

11° CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y AGRONÓMICAS

22 Y 23 DE SEPTIEMBRE DEL 2022

División de Ciencias Económico Administrativas
Universidad Autónoma Chapingo

11° Congreso Internacional de Investigación en Ciencias Básicas y Agronómicas

22 y 23 de septiembre del 2022

MEMORIA MESA 4: QUÍMICA



DIRECCION GENERAL
DE INVESTIGACIÓN Y
POSGRADO

11° CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y AGRONÓMICAS

22 Y 23 DE SEPTIEMBRE DEL 2022

División de Ciencias Económico Administrativas
Universidad Autónoma Chapingo

Editores

Dr. Eleazar Aguirre Mandujano

M.C. Jaime Rocha Quiroz

Dra. Landy Hernández Rodríguez



DIRECCION GENERAL
DE INVESTIGACIÓN Y
POSGRADO

Índice

Actividad antioxidante de hidrolizados enzimáticos obtenidos de proteínas de chapulín (<i>Sphenarium purpurascens</i>)	4
Actividad biológica en hidrolizados de proteína de hormiga chicatana (<i>Atta mexicana</i>)	12
Análisis Docking y Virtual Screening de los cinco compuestos más activos de las bibliotecas virtuales de indazoles y dihidro-indazoles (3,3-disustituidos) en la proteína ALK	23
Docking y virtual screening de 5 compuestos activos de la biblioteca virtual de derivados del <i>O-etil</i> -glucósido de semillas del fruto de crucetillo (<i>Randia aculeata</i>) en <i>Fusarium oxysporum</i>	31
El Mapeo Científico como herramienta de investigación, Caso: Sistema-Producto Mezcal ...	37
Formación de complejos solubles a partir de aislado de proteína de huauzontle y almidón modificado con OSA	45
Digestibilidad, propiedades fisicoquímicas y estructurales del almidón de huauzontle modificado con anhídrido octenil succínico y ácido cítrico	54
Propiedades fisicoquímicas, estructurales y funcionales de almidón modificado de maíz cacahuacintle	68
Comparación de la actividad citotóxica del aceite esencial de las hojas de varias muestras de laurel aromático (<i>Litsea glaucescens</i>)	76
Análisis de RMN de las fracciones enriquecidas en ciclopéptidos del extracto metanólico de semillas de <i>Annona diversifolia</i>	88
Uso de la RMN para analizar dos acetogeninas activas contra la larva del mosquito transmisor del dengue (<i>Aedes aegypti</i>)	97
Caracterización estructural de ligninas aisladas de cáscara de cacao de tres variedades mediante por espectroscopía infrarroja (FTIR-ATR)	107
Influencia de purificación sobre las propiedades fisicoquímicas y funcionales de goma de semilla de chirimoya	114
Caracterización reológica de complejos coacervados de aislado de proteína de amaranto-pectina cítrica	127
Propiedades Reológicas de Películas Biopoliméricas Basadas en Quitosano, Ácido Oleico y Aceite Esencial de Tomillo	137
Capacidad antioxidante del espárrago bajo diferentes métodos de cultivo	145
Propuesta de material didáctico audiovisual para promover el aprendizaje significativo de rapidez de reacción	154
Efecto del tratamiento térmico aplicado a frijol ayocote (<i>Phaseolus coccineus</i> L.) sobre las propiedades tecno-funcionales de sus proteínas	172

Actividad antioxidante de hidrolizados enzimáticos obtenidos de proteínas de chapulín (*Sphenarium purpurascens*)

**Emmanuel Rodea-Lucio¹, Ofelia Sandoval-Castilla¹, Landy Hernández-Rodríguez¹,
Consuelo Silvia Olivia Lobato-Calleros¹, Blanca Elizabeth Hernández-Rodríguez¹**

Resumen

En el presente estudio se determinó la actividad antioxidante de hidrolizados enzimáticos de proteínas de chapulín (*Sphenarium purpurascens*). Se obtuvieron péptidos mediante una hidrólisis enzimática empleando las enzimas Pepsina y Alcalasa[®], el potencial antioxidante de los péptidos fue registrado como capacidad inhibidora de radicales libres ABTS y DPPH. Los péptidos presentaron actividad antioxidante, la cual se determinó mediante la inhibición de radicales libres. Los péptidos obtenidos en un tiempo de 8 h de hidrólisis enzimática con pepsina mostraron una mayor inhibición del radical DPPH (97.87 %) y los péptidos obtenidos a las 2 h de hidrólisis enzimática con Alcalasa[®] presentaron mayor inhibición del radical ABTS (87.81 %). Los resultados obtenidos sugieren que los péptidos pueden ejercer efectos benéficos en la salud del consumidor, teniendo la función de reducir el daño causado por la acción de los radicales libres y con ello evitar el riesgo de desarrollo de diversas enfermedades crónico-degenerativas.

Palabras clave: actividad antioxidante, radicales libres, proteína, insectos comestibles.

Abstract

In this study, the antioxidant activity of enzymatic hydrolysates of grasshopper (*Sphenarium purpurascens*) proteins was determined. Peptides were obtained by enzymatic hydrolysis using the enzymes Pepsin and Alcalase[®], the antioxidant potential of the peptides was recorded as the inhibitory capacity of ABTS and DPPH free radicals. The peptides presented antioxidant activity, which was determined by the inhibition of free radicals. The peptides obtained after 8 h of enzymatic hydrolysis with pepsin showed greater inhibition of the DPPH radical (97.87%) and the peptides obtained after 2 h of enzymatic hydrolysis with Alcalase[®] presented greater inhibition of the ABTS radical (87.81%). The results obtained suggest that peptides can exert beneficial effects on the health of the consumer, having the function of reducing the damage caused by the action of free radicals and thus avoiding the risk of developing various chronic-degenerative diseases.

Keywords: antioxidant activity, free radicals, protein, edible insects.

¹ Universidad Autónoma Chapingo, Km. 38.5, Carretera México-Texcoco, 56230, Texcoco, México.

Correo: al20125521@chapingo.mx; osandovalc@chapingo.mx; lhernandezr@chapingo.mx; clobatoc@chapingo.mx; bhernandezr@chapingo.mx

Introducción

El consumo de insectos representa una alternativa saludable y nutritiva, proporcionando ácidos grasos, vitaminas y micronutrientes como cobre, hierro, magnesio, fósforo, manganeso, selenio y zinc. Adicionalmente, es importante destacar su alto contenido de proteína (Halloran & Vantomme, 2017; Rumpold & Schlüter, 2013; Sun-Waterhouse et al., 2016).

El contenido nutricional de los insectos depende de su etapa de desarrollo (etapa metamórfica), hábitat y dieta. Representan una fuente importante de diversos nutrientes (grasa, fibra y minerales), pero resalta su contenido de proteína, alcanzando hasta el 60 % en algunas especies (Halloran & Vantomme, 2017; Halloran, 2016; Jayanegara et al., 2017; Payne et al., 2016; Van Huis & Oonincx, 2017). Además, se ha registrado que péptidos derivados de las proteínas de insectos comestibles, contienen en su estructura aminoácidos que ejercen actividad antioxidante, como Hys, Pro, Tyr y Trp (Wang & De Mejia, 2005). Liu et al., (2016) ha explicado que los péptidos de bajo peso molecular tienen más aminoácidos expuestos, lo que favorece su interacción con los radicales libres y mejora su efecto antioxidante encontrándose aminoácidos como Lys y Met, que aportan mayor resistencia a la oxidación (Soares de Castro et al., 2018). Con base en lo anterior, este proyecto tiene como objetivos obtener hidrolizados de proteínas de chapulín (*Sphenarium purpurascens*), así como determinar su actividad antioxidante.

Materiales y métodos

Las muestras de chapulín (*Sphenarium purpurascens*) provenientes del estado de Oaxaca, México., fueron adquiridas con el proveedor Be-xoo, S.A de C.V., ubicado en Ciudad de México, México. Los reactivos utilizados fueron ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS), 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) y Trolox, los cuales fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA); NaOH y HCl de la marca J.T.Baker® (Phillipsburg, NJ, USA). La Pepsina (EC 3.4.23.1) fue adquirida en Sigma-Aldrich (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) y Alcalasa® (EC 3.4.21.62) en EMD Millipore Corporation, una filial de Merck KGaA, Alemania.

Análisis químico proximal

La composición químico proximal de los chapulines (*Sphenarium purpurascens*) se determinó de acuerdo con los procedimientos estándar de la AOAC (2002). El contenido de proteína se determinó por el método Kjeldahl (955.04/90), humedad (método de secado a la estufa, 930.15/90), cenizas (método 942.05), grasa (método Soxhlet, 963.15), carbohidratos se determinó por diferencia y los resultados se expresaron en base seca (BS).

Hidrólisis de proteínas con Pepsina

Se realizó la hidrólisis enzimática preparando dispersiones de aislado de proteína de chapulín (APCh) al 5 % (m/v) en amortiguador pH 2. La dispersión se acondicionó a una temperatura de 37 °C con agitación continua a 150 rpm por 15 min y se ajustó el valor de pH a 2.0 con HCl 1 M o NaOH 1 M. Posteriormente, la reacción de hidrólisis se inició adicionando la enzima Pepsina 4 % (m/v). La temperatura (37 °C) y el pH (2.0) se monitorearon y ajustaron según fue

necesario durante el proceso de hidrólisis enzimática. Se tomaron alícuotas al tiempo 0, 30, 60 min y posteriormente en intervalos de 60 min durante 8 h, las cuales se llevaron a ebullición en baño maría durante 15 min para detener la reacción. Se centrifugaron a 8000 rpm durante 15 min a 4 °C, se recuperaron los sobrenadantes y se almacenaron a -20 °C para su posterior análisis.

Hidrólisis de proteínas con Alcalasa®

Se llevó a cabo la hidrólisis enzimática preparando dispersiones de aislado de proteína de chapulín (APCh) al 5 % (m/v) en amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 8. La dispersión se acondicionó a una temperatura de 50°C con agitación continua a 150 rpm por 15 min y se ajustó el valor de pH a 8.0 con HCl 1 M o NaOH 1 M. Posteriormente, la reacción de hidrólisis se inició adicionando la enzima Alcalasa® 4 % (v/v). La temperatura (50 °C) y el pH (8.0) se monitorearon y ajustaron según fue necesario. Se tomaron alícuotas al tiempo 0, 30, 60 min y posteriormente en intervalos de 60 min durante 8 h, las alícuotas se llevaron a ebullición en baño maría durante 15 min para detener la reacción. Se centrifugaron a 8000 rpm durante 15 min a 4 °C, se recuperaron los sobrenadantes y se almacenaron a -20 °C para su posterior análisis.

Inhibición de radical DPPH

Se empleo el procedimiento descrito por Soares de Castro & Harumi (2014) con algunas modificaciones, este método se basa en la estabilidad del radical 2,2-Difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), el cual fue empleado para evaluar la actividad antioxidante de los péptidos de proteínas de chapulín, producidos mediante hidrólisis enzimática con Pepsina y Alcalasa®. Los ensayos se realizaron mezclando 1.5 mL de una solución 0.08 mM de DPPH en metanol al 80 % (v/v) con 0.5 mL de muestra de dispersiones de péptidos obtenidos a los tiempos 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 h de hidrólisis a una concentración de proteína de 1 mg mL⁻¹. La absorbancia se midió a 515 nm en un espectrofotómetro Genesys 10S UV-VIS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) después de 60 min de reacción en la oscuridad. Se preparó un blanco con 1.5 mL de metanol al 80 % (v/v) y 0.5 mL de agua destilada. Así también, se preparó un control con 1.5 mL de una solución 0.08 mM de DPPH en metanol al 80 % (v/v) y 0.5 mL de agua destilada. El porcentaje de inhibición del radical DPPH se calculó mediante la ecuación 1.

$$\% \text{ Inhibición DPPH} = [(A_{515\text{Control}} - A_{515\text{Muestra}}) / A_{515\text{Control}}] \times 100 \quad (1)$$

Donde, $A_{515\text{Control}}$ es la absorbancia (515 nm) del control y $A_{515\text{Muestra}}$ es la absorbancia (515 nm) de la mezcla de reacción con péptidos.

La actividad antioxidante se estimó mediante análisis de regresión lineal del porcentaje de inhibición DPPH vs. concentración de péptidos en diluciones seriales (0 – 1 mg mL⁻¹) y el resultado se reportó como la concentración necesaria de péptidos (mg mL⁻¹) para inhibir el 50 % de la actividad del radical DPPH (IC₅₀). Además, se preparó una curva estándar de Trolox (0 - 100 µM) y la actividad antioxidante, se expresó como µmol equivalentes de Trolox (ET) 100 g⁻¹ de muestra seca.

Inhibición de radical ABTS

La actividad antioxidante por medio de la captación del catión radical ABTS (2,2 'azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)) se determinó de acuerdo con la metodología descrita por Re et al., (1999) con algunas modificaciones. Se mezclaron 5 mL de ABTS 7 mM con 88 µL de

persulfato de potasio 140 mM. La mezcla se mantuvo en la oscuridad por 16 h antes de su uso. Al final de este periodo, la disolución se diluyó con etanol, hasta obtener una absorbancia de 0.700 ± 0.002 a 734 nm en un espectrofotómetro Genesys 10S UV–VIS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). Para los ensayos, se mezclaron 960 µL de la disolución del radical ABTS con 40 µL de dispersiones de péptidos obtenidos a los tiempos 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 h de hidrólisis ($1 \text{ mg}_{\text{proteína}} \text{ mL}^{-1}$), la reacción transcurrió durante 6 min y se midió la absorbancia a 734 nm. Se preparó un blanco con 960 µL de etanol y 40 µL de agua destilada. Así también, se preparó un control con 960 µL de la disolución del radical ABTS y 40 µL de agua destilada. El porcentaje de inhibición del radical ABTS, se calculó de acuerdo con la ecuación 2.

$$\% \text{ Inhibición ABTS} = \left(1 - \frac{A_{734 \text{ muestra}}}{A_{734 \text{ control}}} \right) \times 100 \quad (2)$$

Donde $A_{734 \text{ muestra}}$ es la absorbancia de la disolución ABTS con la muestra; y $A_{734 \text{ control}}$ es la absorbancia de la solución ABTS sin la muestra.

