

BIOPROCESOS Y BIOTECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA Y DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE FLOR Y HOJA DE *Delonix regia* EMPLEADOS PARA SU SÍNTESIS

Karen M. Valencia-Rodríguez^{1, *}, Ahuizolt de J. Joaquín-Ramos², María G. Gómez-Espinoza³, Miguel Á. Guzmán-Altamirano⁴, y Juan G. Ramírez-Pimentel¹

Resumen

Las nanopartículas de plata (AgNps) son ampliamente reconocidas por poseer una importante actividad antimicrobiana teniendo aplicación principalmente en el área médica y alimentaria. Recientemente el método de síntesis verde fue incorporado a los métodos de síntesis de nanopartículas, pues es considerado un proceso rentable y ecológico. Una de las alternativas de esta propuesta es usar extractos vegetales como bioreductores, de tal forma que los extractos desempeñan un papel fundamental en la formación de las nanopartículas y que su capacidad antioxidante probablemente tenga influencia significativa en las características y la eficiencia biológica de las nanopartículas, así como en el rendimiento del proceso de síntesis. El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad antioxidante de los extractos etanólicos de flor y hoja de *Delonix regia* y de las AgNps mediadas con los mismos. Los resultados indicaron que tanto los extractos como las AgNps poseían una importante actividad antioxidante.

Palabras claves: Nanopartículas, AgNps, Síntesis verde, Actividad antioxidante.

Abstract

Silver nanoparticles (AgNps) are widely recognized for their significant antimicrobial activity, and are mainly used in the medical and food sectors. Recently, a so-called "green" method has been incorporated into nanoparticle synthesis methods, which is recognized as a cost-effective and environmentally friendly process. The plant extracts are used as bioreducers, so the extracts became in a fundamental key for the synthesis of nanoparticles, where their antioxidant capacity has a significant influence on the characteristics and biological efficiency of nanoparticles, as well as on the performance of the synthesis process. The objective of this study was to evaluate the antioxidant activity of ethanolic extracts of *Delonix regia* flower and leaf and AgNps mediated with them. The results indicated that both the extracts and the AgNps had significant antioxidant activity.

Keywords: Nanoparticles, AgNps, Green synthesis, Antioxidant activity

¹División de Estudios de Posgrado e Investigación; ²Departamento de ingenierías, Tecnológico Nacional de México/I. T. Roque, carretera Celaya-Juventino Rosas km 8, Celaya, Guanajuato, CP 38110, México.

³Departamento de Ingeniería Agroindustrial, Universidad Politécnica de Pénjamo, Carretera Irapuato - La Piedad km 44, El Derramadero. Pénjamo, Guanajuato, CP 36921, México.

⁴Departamento de Ing. mecatrónica, Tecnológico Nacional de México/ITS Irapuato, Carretera Irapuato-Silao km.12.5, Col. El Copal, Irapuato, Guanajuato, CP 36821, México.

*Autor de correspondencia: m23980118@roque.tecnm.mx

1. Introducción

La nanotecnología a través de los años se ha hecho presente en diversos campos científicos e industriales transformándose en una ciencia de amplio alcance y un importante campo de estudio. Lo interesante de esta tecnología consiste en que al reducir a un tamaño diminuto la materia se genera nuevas y mejores propiedades (Malik et al., 2023).

Las AgNps han mostrado poseer propiedades antioxidantes, catalíticas, eléctricas y ópticas excepcionales. Sin embargo, es su capacidad de inhibir el crecimiento de múltiples microorganismos lo que las ha llevado a ser ampliamente investigadas (Bruna et al., 2021). Algunas de las aplicaciones prácticas que se han realizado para explotar las fascinantes propiedades de las AgNps incluyen terapias antibacterianas y anticancerígenas, desinfección de agua, envases de alimentos, purificación de aire, terapias antifúngicas y antivirales, terapias antiinflamatorias, cicatrización de heridas y otras aplicaciones clínicas, farmacéuticas y en productos de consumo (Deshmukh et al., 2019).

La síntesis verde de nanopartículas es considerada un método prometedor que podría sustituir la síntesis por métodos convencionales, pues el uso de agentes reductores naturales supera limitaciones como el alto gasto energético y el uso de reactivos tóxicos para la salud humana y el medio ambiente atribuidas a los métodos físicos y químicos (Lee y Jun, 2019). El uso de extractos vegetales para la obtención de nanopartículas metálicas es una de las propuestas más populares tomando en cuenta que proporciona una amplia variedad de agentes reductores altamente eficientes, respetuosos con el medio ambiente y rentables, gracias a la rica variedad de especies vegetales y el importante contenido de fitoquímicos del extracto (Malik et al., 2022; Vera & col., 2023).

Hasta ahora se ha sugerido que los compuestos fenólicos son los protagonistas en la síntesis mediada por plantas, pues su importante actividad antioxidante les permite actuar como agentes reductores y estabilizadores durante la formación de las nanopartículas. Por lo antes mencionado, definir la fuente vegetal ideal es uno de los pasos determinantes para la obtención de nanopartículas (Vera et al., 2023). En este contexto varios científicos han documentado que el uso de extractos con composiciones diferentes y por consiguiente con un potencial antioxidante variable puede tener influencia en las características, la estabilidad y la eficiencia biológica de las

nanopartículas, así como en el rendimiento del proceso de síntesis (Stozhko et al., 2019).

Las AgNps tienen posibilidad de ser usadas con éxito en tratamientos contra el cáncer o enfermedades degenerativas como el Alzheimer gracias a su capacidad de prevenir o retardar el daño oxidativo de las células, dicho de otra forma, gracias a su capacidad antioxidante. De manera que conocer la actividad antioxidante de estos nanomateriales ayudaría a determinar sus posibles aplicaciones potenciales (Bedlovičová et al., 2020). Basados en el papel fundamental que tiene la actividad antioxidante de los extractos y de las AgNps, el objetivo de este estudio fue evaluar la actividad antioxidante de los extractos etanólicos de flor y hoja de *Delonix regia* y de las AgNps mediadas con los mismos.

2. Metodología

Fueron pesados 0.15 g de muestra en un tubo eppendorf de 2 mL a los cuales se les agregó 1.5 mL de metanol absoluto, posteriormente los tubos fueron sonificados por 30 minutos. Transcurrido el tiempo los tubos fueron centrifugados a 5000 rpm durante 10 min a 4°C. Concluido lo anterior, la pastilla formada fue desechada y se recuperó el sobrenadante para almacenarlo a 4°C en ausencia de luz hasta su uso.

Fueron preparadas diluciones de concentraciones de 0, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 y 800 μ Molar de Trolox, posteriormente en una microplaca fueron colocados 20 μ L de cada dilución más 280 μ L del radical correspondiente según la metodología trabajada en el momento. La medición se realizó después de 30 minutos de reposo a 517 nm para DPPH y después de 6 minutos de reposo a 734 nm para ABTS. Cada dilución se evaluó por triplicado.

Cada muestra fue evaluada por triplicado. En un pocillo de microplaca se agregaron 20 μ L de cada muestra y 280 μ L de solución DPPH o ABTS, según correspondiera. La lectura fue realizada después de 30 minutos de reposo a 517 nm para DPPH y después de 6 minutos de reposo a 734 nm para ABTS y en ausencia de la luz. El porcentaje de inhibición de los radicales fue calculado siguiendo la siguiente relación: $\%Inh = (A_0 - A_M) / A_0$, donde: $\%Inh$, porcentaje de inhibición; A_0 , absorbancia del blanco; A_M , Absorbancia de la muestra.

3. Resultados

Todas las muestras exhibieron el mismo comportamiento en ambas pruebas. Los hallazgos obtenidos revelaron el extracto mediado con flor de

Delonix regia poseía la mayor actividad antioxidante (Figura 1). Vera et al. (2023) establecieron que propiedades de las nanopartículas como el tamaño, el índice de polidispersidad, el potencial ζ y el rendimiento de la síntesis son dependientes de la planta utilizada para la obtención del extracto. Demostrado que el extracto con el potencial antioxidante más alto resultó ser el mejor candidato para la síntesis de nanopartículas metálicas. De manera similar Stozhko et al. (2019) manifestaron que un aumento en la capacidad antioxidante del extracto conduce a un aumento en la tasa de formación de las nanopartículas, disminuye el tamaño de las partículas formadas y aumenta su estabilidad. En este contexto los extractos de plantas con alta actividad antioxidante permiten obtener las nanopartículas con mejores características, lo que se puede atribuir a que la actividad antioxidante es proporcional a la cantidad de compuestos fenólicos presentes en el extracto, por lo que a mayor actividad antioxidante mayor será la cantidad de compuestos

fenólicos que participen en el proceso de síntesis haciéndolo más eficiente.

La actividad antioxidante mejorada de las AgNps en comparación con los extractos se asocia a que los iones de plata y los fitoquímicos que forman un recubrimiento sobre la nanopartícula podrían funcionar como antioxidantes (Demirbas et al., 2016). De manera similar Kúp et al. (2020) reportaron que una mayor capacidad antioxidante de las nanopartículas era posible gracias a la adsorción de compuestos orgánicos activos provenientes del extracto en la superficie de las nanopartículas. En este caso las AgNps mediadas con flor exhibieron la mayor actividad antioxidante (Figura 1), comportamiento que resulta lógico al ser sintetizadas con el extracto con mayor contenido de compuestos bioactivos disponibles para formar el recubrimiento sobre la superficie de la nanopartícula que tiene influencia en la actividad antioxidante del nanomaterial

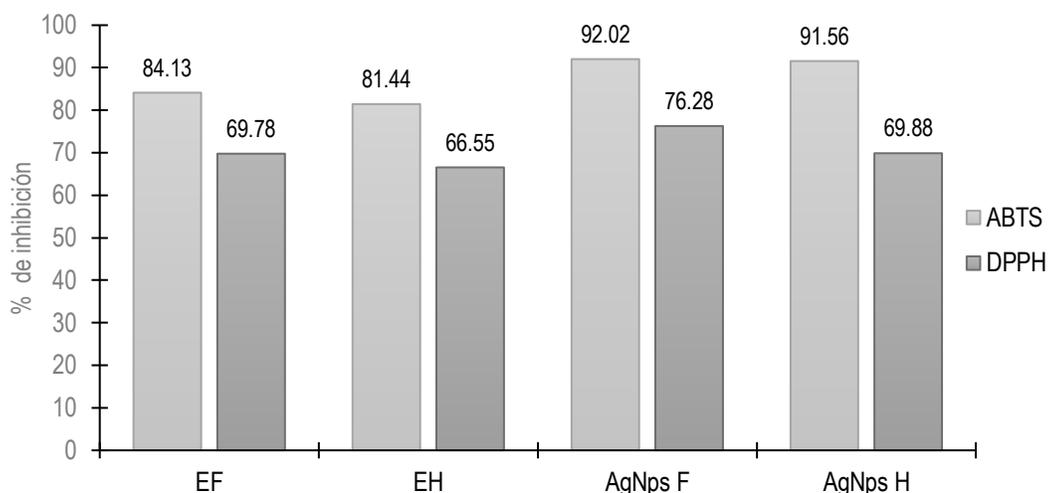


Figura 1. Porcentaje de inhibición de los radicales ABTS \cdot y DPPH \cdot de los extractos y las AgNps sintetizadas con extractos de *Delonix regia*. EF: Extracto flor; EH: Extracto Hoja; AgNps F: Nanopartículas de plata mediadas con extracto de flor; AgNps H: Nanopartículas de plata mediadas con extracto de hoja.

