

ARTÍCULO CIENTÍFICO

EXPLORACIÓN DE EXTRACTOS ACUOSOS DE SEMILLAS Y DERIVADOS PARA LA PRODUCCIÓN DE BRUSHITA ESFÉRICA

*José Antonio Martínez Carreón e Iván Jalil Antón Carreño Márquez**

Resumen

La Brushita ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) es un mineral perteneciente a la familia de los fosfatos. Su crecimiento cristalino es laminar, pero en condiciones particulares puede precipitar como esferas. La morfología esférica es de interés en la ingeniería biomédica para la regeneración de tejido óseo. Se ha reportado la producción de Brushita esférica a partir de extractos acuosos de salvado de trigo, aunque el uso de otros precursores similares no ha sido explorado. Se realizaron extracciones acuosas de derivados del trigo, arroz, avena, linaza y quinoa. Mediante la adición de Ca^{2+} la biomineralización de Brushita ha sido inducida y caracterizada mediante microscopía óptica y espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR). Las señales infrarrojas obtenidas sugieren que el salvado arroz es viable como materia prima para la producción de partículas esféricas de Brushita.

Abstract

Brushite ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) is a mineral from the phosphate family. Its crystal growth occurs in sheets, nevertheless it could precipitate as spherical particles. This morphology is of great interest for biomedical engineering due to its applications in bone tissue regeneration. It has been reported the production of spherical Brushite particles from wheat bran aqueous extracts but, as the best of author's' knowledge, no similar precursors have been used with the same purpose. In this study aqueous extracts from wheat, rice, and oat bran, as well as quinoa and flax seeds and wheat germ have been used to precipitate Brushite through the addition of Ca^{2+} ions. Characterization was performed via optical microscopy and Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR). Results suggest that wheat and rice bran can produce spherical Brushite while other seeds and brans does no deliver adequate morphology or Brushite at all.

Palabras Clave:

Salvado, semilla, extracto acuoso, biomineralización

Keywords:

Bran, seed, aqueous extract, biomineralization

Universidad Politécnica de Chihuahua.
Av. Teófilo Borunda No. 13200, Col. Labor de Terrazas, C.P. 31220, Chihuahua, Chihuahua, México.
* Autor de correspondencia: jcarreno@upchihuahua.edu.mx

1. Introducción

El descubrimiento de la agricultura es uno de los más grandes hitos por los que ha atravesado el Homo sapiens (Harari, 2020). Sin embargo, incluso con lo sofisticada y eficiente que se ha vuelto la industria alimenticia actualmente se pierde cerca de un tercio de la producción global de alimentos anualmente, lo que representa de 1.3 mil millones de toneladas. Uno de los principales componentes de estas pérdidas son los cereales, de los cuales el trigo, el arroz, la soya y la quinoa son los principales contribuyentes (Rashwan et al., 2023). Durante el procesamiento de ciertos granos el salvado se acumula volviendo problemático su manejo y disposición. Se estima que anualmente se produce más de 150 millones de toneladas de salvado de trigo (Prückler et al., 2014) y 29 millones de toneladas de salvado de arroz (Sharif et al., 2014). Por sus componentes (proteínas, minerales, carbohidratos y otros compuestos) el salvado puede ser utilizado crudo o bien darle algún tipo de valor agregado (Pastel, 2005; Balandrán-Quintana et al., 2015; Sharif et al., 2014). Dentro de sus aplicaciones más básicas se encuentra su uso como suplemento nutricional por sus efectos antioxidantes (Tlais et al., 2020) y de inhibición enzimática (Sahu et al., 2021), además de servir como alimento en la ganadería (Tan et al., 2023) o piscicultura (Fiefil et al., 2022). Por otro lado, al ser sometido a algún proceso puede ser usado para la producción de bioetanol (Roukas & Kotzekidou, 2022) o bioplástico (Alonso-González et al., 2021), así como coadyuvar en el transporte de compuestos activos en sistemas biológicos (Zolqadri et al., 2023) o en la remoción de metales pesados (Madela, 2021).