Los resultados se reportaron como IC₅₀, el cual se determinó mediante análisis de regresión lineal del porcentaje de inhibición ABTS vs. concentración de péptidos en diluciones seriales ($0 - 1 \text{ mg mL}^{-1}$) y el resultado se reportó como la concentración necesaria de péptidos (mg mL^{-1}) para inhibir el 50 % de la actividad del radical ABTS (IC₅₀). Además, se preparó una curva estándar de Trolox ($0 - 500 \text{ µM}$) y la actividad antioxidante se expresó como µmol equivalentes de Trolox (ET) 100 g^{-1} de muestra seca.

Resultados y discusión

Análisis proximal de harina de chapulín (*Sphenarium pupurascens*)

La composición químico proximal de *Sphenarium pupurascens*, presenta valores de contenido de proteína de $72.07 \pm 0.03 \%$ (Cuadro 1), similares a los registrados por Melo-Ruiz et al., (2015) de $75.87 \pm 0.6 \%$. Anteriormente, se han registrado valores altos de proteína en insectos comestibles del orden Orthoptera como *Locusta migratoria* y *Acheta domesticus* con 82.30 % y 89.5 %, respectivamente (Villaseñor et al., 2021). Adicionalmente, se encontró un contenido de carbohidratos inferior con respecto a los valores reportados por Melo-Ruiz et al., (2015), mientras que el contenido de lípidos y fibra fue ligeramente mayor, los valores mencionados son 8.51 ± 0.2 , 6.02 ± 1.1 y 7.08 ± 0.9 , respectivamente.

Cuadro 1. Análisis químico proximal de harina de chapulín (*Sphenarium pupurascens*).

Componente	Porcentaje (Base seca)
Proteína	72.07 ± 0.03^1
Lípidos	10.15 ± 0.11
Cenizas	3.35 ± 0.06
Fibra	10.62 ± 0.05

Carbohidratos 3.81 ± 0.00

¹ Los resultados obtenidos son el promedio de 3 repeticiones $\pm$ desviación estándar

Actividad antioxidante de hidrolizados con Pepsina

La actividad antioxidante de los péptidos obtenidos por hidrólisis enzimática con Pepsina se determinó mediante la inhibición de los radicales ABTS y DPPH. Los valores más elevados de actividad antioxidante sobre el radical DPPH (97.87 %), se obtuvieron con los péptidos obtenidos a las 8 h de hidrólisis (figura 1), mientras que sobre el radical ABTS (41.80 %), se obtuvieron con los péptidos obtenidos a las 5 h de reacción (figura 2). Este último valor es 2.3 veces inferior al obtenido por la inhibición del radical DPPH, lo cual se puede atribuir a la especificidad de la Pepsina, que escinde preferentemente los enlaces peptídicos con Lys, Leu, Glu, Ala y aromáticos (Phe, Tyr y Trp) en el extremo carboxilo terminal (Nasri, 2016).

Lo anterior, sugiere la probable formación de interacciones hidrofóbicas entre los residuos de Leu, Glu, Lys y Ala de los péptidos antioxidantes con el radical DPPH y la formación de puentes de hidrogeno a través de los residuos de Lys. Mientras que el radical ABTS interactúa con los péptidos a través de la formación de puentes de hidrógeno con Arg, Gln y Ser e interacciones hidrofóbicas con Asp. Sin embargo, por la especificidad de la enzima, estos aminoácidos no prevalecen en el extremo carboxilo terminal de los péptidos liberados. Wen (2021) demostró mediante el estudio de la relación estructura-actividad de péptidos antioxidantes de semillas de sandía, que los residuos de aminoácidos en péptidos pueden interactuar efectivamente con las moléculas de radicales libres DPPH, lo que hace que el péptido tenga una fuerte actividad de eliminación de estos radicales.

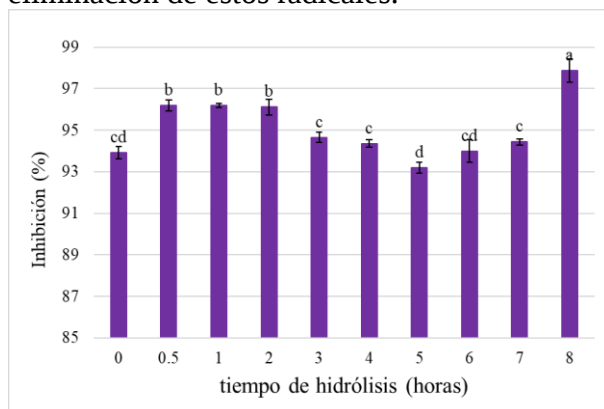


Figura 1. Inhibición del radical DPPH (hidrolizado con Pepsina). Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

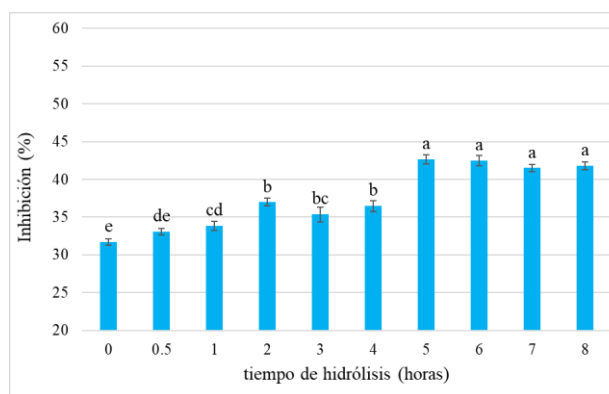


Figura 2. Inhibición del radical ABTS (hidrolizado con Pepsina). Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

Actividad antioxidante de hidrolizados con Alcalasa®

La actividad antioxidante de los péptidos obtenidos por hidrólisis enzimática con Alcalasa® se determinó mediante la inhibición de los radicales ABTS y DPPH. Se registró un valor de 87.81 % de inhibición de radical ABTS con péptidos obtenidos a las 2 h de hidrólisis, siendo esta la actividad antioxidante más elevada, con respecto a la observada en péptidos producidos a los diferentes tiempos de hidrólisis. De igual manera, fue el valor más alto en comparación con los

valores obtenidos mediante la inhibición del radical DPPH, en donde se registró un valor máximo de 64.25 % de inhibición para los péptidos obtenidos a las 8 h de hidrólisis con Alcalasa® (figura 3).

El comportamiento registrado pudo ser debido a que la Alcalasa® al presentar una amplia especificidad por la mayoría de los aminoácidos y mayor especificidad por aminoácidos alifáticos (Gly, Ala, Pro, Val, Leu, Ile) y sin carga (Ser, Thr, Cys, Asn, Gln), permite una mayor interacción del radical ABTS con los péptidos obtenidos a partir de la hidrólisis con esta enzima. Lo anterior, posiblemente por la formación de puentes de hidrogeno entre el radical con Gln y Ser e interacciones hidrofóbicas con Gly, mientras que el radical DPPH presenta una mayor interacción con aminoácidos como Leu, Glu, Lys y Ala. Estos resultados coinciden con el reporte de Nasri (2016), quien concluye que la actividad antioxidante de los péptidos puede mostrar resultados diferentes, dependiendo del radical libre empleado, la especificidad de las enzimas hidrolíticas, así como de las propiedades de los péptidos (longitud, hidrofobicidad y composición).

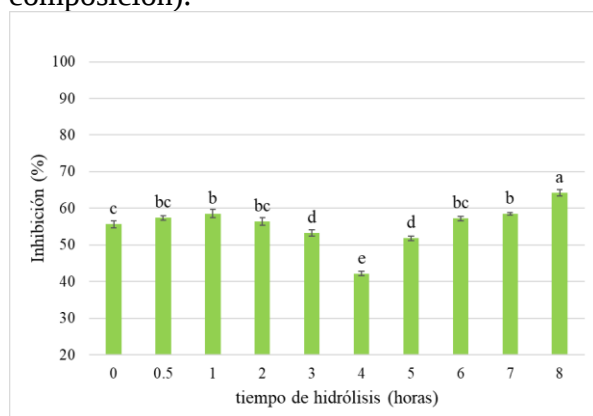


Figura 3. Inhibición del radical DPPH (hidrolizado con Alcalasa®). Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

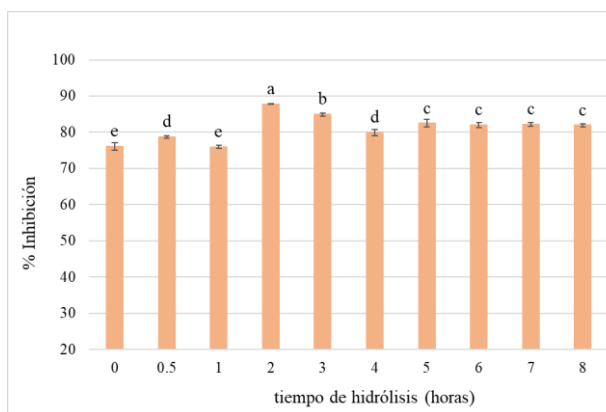


Figura 4. Inhibición del radical ABTS (hidrolizado con Alcalasa®). Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

Conclusiones

Se puede concluir que los péptidos obtenidos por la hidrólisis enzimática de proteínas de chapulín (*Sphenarium purpurascens*), presentan actividad antioxidante. Los resultados mostraron una importante capacidad de inhibición de los radicales libres, observándose una mayor inhibición del radical DPPH con los péptidos producidos a las 8 h de hidrólisis con Pepsina y la mayor inhibición del radical ABTS con los péptidos a las 2 h de hidrólisis con Alcalasa®. Por lo anterior, se concluye que los péptidos obtenidos a partir de proteína de chapulín son ingredientes con potenciales efectos benéficos a la salud del consumidor, teniendo la función de reducir el daño causado por la acción de los radicales libres, evitando el riesgo de desarrollo de diversas enfermedades crónico-degenerativas.

Literatura Citada

- AOAC. (2002). Official Methods of Analysis, Association of Official Analytical Chemists. Washington D.C., USA.
- Halloran, A., Roos, N., Eilenberg, J., Cerutti, A. & Bruun, S. (2016). Life cycle assessment of edible insects for food proteins: a review. *Agronomy for Sustainable Development*, 36 (4), 57. <https://doi.org/10.1007/s13593-016-0392-8>
- Halloran, A. & Vantomme, P. (2017). La contribución de los insectos a la seguridad alimentaria, los medios de vida y el medio ambiente. FAO. Roma, Italia.
- Jayanegara, A., Yantina, N., Novandri, B., Laconi, E. B., Nahrowi, N., & Ridla, M. (2017). Evaluation of some insects as potential feed ingredients for ruminants: Chemical composition, in vitro rumen fermentation and methane emissions. *Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture*, 42(4). 247-254. <https://doi.org/10.14710/jitaa.42.4.247-254>
- Liu, Y., Wan, S., Liu, J., Zou, Y. & Liao, S. (2016). Antioxidant Activity and Stability Study of Peptides from Enzymatically Hydrolyzed Male Silkworm, *Journal of Food Processing and Preservation*, 41 (1), 13081. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13081>
- Melo-Ruiz, V., Sandoval-Trujillo, H., Quirino-Barreda, T., Sánchez-Herrera, K., Díaz-García, R. & Calvo-Carrillo, C. (2015). Chemical composition and amino acids content of five species of edible Grasshoppers from Mexico. *Emirates Journal of Food and Agriculture*. 27(8). 654-658. <https://doi.org/0.9755/ejfa.2015.04.093>
- Nasri, M. (2016). Protein Hydrolysates and Biopeptides: Production, Biological Activities, and Applications in Foods and Health Benefits. *Advances in Food and Nutrition Research*. 2-51. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2016.10.003>
- Payne, C. L., Scarborough, P., Rayner, M., & Nonaka, K. (2016). A systematic review of nutrient composition data available for twelve commercially available edible insects, and comparison with reference values. *Trends in Food Science & Technology*, 47. 69-77. <http://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.10.012>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231-1237. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(98)00315-3)
- Rumpold, B. & schlüter, O. (2013). Nutritional composition and safety aspects of edible insects. *Molecular Nutrition & Food Research*, 57(5), 802-823. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201200735>
- Soares de Castro, R. J., & Harumi, S. H. (2014). Advantages of an acid protease from *Aspergillus oryzae* over commercial preparations for production of whey protein hydrolysates with antioxidant activities. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3, 58-65. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2013.11.012>
- Soares de Castro, R. J., Ohara, A., Gonçalves dos Santos, J. & Fontenele, M. A. (2018). Nutritional, functional and biological properties of insect proteins: Processes for obtaining, consumption and future challenges. *Trends in Food Science & Technology*, 76. 82-84. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2018.04.006>

- Sun-Waterhouse, D., Waterhouse, G., You, L., Zhang J., Liu, Y., Ma, L., Gao, J. & Dong, Y.** (2016). Transforming insect biomass into consumer wellness foods: A review. *Food Research International*, 89. 129-151. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.10.001>
- Van Huis, A., & Oonincx, D. G. A. B.** (2017). The environmental sustainability of insects as food and feed. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 37(5). <http://dx.doi.org/10.1007/s13593-017-0452-8>
- Villaseñor, V. M., Enriquez-Vara, J. N., Urías-Silva, J. E. & Mojica, L.** (2021). Edible Insects: Techno-functional Properties Food and Feed Applications and Biological Potential. *Food Reviews International*. 1-27. <https://doi.org/10.1080/87559129.2021.1890116>
- Wen, C., Zhang, J., Zhang, H., Duan, Y. & Ma, H.** (2021). Study on the structure–activity relationship of watermelon seed antioxidant peptides by using molecular simulations. *Food Chemistry*. 364. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130432>
- Wang, W. Y. & De Mejia, E. G.** (2005). A New Frontier in Soy Bioactive Peptides that May Prevent Age-related Chronic Diseases Comprehensive Reviews in *Food Science and Food Safety*, 4, 63–78. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2005.tb00075.x>

Actividad biológica en hidrolizados de proteína de hormiga chicatana (*Atta mexicana*)

Daniela Soto-Felix¹, Eleazar Aguirre-Mandujano¹, Consuelo Silvia Olivia Lobato-Calleros¹, Blanca Elizabeth Hernández-Rodríguez¹

Resumen

Los insectos son ricas fuentes de nutrientes, destacándose por su contenido proteico significativo que va del 20 al 75 %; por lo que se considera como una fuente alternativa de proteínas que puede ayudar a mejorar tanto la nutrición como la seguridad alimentaria.