4. Conclusiones

Los hallazgos de esta investigación revelan que la actividad antioxidante de los extractos dependerá de la planta y de la parte de la planta de donde provienen. Se determinó que es importante conocer la actividad antioxidante de los extractos utilizados como biomedadores en la síntesis de nanopartículas pues es uno de los factores que determinaran en gran medida

las características y propiedades de las nanopartículas, así como en el rendimiento del proceso de producción. Se concluyó que las propiedades antioxidantes de las AgNps están condicionadas por la composición del extracto, y, por lo tanto, del potencial antioxidante del mismo. Conocer la actividad antioxidante de las AgNps contribuye a definir sus aplicaciones potenciales, pues AgNps con actividad antioxidante alta son una

alternativa para terapias anticancerígenas y contra enfermedades degenerativas.

Referencias

- Bedlovičová, Z., Strapáč, I., Baláž, M., & Salayová, A. (2020). A brief overview on antioxidant activity determination of silver nanoparticles. *Molecules*, 25(14), 3191-3215
DOI: 10.3390/molecules25143191.
- Bruna, T., Maldonado-Bravo, F., Jara, P., & Caro, N. (2021). Silver nanoparticles and their antibacterial applications. *International journal of molecular sciences*, 22(13), 7202-7223.
DOI: 10.3390/ijms22137202].
- Demirbas, A., Welt, B.A., y Ocsoy, I. (2016). Biosynthesis of red cabbage extract directed Ag NPs and their effect on the loss of antioxidant activity. *Materials Letters*, 179, 20-23.
DOI: 10.1016/j.matlet.2016.05.056
- Deshmukh, S.P., Patil, S.M., Mullani, S.B., y Delekar, S.D. (2019). Silver nanoparticles as an effective disinfectant: A review. *Materials Science and Engineering: C*, 97, 954-965.
DOI: 10.1016/j.msec.2018.12.102]
- Küp, F.Ö., Çoşkunçay, S., y Duman, F. (2020). Biosynthesis of silver nanoparticles using leaf extract of *Aesculus hippocastanum* (horse chestnut): Evaluation of their antibacterial, antioxidant and drug release system activities. *Materials Science and Engineering: C*, 107, 110207.
DOI: 10.1016/j.msec.2019.110207.
- Lee, S.H., & Jun, B.H. (2019). Silver nanoparticles: synthesis and application for nanomedicine. *International journal of molecular sciences*, 20(4), 865-889.
DOI: 10.3390/ijms20040865.
- Malik, M., Iqbal, M.A., Malik, M., Raza, M.A., Shahid, W., et al. (2022). Biosynthesis and Characterizations of Silver Nanoparticles from *Annona squamosa* Leaf and Fruit Extracts for Size-Dependent Biomedical Applications. *Nanomaterials*, 12(4), 616-631.
DOI: 10.3390/nano12040616.
- Malik, S., Muhammad, K., y Waheed, Y. (2023). Nanotechnology: A revolution in modern industry. *Molecules*, 28(2), 661-687.
DOI: 10.3390/molecules28020661.
- Stozhko, N.Y., Bukharinova, M.A., Khamzina, E.I., Tarasov, A.V., Vidrevich, M.B., y Brainina, K.Z. (2019). The Effect of the Antioxidant Activity of Plant Extracts on the Properties of Gold Nanoparticles. *Nanomaterials*, 9(12), 1655-1671.
DOI: 10.3390/nano9121655.
- Vera, J., Herrera, W., Hermosilla, E., Díaz, M., Parada, J., et al. (2023). Antioxidant activity as an indicator of the efficiency of plant extract-mediated synthesis of zinc oxide nanoparticles. *Antioxidants*, 12(4), 784-804.
DOI: 10.3390/antiox12040784.

BIOPROCESOS Y BIOTECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA

CUANTIFICACIÓN DE LAS FRACCIONES PROTEICAS DEL EXTRACTO DE *Argemone mexicana* L.

Daniel Augusto Jiménez-Paredes^{1*}, José Luis Zárate-Castrejón², Juan Carlos Raya-Pérez¹, Juan Gabriel Ramírez-Pimentel¹, César Leobardo Aguirre-Mancilla¹

Resumen

En los últimos años ha existido un incremento en la utilización de extractos de plantas para control biológico, los cuales presentan una gran ventaja al no generar residuos contaminantes, gracias a su rápida degradación en el ambiente. Estos compuestos se pueden encontrar en flores, tallo, frutos, semillas, hojas, corteza y raíz. Bajo esta situación, se cuantificaron las fracciones proteicas obtenidas de la semilla de *Argemone mexicana* L., como parte de una caracterización de los extractos proteicos. En el caso de las fracciones de proteína obtenidas de la harina desgrasada, la fracción con mayor concentración fue glutelina, representando cerca del 70% de la proteína soluble total. Para el caso de las fracciones de proteína obtenidas de la harina sin desgrasar, la fracción proteica de mayor concentración fue globulina con aproximadamente el 56% de la proteína soluble total.

Palabras claves:

Proteína, fracciones, extractos, harina, desgrasado

Abstract

In recent years there has been an increase in the use of plant extracts for biological control, which have a great advantage in not generating polluting waste, thanks to their rapid degradation in the environment. These compounds can be found in flowers, stem, fruits, seeds, leaves, bark, and root. Under this situation, the protein fractions obtained from the *Argemone Mexicana* L. seed were quantified, as part of a characterization of the protein extracts. In the case of the protein fractions obtained from defatted flour, the fraction with the highest concentration was glutelin, representing about 70% of the total soluble protein. In the case of the protein fractions obtained from the non-defatted flour, the protein fraction with the highest concentration was globulin with approximately 56% of the total soluble protein.

Key words

Protein, fractions, extracts, flour, defatted

¹Tecnológico Nacional de México/I. T. Roque, km. 8 Carretera Celaya Juventino Rosas, Celaya C.P. 38110, Guanajuato, México.

²Universidad de Guanajuato. División de Ciencias de la Salud e Ingenierías. Sede Mutualismo,

*Autor de correspondencia: m22980879@roque.tecnm.mx

1. Introducción

Argemone mexicana L. también conocida como chicalote o cardo santo, es considerada una de las principales malezas en diferentes partes del mundo, afectando cultivos de interés económico, es endémica de México, (Hernández et al., 2022) se utiliza para tratar diferentes enfermedades como el cáncer o problemas intestinales, además de ser usada para el tratamiento de úlceras (Delgado-Ortiz et al., 2023). Estas propiedades se atribuyen a la presencia de metabolitos secundarios como fenoles, flavonoides, terpenoides y alcaloides, confiriéndole actividad biológica, los cuales se encuentran distribuidos en diferentes partes de la planta como hojas, raíz, flores o semillas (Ji et al., 2016). En las semillas se encuentran las proteínas de reserva, las cuales se acumulan y sintetizan durante el proceso de madurez. Se clasifican de acuerdo con su extracción y solubilidad, en Albuminas (solubles en agua), Globulinas (soluciones salinas), Prolaminas (soluciones alcohólicas) y Glutelinas (Soluciones acidas o básicas) (Abarca et al., 2002). Estas proteínas no solo tienen función en el crecimiento y desarrollo de la planta, si no también pueden presentar actividad antimicrobiana contra diferentes patógenos.

2. Metodología

Colecta de materia prima. Las semillas de *Argemone mexicana* L. se colectaron en la localidad General Pedro María Anaya en el municipio de Tepetitlán en el

estado de Hidalgo. A partir de la semilla se obtuvo harina y se desgraso con una mezcla de cloroformo-metanol (2:1).

Extracción y fraccionamiento de proteínas. Se realizó una extracción secuencial, comenzando con la fracción de albumina. Se pesó 0.1 g de harina y se agregó 1 mL de agua destilada, se colocó en vortex durante 15 min, posteriormente se centrifugo a 14000 rpm durante 15 min y se recuperó el sobrenadante, este proceso se realizó para las cuatro fracciones proteicas (albumina, globulina, prolamina y glutelina) (Raya-Pérez et al., 2014).

Cuantificación de proteínas. Se cuantifico la proteína presente en las diferentes fracciones proteicas mediante el método de Bradford con albumina de suero bovino (BSA) como estándar (Bradford, 1976).

3. Resultados

En la harina desgrasada se obtuvo que la fracción que representa el mayor porcentaje de la proteína soluble total fue glutelina con 69%, seguido de albumina con 13.34% (Figura 1). En la harina entera se pudo observar que la fracción globulina aumento su contenido de proteína alcanzando un 56.84% seguido de glutelina con 31.27% (Figura 2) indicando que el proceso de desgrasado afecta el contenido de proteína presente en las fracciones.

