Feldbrugge, R., Grundig, B., Sprener, F. The lipoyxygenase sensor, a new approach in essential fatty acid determination in foods, *Biosensors & bioelectronics* 12 (1997) 1089-1099.
- [19] Weber, F., Laskawy, G., Grosch, W., Co-oxidation of carotene and crocin by soybean lipoyxygenase isoenzymes, *European food research and technology* 155 (1974) 142-150.
- [20] Schweiggert, U., Shieber, A., Carle, R. Inactivation of peroxidase, polyphenoloxidase, and lipoyxygenase in paprika and chili powder after immediate thermal treatment of the plant material, *Innovative food science & emerging technologies* 6 (2005) 403-411.
- [21] Timabud, T., Sanitchon. J., Pongdontri, P. A modified ferrous oxidation-xylene orange assay for lipoyxygenase activity in rice grains, *Food Chemistry* 141 (2013) 2405-2411.
- [22] Lin, Y., Schwarz, P. B., Use of a Ferrous Oxidation-Xylene Orange (FOX) Assay to Determine Lipoyxygenase Activity in Barley and Malt. *Journal of the American society of brewing chemist* 38 (2011).
- [23] Gross, E., Krier, J. M., Heinke, L., Somorjai, G. A. Building Bridges in Catalysis Science. Monodispersed Metallic Nanoparticles for Homogeneous Catalysis and Atomic Scale Characterization of Catalysts Under Reaction Conditions. *Topics in catalysis* 55 (2012) 13-23.
- [24] Shirokova, L. N., Alexandrova, V. A., Egorva, E. M., Vihoreva, V. A., 2009, Macromolecular Systems and Bactericidal Films Based on Chitin Derivatives and Silver Nanoparticles. *Applied Biochemistry and Microbiology* 45 (2009) 380-383.
- [25] Lu, L., Wang, X., Xiong, C., Yao, L. Recent advances in biological detection with magnetic nanoparticles as a useful tool. *Science China Chemistry* 58 (2015) 793-809.
- [26] Homozi, M. R., Tashkhourian, J., Khodaveisi, J. Silver nanoparticles modified carbon nanotube past electrode for simultaneous determination of dopamine and ascorbic acid. *Journal of Electroanalytical chemistry* 633 (2010) 85-91.
- [27] Vilela, D., González, M. C., Escarpa, A. Sensing colorimetric approaches based on gold and silver nanoparticles aggregation: Chemical creativity behind the assay. A review. *Analytica Chimica Acta* 751 (2012) 24-43.

-
- [28] Chai, F., Wang, C., Wang, T., Li, L., Su, Z. Colorimetric detection of Pb²⁺ using glutathione functionalized Gold particles, *ACS applied materials & interfaces*, 2 (2010) 1466-1470.
- [29] He, Y., Zhang, X., 2016, Ultrasensitive colorimetric detection of manganese (II) ions based on anti-aggregation of unmodified silver nanoparticles, *Sensors and Actuators B: Chemical* 222 (2016) 320-324.
- [30] Hou, X. Chen, S., Tang, J., Xiong, Y., Long, Y. Silver nanoplates-based colorimetric iodide recognition and sensing using sodium thiosulphate as a sensitizer, *Analytica Chimica Acta* 825 (2014) 57-62.
- [31] Stampelcoskie, K. G., Scaiano, J. C., Light emitting diode irradiation can control the morphology and optical properties of silver nanoparticles, *Journal of American Chemical Society*, 132 (2010) 1825-1827.
- [32] Wu, X., Redmond, P. L., Liu, H., Chen, Y., Steigerwald, M, Brus, L. Photovoltage mechanism for room light conversion of citrate stabilized silver nanocrystal seeds to large nanoprisms, *Journal of American chemical society* 2008, 130, 9500.
- [33] Roh, J., Yi, J., Kim, Y. Rapid, Reversible Preparation of Size-Controllable Silver Nanoplates by Chemical Redox, *Langmuir letter* 26 (2010), 11621-11623.
- [34] López-Miranda, A., López-Valdivieso, A., Viramontes-Gamboa, G. Silver nanoparticles synthesis in aqueous solutions using sulfite as reducing agent and sodium dodecyl sulfate as stabilizer, *Nanoparticle research*, 14 (2012) 1101-1112.
- [35] Sau, T. K., Pal, A., Jana, N. R., Wang, Z. L., Pal, T., Size controlled synthesis of gold nanoparticles using photochemically prepared seed particles, *Journal of nanoparticle research*, 3 (2001) 257-261.
- [36] Currie, L. A., IUPAC Commission of Analytical nomenclature, "Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities", *Pure and applied chemistry* 67 (1995) 1699
- [37] Massart, D. L., Vandeginste, B. G. M., Buydens, L. M. C., De Jong, S., Lewi, P. J., Smeyers-Berveke, J., Handbook of chemometrics and qualimetrics, Elsevier, Amsterdam, Países Bajos, Primera Edición, 1997
- [38] Porter, N. A., Sullivan J. W., Allylic hidroperoxide rearrangement: β -scission or concerted pathway?, *Journal of organic chemistry*, 52 (1987) 5085-5089