En este estudio se determinó el potencial biológico de los péptidos producidos durante la digestión gastrointestinal (DGI) *in vitro* de proteínas de hormiga chicatana (*Atta mexicana*) presentes en la harina desgrasada. El potencial antioxidante de los hidrolizados se determinó como actividad de inhibición de radicales libres (ABTS y DPPH), mientras que la actividad antidiabética y antihipertensiva, se expresó como la actividad inhibitoria sobre α -amilasa y enzima convertidora de angiotensina – I (ECA-I), respectivamente.

La mayor actividad antirradical sobre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), se observó en la fracción completa antes de la hidrólisis ($93,51 \pm 1,15$ %) y sobre ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) en las fracciones completas antes y después de la hidrólisis ($99,85 \pm 0,00$ y $98,94 \pm 0,15$ %, respectivamente). La actividad antidiabética mostró un incremento en el porcentaje de inhibición de la fracción total ($77,12 \pm 3,29$ %) después del proceso de DGI ($92,86 \pm 4,22$ %). Con respecto a la inhibición de ECA-I no se observaron cambios significativos en los tratamientos, sin embargo, en todos los casos se presentaron porcentajes altos de inhibición (72 - 96 %). Por lo anterior, cabe señalar que el consumo de insectos con alto contenido de proteína puede ser potencialmente beneficioso para el organismo humano, ya que pueden prevenir enfermedades asociadas al estrés oxidativo, diabetes e hipertensión.

Palabras Clave: Hormiga chicatana, actividad biológica, antioxidante, antidiabética, antihipertensiva.

Abstract

Insects are rich sources of nutrients, standing out for their significant protein content ranging from 20 to 75 %; therefore, they are considered as an alternative source of protein that can help improve both nutrition and food security.

In this study, the biological potential of peptides produced during *in vitro* gastrointestinal digestion (GID) of chicatana ant (*Atta mexicana*) proteins present in defatted flour was determined. The antioxidant potential of the hydrolysates was determined as free radical inhibition activity (ABTS and DPPH), while the antidiabetic and antihypertensive activity was

¹ Universidad Autónoma Chapingo, Km. 38.5, Carretera México-Texcoco, 56230, Texcoco, México.

Correo: dani_dann@outlook.com; eleagman@yahoo.com; consuelobato@yahoo.com; blancaeli_hr@yahoo.com.mx

expressed as inhibitory activity on α -amylase and angiotensin - I converting enzyme (ACE-I), respectively.

The highest antiradical activity on DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), was observed in the complete fraction before hydrolysis (93.51 ± 1.15 %) and on ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) in the complete fractions before and after hydrolysis (99.85 ± 0.00 and 98.94 ± 0.15 %, respectively). The antidiabetic activity showed an increase in the percentage inhibition of the total fraction (77.12 ± 3.29 %) after the DGI process (92.86 ± 4.22 %). With respect to ACE-I inhibition, no significant changes were observed in the treatments; however, in all cases high percentages of inhibition were presented (72 - 96 %). Therefore, it should be noted that the consumption of insects with high protein content can be potentially beneficial for the human organism, since they can prevent diseases associated with oxidative stress, diabetes and hypertension.

Keywords: Chicatana ant, biological activity, antioxidant, antidiabetic, antihypertensive.

Introducción

Los insectos comestibles son un recurso natural renovable que ha sido aprovechado desde la antigüedad con fines alimenticios y medicinales. El interés por el consumo de insectos se ha incrementado en los últimos años debido a su reconocido valor nutricional (alto contenido en

micro y macronutrientes), potenciales beneficios para la salud (presencia de sustancias bioactivas) y bajo impacto ambiental (uso de menos recursos y reducidos niveles de contaminación) (Castro-López et ál., 2020).

Desde el punto de vista nutricional, los insectos en todas las etapas de la vida son ricas fuentes de proteína, grasa y muchos otros nutrientes importantes (Bovera et al., 2016), presentan un contenido proteico significativo que va del 20 al 75 %. En el caso de la hormiga chicatana (*Atta mexicana*), contiene 42.59 % de proteína en base seca (Amarender et ál., 2020; Ramos-Elorduy, 1997), por lo que se considera como una fuente alternativa de proteínas que puede ayudar a mejorar tanto la nutrición como la seguridad alimentaria.

Se ha reportado que la digestibilidad de las proteínas de insectos oscila entre el 76 y el 96 %; estos valores son solo un poco más pequeños que los valores reportados para la proteína de huevo (95 %) o la carne de vacuno (98 %) e incluso más altos que en el caso de muchas proteínas vegetales (13 a 60 %) (Rumpold y Schlüter, 2013; Kouřimská y Adámková, 2016; Pojić et al., 2018). Aunque existen estudios sobre la composición nutricional, el perfil de aminoácidos y las propiedades funcionales de muchos insectos (van Huis, 2013; Yi et al., 2013), aún hay especies con propiedades novedosas por descubrir, y la exploración de más especies de insectos puede ayudar encontrar candidatos para desarrollar alimentos nutritivos y funcionales

Además, el consumo de insectos también puede enriquecer la dieta humana en componentes bioactivos, por ejemplo, péptidos biológicamente activos (Zielínska et al., 2017). Los péptidos bioactivos liberados durante la digestión gastrointestinal, o por hidrólisis previa de proteínas *in vitro*, son compuestos con actividad biológica beneficiosa, por ejemplo, actividad antihipertensiva, antioxidante, antiinflamatoria o hipocolesterolémica (Gobbetti et al., 2002; Saiga, Tanabe y Nishimura, 2003; Zhang, et al., 2012; Kara's et al., 2017).

Con base en lo anterior, en el presente trabajo se determinaron diferentes actividades biológicas en los péptidos obtenidos por un proceso de hidrólisis enzimática secuencial (digestión gastrointestinal) de las proteínas hormiga chicatana (*Atta mexicana*).

Materiales y métodos

Materiales

La hormiga chicatana se colectó en Bochil, Chiapas; con una preparación previa en la que se deshidrataron después de remover la cabeza y las alas del insecto.

Preparación de la harina de hormiga chicatana

Las hormigas se deshidrataron empleando una estufa (RIOSSA, modelo HCF-S2-D) a 45 °C hasta peso constante. Después, se pulverizaron empleando un equipo Ultra-Bullet® durante 3 min. Se utilizó el equipo Soxhlet empleando éter de petróleo como disolvente para la extracción. La harina de hormiga chicatana (HHC) se introdujo en cartuchos de papel filtro durante 6 h a partir del primer sifón. Posteriormente, se dejó evaporar el disolvente en una campana de extracción por 3 h. Finalmente, se pulverizó nuevamente empleando un equipo Ultra-Bullet® durante 3 min y se almacenó en refrigeración hasta su análisis.

Hidrólisis enzimática secuencial

La hidrólisis enzimática se realizó según la metodología descrita por Montiel-Aguilar, et al. (2020). Para simular el proceso gastrointestinal, se realizó una digestión secuencial con pepsina y pancreatina (tripsina-quimotripsina) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.). Se preparó

una suspensión de harina de hormiga desgrasada (HHD) al 5 % (p/v) en agua destilada, se mantuvo en agitación constante a temperatura ambiente (21 ± 2 °C) por una hora y después se ajustó el pH a 2.0 con HCl 1 M. Se llevó a una temperatura de 37 °C y se mantuvo constante durante todo el proceso de digestión. En primer lugar, se adicionó pepsina 4 % (m/v) y la reacción se desarrolló durante 2 h. Posteriormente, se ajustó el pH inicialmente a 5.3 adicionando bicarbonato de sodio 0.9 M y después a pH 7.5 con NaOH 1M, se adicionó la enzima pancreatina 10 % (m/v) y se agitó durante 2 h. Se tomaron alícuotas antes de la hidrólisis (AH) y al finalizar hidrólisis (DH). Las alícuotas se llevaron a ebullición por 15 min para detener la reacción y finalmente se centrifugaron (Centrifuge 5810 R, Eppendorf, AG, Hamburgo, Alemania) a 8000 rpm por 15 minutos a 4 °C. Los sobrenadantes muestras se almacenaron a -20 °C hasta su análisis.

Actividad antioxidante

Actividad inhibitoria de radicales DPPH

Se determinó la actividad antioxidante, empleando el radical libre DPPH (2,2 difenil-1-picrilhidrazil), de acuerdo con la metodología descrita por (Cheison, Wang, & Xu, 2007) con ligeras modificaciones. Los ensayos se realizaron mezclando 1.5 mL de una disolución de DPPH 0.08 mM en metanol al 80 % (v/v) y 0.5 mL de las muestras (AH, DH y las respectivas fracciones peptídicas) a $0.9 \text{ mg}_{\text{proteína}} \text{ mL}^{-1}$. Se agitó y dejó reposar a temperatura ambiente durante 60 min protegido de la luz. La absorbancia se midió en un espectrofotómetro Genesys 10S-UV-VIS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) a 515 nm. Se preparó un blanco con 1.5 mL de metanol al 80 % y 0.5 mL de agua destilada. También se preparó un control adicionando 1.5 mL de una disolución de DPPH 0.08 mM en metanol al 80 % (v/v) y 0.5 mL de agua destilada. El porcentaje de inhibición del radical se calculó mediante la ecuación:

$$\% \text{ inhibición DPPH} = \left[\frac{Abs_{\text{control}} - Abs_{\text{muestra}}}{Abs_{\text{control}}} \right] * 100 \dots\dots\dots (1)$$

Donde Abs_{control} es la absorbancia del control y Abs_{muestra} es la absorbancia del ensayo.

Actividad inhibitoria de radicales ABTS

La determinación de actividad antioxidante empleando el radical libre ABTS (2,2 'azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)) se determinó de acuerdo con la metodología descrita por (Re, et al., 1999) con algunas modificaciones. Se mezclaron 5 mL de ABTS 7 mM con 88 µL de persulfato de potasio 140 mM. La mezcla se mantuvo en la oscuridad por 16 h antes de su uso. Al final de este periodo, la disolución se diluyó con etanol, hasta obtener una absorbancia de 0.700 ± 0.002 a 734 nm en un espectrofotómetro Genesys 10S UV-VIS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). Para los ensayos, se mezclaron 960 µL de la disolución del radical ABTS con 40 µL de las muestras (AH, DH y las respectivas fracciones peptídicas) a $0.9 \text{ mg}_{\text{proteína}} \text{ mL}^{-1}$, se dejó reaccionar durante 6 min y se midió la absorbancia a 734 nm en un espectrofotómetro Genesys 10S-UV-VIS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Se preparó un blanco con 960 µL de etanol con 40 µL de agua destilada. También se preparó un control adicionando 960 µL de la disolución del radical ABTS con 40 µL de agua destilada. El porcentaje de inhibición del radical se calculó mediante la ecuación:

$$\% \text{ inhibición ABTS} = \left[\frac{Abs_{control} - Abs_{muestra}}{Abs_{control}} \right] * 100 \dots\dots\dots (2)$$

Donde $Abs_{control}$ es la absorbancia del control y $Abs_{muestra}$ es la absorbancia del ensayo.

Compuestos fenólicos totales

Se determinó la concentración de compuestos fenólicos totales (CFT) de las muestras (HHAH, HHDH y las respectivas fracciones peptídicas) a 0.9 mg de proteína mL⁻¹ siguiendo el método descrito por (Singleton & Rossi, 1965) modificado por (Gómez-Maldonado, et al., 2020). Se colocaron 250 µL de las muestras (AH, DH y las respectivas fracciones peptídicas) a 0.9 mg de proteína mL⁻¹ en un tubo conteniendo 200 µL de Folin-Ciocalteu y 1250 µL de agua destilada. Tras la agitación de la mezcla, se dejó reposar 3 min. Posteriormente, se adicionaron 300 µL de carbonato de sodio (15 % p/v), se dejó incubar a temperatura ambiente por 30 min y se leyó la absorbancia a 760 nm con el espectrofotómetro Genesys 10S UV–VIS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA.). Adicionalmente, se preparó una curva estándar de ácido gálico (0 – 60 mg L⁻¹). El contenido de compuestos fenólicos totales se expresó como mg equivalentes de ácido gálico (EAG) g⁻¹ de muestra seca.