Tabla 1 Curva de calibración BSA

Concentración $\mu\text{g/mL}$	Agua	BSA 1 mg/mL
0	1000 μL	0 μL
50	950 μL	50 μL
100	900 μL	100 μL
200	800 μL	200 μL
300	700 μL	300 μL
400	600 μL	400 μL
500	500 μL	500 μL
600	400 μL	600 μL
700	300 μL	700 μL
800	200 μL	800 μL
900	100 μL	900 μL
1000	0 μL	1000 μL

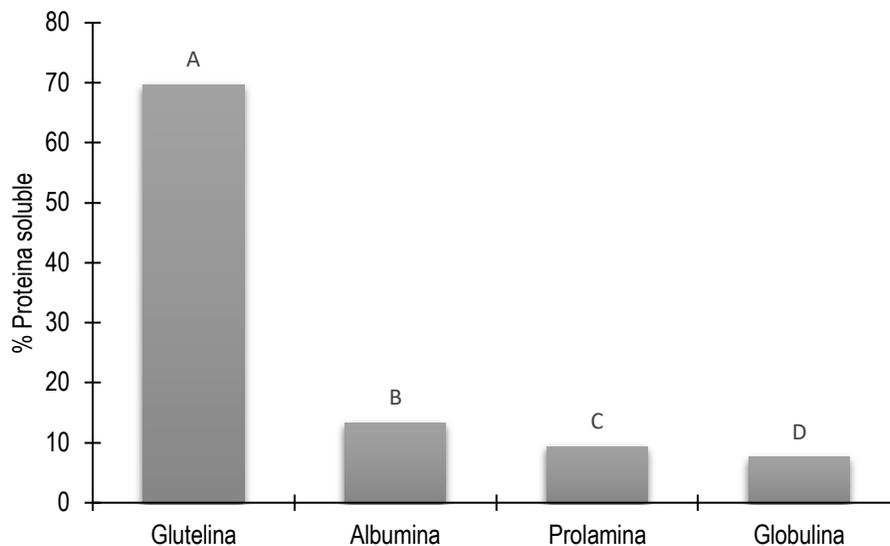


Figura 1. Porcentaje de proteína soluble en las cuatro fracciones obtenidas de harina desgrasada obtenida de semilla de *Argemone mexicana* L. Medias con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, $p < 0.05$).

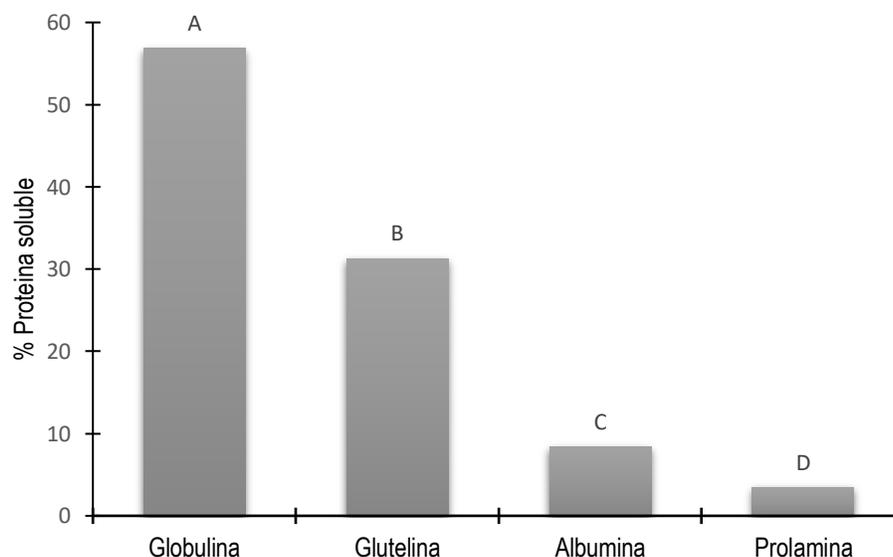


Figura 2. Porcentaje de proteína soluble en las cuatro fracciones obtenidas de harina entera obtenida de semilla de *Argemone mexicana* L. Medias con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, $p < 0.05$).

4. Conclusiones

El extracto de la harina obtenida de semilla de *Argemone mexicana* L. presenta proteínas liposolubles, las cuales se pierden en el proceso de desgrasado, se necesitan más estudios para conocer la función de estas proteínas y si pueden ser utilizadas para el control de patógenos e insectos que producen pérdidas económicas y afectan la calidad de los productos.

Referencias

Abarca, N.A., Ávila Reyes, J.A., Naranjo Jiménez, N., Herrera Corral, J., y Gonzales Güereca, C.M. (2002). Perfiles electroforéticos de las proteínas de semilla de pinos como caracteres taxonómicos Pine. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 38–44.

- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–252.
- Delgado-Ortiz, J.C., López-López, H., Beltrán-Beache, M., Ochoa-Fuentes, Y.M., y Castro del Ángel, E. (2023). Efecto insecticida del extracto metanólico de *Argemone mexicana* para el control de *Bactericera cockerelli* (Sulc.) (Hemiptera: Trioziidae). *Revista Bio Ciencias*. DOI: 10.15741/revbio.10.e1404
- Hernández, I., Juárez, A., Germán, R., y Montiel, C. (2022). Metabolitos secundarios de *Argemone mexicana* para el control de hongos fitopatógenos. *Ciencias Agropecuarias Del ICAP*, 8(15), 6–10.
- Ji, G., Dwivedi, P., Sundaram, S., y Prakash, R. (2016). Aqueous extract of *Argemone mexicana* roots for effective protection of mild steel in an HCl environment. *Research on Chemical Intermediates*, 42(2), 439–459. DOI: 10.1007/s11164-015-2029-y
- Raya-Pérez, J.C., Gutiérrez-Benicio, G.M., Ramírez-Pimentel, J.G., Covarrubias-Prieto, J., y Aguirre-Mancilla, C.L. (2014). Caracterización de proteínas y contenido mineral de dos variedades nativas de frijol de México. *Agronomía Mesoamericana*, 25(1), DOI: 10.15517/am.v25i1.14185

BIOPROCESOS Y BIOTECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA

EFFECTO DE LA SUSTITUCIÓN DE GRASAS VEGETALES HIDROGENADAS (SHORTENING) POR OLEOGELES EN PAN TIPO PASTEL SOBRE SUS PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS.

Bryan Ochoa-Martínez¹, Elizabeth C. Varela-Santos¹, Gilda Avendaño-Vásquez^{1*},
Karen A. Vargas-García¹.

Resumen

En México, el pan es un alimento básico ampliamente consumido, ya sea fresco o empacado, que contiene grasas saturadas (GS) o mantecas hidrogenadas (manteca vegetal) en su formulación, las cuales pueden contribuir a enfermedades metabólicas como hipertensión, obesidad y diabetes. El objetivo de este estudio es elaborar un pan utilizando oleogeles como sustituto de GS y manteca. Se realizó oleogeles de maíz al 5%p/p con cera de candelilla (CC), los cuales se incorporan a una formulación de pan sustituyendo a la manteca en su totalidad. Se evaluaron características fisicoquímicas (humedad, cenizas, extracto etéreo, proteína y actividad de agua (Aw)), color y microbiología de las formulaciones con oleogel y un control con manteca. Los resultados indicaron que no hubo diferencias significativas ($\alpha=0.05$) entre los sistemas evaluados en características fisicoquímicas, análisis microbiológico y atributos de color. Este sistema se considera un excelente sustituto de las grasas *trans*, mejorando los atributos nutricionales del producto tipo pastel.

In México, bread is a widely consumed staple food, whether fresh or packaged, which contains saturated fats (GS) or hydrogenated butter (vegetable butter) in its formulation, which can contribute to metabolic diseases such as hypertension, obesity and diabetes.

The objective of this study is to make a bread using oleogels as a substitute for GS and butter. Corn oleogels were made at 5% p/p with candelilla wax (CC), which are incorporated into a bread formulation replacing butter in its entirety. Physicochemical characteristics (humidity, ash, ethereal extract, protein and water activity (Aw)), color and microbiology of the formulations with oleogel and a control with butter were evaluated. The results indicated that there were no significant differences ($\alpha=0.05$) between the systems evaluated in physicochemical characteristics, microbiological analysis and color attributes. This system is considered an excellent substitute for trans fats, improving the nutritional attributes of the cake-like product.

Palabras clave: Oleogeles Grasas saturadas Panificación

Keywords:
Oleogels, saturated fats, baking

Abstract

¹Maestría en Ciencias de los Alimentos y Biotecnología, TECNM Campus ITS Tierra Blanca. Av. Veracruz s/n esquina Héroes de Puebla, Col. Pemex, Tierra Blanca, Ver. C.P. 95180, México.
Autor de correspondencia: gilda.av@itstb.edu.mx

1. Introducción

La sustitución de grasas saturadas (GS) y mantecas hidrogenadas en procesos de panificación es un tema de creciente interés debido a las preocupaciones de salud asociadas con el consumo de ácidos grasos *trans* y saturados (Cabezas-Zábala et al., 2016). Una alternativa prometedora es el uso de oleogeles, que consisten en estructuras semisólidas que pueden formarse mediante la gelificación de aceites líquidos. Los oleogeles son capaces de imitar las propiedades funcionales de las grasas sólidas en productos de panificación, ofreciendo una opción más saludable sin comprometer la calidad del producto final. Existen varias opciones para ser empleadas como moléculas gelantes (Toro-Vázquez et al., 2011). El uso de CC es especialmente atractivo debido a su origen vegetal y su capacidad para formar oleogeles mejor estructurados a bajas concentraciones, en contraste con las grasas duras que requieren concentraciones significativamente mayores para inducir la formación de un gel (da Silva et al., 2019). Este comportamiento se atribuye a la composición predominante de hentriacontano en la cera, acompañado por otros n-alcenos en proporciones menores, como el nonacosano y el tritriacontano, los cuales poseen la capacidad de acoplarse en distintos solventes no polares, generando estructuras microcristalinas que, en todos los casos, configuran una matriz tipo placa. Estas estructuras microcristalinas constituyen las unidades básicas que integran la red cristalina tridimensional de los n-alcenos en los oleogeles (Toro-Vázquez et al., 2011).

Además, el uso de oleogeles en lugar de grasas tradicionales puede tener beneficios significativos para la salud. Un estudio realizado por Martins et al. (2020), demostró que los oleogeles pueden reducir el contenido de GS y *trans* en los productos de panadería sin afectar negativamente sus propiedades organolépticas. Esto es particularmente importante considerando la creciente demanda de productos más saludables por parte de los consumidores (Álvarez-Ramírez et al., 2020). Adicionalmente Giacomozzi et al., (2018) evaluaron la influencia de la incorporación de oleogeles de monoglicerol/aceite de girasol en pan tipo muffins, así mismo, Demirkesen & Mert, (2019); Kim et al., (2017); Lim et al., (2017) y Patel, (2015) han ensayado el efecto de la incorporación de oleogeles estructurados con ceras comestibles en diferentes aceites sobre productos horneados de panificación. Es por ello que el objetivo de este estudio es elaborar un pan utilizando oleogeles como sustituto de GS y

manteca hidrogenadas observando el comportamiento del producto terminado al sustituir su sistema graso tradicional, determinando las características fisicoquímicas (% de humedad, cenizas, extracto etéreo, proteína y actividad de agua (Aw)), asimismo de color y vida de anaquel estimada por análisis microbiológico en lapsos de 0, 3 y 7 días después de su elaboración.