Se ha encontrado que el extracto acuoso de salvado de trigo, por su alta concentración de ácido fítico, puede ser utilizado para la producción de Brushita esférica (Zavala-Corrales et al., 2020), un mineral de importancia en la ingeniería biomédica (Fuchs et al., 2022). El ácido fítico es un compuesto de almacenamiento de fósforo presente en gran variedad de semillas como la linaza o la quinoa (Kumar et al., 2021). Otros componentes detectados por Zavala-Corrales (2020) en los extractos acuosos de salvado de trigo incluyen péptidos que sirven como andamios para la biomineralización del fosfato de calcio (Carreño-Márquez et al., 2023). Esto hace a las semillas, en general, buenos candidatos para aportar fósforo en cantidades suficientes para precipitar fosfato de calcio. Debido a que los huesos están

formados en más de dos terceras partes por fosfatos (Michigami & Ozono, 2019), es un candidato perfecto para ser utilizado como material de relleno (Demir-Oğuz et al., 2023). Las propiedades fisicoquímicas de la Brushita la vuelven un material relativamente fácil de producir y adsorber en los tejidos, además de que la morfología esférica reduce la abrasión y el tiempo de recuperación (Moseke et al., 2012; Hlabse & Walton, 1965). El presente estudio tiene como objetivo explorar la viabilidad de los extractos acuosos de otros salvados y semillas para determinar si estos tienen la capacidad de formar este biomaterial.

2. Metodología

Se obtuvieron extractos acuosos de salvado de trigo, arroz y avena, semilla de quinoa y linaza, hojuela de quinoa, linaza molida y germen de trigo. Estos materiales en su conjunto en adelante serán referidos como las materias primas. Estas se adquirieron de fuentes comerciales minoristas como se declara en la Tabla 1. Las extracciones acuosas se realizaron partiendo de la metodología propuesta por Zavala-Corrales (2020) y mostrada en la Figura 1. El material se cribó utilizando una malla U.S. Standar #40 (425 μm) para eliminar la presencia de partículas contaminantes. Posteriormente se lavó con agua tridestilada en una relación 1:10 (material:agua) y se secó en un horno de convección Felisa FE291 a 40 ± 3 °C por 24 horas. La extracción acuosa se realizó a temperatura ambiente utilizando agitación magnética a 750 rpm por 3 horas en una placa de calentamiento Corning PC-420D. La mezcla resultante fue filtrada utilizando una tela de organza, donde el sólido retenido fue descartado. El extracto fue centrifugado en una centrifuga Velab CVQ-4005 por 10 minutos a 805 xg a temperatura ambiente. El precipitado fue descartado y al sobrenadante se le adicionó una solución 0.75 M de cloruro de calcio (CaCl_2) en proporción 1:10 (sobrenadante: CaCl_2). La mezcla fue incubada por 10 días a 4 °C sin agitación para posteriormente separar el precipitado por decantación y secarlo a 40 ± 3 °C por 24 horas.

El precipitado, de obtenerse, fue recuperado y su morfología analizada en un microscopio óptico Motic EcoSeries. La identificación del material se realizó mediante espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR) utilizando un equipo Thermo Nicolet Nexus 670 desde los 600 a los 4000 cm^{-1} con resolución de 4 cm^{-1} y velocidad de 0.6329 cm/s .