Actividad antidiabética

Actividad inhibitoria de la enzima α-amilasa

La inhibición de la enzima α-amilasa se realizó según la metodología propuesta por Montiel-Aguilar, et al. (2020) con algunas modificaciones. La reacción se preparó con 100 µL de α-amilasa de origen pancreático porcino (1 U/mL) y se incubó con 100 µL de muestra (AH, DH y las respectivas fracciones peptídicas) a 0.9 mg de proteína mL⁻¹ durante 45 min a 37 °C. Posteriormente, se adicionaron 800 µL de almidón soluble de maíz al 1 % en disolución amortiguadora de fosfato de sodio 20 mM con cloruro de sodio 6.7 mM, pH 6.9 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.). Se dejó reposar a 37°C por 5 min. Después se agregó 1 mL de ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) 96 mM en disolución amortiguadora de tartrato de sodio y potasio 5.3 M en NaOH 2 M (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) y se llevó a ebullición por 5 min. Luego se dejó a temperatura ambiente (21 ± 2 °C), se tomaron 100 µL de la reacción final y se diluyó en 1 mL de disolución amortiguadora de fosfato de sodio 20 mM con cloruro de sodio 6.7 mM, pH 6.9. La absorbancia se midió a 540 nm en un espectrofotómetro Genesys 10S-UV-VIS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). El blanco se preparó usando 1 mL de disolución amortiguadora de fosfato de sodio 20 mM con cloruro de sodio 6.7 mM, pH 6.9 y 1 mL de de ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) 96 mM en disolución amortiguadora de tartrato de sodio y potasio 5.3 M en NaOH 2 M. Así también se preparó un control sustituyendo 100 µL de muestra por 100 µL de disolución amortiguadora de fosfato de sodio 20 mM con cloruro de sodio 6.7 mM, pH 6.9. El porcentaje de inhibición se estableció por diferencia de absorbancia según la ecuación:

$$\% \text{ inhibición } \alpha - \text{amilasa} = \left[\frac{Abs_{control} - Abs_{muestra}}{Abs_{control}} \right] * 100 \dots\dots\dots (3)$$

Donde $Abs_{control}$ es la absorbancia del control y $Abs_{muestra}$ es la absorbancia del ensayo.

Actividad antihipertensiva

Actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina (ECA-I)
 Para el ensayo de la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina se adicionarán 100 μL de muestra (AH, DH y las respectivas fracciones peptídicas) a 0.9 $\text{mg}_{\text{proteína}} \text{mL}^{-1}$ con 100 μL de ECA-I (2 mU) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) y se incubaron durante 20 min a 37 °C, posteriormente se agregaron 200 μL de N-Hippuryl-His-Leu (HHL) 5 mM en amortiguador de borato pH 8.3 0.1 M (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) y se incubó a 37 °C durante 45 min. Después de la reacción se agregó un volumen de 300 μL de HCl 1N y 1 mL de acetato de etilo, se agitó 30 s en vórtex y se llevó a centrifugar a 6000 rpm durante a 10 min a 15 °C. Una vez separadas las fases, se tomaron 750 μL de la fase superior, que contiene la mezcla de acetato de etilo con ácido hipúrico, y se depositaron en un tubo de vidrio, éste se llevó a ebullición a baño maría hasta evaporar la fase líquida de la mezcla, después se rehidrató el sedimento con 1.2 mL de agua destilada y agitó por 20 s en vórtex. Finalmente, se midió la absorbancia a 284 nm en el espectrofotómetro (Genesys 10S-UV-VIS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)). El blanco se preparó usando 300 μL de amortiguador de borato pH 8.3 0.1 M, 300 mL de HCl 1 N y 1 mL de acetato de etilo. Para el control, se sustituyó 100 μL de muestra por 100 μL de amortiguador de borato pH 8.3 0.1 M, 300 mL de HCl 1 N. El porcentaje de inhibición se obtuvo por la ecuación:

$$\% \text{ inhibición ECA} - I = \left[\frac{Abs_{\text{control}} - Abs_{\text{muestra}}}{Abs_{\text{control}}} \right] * 100 \dots\dots\dots (4)$$

Donde Abs_{control} es la absorbancia del control y Abs_{muestra} es la absorbancia del ensayo.

Resultados y discusión

Actividad antioxidante

El ensayo de la actividad antioxidante mostró un valor de inhibición del radical DPPH de $93.51 \pm 1.51 \%$ en la muestra total (AH) siendo la fracción $F_{\text{AH}} 3-10 \text{ kDa}$ la de mayor valor ($91.03 \pm 0.38 \%$) mientras que para la muestra DH se obtuvo un valor de $82.76 \pm 0.22 \%$ y el valor mayor en la fracción $F_{\text{DH}} >10 \text{ kDa}$ (79.26 ± 0.29). Kumah et al. (2019) reportaron porcentajes menores de inhibición del radical DPPH en hidrolizados de proteína de harina sonicada de larvas de *Hermetia illucens*, con valores entre 26.78 y 48.42 %.

Los valores de inhibición del radical ABTS no mostraron diferencias significativas en las muestras totales AH y DH (99.85 ± 0.00 y $98.94 \pm 0.15 \%$, respectivamente) siendo las fracciones $F_{\text{AH}} < 3$, $F_{\text{DH}} >10$, $F_{\text{AH}} 3-10$ y $F_{\text{DH}} <3 \text{ kDa}$ las que reportaron los valores más altos con 94.63 ± 0.18 , 94.22 ± 1.52 , 91.38 ± 0.72 y $90.16 \pm 1.01 \%$, respectivamente. Los porcentajes de inhibición de ABTS obtenidos fueron mayores a los reportados por Montiel-Aguilar et al. (2020) para hidrolizado de aislado de proteína de *Pterophylla beltrani* tanto en el hidrolizado total (53.65%) como en sus fracciones peptídicas $F >10$, $F 3-10$ y $F <3 \text{ kDa}$ con porcentajes de 60.79, 59.53 y 60.73 %, respectivamente.

En diversos estudios se reporta la hidrólisis como una variable que incrementa la actividad antioxidante con respecto a las muestras no hidrolizadas, los resultados en esta investigación muestra un comportamiento opuesto, donde la actividad antioxidante evaluada con la inhibición del radical libre DPPH fue mayor en la muestra antes de la hidrólisis (AH) con respecto a la muestra después de la hidrólisis (DH), mientras que para la inhibición del radical ABTS las

muestras (AH y DH) no presentaron una diferencia significativa. Este comportamiento podría atribuirse a la sensibilidad de los compuestos fenólicos a la temperatura que se representa como una disminución en el contenido de estos compuestos después del proceso DGI (cuadro 2), sin embargo, la variación del porcentaje de inhibición posterior a la hidrólisis no fue tan amplia como la disminución de los compuestos fenólicos, por lo que se puede considerar que la hidrólisis generó péptidos de menor tamaño molecular con una función antioxidante mejorada, compensando así la pérdida de los CFT.

Cuadro 1. Actividad antioxidante por inhibición de los radicales DPPH y ABTS de muestras de harina de hormiga chibatana antes y después de la digestión gastrointestinal.

Tratamientos ¹	Actividad antioxidante (% Inhibición)	
	DPPH	ABTS
AH	93.51 ± 1.15 ^{a2}	99.85 ± 0.00 ^a
F _{AH} <3	85.11 ± 0.19 ^c	94.63 ± 0.18 ^b
F _{AH} 3-10	91.03 ± 0.38 ^b	91.38 ± 0.72 ^{bc}
F _{AH} >10	87.34 ± 0.67 ^c	71.00 ± 1.76 ^e
DH	82.76 ± 0.22 ^d	98.94 ± 0.15 ^a
F _{DH} <3	72.33 ± 1.34 ^f	90.16 ± 1.01 ^c
F _{DH} 3-10	62.98 ± 1.25 ^g	77.85 ± 1.31 ^d
F _{DH} >10	79.26 ± 0.29 ^e	94.22 ± 1.52 ^b

¹AH: Muestra total antes de la hidrólisis; DH: Muestra total después de la hidrólisis; F_{XH} <3: Fracción permeada de la membrana de 3 kDa; F_{XH} 3-10: Fracción retenida en la membrana de 3 kDa y posteriormente permeada en la membrana de 10 kDa; F_{XH} >10: Fracción retenida en la membrana de 10 kDa

²Medias con letras distintas fueron significativamente distintas (p < 0.05)

Compuestos fenólicos totales

Los valores para la muestra AH y sus fracciones fueron mayores a los obtenidos con las muestras DH, a excepción de la fracción FAH>10 kDa que no presentó diferencias significativas con respecto a DH y FDH <3 kDa. Las fracciones AH con mayor contenido de compuestos fenólicos totales fueron FAH 3-10 y FAH<3 kDa con 152.87 y 148.333 mg eq. ác. gálico mL⁻¹ respectivamente, lo que indica que el insecto contenía un alto valor de compuestos fenólicos totales probablemente debido a su alimentación a base de plantas. Lo anterior fue reportado por Di Mattia et al. (2019) mostrando contenidos de polifenoles totales mayores a 100 mg eq. ác. gálico/100 g en extractos hidrosolubles de 11 especies distintas de insectos con hábitos herbívoros.

El contenido de CFT disminuyó notablemente después del proceso de hidrólisis, esto debido a la sensibilidad térmica que presentan estos compuestos como lo indica Gallegos-Infante et al (2013) en muestras de pinole con tratamientos a temperaturas altas, los cuales presentaron un efecto negativo en el contenido de polifenoles totales; mientras que Xu, Ye, Chen, & Liu (2007) encontraron que el efecto de la temperatura sobre la estabilidad de los fenoles en general se reducen al combinar temperatura y tiempo, lo cual indica que existe una destrucción de algunos fenoles debido al tratamiento térmico principalmente.

Cuadro 2. Contenido de compuestos fenólicos totales en muestras de muestras de harina de hormiga chicatana antes y después de la digestión gastrointestinal.

Tratamientos ¹	Compuestos fenólicos totales (mg eq. Ac. Gálico mL ⁻¹)
AH	140.91 ± 2.25 ^{b2}
F _{AH} <3	148.33 ± 2.00 ^a
F _{AH} 3-10	152.87 ± 3.01 ^a
F _{AH} >10	33.35 ± 0.87 ^d
DH	30.40 ± 0.87 ^d
F _{DH} <3	31.09 ± 1.13 ^d
F _{DH} 3-10	20.43 ± 0.62 ^e
F _{DH} >10	49.99 ± 0.88 ^c

¹AH: Muestra total antes de la hidrólisis; DH: Muestra total después de la hidrólisis; F_{XH} <3: Fracción permeada de la membrana de 3 kDa; F_{XH} 3-10: Fracción retenida en la membrana de 3 kDa y posteriormente permeada en la membrana de 10 kDa; F_{XH} >10: Fracción retenida en la membrana de 10 kDa

²Medias con letras distintas fueron significativamente distintas (p < 0.05)

Actividad antidiabética

La actividad antidiabética evaluada por medio de la inhibición de la enzima α -amilasa fue mayor después del proceso de hidrólisis (DH) con un valor de 92.86 %, siendo FDH <3 kDa y FDH >10 kDa las fracciones peptídicas que presentaron mayor inhibición (92.74 y 92.86 %) sin diferencias significativas con las fracciones FAH <3 kDa y FAH 3 - 10 kDa, sin embargo, la fracción total previa a la hidrólisis (AH) mostró un porcentaje de inhibición menor de 77.12 %. Un comportamiento similar fue reportado por Montiel-Aguilar et al. (2020) donde las fracciones peptídicas <3 y > 10 kDa, de una muestra hidrolizada de *P. beltrani*, presentaron los porcentajes de inhibición más altos (54.3 y 41.4 %) aunque estos fueron menores al hidrolizado de la hormiga chicatana. Los resultados mostraron un incremento de 77.12 % a 92.86 % en el porcentaje de inhibición de α -amilasa con la hidrólisis enzimática de proteínas. Un comportamiento similar fue reportado por de Matos, de Lacerda, Zanetti, & de Castro (2022), reportando un valor 2.14 ± 1.02 % para proteína de grillo negro, valor que incremento hasta un 55.40 ± 2.93 % posterior a un proceso de hidrólisis multienzimático.

Ramadhan et al. (2017) encontraron péptidos con actividad inhibitoria de α -amilasa en hidrolizados proteicos de salamandra gigante china (*Andrias davidianus*) con tripsina. El péptido Leu-Gly-Gly-Gly-Asn se reconoció como la secuencia con mayor bioactividad, seguido del péptido Pro-Gly-Gly-Pro; los aminoácidos constituyentes de estos péptidos fueron encontrados en cantidades importantes en la hormiga chicatana.