2. Metodología

La elaboración del oleogel se realizó de acuerdo con lo establecido por Demirkesen & Mert, (2020) usando 5% p/p de CC y adicionando un 95% de aceite vegetal a 68-72°C con una agitación de 350 RPM, una vez disperso se almacenó a ± 4 °C, al menos 24 horas previas a su uso en el proceso de panificación.

Los batidos fueron elaborados de acuerdo con Álvarez-Ramírez et al. (2020). Las materias primas fueron pesadas e incorporadas una a una en la batidora (Oster® Modelo FPSTHS3611) durante 1 minuto a velocidad 4 y 9 minutos a velocidad 6, posteriormente se depositaron en moldes de aluminio y se llevan al horno a 190°C por 30 minutos. Los panes elaborados con GS (Control) y con oleogel de maíz (TM) se almacenaron a temperatura ambiente en domos de plástico previamente sanitizados.

Se determinaron en términos de humedad, cenizas, extracto etéreo y proteínas. La determinación de humedad y cenizas se realizaron gravimétricamente (NOM-116-SSA1-1994 y NMX-F-066-S1978) con un horno (ECOSHEL® 9023A) por 24 horas a 105 °C, y una mufla (LabTECH® LEF-203P-0) a 550°C por 2 horas. Mientras que la Aw fue medida por un higrómetro de punto de rocío (HFBTE® modelo HD-6), y el extracto etéreo por Soxhlet utilizando cartuchos de celulosa y hexano como solvente durante 4 horas a 106 °C. La determinación de proteína fue conducida por el Método Micro-Kjeldahl, realizando 3 réplicas por cada tratamiento.

En complemento, el análisis de color se realizó con una muestra de corteza y miga previamente homogeneizada utilizando un Colorímetro Lico 690 con el registro de los valores CIE L*, a* y b* para determinar los parámetros CROMA (c) y HUE (h) de acuerdo con las ecuaciones 1, 2, y 3. El muestreo del análisis se realizó por quintuplicado.

$$\text{Luminosidad} = L^* \quad (1)$$

$$\text{Tonalidad} = h^* = \arctg \frac{b^*}{a^*} \quad (2)$$

$$\text{Pureza} = C^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \quad (3)$$

Se determinó la vida de anaquel en términos de mohos y levaduras (NOM-147-SSA1-1996) durante el tiempo de almacenamiento 0, 3 y 7 días de la elaboración del pan. Realizando el muestreo por triplicado.

Las variables de respuesta de las determinaciones fisicoquímicas, microbiológicas y de color fueron analizadas mediante un ANOVA utilizando el software STATISTICA (StatSoft, Inc., 1994-2011), con un nivel de significancia de $\alpha < 0.05$.

3. Resultados

Los resultados obtenidos de las pruebas fisicoquímicas se muestran en la tabla 1, donde se observa que la determinación de humedad en la muestra control no presenta diferencia significativa durante el tiempo de estudio, esto debido a la capacidad de retener humedad por parte de las grasas hidrogenadas reportada por Perez-Santana et al. (2022) dificultando su liberación al ambiente con el paso del tiempo, este fenómeno está correlacionado con los datos obtenidos de Aw en donde el factor del tiempo influye significativamente con la Aw del tratamiento, siendo TM quien presenta una menor Aw, mientras que la humedad disminuyó en un 2% entre los días 0 al 3, sin embargo, no presentó diferencia significativa ($\alpha < 0.05$) en los días 3 al 7, lo cual influyó sobre la carga microbiana observando mayor presencia en el

tratamiento control presentado en la tabla 2. Por otro lado, los parámetros de proteína de TM son estadísticamente diferentes al tratamiento control, presentando un incremento hasta un 2%, estos resultados concuerdan con lo reportado por Chulde, (2022); y Rodríguez, (2020), quienes asocian este comportamiento al efecto barrera que presentan las mantecas hidrogenadas durante su incorporación con el resto de compuestos. Los resultados de grasas y cenizas no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos durante los días de estudio, sin embargo, la muestra control de cenizas del día 3 presentó diferencia significativa ($\alpha < 0.05$) con respecto al día 0 y 7, siendo un comportamiento inverso a la Aw, lo que refiere que a menor presencia Aw menor distribución de los minerales.

Los resultados de la determinación de color no presentaron diferencia significativa dentro de los parámetros de luminosidad y tonalidad, (Tabla 3) sin embargo, la saturación presenta una diferencia significativa entre el día 0 y los días 3 y 7 del tratamiento control, siendo un fenómeno atribuido a las reacciones enzimáticas y presencia microbiológica causados por los porcentajes de humedad y Aw esto similar a lo reportado por Pajak et al., (2012) y Tang & Ghosh, (2021).

Tabla 2. Resultados de las determinaciones fisicoquímicas del pan tipo pastel.

TRATAMIENTO	TIEMPO (DÍAS)	% HUMEDAD	% CENIZAS	% GRASA	% PROTEÍNA	Aw
CONTROL	0	24.06 ± 0.89 ^a	0.98 ± 0.03 ^a	16.84 ± 0.15 ^a	1.86 ± 0.19 ^a	0.86 ± 0.011 ^a
	3	23.58 ± 0.34 ^a	1.12 ± 0.02 ^b	16.91 ± 0.53 ^a	2.32 ± 0.17 ^a	0.84 ± 0.010 ^b
	7	23.43 ± 0.24 ^a	0.96 ± 0.03 ^a	16.73 ± 0.10 ^a	1.20 ± 0.42 ^a	0.85 ± 0.003 ^b
TM	0	23.48 ± 0.57 ^a	1.04 ± 0.08 ^{ab}	17.66 ± 0.67 ^a	5.79 ± 2.6 ^b	0.84 ± 0.006 ^b
	3	21.53 ± 0.88 ^b	1.07 ± 0.01 ^{ab}	15.57 ± 0.44 ^b	4.86 ± 0.32 ^b	0.84 ± 0.002 ^b
	7	21.05 ± 0.22 ^b	0.97 ± 0.01 ^a	16.78 ± 0.79 ^{ab}	5.32 ± 1.4 ^b	0.83 ± 0.004 ^c

Media ± STD, n = 3. Letras diferentes en la misma columna son significativamente diferentes ($\alpha < 0,05$).

Tabla 2. Resultados del análisis microbiológico del tratamiento Control y TM.

TRATAMIENTOS	DILUCIÓN	UFC/mL log (10)		
		DÍA 0	DÍA 3	DÍA 7
CONTROL	1 x10	1.10 x10 ²	6.33 x10 ¹	6.93 x10 ²
	1 x10 ⁻¹	N/D	N/D	2.33 x10 ¹
	1 x10 ⁻²			N/D
TM	1 x10	1.67 x10 ²	7.67 x10 ¹	1.20 x10 ²
	1 x10 ⁻¹	N/D	N/D	N/D
	1 x10 ⁻²			

N/D = No detectado, cada dilución se realizó por triplicado y se reporta el promedio.

Tabla 3. Resultados del análisis de color por el método Croma (C) y HUE (H).

TRATAMIENTOS	TIEMPO (DÍAS)	L	H	C
CONTROL	0	67.16 ± 3.58 ^a	89.89 ± 1.27 ^a	24.24 ± 0.81 ^a
	3	67.36 ± 2.06 ^a	89.50 ± 1.77 ^a	21.95 ± 1.10 ^b
	7	71.68 ± 3.51 ^a	90.10 ± 0.92 ^a	21.60 ± 0.86 ^b
TM	0	69.58 ± 2.93 ^a	90.73 ± 0.94 ^a	24.43 ± 0.18 ^a
	3	71.71 ± 0.96 ^a	89.49 ± 1.74 ^a	23.73 ± 0.95 ^a
	7	71.68 ± 0.81 ^a	89.90 ± 0.95 ^a	21.60 ± 1.32 ^a

Media ± STD, n= 5. Letras diferentes en la misma columna son significativamente diferentes ($\alpha < 0,05$).

4. Conclusiones

Los resultados sugieren que sustituir el sistema graso tradicional por un oleogel de aceite de maíz y cera de candelilla es viable en la panificación, encontrándose diferencias significativas durante el tiempo de almacenamiento en la humedad, Aw y proteína, no así en cenizas ni grasas. En cuanto a la saturación del color este fenómeno se atribuye a la redistribución de la humedad desde el interior hasta la superficie esto suavizando la corteza y reduciendo la intensidad del color. de la corteza.