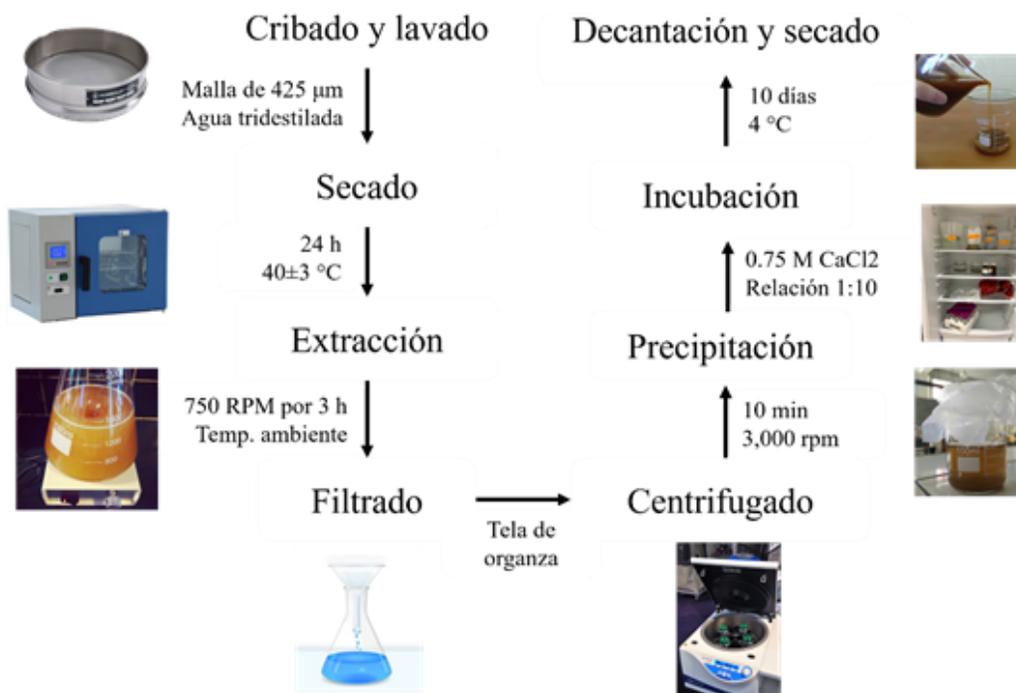


Fig. 1. Pasos para la obtención de precipitados a partir de extractos acuosos.

Tabla 1. Información de las materias primas utilizadas para las extracciones acuosas.

Materia prima	Marca comercial	Lote	Origen
Salvado de trigo	Maxilu	3223	México
Salvado de arroz	Independiente	-	México
Salvado de avena	RapiSalvado	LSA090523	México
Hojuela de quinoa	Okko Super Foods	010823/07	Perú
Quinoa entera	Okko Super Foods	080823/44	Perú
Semilla de linaza	Carepak	SL5130923	México
Linaza molida	Carepak	LM5040923	México
Germen de trigo	Maxilu	3323	México

3. Resultados y discusión

Los extractos retirados de la incubación fueron inspeccionados visualmente (Figura 2) en busca de características particulares. El extracto de semilla de linaza y de linaza molida generaron soluciones de alta viscosidad, mientras que el resto de los extractos presentaron una viscosidad similar a la del agua. Todos los extractos se decantaron y secaron. Solo los extractos de salvado de trigo, salvado de arroz, hojuela de quinoa y quinoa entera presentaron precipitados (Tabla 2). El resto de los extractos fueron descartados. En el caso de la semilla de linaza y la linaza molida, su elevado contenido de lípidos y fibra dietética (Mueed et

al., 2022) dieron como resultado un extracto de alta viscosidad, lo que impidió la eficiente extracción y posterior biomineralización.

Los materiales resultantes fueron observados en microscopio óptico para determinar la morfología del precipitado. El salvado de trigo y el salvado de arroz presentaron una mezcla de precipitados esféricos y laminares (Figura 3a y 3b), mientras que los extractos de quinoa produjeron material amorfo y viscoso (Figura 3c y d). El caso del salvado de trigo es congruente con los resultados obtenidos de manera independiente por Zavala-Corrales et al. (2020) y Carreño-Márquez et al. (2023), mientras que resultados similares no han sido

reportados previamente con salvado de arroz. Los diámetros observados se encuentran en el rango de los cientos de micrómetros, lo que es congruente con tamaños de partícula reportados previamente a partir de diversos métodos de producción de Brushita esférica (Bohner et al. 2013). Si bien las dimensiones de las esferas dependen directamente del método de

síntesis utilizado, se ha observado que temperaturas menores los diámetros tienden a aumentar (Moseke et al., 2012). Debido a que el presente trabajo es un estudio exploratorio de la capacidad de producción de partículas esféricas de diversas fuentes, en el futuro se requerirá analizar a mayor detalle la distribución de tamaños producida por el salvado de arroz.

Tabla 2. Resultados de la precipitación en los diferentes extractos acuosos y morfología resultante.

Materia prima	Precipitado	Morfología
Salvado de trigo	+	Esférica y laminar
Salvado de arroz	+	Esférica y laminar
Salvado de avena	-	N/A
Hojuela de quinoa	+	Amorfo
Quinoa entera	+	Amorfo
Semilla de linaza	-	N/A
Linaza molida	-	N/A
Germen de trigo	-	N/A



Fig. 2. Extractos acuosos obtenidos. La viscosidad alta se indica con un rombo rojo.