Cuadro 3. Actividad antidiabética por inhibición de la enzima α -amilasa en muestras de muestras de harina de hormiga chicatana antes y después de la digestión gastrointestinal

Tratamientos ¹	Porcentaje de inhibición de α -amilasa
AH	77.12 ± 3.29 ^b
F _{AH} <3	92.10 ± 1.75 ^a
F _{AH} 3-10	92.22 ± 1.65 ^a
F _{AH} >10	53.14 ± 5.26 ^c
DH	92.86 ± 4.22 ^a
F _{DH} <3	92.74 ± 4.89 ^a

11° Congreso Internacional de Investigación en Ciencias Básicas y Agronómicas
Universidad Autónoma Chapingo, 22 y 23 de septiembre de 2022
Chapingo, México

$F_{DH} 3-10$	73.75 ± 3.63^b
$F_{DH} >10$	92.86 ± 2.28^a

¹AH: Muestra total antes de la hidrólisis; DH: Muestra total después de la hidrólisis; $F_{XH} <3$: Fracción permeada de la membrana de 3 kDa; $F_{XH} 3-10$: Fracción retenida en la membrana de 3 kDa y posteriormente permeada en la membrana de 10 kDa; $F_{XH} >10$: Fracción retenida en la membrana de 10 kDa

²Medias con letras distintas fueron significativamente distintas ($p < 0.05$)

Actividad antihipertensiva

No se presentaron diferencias significativas entre los distintos tratamientos, por lo que en esta actividad biológica la hidrólisis enzimática no fue un factor determinante. Sin embargo, se presentan valores de inhibición altos, entre 72 y 96 % antes y después de la hidrólisis enzimática, por lo que puede considerarse la harina de hormiga chicatana como una fuente rica en péptidos antihipertensivos. Dai y colaboradores (2013) reportaron un incremento en el porcentaje de inhibición de ECA-I de 2 a 80 %, después de la hidrólisis multienzimática de proteínas nativas de *Tenebrio molitor*. También reportaron que el tratamiento con mayor actividad antihipertensiva presentaba 64.8 % de aminoácidos hidrófobos (Val, Leu, Ile, Phe y Met), así como Arg y Lys por lo que se consideró eran los principales potenciadores de esta actividad.

Cuadro 4. Actividad antihipertensiva por inhibición de la enzima convertidora de angiotensina de muestras de harina de hormiga chicatana antes y después de la digestión gastrointestinal

Tratamientos ¹	Porcentaje de inhibición de ECA-I
AH	85.71 ± 8.57^{abc}
$F_{AH} <3$	76.19 ± 7.19^{bc}
$F_{AH} 3-10$	77.62 ± 8.73^{abc}
$F_{AH} >10$	72.38 ± 5.95^c
DH	91.90 ± 7.19^{ab}
$F_{DH} <3$	94.29 ± 5.71^{ab}
$F_{DH} 3-10$	86.67 ± 7.19^{abc}
$F_{DH} >10$	95.71 ± 2.86^a

¹AH: Muestra total antes de la hidrólisis; DH: Muestra total después de la hidrólisis; $F_{XH} <3$: Fracción permeada de la membrana de 3 kDa; $F_{XH} 3-10$: Fracción retenida en la membrana de 3 kDa y posteriormente permeada en la membrana de 10 kDa; $F_{XH} >10$: Fracción retenida en la membrana de 10 kDa

²Medias con letras distintas fueron significativamente distintas ($p < 0.05$)

Conclusiones

Los resultados obtenidos mostraron que la proteína de hormiga chicatana, se convierte en una fuente potencial de péptidos bioactivos después del proceso de digestión, tal como lo demuestran los resultados obtenidos en la actividad antioxidante, antidiabética y antihipertensiva. Se puede observar que, la ingesta de insectos comestibles con alto contenido de proteínas puede ser potencialmente beneficioso para el cuerpo humano al coadyuvar en la prevención de enfermedades asociadas al estrés oxidativo.

Literatura Citada

- Amarender, R. V.; Bhargava, K.; Dossey, A.T.; y Gamagedara, S.;** (2020). Lipid and protein extraction from edible insects – Crickets (Gryllidae). *LWT - Food Science and Technology* 125, 1-4. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109222>
- Bovera F., Loponte R., Marono S., Piccolo G., Parisi G., Iaconisi V., Gasco L., Nizza A.,** (2016). Use of *Tenebrio molitor* larvae meal as protein source in broiler diet: Effect on growth performance, nutrient digestibility, and carcass and meat traits. *J. Anim. Sci.* 94(2), 639–647. <http://doi.org/10.2527/jas2015-9201>
- Castro-López, C., Santiago-López, L., Vallejo-Cordoba, B., González-Cordova, A. F., Liceaga, A., García, H., & Hernández-Mendoza, A.** (2020). An insight to fermented edible insects: A global perspective and prospective. *Food Research International*(137),1-11. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109750>.
- Dai, C., Ma, H., Luo, L., & Yin, X.** (2013). Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide derived from *Tenebrio molitor* (L.) larva protein hydrolysate. *European Food Research and Technology.*, 236(4), 681-689. <http://doi.org/10.1007/s00217-013-1923-z>
- de Matos, F. M., de Lacerda, J., Zanetti, G., & de Castro, R.** (2022). Production of black cricket protein hydrolysates with α -amylase, α -glucosidase and angiotensin I-converting enzyme inhibitory activities using a mixture of proteases. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 39(102276), 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102276>
- Di Mattia, C., Battista, N., Sacchetti, G., & Serafini, M.** (2019). Antioxidant activities in vitro of water and liposoluble extracts obtained by different species of edible insects and invertebrates. *Frontiers in Nutrition*, 6(106), 1-7. <https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00106>
- Gallegos-Infante, J. A., Rocha-Guzman, N. E., Gonzales-Laredo, R. F., & Garcia-Casas, M. A.** (2013). Efecto del procesamiento térmico sobre la capacidad antioxidante de pinole a base de vainas de mezquite (*Prosopis laevigata*). *CyTA. Journal of Food*, 11(2), 162-170. <https://doi.org/10.1080/19476337.2012.712057>
- Gobbetti, M.; Stepaniak, L.; De Angelis, M.; Corsetti, A.; Di Cagno, R.** (2002). Latent bioactive peptides in milk proteins: Proteolytic activation and significance in dairy processing. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 42, 223–239. <https://doi.org/10.1080/10408690290825538>
- Kara's, M.; Jakubczyk, A.; Szymanowska, U.; Zlotek, U.; Zielinska, E.** (2017). Digestion and bioavailability of bioactive phytochemicals. *Int. J. Food Sci. Technol.* 52, 291–305. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13323>
- Karas, M., Baraniak, B., Rybcznska, K., Gminski, J., Gawel-Beben, K. y Jakubczyk, A.** (2015). The influence of heat treatment of chickpea seeds on antioxidant and fibroblast growth-stimulating activity of peptide fractions obtained from proteins digested under simulated gastrointestinal conditions. *International Journal of Food Science & technology.* 50(9), 2097–2103. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12872>
- Kouřimská, L., Adámková, A.,** (2016). Nutritional and sensory quality of edible insects. *NFS J.* 4, 22–26. <https://doi.org/10.1016/j.nfs.2016.07.001>
- Kumah Mintah, B., He, R., Dabbour, M., Kwaku Golly, M., Akomeah Agyekum, A., & Ma, H.** (2019). Effect of sonication pretreatment parameters and their optimization on the antioxidant activity of *Hermitia illucens* arvae meal protein hydrolysates. *Jorunal of Food Processing and Preservation*, e14093, 1-12. <https://doi.org/10.1111/jfpp.14093>
- Montiel-Aguilar, L.J., Torres-Castillo, J.A., Rodríguez-Servin, R., López-Flores, A.B., Aguirre-Arzola, V.E., Méndez-Zamora, G., Sinagawa-García, S.R.;** (2020). Nutraceutical

effects of bioactive peptides obtained from *Pterophylla beltrani* (Bolivar & Bolivar) protein isolates, *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 23.(3) 1-17.
<https://doi.org/10.1016/j.aspen.2020.06.006>

Pojić, M., Mišan, A., Tiwari, B., 2018. Eco-innovative technologies for extraction of proteins for human consumption from renewable protein sources of plant origin. *Trends Food Sci. Technol.* 75, 93–104. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.03.010>

Ramadhan, A., Nawas, T., Zhang, X., Pembe, W., Xia, W., & Xu, Y. (2017). Purification and identification of a novel antidiabetic peptide from Chinese giant salamander (*Andrias davidianus*) protein hydrolysate against α -amylase and α -glucosidase. *International Journal of Food Properties*, 20(3), 3360-3372. <https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1354885>

Ramos-Elorduy, J.; (1997). Insects: a sustainable source of food. *Ecology of Food and Nutrition*, 36: 247-276. <https://doi.org/10.1080/03670244.1997.9991519>

Rumpold, B.A. and Schlüter, O.K., (2013). Potential and challenges of insects as an innovative source for food and feed production. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 17: 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2012.11.005>

Saiga, A.; Tanabe, S.; Nishimura, T. (2003). Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment. *J. Agric. Food Chem.* 51, 3661–3667. <https://doi.org/10.1021/jf021156g>

Van Huis, A., 2013. Potential of Insects as Food and Feed in Assuring Food Security. *Annu. Rev. Entomol.* 58, 563–583. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153704>

Xu, G., Ye, X., Chen, J., & Liu, D. (2007). Effect of heat treatment on the phenolic compounds and antioxidant capacity of citrus peel extract. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*., 55(1), 330-335. <https://doi.org/10.1021/jf062517l>

Yi, L., Lakemond, C.M.M., Sagis, L.M.C., Eisner-Schadler, V., van Huis, A., van Boekel, M.A.J.S., (2013). Extraction and characterisation of protein fractions from five insect species. *Food Chem.* 141, 3341–3348. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.115>

Zhang, M.; Mu, T.H.; Wang, Y.B.; Sun, M.J. (2012). Evaluation of free radical-scavenging activities of sweet potato protein and its hydrolysates as affected by single and combination of enzyme systems. *Int. J. Food Sci. Technol.* 47, 696–702. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02895.x>

Zielinska, E.; Kara's, M.; Jakubczyk, A. (2017). Antioxidant activity of predigested protein obtained from a range of farmed edible insects. *Int. J. Food Sci. Technol.* 52, 306–312. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13282>

Análisis Docking y Virtual Screening de los cinco compuestos más activos de las bibliotecas virtuales de indazoles y dihidro-indazoles (3,3-disustituidos) en la proteína ALK

Luis Germán López-Valdez¹ y Holber Zuleta-Prada¹

Resumen

En este proyecto, se realiza el análisis acoplamiento molecular automatizado (Docking) y cribado virtual (Virtual Screening), de los 5 compuesto más activos de las bibliotecas virtuales de indazoles y dihidro-indazoles (3,3-disustituidos) con el propósito de identificar relaciones existentes entre la estructura de los compuestos (indazoles y dihidro-indazoles) y la proteína Kinasa del Linfoma Anaplásico (ALK) encargada de regular un proceso metabólico asociado al desarrollo de diferentes tipos de tumores, para hallar aquellas moléculas que más inhiben este proceso. Las cuales cuáles valdrían la pena probar su actividad experimentalmente. También se identifica los posibles sitios de modificación de los compuestos con el fin de proponer nuevos núcleos estructurales más potentes.

Palabras Clave: Cribado virtual, acoplamiento molecular automatizado, DIFAC, optimización de compuesto bioactivos, diseño de nuevos compuestos bioactivos insilico.

Abstract

In this work Docking and Virtual Screening were realized in the 5 most active compound from the virtual library of indazoles and dihydro-indazoles (3,3-substituted) with the purpose of identifying existents relations between the active compounds and the protein Anaplastic Lymphoma Kinas (ALK) responsible for appearing several types of tumors, to find those molecules that more inhibit the process. And which of these molecules would be worth testing their activity experimentally. Also we identified the possible modifying sites of the molecules to propose new ones, more potent inhibiting the ALK process.

Keywords: Virtual Screening, Docking, CADD, bioactive compounds optimization, insilico design of new bioactive compounds.

¹Departamento de Preparatoria Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo. Km. 38.5 carretera México-Texcoco, Chapingo Edo. de México. CP 56230. Tel +595-21500 ext 1619. Fax +595 -9521617 Correo: lgermanlv@taurus.chapingo.mx, lgermanlv@gmail.com, honzuleta_13@hotmail.com

Introducción

Los enfoques computacionales que anclan (Dock) pequeñas moléculas en las estructuras de los objetivos macromoleculares (proteínas o dianas biológicas) y puntúan (Score) su potencial complementariedad con los sitios de unión se utiliza ampliamente en la identificación de compuestos líderes con actividad biológica que pueden optimizarse. De hecho, ahora hay una serie de medicamentos cuyo desarrollo estuvo fuertemente influenciado por o se basó en el diseño basado en la estructura y las estrategias de detección, como los inhibidores de la proteasa del VIH. (Kitchen *et al.*, 2004).

Así, el número de proteínas con una estructura tridimensional conocida está aumentando rápidamente, y las estructuras producidas por iniciativas de genómica estructural ya están disponibles públicamente (Berman, *et. al.* 2000; Westbrook *et. al.* 2003). El aumento en el número de objetivos estructurales se debe en parte a las mejoras en las técnicas para la determinación de la estructura, como la cristalografía de rayos X de alto rendimiento (Blundell *et. al.* 2002). Con proyectos de determinación de estructuras a gran escala impulsados por consorcios de genómica, se han seleccionado muchas proteínas diana actuales por su potencial terapéutico.

Las metodologías computacionales se han convertido en un componente crucial de muchos programas de descubrimiento de fármacos, desde la identificación de aciertos hasta la optimización de pistas y más allá (Bajorath, 2002; Walters, 1998; Langer y Hoffmann, 2001), y enfoques como el ligando (Bajorath, 2002) o las técnicas de cribado virtual basadas en estructuras (Gohlke y Klebe, 2002) se utilizan ampliamente en muchos esfuerzos de descubrimiento. Una metodología clave, el acoplamiento de moléculas pequeñas a los sitios de unión de proteínas, fue pionera a principios de la década de 1980 (Kuntz, *et. al.* 1982) y sigue siendo un área de investigación muy activa (Gohlke y Klebe, 2002). Cuando solo está disponible la estructura de un objetivo y su sitio activo o vinculante, el acoplamiento de alto rendimiento se utiliza principalmente como una herramienta de identificación de aciertos. Sin embargo, cálculos similares a menudo también se usan más adelante durante la optimización principal, cuando las modificaciones a las estructuras activas conocidas se pueden probar rápidamente en modelos de computadora antes del compuesto.