Referencias

- Álvarez-Ramírez, J., Vernon-Carter, E., Carrera-Tarela, Y., García, A., & Roldán-Cruz, C. (2020). Efectos del oleogel de cera de candelilla/aceite de canola sobre la reología, textura, propiedades térmicas y digestibilidad del almidón in vitro del pan de bizcocho de trigo. *LWT Food Science and Technology*, 130.
- Cabezas-Zábala, C.C., Hernández-Torres, B.C., & Vargas-Zárate, M. (2016). Fat and oils: Effects on health and global regulation. *Revista Facultad de Medicina*, 64(4), 761–768. DOI: 10.15446/revfacmed.v64n4.53684.
- Chulde, L. (2022). Evaluación de harinas de tres variedades de papa en la sustitución parcial de harina de trigo para la elaboración de pan común. Universidad Politécnica Estatal Del Carchi Facultad.
- da Silva, T.L.T., Arellano, D.B., & Martini, S. (2019). Interactions between candelilla wax and saturated triacylglycerols in oleogels. *Food Research International*, 121, 900–909. DOI: 10.1016/j.foodres.2019.01.018.
- Demirkesen, I., & Mert, B. (2019). Utilization of Beeswax Oleogel-Shortening Mixtures in Gluten-Free Bakery Products. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 96(5), 545–554. DOI: 10.1002/aocs.12195.
- Demirkesen, I., & Mert, B. (2020). Recent developments of oleogel utilizations in bakery products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(14), 2460–2479. DOI: 10.1080/10408398.2019.1649243.
- Giacomozzi, A.S., Carrín, M.E., & Palla, C.A. (2018). Muffins Elaborated with Optimized Monoglycerides Oleogels: From Solid Fat Replacer Obtention to Product Quality Evaluation. *Journal of Food Science*, 83(6), 1505–1515. DOI: 10.1111/1750-3841.14174.
- Kim, J.Y., Lim, J., Lee, J.H., Hwang, H.S., & Lee, S. (2017). Utilization of Oleogels as a Replacement for Solid Fat in Aerated Baked Goods: Physicochemical, Rheological, and Tomographic Characterization. *Journal of Food Science*, 82(2), 445–452. DOI: 10.1111/1750-3841.13583.
- Lim, J., Jeong, S., Lee, J., Park, S., Lee, J., & Lee, S. (2017). Effect of shortening replacement with oleogels on the rheological and tomographic characteristics of aerated baked goods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(11), 3727–3732. DOI: 10.1002/jsfa.8235.
- Martins, A.J., Vicente, A.A., Pastrana, L.M., & Cerqueira, M. A. (2020). Oleogels for development of health-promoting food products. *Food Science and Human Wellness*, 9(1), 31–39. DOI: 10.1016/j.fshw.2019.12.001.
- Pająk, P., Habryka, C., & Fortuna, T. (2012). Changes in the physical properties of bread during storage. *Potravinárstvo Slovak Journal of Food Sciences*, 6(2), 42–45. DOI: 10.5219/194.
- Patel, A. R. (2015). *Natural Waxes as Oil Structurants* (pp. 15–27).

- DOI: 10.1007/978-3-319-19138-6_2.
- Perez-Santana, M., Cagampang, G.B., Nieves, C., Cedeño, V., & MacIntosh, A.J. (2022). Use of High Oleic Palm Oils in Fluid Shortenings and Effect on Physical Properties of Cookies. *Foods*, 11(18).
DOI: 10.3390/foods11182793.
- Rodríguez, R. (2020). Evaluación de las propiedades fisicoquímicas, reológicas y sensoriales de un pan libre de gluten elaborado con harina de malanga como sustituto de grasa. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo Instituto de Ciencias Agropecuarias.
- Tang, Y.R., & Ghosh, S. (2021). Canola protein thermal denaturation improved emulsion-templated oleogelation and its cake-baking application. *RSC Advances*, 11(41), 25141–25157.
DOI: 10.1039/d1ra02250d
- Toro-Vazquez, J.F., Charó-Alonso, M.A., Pérez-Martínez, J.D., & Morales-Rueda, J.A. (2011). Candelilla Wax as an Organogelator for Vegetable Oils-An Alternative to Develop Trans-free Products for the Food Industry. In *Edible Oleogels: Structure and Health Implications* (Second Edi). AOCS Press.
DOI: 10.1016/B978-0-9830791-1-8.50009-7.

BIOPROCESOS Y BIOTECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA

ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA E INHIBITORIA DEL EXTRACTO DE *Argemone mexicana* L.

Daniel Augusto Jiménez–Paredes^{1*}, José Luis Zárate–Castrejón², Juan Gabriel Ramírez–Pimentel¹, Juan Carlos Raya–Pérez¹, César Leobardo Aguirre–Mancilla¹

Resumen

Las proteasas y los inhibidores de proteasas presentes en las plantas son de gran importancia, debido a que poseen propiedades antiinflamatorias y anticancerígenas. Además, presentan actividad antimicrobiana, por lo cual se han utilizado como una alternativa para el control de patógenos e insectos. En este trabajo se midió la actividad proteolítica e inhibitoria de las fracciones proteicas presentes en el extracto de semilla de *Argemone mexicana* L. Las fracciones proteicas de la semilla desgrasada presentaron actividad proteolítica e inhibitoria, siendo la fracción prolamina la que presentó mayor actividad inhibitoria de proteasas seguido de glutelina, la fracción albumina y globulina no presentaron actividad proteolítica. La fracción prolamina fue la de mayor actividad inhibitoria de proteasas. Lo que nos indica que el extracto de semilla de *Argemone mexicana* L. contiene enzimas proteolíticas e inhibidores de proteasas.

Palabras claves

Inhibitoria, fracciones, proteolítica, harina, actividad

Abstract

Proteases and protease inhibitors present in plants are of great importance, because they have anti-inflammatory and anti-cancer properties. In addition, they have antimicrobial activity, which is why they have been used as an alternative for the control of pathogens and insects. In this work, the proteolytic and inhibitory activity of the protein fractions present in the seed extract of *Argemone mexicana* L. was measured. The protein fractions of the defatted seed showed proteolytic and inhibitory activity, with the prolamin fraction showing the highest protease inhibitory activity followed by glutelin, the albumin and globulin fraction did not show proteolytic activity. The prolamin fraction was of the highest protease inhibitory activity. This indicates that *Argemone mexicana* L. seed extract contains proteolytic enzymes and protease inhibitors.

Key words

Inhibitory, fractions, proteolytic, flour, activity

¹Tecnológico Nacional de México/I. T. Roque, km. 8 Carretera Celaya Juventino Rosas, Celaya C.P. 38110, Guanajuato, México.

²Universidad de Guanajuato. División de Ciencias de la Salud e Ingenierías. Sede Mutualismo,

*Autor de correspondencia: m22980879@roque.tecnm.mx

1. Introducción

Argemone mexicana L. es una maleza que se encuentra distribuida en diversas partes del mundo, se caracteriza por presentar espinas, hojas de color verde-blanco, flores y cápsulas, las cuales en su interior contienen semillas de color negro brillantes, es una planta que presenta diferentes compuestos como alcaloides, flavonoides, fenoles y terpenoides, los cuales presentan actividad biológica contra diversos organismos como bacterias, hongos e insectos (Hernández et al., 2022). Los inhibidores de proteasas son proteínas de bajo peso molecular que actúan como mecanismos de defensa en las plantas (Castillo et al., 2017), se pueden clasificar de acuerdo con la enzima que interactúan (serin, cistein, aspártico, metalo, treonin y glutámico proteasas) las cuales presentan actividad biológica interfiriendo principalmente en el desarrollo y crecimiento de insectos, teniendo un gran potencial en la agricultura (Molina V. et al., 2011). Las proteasas son enzimas que tienen diversas funciones fisiológicas, las cuales tienen la capacidad de hidrolizar los enlaces peptídicos, estas proteasas se pueden obtener de diversos organismos clasificándose de acuerdo con su pH óptimo en ácidas, básicas o neutras (López et al., 2018). Son de gran importancia principalmente en la industria alimentaria y farmacéutica (Vázquez et al., 2008).

2. Metodología

Las semillas de *Argemone mexicana* L. se colectaron en la localidad General Pedro María Anaya en el

municipio de Tepetitlán en el estado de Hidalgo. A partir de la semilla se obtuvo harina y se desgrasó con una mezcla de cloroformo-metanol (2:1).

Se realizó una extracción secuencial, comenzando con la fracción de albumina. Se pesó 0.1 g de harina y se agregó 1 ml de agua destilada, se colocó en vórtex durante 15 min, posteriormente se centrifugó a 14000 rpm durante 15 min y se recuperó el sobrenadante este proceso se realizó para las cuatro fracciones proteínicas (albumina, globulina, prolamina y glutelina) (Raya-Pérez et al., 2014).

La actividad Inhibitoria se determinó con la técnica de (Erlanger et al., 1961), se midió la absorbancia a 405 nm en el programa Perkin Elmer 2030 Manager, en espectrofotómetro marca Beckman. Se realizó un Stock de tripsina ($1 \frac{mg}{mL}$) en agua ácida, de este stock se obtuvo la solución de trabajo con una dilución 1:20. En la microplaca se añadió buffer, tripsina y la fracción evaluada se dejó incubando a 37°C durante 30 min al terminar el tiempo se agregó sustrato (BapNA 0.1 M. en Dimetilsulfóxido). Finalmente se leyó en el espectrofotómetro cada 5 min a 405 nm por 30 min. Se utilizó un blanco, un control positivo y un control negativo, los reactivos se colocaron en la microplaca de acuerdo con las proporciones presentes en la Tabla 1. Para la actividad proteolítica se colocó en la microplaca buffer, sustrato y la fracción evaluada, ocupando el mismo blanco y control positivo (Tabla 2) bajo las mismas condiciones utilizadas en actividad inhibitoria.

Tabla 3 Proporción de reactivos para actividad inhibitoria

	Buffer	Sustrato	Tripsina	Fracción
Blanco	180 μ L	20 μ L	-	-
Control positivo	170 μ L	20 μ L	10 μ L	-
Control negativo	170 μ L	20 μ L	-	10 μ L Alb frijol
Muestra	160 μ L	20 μ L	10 μ L	10 μ L

Tabla 4 Proporción de reactivos para actividad proteolítica

	Buffer	Sustrato	Tripsina	Fracción
Blanco	180 μ L	20 μ L	-	-
Control positivo	170 μ L	20 μ L	10 μ L	-
Muestra	170 μ L	20 μ L	-	10 μ L

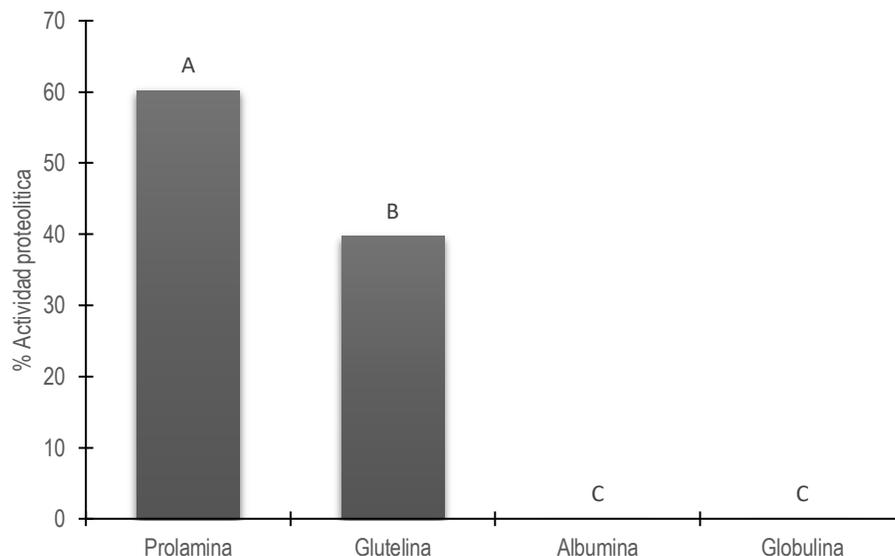


Figura 3 Actividad proteolítica en las cuatro fracciones obtenidas harina desgrasada obtenida de semilla de *Argemone mexicana* L. Medias con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, $P < 0.05$).