La caracterización por FT-IR de los precipitados esféricos indican la formación de una sola fase. En la Figura 4 se aprecian algunos espectros obtenidos en el rango de 700 a 3600 cm^{-1} , en los cuales se identifica el material como fosfato de calcio dihidratado o Brushita. Las señales en infrarrojo de la Brushita están bien identificadas en la literatura, ya sea en muestras obtenidas por precipitación directa (Hirsch et al., 2014) o mediante biomieralización (Zavala-Corrales et al., 2020; Carreño-Márquez et al., 2023). Las vibraciones de tensión de las moléculas de agua fueron identificadas en 3283 y 2924 cm^{-1} mientras que su tijereteo fue observado en 1649 cm^{-1} (Seki et al.,

2020). Las vibraciones de tensión del enlace P=O fueron encontradas en 1133 y 1058 cm^{-1} y su vibración de tijereteo fue ubicada en 1215 y 790 cm^{-1} (Mevellec et al., 2013). Señales características de los grupos amino de proteínas y que aparecen entre de 1600 y 1650 cm^{-1} pueden estar traslapadas con señales de la Brushita (Barth, 2007) mientras que otras correspondientes a vibraciones C-H aparecen aproximadamente en 2880 cm^{-1} (Nga et al., 2020). Esto sugiere la presencia de péptidos o proteínas asociadas a las partículas de Brushita; sin embargo, esta hipótesis requiere un análisis proteómico posterior.

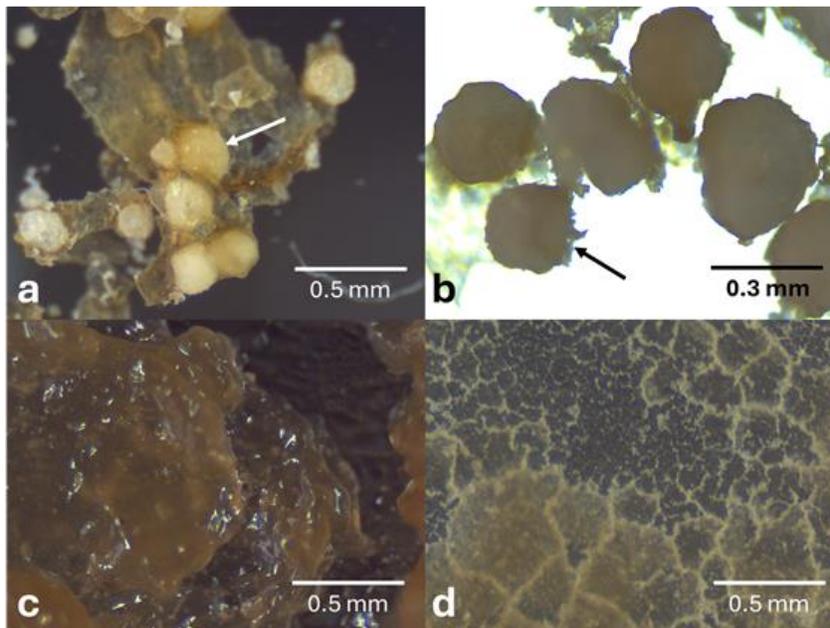


Fig. 3. Imágenes de microscopía óptica. Extractos de: a) salvado de trigo, b) salvado de arroz, c) semilla de quinoa y d) extracto de quinoa. Con flechas en a) y b) se indica la morfología esférica de interés.