Metodología

Muchas estructuras de proteína (dianas biológicas) se pueden hallar en línea y muchas de ellas son de libre acceso. En la tabla 1 se muestran 4 bases de datos.

Tabla 1. Bases de datos de macromoléculas disponibles en línea.

Base de datos	Descripción	URL
	Archivo de estructuras tridimensionales de proteínas y aminoácidos resueltas experimentalmente.	https://www.rcsb.org/
	Catálogo de información y almacenamiento de secuencias confirmadas.	https://www.uniprot.org/
	Recurso para la identificación e interpretación de la información de la secuencia de las proteínas.	https://proteininformationresource.org/
	Registro de todas las secuencias de aminoácidos y proteínas.	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/

Descripción de la metodología

Preparación de la diana biológica

Procedimiento (utilizando MOE)

1. Se obtuvo la estructura de la proteína en formato PDB.

Se ingresó a la página de Protein Data Bank (ver URL en la Tabla 1) y en el buscador escriba el nombre de la proteína (En su defecto escriba el código PDB).

En nuestro caso fue: **ALK**, código (**3AOX**).

2. Se abrió la estructura de la proteína en MOE. Se preparó, seleccionando el sitio de unión.

3. Se validó el protocolo de docking. Y se guardó el archivo generado en formato.moe

Preparación del ligando

Procedimiento

Se abrió el archivo.csv con los SMILES de los 5 indazoles y 5 dihidro-imdazoles más activos calculados con el método de Machine Learning predictivo, desarrollado en este mismo proyecto.

Se minimizó la energética de cada molécula.

Se escogió la columna correspondiente a las estructuras minimizadas.

Acoplamiento molecular para indazoles

Procedimiento

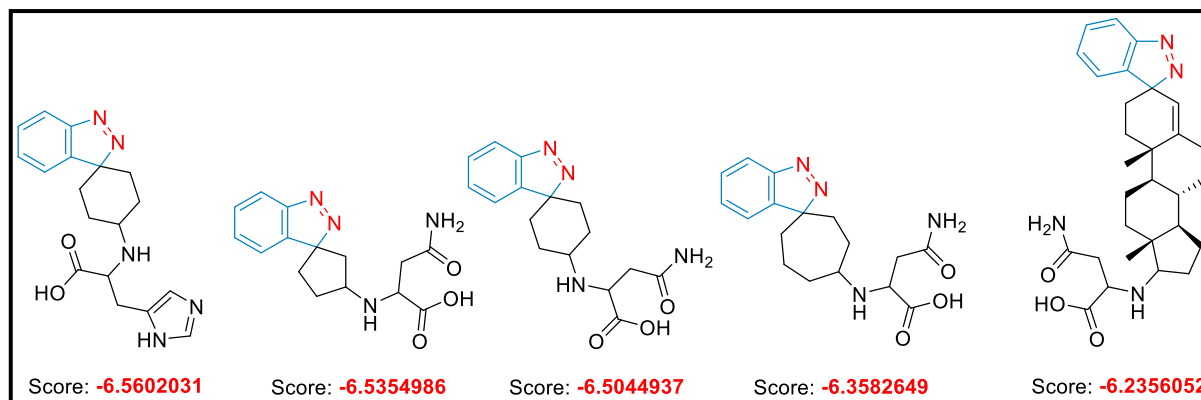
Se abrió el archivo generado en la preparación de la diana biológica y de las estructuras minimizadas de los indazoles.

Se realizó el acoplamiento molecular automatizado.

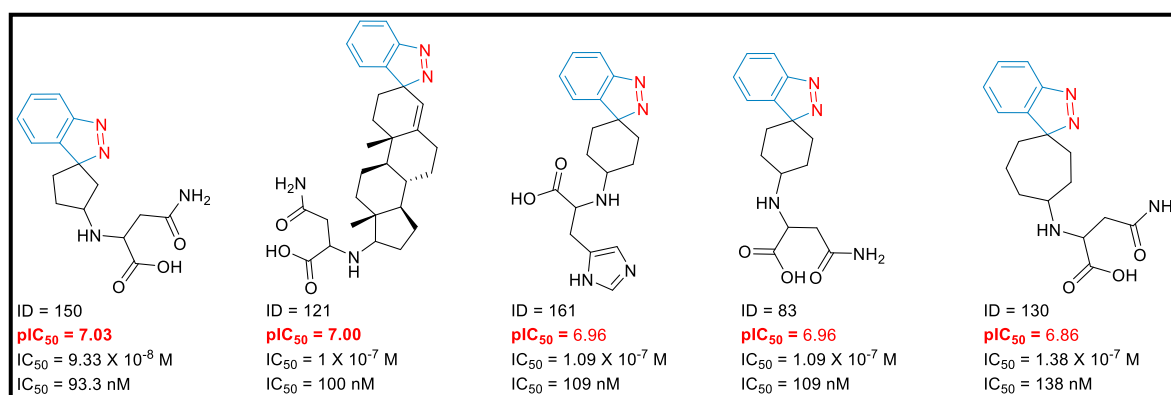
Interpretación de resultados

11° Congreso Internacional de Investigación en Ciencias Básicas y Agronómicas
Universidad Autónoma Chapingo, 22 y 23 de septiembre de 2022
Chapingo, México

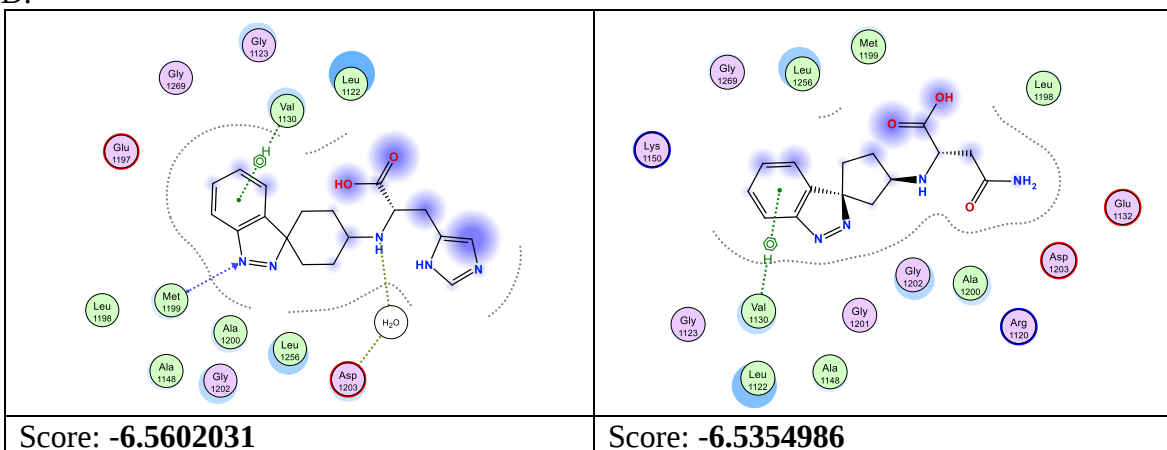
Esquema 1: Cribado virtual (Virtual Screening) y score obtenido del acoplamiento molecular de los 5 indazoles más activos.



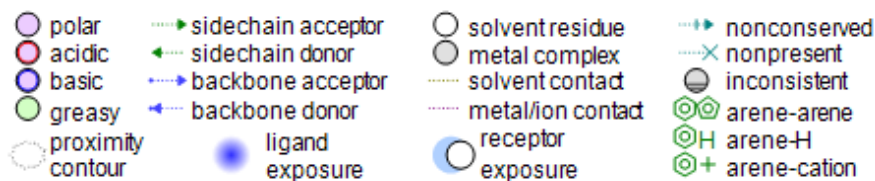
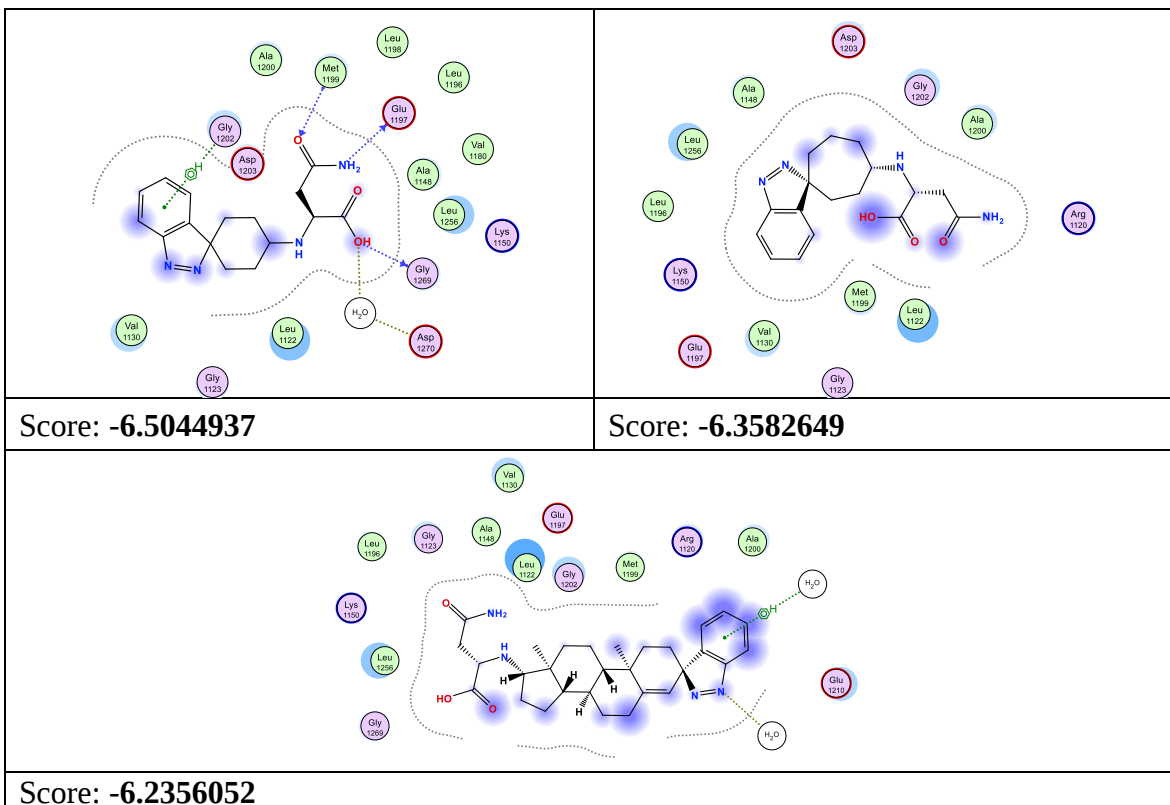
Esquema 2: Resultados de la actividad IC₅₀ de los 5 indazoles más activos de acuerdo al modelo de Machine Learning.



Esquema 3: Visualización de las interacciones entre el ligando y el receptor como un diagrama 2D.



11° Congreso Internacional de Investigación en Ciencias Básicas y Agronómicas
Universidad Autónoma Chapingo, 22 y 23 de septiembre de 2022
Chapingo, México



Los residuos del sitio activo se representan como sigue: residuos polares en rosa, residuos hidrófobos en verde, residuos ácidos con un anillo de contorno color rojo, residuos básicos con un anillo de contorno azul. Las flechas verdes y azules indican el enlace de hidrógeno a cadena lateral y átomos del esqueleto, respectivamente. El icono de naftil representa una interacción π - π , mientras que un benceno con un signo + representa una interacción catión- π . "Nubes" azules en átomos del ligando indican el área de superficie expuesta al disolvente (nubes más oscuras y más grandes significan una exposición mayor). "Halos" celestes alrededor de los restos de aminoácidos indican el grado de interacción con los átomos del ligando (halos más grandes y oscuros significan una mayor interacción). El contorno de puntos refleja la habitación estérica para la sustitución de metilo. La línea de contorno se rompe si es más cercano a un átomo que está totalmente expuesto.

Acoplamiento molecular para dihidro-indazoles

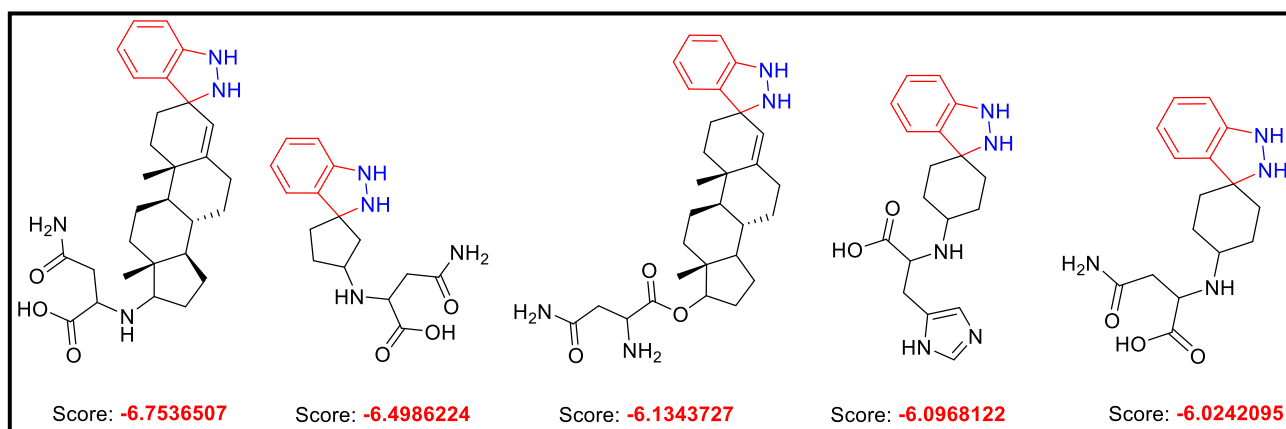
Procedimiento

Se abrió el archivo generado en la preparación de la diana biológica y de las estructuras minimizadas de los dihidro-indazoles.