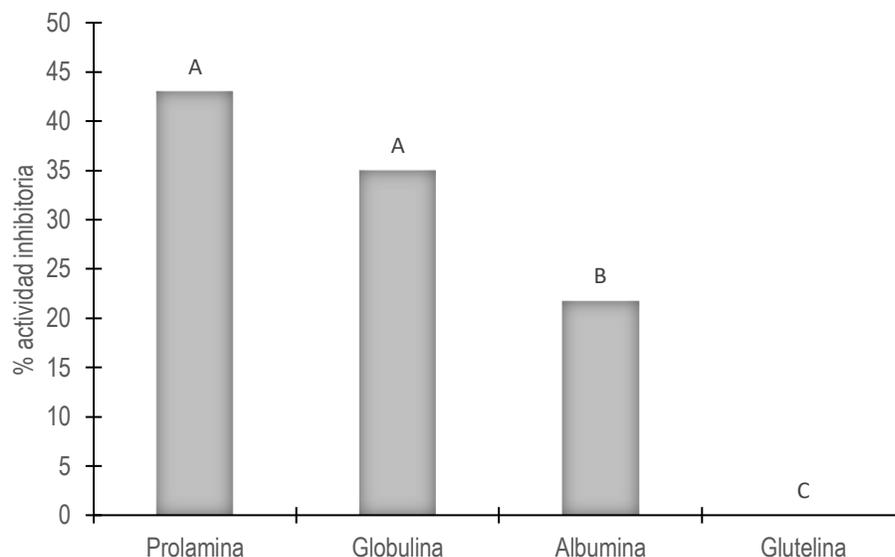


Figura 4 Actividad inhibitoria en las cuatro fracciones obtenidas harina desgrasada obtenida de semilla de *Argemone mexicana* L. Medias con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, $p < 0.05$).

3. Resultados

La fracción prolamina presentó mayor actividad proteolítica con un 60.18% seguido de glutelina con 39.71%, la fracción albumina y globulina no presentó actividad proteolítica (Figura 1). Para el caso de actividad inhibitoria la fracción prolamina fue el mejor tratamiento obteniendo un 42.92% seguido de globulina

y albumina con 34.99 y 21.73% respectivamente, la fracción glutelina no presentó actividad proteolítica. Estos resultados nos indican que el extracto obtenido de semilla de *Argemone mexicana* L. presenta enzimas proteolíticas.

4. Conclusiones

El extracto de la harina obtenida de semilla de *Argemone mexicana* contiene enzimas proteolíticas e inhibidores de serin proteasas, siendo la fracción prolamina el mejor tratamiento para actividad proteolítica y para actividad inhibitoria la fracción prolamina y albumina, se necesitarían más estudios para caracterizar las proteasas e inhibidores presentes en cada fracción proteica.

Referencias

- Castillo, P., Quinchuela, L., Echeverría, P., & Jácome, G. (2017). Extracción purificación y caracterización de inhibidores de tripsina provenientes de semillas andinas. *Enfoque UTE*, 4, 53–67.
<http://ingenieria.ute.edu.ec/enfoqueute/>.
- Erlanger, B.F., Kokowski, N., y Cohen, W. (1961). the preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 95, 271–278.
- Hernández, I., Juárez, A., Germán, R., y Montiel, C. (2022). Metabolitos secundarios de *Argemone mexicana* para el control de hongos fitopatógenos. *Ciencias Agropecuarias Del ICAP*, 8(15), 6–10.
- López, D., Galante, M., Ruggieri, G., Lombardi, J., Boeris, V., & Spelzini, D. (2018). Producción de proteasas fúngicas para la hidrólisis de proteínas vegetales. *Energeia*, 15.
- Molina, V.D., Blanco-Labra, A., y Zamora E., H. (2011). Inhibidores de proteasas de plantas efectivos contra las aspártico proteasas de *Hypothenemus hampei*. *Revista Colombiana de Entomología*.
- Raya-Pérez, J.C., Gutiérrez-Benicio, G.M., Ramírez-Pimentel, J.G., Covarrubias-Prieto, J., y Aguirre-Mancilla, C.L. (2014). Caracterización de proteínas y contenido mineral de dos variedades nativas de frijol de México. *Agronomía Mesoamericana*, 25(1), 1.
DOI:10.15517/am.v25i1.14185.
- Vázquez, I.R., Aguilera, A.F., Prado-Barragán, L.A., & Aguilar, C.N. (2008). Producción Fúngica de Proteasas Inducidas con Pelo de Cerdo. *Información Tecnológica*, 19(2), 33–40.

BIOPROCESOS Y BIOTECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA

SELECCIÓN DE OLIGONUCLEÓTIDOS PARA LA AMPLIFICACIÓN DE UN INHIBIDOR DE PROTEASAS DE SEMILLA DE CHAN (*Hyptis suaveolens* L.)

Diana C. García-González¹, Glenda M. Gutiérrez-Benicio¹, J. Gabriel Ramírez-Pimentel¹, Eduardo García González², César L. Aguirre-Mancilla^{1*}

Resumen

Los inhibidores de proteasas (IP's) presentes en granos y semillas son considerados factores antinutricionales. Sin embargo, en fechas recientes se les ha considerado como elementos nutraceuticos por su capacidad anticancerígena. Otra característica que ha sido identificada en los IP's es su capacidad para interferir con el crecimiento y desarrollo de insectos, interfiriendo con la digestión y reduciendo la disponibilidad de aminoácidos de las proteínas ingeridas y en algunos casos ocasionando la muerte. El chan (*Hyptis suaveolens* L.), pertenece a un grupo de semillas conocidas genéricamente como chías y en estudios previos se ha identificado la presencia de IP en la semilla. Es un arbusto de amplia distribución que crece principalmente en México, América Central, América del Sur, Asia y las Islas del Pacífico. La semilla se consume en el centro occidente de México en forma de bebidas refrescantes. Su alta resistencia al ataque de insectos y hongos posiblemente se conocía en la época prehispánica ya que las plantas de chan se cultivaban junto con el maíz para brindar protección contra las plagas de insectos. En el presente trabajo se muestran los principales productos de amplificación provenientes de reacciones de PCR con oligonucleotidos diseñados de acuerdo con la secuencia N-terminal de 18 aminoácidos del IP de semillas de Chan.

Palabras clave. Inhibidores de proteasas, Chan, *Hyptis suaveolens* L., oligonucleótidos, amplicón.

Abstract

Protease inhibitors (PIs) present in grains and seeds are considered antinutritional factors. However, recently they have been considered nutraceutical elements for their anticancer capacity. Another characteristic that has been identified in PIs is their ability to interfere with the growth and development of insects, interfering with digestion and reducing the availability of amino acids from ingested proteins and in some cases causing death. Chan (*Hyptis suaveolens* L.) belongs to a group of seeds known generically as chia and in previous studies the presence of PIs in the seed has been identified. It is a widely distributed shrub that grows mainly in Mexico, Central America, South America, Asia and the Pacific Islands. The seed is consumed in central-western Mexico in the form of soft drinks. Its high resistance to insect and fungal attack was possibly known in pre-Hispanic times since chan plants were grown together with corn to provide protection against insect pests. This work shows the main amplification products from PCR reactions with oligonucleotides designed according to the 18-amino acid N-terminal sequence of the Chan seed IP.

Keywords:

Protease inhibitors, Chan, *Hyptis suaveolens* L., oligonucleotides, amplicon.

¹División de Estudios de Posgrado e Investigación, Tecnológico Nacional de México/I.T. Roque, Carretera Celaya-Juventino Rosas km 8.0 Celaya, Guanajuato, C.P. 38110, México.

²Programa de Biotecnología, Universidad de Guanajuato, Mutualismo #303, colonia la Suiza, Celaya, Guanajuato, C.P. 38060, México.

*Autor de correspondencia: cesar.aguirre.m@gmail.com

1. Introducción

Los inhibidores de proteasa (IP) son esenciales para la regulación de la actividad proteolítica y juegan un papel importante en varios procesos biológicos relacionados con el metabolismo y la fisiología celular, así como receptores en vías de señalización celular o durante procesos de carcinogénesis. Por el contrario, varias enfermedades hereditarias como el enfisema o ciertos casos de epilepsia se deben al mal funcionamiento de IP específicos (Clemente *et al.*, 2019). En la actualidad, existen numerosos inhibidores de proteasa en el mercado para el tratamiento de la coagulación, la hipertensión, las infecciones virales, el cáncer y la diabetes, que actúan sobre proteasas bien establecidas, como la enzima convertidora de angiotensina y las proteasas del VIH (López *et al.*, 2019).

También tienen un papel en muchos procesos fisiológicos: movilización de proteínas de almacenamiento; regulación de actividades enzimáticas endógenas; modulación de la apoptosis y muerte celular programada; y estabilización de proteínas o compuestos de defensa contra animales, insectos y microorganismos (Cervantes *et al.*, 2022). La mayoría de estos inhibidores son moléculas pequeñas con masas moleculares relativas que oscilan entre 5 y 25 kDa, con estructuras compactas y en muchos casos con un alto contenido de puentes disulfuro, características que podrían contribuir a su alta estabilidad térmica (Aguirre *et al.*, 2004). En el presente trabajo se muestran los principales productos de amplificación provenientes de reacciones de PCR con oligonucleotidos diseñados de acuerdo con la secuencia N-terminal de 18 aminoácidos del IP de semillas de Chan

2. Metodología

Tabla 1. Juegos de oligonucleótidos forward y reverse diseñados con base en la secuencia N-terminal del inhibidor de proteasas de Chan.