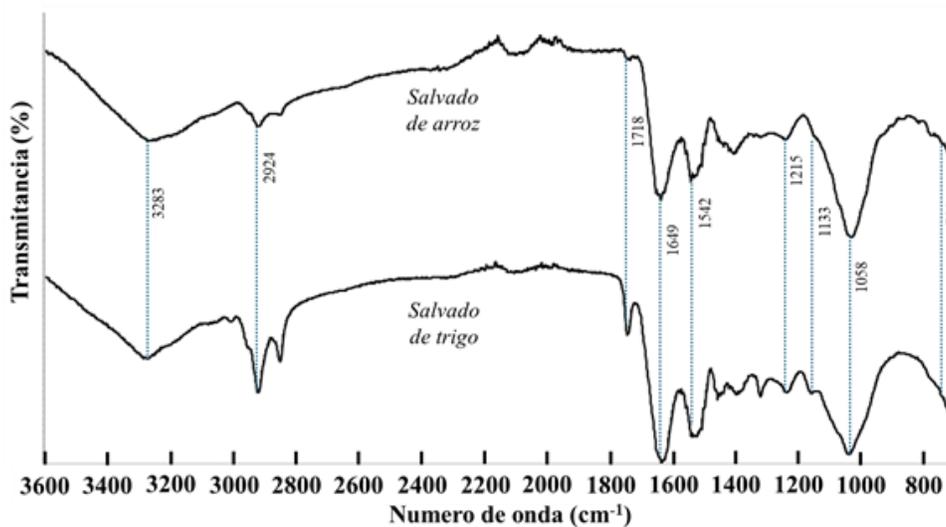


Fig. 4. Vibraciones obtenidas por FT-IR de las partículas esféricas precipitadas.

Las semillas y sus derivados están compuestos de proteínas, lípidos, carbohidratos, agua y otras biomoléculas. La composición específica puede variar y es susceptible a factores como la estación de cosecha, las condiciones de cultivo o la parte de la planta que se

analice (Wu et al., 2024; Copeland & McDonald, 1999). Sin embargo, uno de los componentes que está presente de manera persistente es el ácido fítico ($C_6H_{18}O_{24}P_6$). Este tiene una estructura particular que le permite ligarse con proteínas, carbohidratos o

minerales, lo cual lo vuelve un importante antioxidante para las plantas (Graf & Eaton, 1990). El rompimiento del ácido fítico por la acción de la enzima fitasa da como resultado la liberación de fosfatos (PO_4^{3-}) (Gupta et al. 2015). Este ion puede utilizarse, mediante la adición de calcio, para la biomineralización de Brushita (Zavala-Corrales et al. 2020). Tanto el salvado de trigo como el salvado de arroz poseen cantidades similares de ácido fítico (Gupta et al. 2015) lo que explica porque sus extractos acuosos fueron capaces de precipitar Brushita. Tanto en la quinoa (Valencia-Chamorro, 2016) como en la linaza (Oomah et al., 1996) la cantidad de ácido fítico es menor por lo que la probabilidad de que formen Brushita también lo es. Carreño-Márquez et al. (2023) determinaron que la presencia de ciertas proteínas o péptidos promueven la producción de partículas esféricas, su ausencia o baja concentración en otros tipos de extractos pudo impedir su formación. Esta hipótesis merece un minucioso estudio proteómico posterior.

4. Conclusiones

La producción de partículas esféricas de Brushita es relevante para la biomedicina ya que estas poseen atractivas características como materiales de relleno óseo. Si bien existen diversos métodos para su producción, el uso de extractos acuosos de diversos subproductos alimenticios recién está siendo explorado. En el presente trabajo se observó por primera vez la producción de estas partículas esféricas de Brushita a partir del salvado de arroz.

Dado que el salvado de arroz es uno de los principales subproductos agroindustriales a nivel global, su potencial inserción en la economía circular mediante su uso para la creación de materiales avanzados es prometedora. En el caso del salvado de arroz se requiere un estudio proteómico que determine si las moléculas andamio que dan origen a la morfología esférica son iguales o similares a las del salvado de trigo. Adicionalmente, se requiere optimizar las condiciones de precipitación y hacer un análisis de la distribución de tamaño de partícula.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Universidad Politécnica de Chihuahua por las facilidades prestadas para la elaboración del presente trabajo a través de la Convocatoria de Investigación 2023. Al Mtro. Eduardo Alonso Barbosa Sáenz, encargado del despacho de rectoría de la universidad, la Dra. María Guadalupe

Roacho Torres, directora de carrera y a la M.C. Guadalupe Elizabeth Aranda Gardea encargada del laboratorio de química, por las diversas gestiones realizadas.