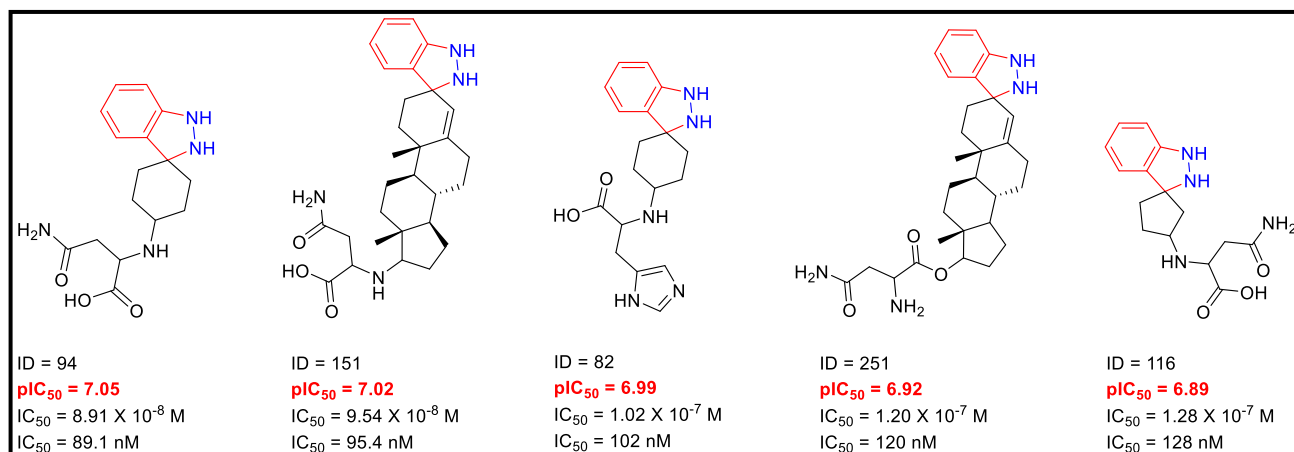
Se realizó el acoplamiento molecular automatizado.

Interpretación de resultados

Esquema 4: Cribado virtual (Visual Screening) y score obtenido del acoplamiento molecular de los los 5 dihidro-indazoles más activos.

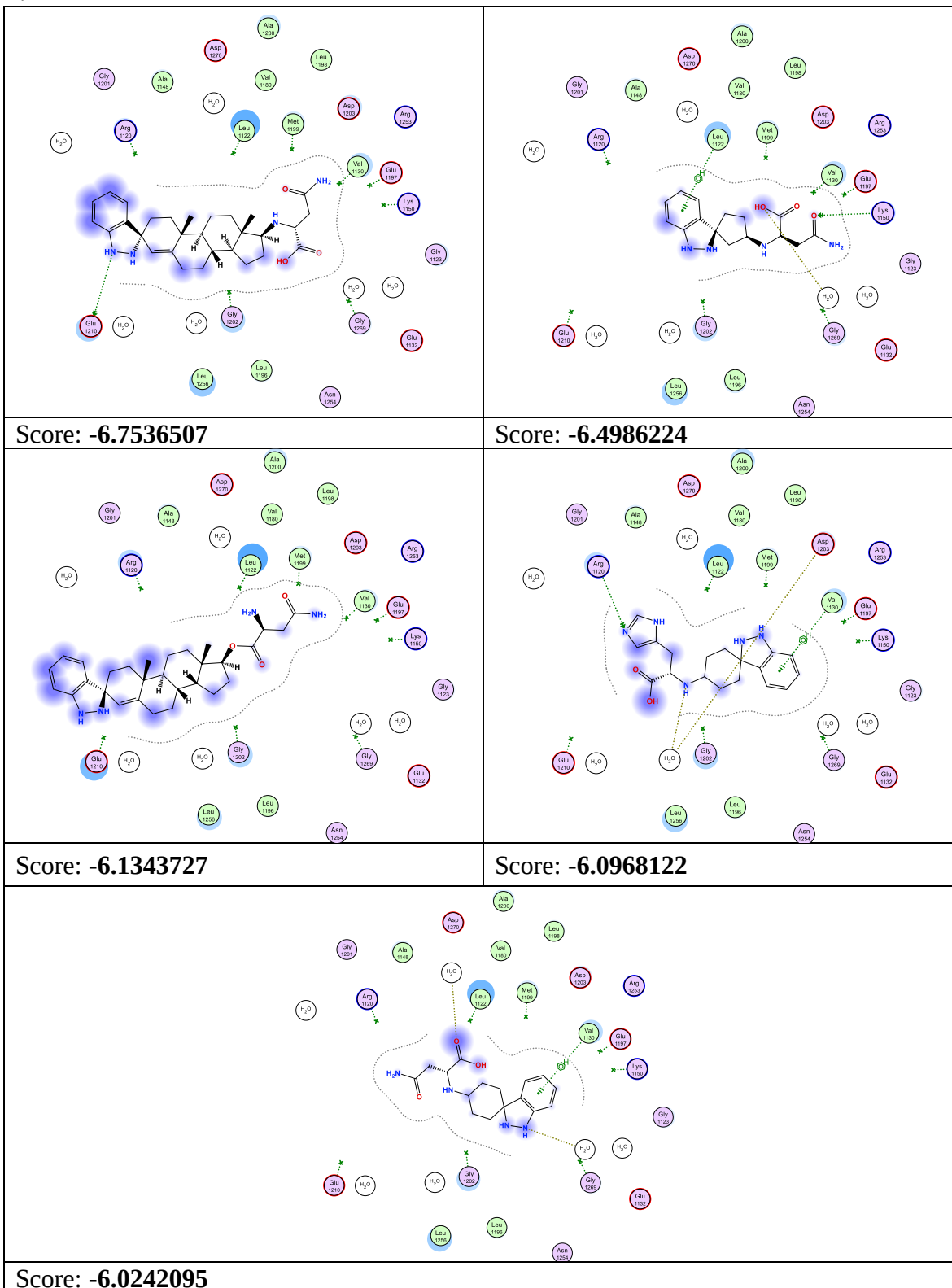


Esquema 5: Resultados de la actividad IC₅₀ de los 5 dihidro-indazoles más activos de acuerdo al modelo de Machine Learning.



11° Congreso Internacional de Investigación en Ciencias Básicas y Agronómicas
Universidad Autónoma Chapingo, 22 y 23 de septiembre de 2022
Chapingo, México

Esquema 6: Visualización de las interacciones entre el ligando y el receptor como un diagrama 2D.



Conclusión

Los resultados del Docking y Virtual Screening de este proyecto en conjunto con el modelo de Machine Learning adaptado para predecir la actividad biológica IC₅₀ de los indazoles y dihidro-indazoles, han arrojado información sólida para poder tomar decisiones a la hora de elegir al compuesto más prometedor los cuáles valdrían la pena sintetizar en el laboratorio y probar su actividad experimentalmente. Así, sabemos que de acuerdo con los resultados de los diagramas de interacción ligando receptor (Esquemas 3 y 6), los 2 indazoles más activos, presentan su interacción con la proteína involucrando al núcleo de indazol, mientras que la mayoría de los dihidro-indazoles además de involucrar al núcleo de dihidro-indazole, involucran otras partes de las moléculas, limitando así la posible modificación estructural para sintetizar derivados de estos. De esta manera, sabemos que será más conveniente preparar los indazoles para su posterior prueba biológica experimental.

Literatura Citada

- Bajorath, J.** (2002). Integration of virtual and high-throughput screening. *Nature Rev. Drug Discov.*, 1, pages 882–894. <https://www.nature.com/articles/nrd941>
- Berman, H. M., Bhat, T. N., Bourne, P. E., Feng, Z., Gilliland, G., Weissig, H., Westbrook, J..** (2000). The Protein Data Bank and the challenge of structural genomics. *Nature Struct. Biol.*, 7, 957–959. https://www.nature.com/articles/nsb1100_957#citeas
- Blundell, T. L., Jhoti, H., Abell, C.** (2002). High-throughput crystallography for lead discovery in drug design. *Nature Rev. Drug Discov.*, 1, 45-54. <https://www.nature.com/articles/nrd706>
- Gohlke, H., Klebe, G.** (2002). Approaches to the description and prediction of the binding affinity of small-molecule ligands to macromolecular receptors. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 41, 2644–2676. [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1521-3773\(20020802\)41:15%3C2644::AID-ANIE2644%3E3.0.CO;2-O](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1521-3773(20020802)41:15%3C2644::AID-ANIE2644%3E3.0.CO;2-O)
- Kitchen, D. B., Decornez, H., Furr, J. R., Bajorath, J.** (2004). Docking and Scoring in Virtual Screening for Drug Discovery: Methods And Applications. *NATURE REVIEWS | DRUG DISCOVERY*, 3, 935-949. <https://www.nature.com/articles/nrd1549>
- Kuntz, I. D., Blaney, J. M., Oatley, S. J., Langridge, R., Ferrin, T. E.** (1982). A geometric approach to macromolecule–ligand interactions. *J. Mol. Biol.*, 161, 269–288. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/002228368290153X?via%3Dihub>
- Langer, T., Hoffmann, R. D.** (2001). Virtual screening: an effective tool for lead structure discovery. *Curr. Pharm. Design*, 7, 509–527. <http://www.eurekaselect.com/article/10010>
- Walters, W. P., Stahl, M. T., Murcko, M. A.** (1998). Virtual screening—an overview. *Drug Discov. Today*, 3, 160-178. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S135964469701163X>
- Westbrook, J., Feng, Z., Chen, Li., Yang, H., Berman, H. M.** (2003). The Protein Data Bank and structural genomics. *Nucleic Acid Res.*, 31, 489–491. <https://academic.oup.com/nar/article/31/1/489/2401336?login=false>

Docking y virtual screening de 5 compuestos activos de la biblioteca virtual de derivados del *O-etil-glucósido* de semillas del fruto de crucetillo (*Randia aculeata*) en *Fusarium oxysporum*

Luis Germán López-Valdez¹ y Holber Zuleta-Prada¹

Resumen

En este proyecto, se realiza el análisis acoplamiento molecular automatizado (Docking) y cribado virtual (Virtual Screening), de 5 compuestos activos de la biblioteca virtual de *O-etil-glucósidos* de semillas del fruto de crucetillo (*Randia aculeata*) con el propósito de identificar relaciones existentes entre la estructura de estos compuestos y la proteína (5OD4) encargada de regular un proceso metabólico del hongo *Fusarium oxysporum*, responsable de la devastación de diferente tipo de cultivos en el mundo, para hallar aquellas moléculas que más inhiben el proceso. Y cuáles valdrían la pena probar su actividad experimentalmente. También se identifica los posibles sitios de modificación de los compuestos con el fin de proponer nuevos núcleos estructurales más potentes.

Palabras clave: Cribado virtual, acoplamiento molecular automatizado, DIFAC, optimización de compuesto bioactivos, diseño de nuevos compuestos bioactivos insilico.

Abstract

In this work Docking and Virtual Screening were realized in the 5 most active compound from the virtual library of *O-etil-glucósides* from crucetillo fruit's seeds, with the purpose of identifying existent relation between the active compounds and the protein (5OD4) responsible of regulating the metabolic process of the *Fusarium oxysporum* fungi, responsible of devastating of several type of crops in the word, to find those molecules that more inhibit the process. And which of these molecules would be worth testing their activity experimentally. Also we identified the possible modifying sites of the molecules to propose new ones, more potent inhibiting the fungi.

Keywords: Virtual Screening, Docking, CADD, bioactive compounds optimization, insilico design of new bioactive compounds.

¹Departamento de Preparatoria Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo. Km. 38.5 carretera México-Texcoco, Chapingo Edo. de México. CP 56230. Tel +595-21500 ext 1619. Fax +595 -9521617 Correo: lgermanlv@taurus.chapingo.mx, lgermanlv@gmail.com. hozuleta_13@hotmail.com

Introducción

Los enfoques computacionales que anclan (Dock) pequeñas moléculas en las estructuras de los objetivos macromoleculares (proteínas o dianas biológicas) y puntúan (Score) su potencial complementariedad con los sitios de unión se utiliza ampliamente en la identificación de compuestos líderes con actividad biológica que pueden optimizarse. De hecho, ahora hay una serie de medicamentos cuyo desarrollo estuvo fuertemente influenciado por o se basó en el diseño basado en la estructura y las estrategias de detección, como los inhibidores de la proteasa del VIH. (*Kitchen et al., 2004*).

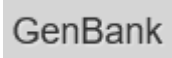
Así, el número de proteínas con una estructura tridimensional conocida está aumentando rápidamente, y las estructuras producidas por iniciativas de genómica estructural ya están disponibles públicamente (*Berman, et. al. 2000; Westbrook et. al. 2003*). El aumento en el número de objetivos estructurales se debe en parte a las mejoras en las técnicas para la determinación de la estructura, como la cristalografía de rayos X de alto rendimiento (*Blundell et. al. 2002*). Con proyectos de determinación de estructuras a gran escala impulsados por consorcios de genómica, se han seleccionado muchas proteínas diana actuales por su potencial terapéutico.