Sentido	SECUENCIA	Antisentido	SECUENCIA
Hsti1	5'-GGATCGGACGAGAAGAAGGA-3'	slr	AGAAAACATAAAAAGTAGGGGTCAG
		atr	TCACTCAGGCCAAAAGGAT
		vvr	TCGCAGACCACTGTTCAAG
Hsti2	5'-GGCTCGGATGAGAAGAAGGA-3'	slr	AGAAAACATAAAAAGTAGGGGTCAG
		atr	TCACTCAGGCCAAAAGGAT
		vvr	TCGCAGACCACTGTTCAAG
Hsti3	5'-CGAGGATGGGGATGCCA-3'	slr	AGAAAACATAAAAAGTAGGGGTCAG
		atr	TCACTCAGGCCAAAAGGAT
		vvr	TCGCAGACCACTGTTCAAG

Se utilizaron 9 juegos de oligonucleótidos (Tabla 1) de los cuales, los iniciadores forward fueron diseñados con base en la secuencia N-terminal del inhibidor de proteasas y los oligonucleótidos reverse se diseñaron con base en secuencias que mostraron alto porcentaje de homología de otras especies vegetales, *Solanum lycopersicum* con un porcentaje de homología del 95% (accesión al NCBI: AC218455.2) con la secuencia N-terminal del inhibidor, *Arabidopsis thaliana*, 80% de homología (accesión al NCBI: NM 111191.3) y *Vitis vinifera*, porcentaje de homología del 94% (accesión al NCBI: AM465282.2) a la secuencia N-terminal al inhibidor de proteasas de semillas de Chan, estos juegos de oligonucleótidos no mostraron dímeros entre ellos y se utilizó ADNg como templado, descrito por Doyle and Doyle, (1987), para la amplificación e identificación mediante PCR de la secuencia que codifica el gen de dicha proteína, las condiciones de amplificación fueron: 1 ciclo de desnaturalización a 94 °C por 3 minutos, 35 ciclos a 95 °C por 30 segundos, la Tm de 52.7°C por 2 min, 72 °C por 2 min y 1 ciclo de síntesis a 72 °C por 5 min, los productos de PCR se analizaron por electroforesis de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio, visualizadas en un fotodocumentador.

3. Resultados

El juego de oligonucleótidos sentido (Hsti3: 5'-CGAGGATGGGGATGCCA-3') y antidentido de *Solanum lycopersicum* (slr: 5'-AGAAAACATAAAAAGTAGGGGTCAG-3') (Figura 1), mostró una amplificación de aproximadamente 200 pb, a diferencia de los otros juegos de oligonucleótidos que no mostraron homogeneidad en el tamaño de los fragmentos amplificados que mostraron amplificaciones de tamaño variable desde los 400 hasta las 800 pb (dato no mostrado).

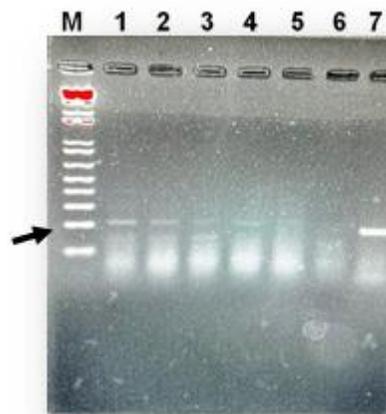


Figura 1. Amplificación por PCR de un fragmento de IP de semillas de Chan. M, marcador de peso molecular. PCR en carriles del 1 al 6 con T_m 50.2°C, 50.7°C, 52.7°C, 55.4°C, 59.2°C y 60.4°C, respectivamente. Flecha señala las amplificaciones a 200 pb de bases. 7, Control positivo del gen constitutivo 26S.

4. Conclusiones

Se identificó un juego oligonucleótidos lo cual permitió la amplificación de un fragmento de ADN, el juego de oligonucleótidos amplificó a distintas temperaturas, es por ello que en los análisis posteriores se determinará la temperatura óptima de reacción de PCR, además permitirá continuar con la siguiente etapa del trabajo, que consistirá en reacciones de RT-PCR a partir de ADN complementario para el aislamiento del gen.

Referencias

- Aguirre, C., Valdés-Rodríguez, S., Mendoza-Hernández, G., Rojo-Domínguez, A., & Blanco-Labra, A. (2004). A novel 8.7 kDa protease inhibitor from chan seeds (*Hyptis suaveolens* L.) inhibits proteases from the larger grain borer *Prostephanus truncatus* (Coleoptera: Bostrichidae). *Comparative Biochemistry And Physiology Part B Biochemistry And Molecular Biology*, 138(1), 81-89.
- Cervantes-Jiménez, R., Martínez, M.M., Mercado-Luna, A., Chávez-Servín, J.L., Ruiz, B.C., et al. (2022). Effect of Induced Mechanical Leaf Damage on the Yield and Content of Bioactive Molecules in Leaves and Seeds of Tepary Beans (*Phaseolus acutifolius*). *Plants*, 11(24), 3538.
- Clemente, M., Corigliano, M., Pariani, S., Sánchez-López, E., Sander, V., & Ramos-Duarte, V. (2019). Plant Serine Protease Inhibitors: Biotechnology Application in Agriculture and Molecular Farming. *International Journal Of Molecular Sciences*, 20(6), 1345.
- Doyle, J.J. & Doyle, J.L. (1987) A Rapid DNA Isolation Procedure for Small Quantities of Fresh Leaf Tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19, 11-15. - *References - Scientific Research Publishing*.
- López, T., Mustafa, Z., Chen, C., Lee, K.B., Ramírez, A et al. (2019). Functional selection of protease inhibitory antibodies. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 116(33), 16314-16319.

BIOPROCESOS Y BIOTECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA

ESTUDIO PRELIMINAR DEL CRECIMIENTO DE *Chlorella vulgaris* COMO FUENTE ALTERNATIVA DE PROTEÍNAS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

Emmanuel Patiño-Almanza¹, Juan Gabriel Ramírez-Pimentel^{1,2}, Carlos Alberto Flores-Gómez^{1,2*}

Resumen

Chlorella vulgaris, ha captado interés tanto en la industria alimentaria, como en la bio-refinería, debido a su tasa de crecimiento alta y composición rica en nutrientes. Esta microalga tiene la habilidad de secuestrar grandes cantidades de CO₂ (gas con efecto invernadero) de la atmósfera, y por acción fotosintética, producir diversas biomoléculas de interés, al mismo tiempo libera al ambiente oxígeno molecular. En este trabajo se analizó el crecimiento de *C. vulgaris* cultivada en laboratorio, en régimen por lotes con un medio basal de Bold. Las condiciones de cultivo incluyeron un fotoperiodo de 16 h con luz y 8 h de oscuridad, con una intensidad luminosa de 2620 lux, a 27 °C. El crecimiento de la microalga mostró un crecimiento exponencial durante los primeros 7 días, seguido de una fase estacionaria de tres días, y una fase de declive a partir del día 11. Las imágenes microscópicas proporcionaron una visión clara de la estructura celular y sus cambios morfológicos durante el ciclo de crecimiento. La velocidad específica de crecimiento observada en este trabajo preliminar fue de $\mu_m = 0.261 \text{ d}^{-1}$. Aunado a lo anterior, con la notable composición nutricional de la microalga reportada en la literatura, que incluye un alto contenido de proteínas, lípidos (ácido α -Linoleico), clorofila y otros compuestos bioactivos; se destaca el potencial de *Chlorella vulgaris* como fuente alternativa y sostenible de proteínas para la industria alimentaria.

Palabras clave:

Microalgas, proteínas alternativas, sostenibilidad, bioeconomía.

Abstract

Chlorella vulgaris is receiving increased attention in the food industry and in the biorefinery due to its high growth rate and nutrient-rich composition. This microalga has the ability to sequester large amounts of CO₂ (a greenhouse gas) from the atmosphere, and through photosynthetic action, produce various biomolecules of interest, and at the same time releases oxygen into the environment. In this work, the growth of this microalgae cultivated under controlled laboratory conditions in a Bold basal medium was analyzed. The cultivation conditions included a photoperiod of 16 hours of light and 8 hours of darkness, with a light intensity of 2620 lux, at a temperature of 27°C. The growth of the microalgae showed exponential growth during the first 7 days, followed by a three-day stationary phase, and a decline phase starting on day 11. The microscopic images provided a clear view of the cell structure and its morphological changes during the growth cycle. The specific growth rate observed in this preliminary work was $\mu_m = 0.261 \text{ d}^{-1}$. In addition, with the notable nutritional composition of the microalgae reported in the literature, which includes a high content of proteins, lipids (α -Linoleic acid), chlorophyll and other bioactive compounds; the potential of *Chlorella vulgaris* as an alternative and sustainable source of proteins for the food industry is highlighted.

Key words:

Microalgae, alternative protein, sustainability, bio-economy.

¹ División de Estudios de Posgrado e Investigación; ² Depto. de Ingenierías. Tecnológico Nacional de México campus Roque. Celaya, Gto., México.

* Autor de correspondencia: carlos.fg@roque.tecnm.mx

1. Introducción

Chlorella vulgaris es una microalga verde dulceacuícola que está captando interés en la industria alimentaria, debido a su alta tasa de crecimiento y su rica composición en nutrientes (Cifuentes y López, 2021; Richmond y Hu, 2022). Este estudio presenta un análisis detallado de la curva de crecimiento de *Chlorella vulgaris* y observaciones microscópicas para resaltar sus características morfológicas y potenciales aplicaciones. En la Tabla 1, se muestra la composición general declarada de un suplemento nutritivo comercial a base de polvo seco de *Chlorella vulgaris*.

Por otra parte, existen algunas ecuaciones primarias (Tabla 2) para modelar el crecimiento de microorganismos en función del tiempo (Narayanan et al., 2017; Zwietering et al., 1990).

El objetivo de este trabajo, es evaluar de manera preliminar el crecimiento de *Chlorella vulgaris* a condiciones controladas de laboratorio, así como evaluar el ajuste de los datos experimentales a modelos matemáticos que representen la cinética de crecimiento de dicho microorganismo.

Tabla 1. Composición general de polvo seco comercial de *Chlorella vulgaris* (Dote y Goto, 2023).

Componentes	Contenido (g)
Proteínas	60.600
Carbohidratos	3.700
Grasas	12.800
Fibra dietética	13.000
Cenizas	4.500
Húmedad	5.400
Clorofila	2.400
Carotenos	0.106
Vitamina C	0.074
Vitamina E	0.023

2. Metodología

La presente investigación se estableció en condiciones de laboratorio, en el Instituto Tecnológico de Roque. La cepa de *Chlorella vulgaris* CCAB 90/41, se cultivó en un Medio Basal de Bold (BBM) en régimen por lote. Las condiciones de cultivo incluyeron un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, con una intensidad luminosa de 2620 lux, y una temperatura de 25-28 °C. Se utilizó una bomba de aire para agitar el sistema de cultivo. Para monitorear el crecimiento se empleó un espectrofotómetro de microplaca registrando la densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm (DO_{600}).