Referencias

- Alonso-González, M., Felix, M. & Romero, A. (2021). Rice bran-based bioplastics: Effects of biopolymer fractions on their mechanical, functional and microstructural properties. *Polymers*, 14(1), 100. DOI: 10.3390/polym14010100.
- Balandran-Quintana, R.R., Mercado-Ruiz, J.N. & Mendoza-Wilson, A.M. (2015) Wheat bran proteins: a review of their uses and potential. *Food Rev. Int.* 31:279–93 DOI: 10.1080/87559129.2015.1015137.
- Barth, A. (2007). Infrared spectroscopy of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1767(9), 1073–1101. DOI: 10.1016/j.bbabi.2007.06.004.
- Bohner, M., Tadier, S., van Garderen, N., de Gasparo, A., Döbelin, N., & Baroud, G. (2013). Synthesis of spherical calcium phosphate particles for dental and orthopedic applications. *Biomatter*, 3(2). DOI: 10.4161/BIOM.25103.
- Carreño-Márquez, I.J.A., Balandrán-Quintana, R.R., Azamar-Barrios, J.A., Huerta-Ocampo, J.Á., Mendoza-Wilson, A.M., et al. (2023) Proteomic analysis of the biomineralization of spherical Brushite produced from a wheat bran aqueous extract. *Food Biosci.*, 53, 102692, DOI: 10.1016/J.FBIO.2023.102692.
- Copeland, L.O. & McDonald, M.B. (1999). *The Chemistry of Seeds*. In: *Principles of Seed Science and Technology*. Springer, Boston, MA. DOI: 10.1007/978-1-4615-1783-2_3.
- Demir-Oğuz, Ö., Boccaccini, A.R. & Loca, D. (2023) Injectable bone cements: What benefits the combination of calcium phosphates and bioactive glasses could bring? *Bioact. Mater.* 19 217–236. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2022.04.007.
- Flefil, N.S., Ezzat, A., Aboseif, A.M. & El-Dein, A.N. (2022). Lactobacillus-fermented wheat bran, as an economic fish feed ingredient, enhanced dephytinization, micronutrients bioavailability, and tilapia performance in a biofloc system.

- Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 45, 102521.
- Fuchs, A., Kreczy, D., Brückner, T., Gbureck, U., Stahlhut, P., et al. (2022) Bone regeneration capacity of newly developed spherical magnesium phosphate cement granules, *Clin. Oral Invest.* 26, 2619–2633.
DOI: 10.1007/s00784-021-04231-w.
- Graf, E. & Eaton, J.W. (1990) Antioxidant functions of phytic acid. *Free Radic Biol Med.* 8(1):61-9.
DOI: 10.1016/0891-5849(90)90146-a.
- Gupta, R.K., Gangoliya, S.S. & Singh, N.K. (2015) Reduction of phytic acid and enhancement of bioavailable micronutrients in food grains. *J Food Sci Technol* 52(2):676-84.
DOI: 10.1007/s13197-013-0978-&.
- Harari, Y.N. (2015). *Sapiens: A brief history of humankind*. Harper.
- Hirsch, A., Azuri, I., Addadi, L., Weiner, S., Yang, K., et al. (2014) Infrared absorption spectrum of brushite from first principles, *Chem.Mater.*, 26(9) (2014) 2934–2942.
DOI: 10.1021/CM500650T/.
- Hlabse, T. & Walton, A.G. (1965) The nucleation of calcium phosphate from solution. *Anal. Chim. Acta.* 33(C), 373–377.
DOI: 10.1016/S0003-2670(01)84906-0.
- Kumar, A., Singh, B., Raigond, P., Sahu, C., Mishra, U. N., Sharma, S., & Lal, M.K. (2021). Phytic acid: Blessing in disguise, a prime compound required for both plant and human nutrition. *Food research international*, 142, 110193.
DOI: 10.1016/j.foodres.2021.110193.
- Mevelléc, J.Y., Quillard, S., Deniard, P., Mekmene, O., Gaucheron, F., et al. (2013). Polarized infrared reflectance spectra of brushite (CaHPO₄·2H₂O) crystal investigation of the phosphate stretching modes, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, 111, 7–13.
DOI: 10.1016/j.saa.2013.03.047.
- Michigami, T. & Ozono K. (2019) Roles of phosphate in skeleton. *Front. Endocrinol.*, 10 180.
DOI: 10.3389/fendo.2019.00180.
- Moseke, C., Bayer, C., Vorndran, E., Barralet, J.E., Groll, J. & Gbureck, U. (2012) Low temperature fabrication of spherical brushite granules by cement paste emulsion. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, 23 (11), 2631–2637.
DOI: 10.1007/S10856-012-4740-1.
- Mueed, A., Shibli, S., Korma, S.A., Madjirebaye, P., Esatbeyoglu, T., & Deng, Z. (2022). Flaxseed Bioactive Compounds: Chemical Composition, Functional Properties, Food Applications and Health Benefits-Related Gut Microbes. *Foods.* 11(20), 3307.
DOI: 10.3390/foods11203307.
- Nga, N.K., Thanh Tam, L.T., Ha, N.T., Hung, V.P., & Huy, T.Q. (2020). Enhanced biomineralization and protein adsorption capacity of 3D chitosan/hydroxyapatite biomimetic scaffolds applied for bone-tissue engineering. *RSC Advances*, 10(70), 43045–43057.
DOI: 10.1039/d0ra09432c.
- Oomah, B. D., Kenaschuk, E. O. & Mazza, G. (1996) Phytic Acid Content of Flaxseed As Influenced by Cultivar, Growing Season, and Location. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44 (9), 2663-2666.
DOI: 10.1021/jf9601527.
- Prückler, M., Siebenhandl-Ehn, S., Apprich, S., Holtinger, S. & Haas, C. (2014) Wheat bran-based biorefinery 1: composition of wheat bran and strategies for functionalization. *LWT Food Sci. Technol.* 56:211–21.
DOI: 10.1016/j.lwt.2013.12.004.
- Rashwan, A.K., Bai, H., Osman, A.I., Eltohamy, K. M., Chen, Z., et al. (2023) Recycling food and agriculture by-products to mitigate climate change: a review. *Environ Chem Lett* 21, 3351–3375.
DOI: 10.1007/s10311-023-01639-6.
- Roukas, T. & Kotzekidou, P. (2022). From food industry wastes to second generation bioethanol: a review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 21(1), 299-329.
DOI: 10.1007/s11157-021-09606-9.
- Sahu, R., Kundu, P. & Sethi, A. (2021) In vitro antioxidant activity and enzyme inhibition properties of wheat whole grain, bran and flour defatted with hexane and supercritical fluid extraction. *LWT*, 146, 111376.
DOI: 10.1016/j.lwt.2021.111376.
- Seki, T., Chiang, K.Y., Yu, C.C., Yu, X., Okuno, M., et al. (2020). The bending mode of water: A powerful probe for hydrogen bond structure of aqueous systems. *Journal of Physical Chemistry Letters*, 11, 8459–8469.
DOI: 10.1021/acs.jpcclett.0c01259?ref=pdf.