Las observaciones microscópicas se llevaron a cabo utilizando un microscopio óptico invertido OLYMPUS IX71, las fotografías fueron tomadas con ayuda de una cámara fotográfica adaptada al microscopio OLYMPUS DP72. La composición nutricional de *Chlorella vulgaris* se discutió con base en datos de literatura científica.

Los datos de la cinética de crecimiento de *Chlorella vulgaris*, se ajustaron por regresión no lineal a cada modelo matemático evaluado, empleando el complemento Solver de Microsoft Excel, que minimiza la suma de los residuos al cuadrado, usando el algoritmo de Gauss-Newton. Además, se realizaron

pruebas de calidad de ajuste y el análisis de varianza (ANOVA) de los parámetros cinéticos con significancia biológica, para evaluar la significancia del modelo.

3. Resultados

El crecimiento de *Chlorella vulgaris* fue determinado durante un periodo de 15 días, observado sus características morfológicas en el microscopio. En la figura 1 muestra una imagen de las células individuales, donde se puede apreciar el color verde brillante característico del organismo fotosintético. Se puede observar también la forma esférica típica de la microalga unicelular, así como una "instantánea" de la dinámica de los cambios morfológicos que ocurren durante el ciclo de crecimiento. Las células de *C. vulgaris* presentan dimensiones características de entre 2 a 10 μm de diámetro.

En la figura 2, se muestra la curva de crecimiento de *C. vulgaris*; en la donde se puede observar que la fase de crecimiento exponencial inicia después del tercer día de cultivo y hasta cerca del día 10, seguido de una fase de desaceleración que va de entre los días 10 a 15, y finalmente se puede apreciar el inicio de la fase de

estancamiento del crecimiento en el régimen de cultivo evaluado.

Tabla 2. Expresiones matemáticas para modelar el crecimiento de microorganismos.

Modelo	Expresión	Nomenclatura:
Gompertz modificado	$y = A \exp \left\{ - \exp \left[\frac{\mu_{max} * \exp (1)}{A} (\lambda - t) + 1 \right] \right\}$	$y = \ln(N/N_0)$; t es el tiempo (días). Los parámetros del modelo con significado biológico, son: λ , tiempo de retardo inicial o fase "lag"; μ_{max} velocidad específica de crecimiento máxima; A , máximo valor de la variable "y" alcanzada.
Weibull modificado	$y = \exp(-\theta * t^\delta) (\beta - \alpha) + \alpha$	$\alpha, \beta, \delta, \theta$ son parámetros empíricos de cada modelo
Logístico modificado	$y = \frac{(\beta - \alpha)}{1 + \exp \left[\frac{(t - \theta)}{\delta} \right]} + \alpha$	

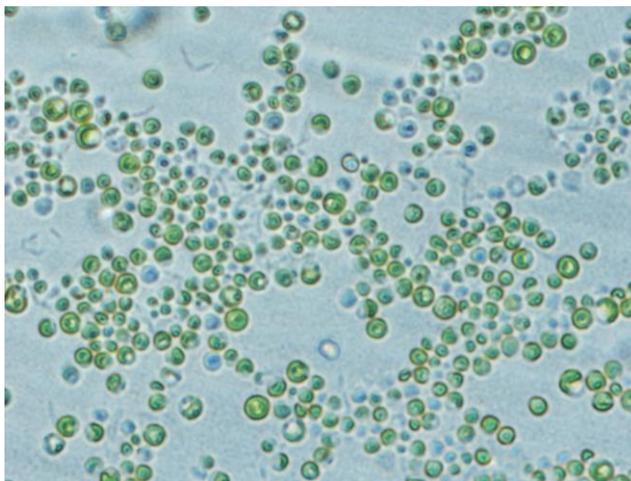


Fig. 1. Microfotografía de *Chlorella vulgaris* CCAB 90/41.

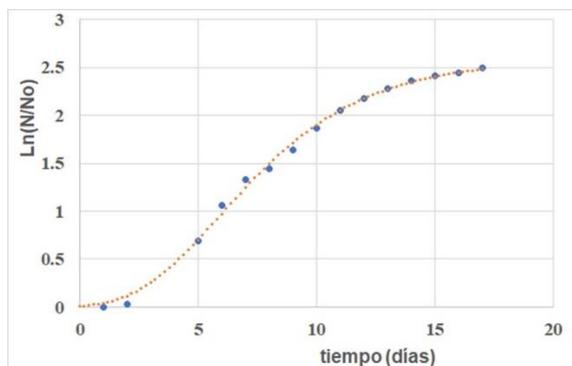


Fig. 2. Curva de crecimiento de *Chlorella vulgaris*. Puntos azules: datos experimentales; línea punteada: ajuste con el modelo de Gompertz modif.

Los resultados del ajuste por regresión no lineal al modelo de Gompertz modificado, de los datos promedio de la cinética de crecimiento de *Chlorella vulgaris*, se pueden observar gráficamente en la línea punteada de la Figura 2. Por otra parte, en la Tabla 2, se reportan los estimados de los parámetros de las tres ecuaciones, así como los coeficientes de determinación R^2 del análisis del ajuste a los modelos.

Aunque los modelos evaluados no representan todos los fenómenos significativos que suceden en la cinética de crecimiento de *C. vulgaris* en el régimen de cultivo por lotes, son útiles para representar en forma sencilla, el modelamiento matemático necesario en futuras etapas de diseño de fotobiorreactores. Se puede observar que la calidad de ajuste de los tres modelos de crecimiento a los datos experimentales es excelente, toda vez que todos los coeficientes de determinación R^2 son superiores a 0.997. Se acentúa el correspondiente al modelo de Gompertz modificado, por la significancia biológica de sus parámetros, que arroja una velocidad específica de crecimiento máxima $\mu_{\max} = 0.261 \text{ d}^{-1}$; a partir de este valor, se puede

calcular un tiempo de duplicación de $t_d = 2.6$ días, de acuerdo a la ecuación de cinética de crecimiento ($dN/dt = \mu N$). El valor de la fase "lag" es $\lambda = 2.192 \text{ d}$, que es elevado para casos prácticos, se podría explicar porque no hubo acondicionamiento previo de la microalga a las condiciones de cultivo, lo que resalta la importancia de realizarlo en futuros ensayos. Finalmente, la asíntota $A = 2.624$, demuestra el valor máximo del número de células normalizado (N_{\max}/N_0) que se alcanzaría según la tendencia de los datos cinéticos obtenidos en el periodo evaluado.

Los valores de la velocidad específica de crecimiento máxima, reportados en la literatura consultada van de: $0.13 \text{ d}^{-1} \leq \mu_{\max} \leq 0.69 \text{ d}^{-1}$, obtenidas con diferentes medios/condiciones de cultivo (Lee y Yoon, 2021). Comparando con el correspondiente valor obtenido en este trabajo, se puede observar por una parte que se obtuvo un valor coherente, y por la otra, se puede inferir que las condiciones de cultivo son susceptibles a optimizarse y buscar elevar la tasa de crecimiento (Vaičiulytė et al., 2014).

Tabla 2. Coeficientes de determinación y valores estimados de los parámetros obtenidos por *regresión no lineal* de los datos del cultivo de *Chlorella vulgaris*.

Modelo	R^2	Parámetros de los modelos						
		α	β	θ	δ	A	μ_m	λ
Logístico	0.9976	2.576	-0.3378	6.4984	3.011	-	-	-
Weibull	0.9981	2.556	-0.0065	0.0161	1.918	-	-	-
Gompertz	0.9978	-	-	-	-	2.624	0.261	2.192

4. Conclusiones.

La cinética de crecimiento de la microalga fotosintética *Chlorella vulgaris* fue obtenida exitosamente, presentó una velocidad específica de crecimiento máxima μ_{\max} de 0.261 d^{-1} , una fase de adaptación (lag) $\lambda = 2.192 \text{ d}$, y el número de células máximo posible a obtener es de $(N_{\max}/N_0) = 2.624$, a las condiciones de cultivo evaluadas.

Las ecuaciones modificadas de Gompertz, de Weibull y logística, describen adecuadamente los datos de crecimiento de *Chlorella vulgaris* obtenidos a las condiciones evaluadas, su ajuste resultó estadísticamente significativo.

Agradecimientos

Se agradece al Tecnológico Nacional de México por el apoyo financiero para la realización del presente trabajo de investigación con folio de proyecto 18772.23-P.

Referencias

- Cifuentes, A., & López, R. (2021). Advances in the industrial application of microalgae: A focus on *Chlorella vulgaris*. *Biotechnology Advances*, 49, 107737.
DOI: 10.1016/j.biotechadv.2021.107737
- Dote, T., & Goto, S. (2023). Nutritional and biochemical properties of *Chlorella vulgaris* as a functional food. *Journal of Applied Phycology*, 35(2), 467-480.
DOI: 10.1007/s10811-022-02786-9
- Lee, Y. K., & Yoon, B. S. (2021). Optimization of growth conditions for *Chlorella vulgaris* and its potential in commercial applications. *Algal Research*, 59, 102473.
DOI: 10.1016/j.algal.2021.102473
- Richmond, A., & Hu, Q. (2022). *Handbook of microalgae culture: Applied phycology and biotechnology* (2nd ed.). Wiley-Blackwell.

- Narayanan, V., Schelin, J., Gorwa, G.M., & Carlquist, M. (2017). Increased lignocellulosic inhibitor tolerance of *S. cerevisiae* cell populations in early stationary phase. *Biotechnology for Biofuels*, 10(1).
- National Center for Biotechnology Information (2024). PubChem Compound Summary for , *Chlorella vulgaris*. Retrieved December 1, 2024 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Chlorella-vulgaris>.
- Vaičiulytė, S., Padovani, G., Kostkevičienė, J., & Carlozzi, P. (2014). Batch growth of *Chlorella vulgaris* versus semi-continuous regimen for enhancing oil-rich biomass productivity. *Energies*, 7(6), 3840-3857.
- Zwietering, M. H., Jongenburger, I., & van 't Riet, K. (1990). Modeling of the bacterial growth curve. *Applied & Env. Microbiol.*, 56(6), 1875-1881.