- Sharif, M.K., Butt, M.S., Anjum, F.M. & Khan, S.H. (2014) Rice bran: a novel functional ingredient. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 54:807–16.
DOI: 10.1080/10408398.2011.608586.
- Tan, B.L., Norhaizan, M.E., & Chan, L.C. (2023) Rice Bran: From Waste to Nutritious Food Ingredients. *Nutrients*, 15, 2503.
DOI: 10.3390/nu15112503.
- Tlais, A.Z.A., Fiorino, G.M., Polo, A., Filannino, P., & Di Cagno, R. (2020) High-Value Compounds in Fruit, Vegetable and Cereal Byproducts: An Overview of Potential Sustainable Reuse and Exploitation. *Molecules*, 25, 2987.
DOI: 10.3390/molecules25132987.
- Valencia-Chamorro, S. (2016). Quinoa, Overview. In: B. Caballero, Ed., *Encyclopedia of Food Science and Nutrition*, Academic Press, Waltham, 2003, pp. 4895-4902.
DOI: 10.1016/B0-12-227055-X/00995-0.
- Wu, Q., Zhang, M., Hu, H., Tu, Y., Gao, P., et al. (2024) Comparative study on chemical composition, functional properties of dietary fibers prepared from four China cereal brans. *Int J Biol Macromol.* 257(2):128510.
DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2023.128510.
- Zavala-Corrales, J.L., Balandrán-Quintana, R.R., Azamar-Barríos, J.A., Mendoza-Wilson, A.M., Hurtado-Solórzano, P.G. & Pompa-Redondo, J.S. (2020) Wheat bran extracts as biomineralization scaffolds: An exploratory study leading to aqueous solution synthesis of spheroidal brushite particles. *Food Bioprod. Process.*, 121, 238–249.
DOI: 10.1016/J.FBP.2020.03.003.
- Zolqadri, R., Damani, M.H., Malekjani, N., Kharazmi, M.S. & Jafari, S.M. (2023). Rice bran protein-based delivery systems as green carriers for bioactive compounds. *Food Chemistry*, 420, 136121.
DOI: 10.1016/j.foodchem.2023.136121.