Las metodologías computacionales se han convertido en un componente crucial de muchos programas de descubrimiento de fármacos, desde la identificación de aciertos hasta la optimización de pistas y más allá (*Bajorath, 2002; Walters, 1998; Langer y Hoffmann, 2001*), y enfoques como el ligando (*Bajorath, 2002*) o las técnicas de cribado virtual basadas en estructuras (*Gohlke y Klebe, 2002*) se utilizan ampliamente en muchos esfuerzos de descubrimiento. Una metodología clave, el acoplamiento de moléculas pequeñas a los sitios de unión de proteínas, fue pionera a principios de la década de 1980 (*Kuntz, et. al. 1982*) y sigue siendo un área de investigación muy activa (*Gohlke y Klebe, 2002*). Cuando solo está disponible la estructura de un objetivo y su sitio activo o vinculante, el acoplamiento de alto rendimiento se utiliza principalmente como una herramienta de identificación de aciertos. Sin embargo, cálculos similares a menudo también se usan más adelante durante la optimización principal, cuando las modificaciones a las estructuras activas conocidas se pueden probar rápidamente en modelos de computadora antes del compuesto.

Metodología

Muchas estructuras de proteína (dianas biológicas) se pueden hallar en línea y muchas de ellas son de libre acceso. En la tabla 1 se muestran 4 bases de datos.

Tabla 1. Bases de datos de macromoléculas disponibles en línea.

Base de datos	Descripción	URL
	Archivo de estructuras tridimensionales de proteínas y aminoácidos resueltas experimentalmente.	https://www.rcsb.org/
	Catálogo de información y almacenamiento de secuencias confirmadas.	https://www.uniprot.org/
	Recurso para la identificación e interpretación de la información de la secuencia de las proteínas.	https://proteininformationresource.org/
	Registro de todas las secuencias de aminoácidos y proteínas.	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/

Descripción de la metodología

Preparación de la diana biológica

Procedimiento (utilizando MOE)

1. Se obtuvo la estructura de la proteína en formato PDB.

Se ingresó a la página de Protein Data Bank (ver URL en la Tabla 1) y en el buscador escriba el nombre de la proteína (En su defecto escriba el código PDB).

En nuestro caso fue: código (**5OD4**).

2. Se abrió la estructura de la proteína en MOE. Se preparó, seleccionando el sitio de unión.

3. Se validó el protocolo de docking. Y se guardó el archivo generado en formato.moe

Preparación del ligando

Procedimiento

Se abrió el archivo.csv con los SMILES de los 5 *O-etil*-glucósidos activos calculados con el método de Machine Learning predictivo, desarrollado en este mismo proyecto.

Se minimizó la energética de cada molécula.

Se escogió la columna correspondiente a las estructuras minimizadas.

ACOPLAMIENTO MOLECULAR para *O-etil*-glucósidos

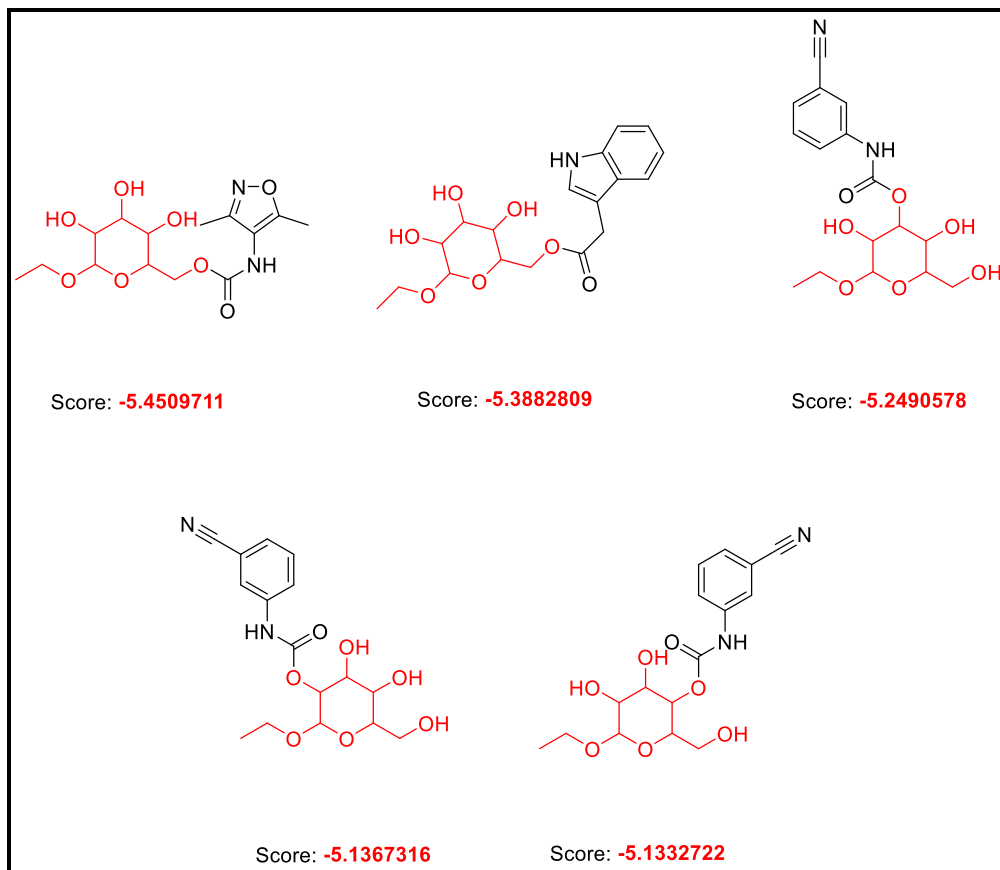
Procedimiento

Se abrió el archivo generado en la preparación de la diana biológica y de las estructuras minimizadas de los *O-etil*-glucósidos.

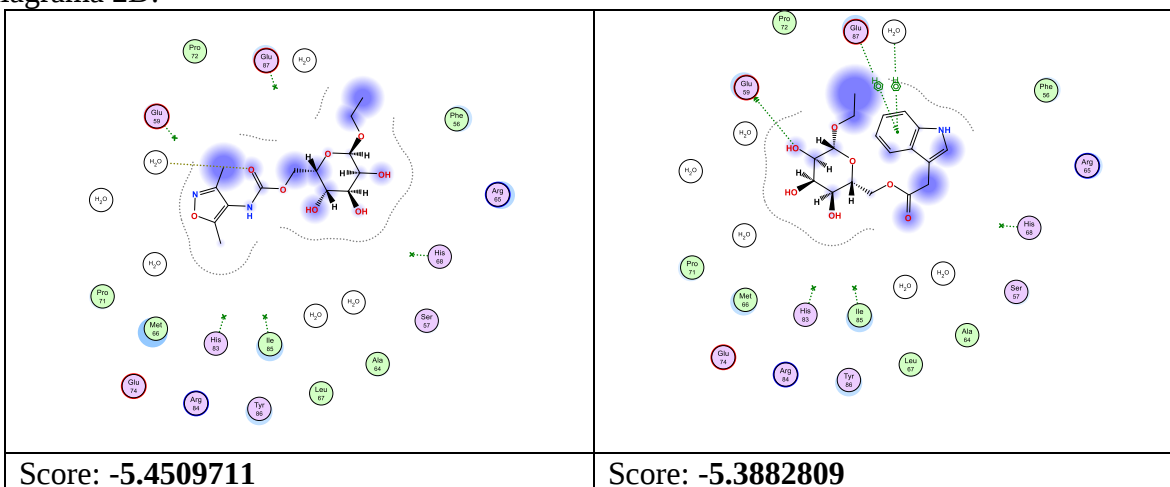
Se realizó el acoplamiento molecular automatizado.

Interpretación de resultados

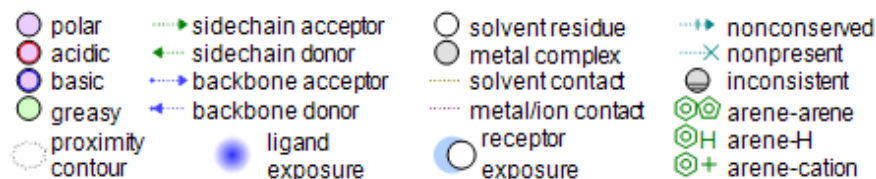
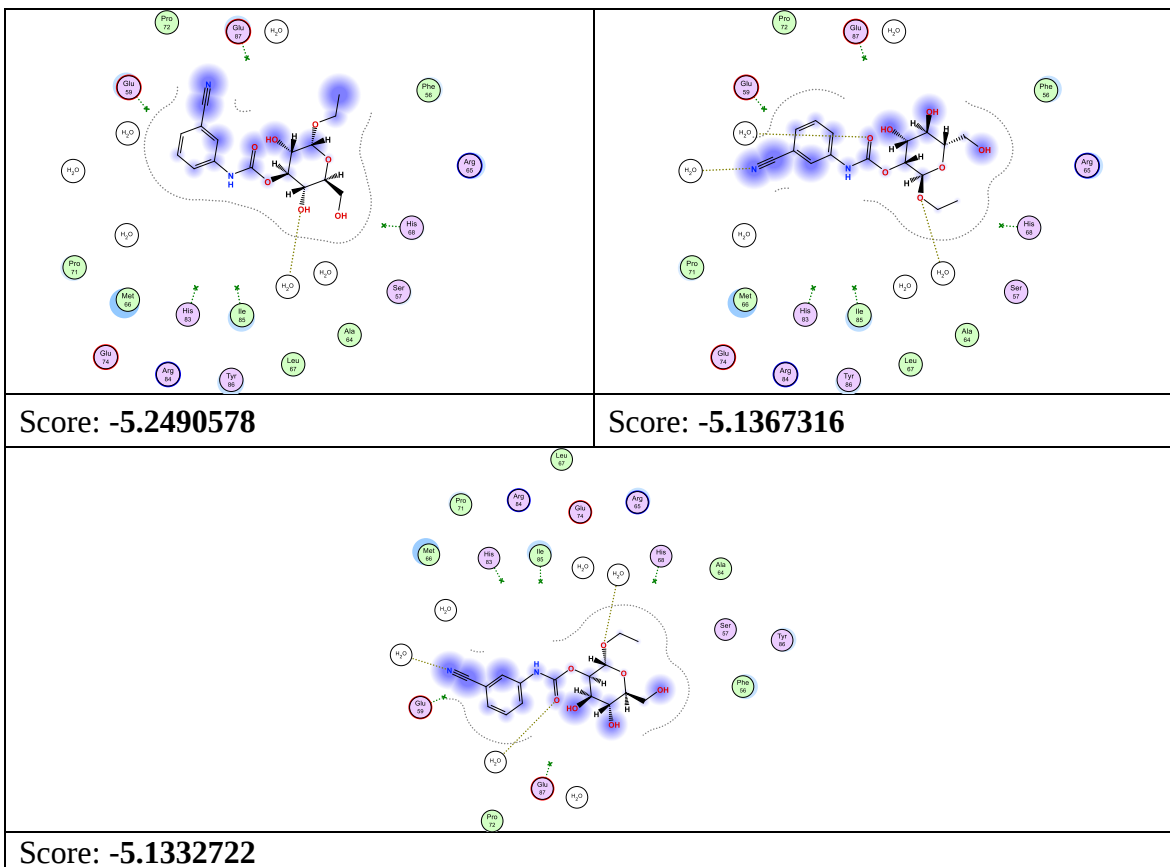
Esquema 1: Cribado virtual (Virtual Screening) y score obtenido del acoplamiento molecular de los 5 *O*-etil-glucósidos más activos.



Esquema 2: Visualización de las interacciones entre el ligando y el receptor como un diagrama 2D.



11° Congreso Internacional de Investigación en Ciencias Básicas y Agronómicas
Universidad Autónoma Chapingo, 22 y 23 de septiembre de 2022
Chapingo, México



Los residuos del sitio activo se representan como sigue: residuos polares en rosa, residuos hidrófobos en verde, residuos ácidos con un anillo de contorno color rojo, residuos básicos con un anillo de contorno azul. Las flechas verdes y azules indican el enlace de hidrógeno a cadena lateral y átomos del esqueleto, respectivamente. El icono de naftil representa una interacción π - π , mientras que un benceno con un signo + representa una interacción catión- π . "Nubes" azules en átomos del ligando indican el área de superficie expuesta al disolvente (nubes más oscuras y más grandes significan una exposición mayor). "Halos" celestes alrededor de los restos de aminoácidos indican el grado de interacción con los átomos del ligando (halos más grandes y oscuros significan una mayor interacción). El contorno de puntos refleja la habitación estérica para la sustitución de metilo. La línea de contorno se rompe si es más cercano a un átomo que está totalmente expuesto.

Conclusión

Los resultados del Docking y Virtual Screening de este proyecto para predecir las interacciones entre el ligando y el receptor, han arrojado información reveladora para poder tomar decisiones a la hora de elegir al compuesto más prometedor los cuáles valdrían la pena sintetizar en el laboratorio y probar su actividad experimentalmente. Así, sabemos que de acuerdo con los resultados de los diagramas de interacción ligando receptor (Esquemas 2), los *O-etil*-glucósidos más activos, presentan su interacción con la proteína involucrando al núcleo de heterociclo aromático y otras partes de las moléculas, limitando así la posible modificación estructural para sintetizar derivados de estos. De manera muy interesante, el compuesto de indol, el segundo más activo de los compuestos estudiados (Esquemas 1y 2), supone una reparación relativamente simple en el laboratorio, lo cual lo perfila como un posible candidato para sintetizar en el laboratorio y probar su actividad experimentalmente.

Literatura Citada

- Bajorath, J.** (2002). Integration of virtual and high-throughput screening. *Nature Rev. Drug Discov.*, 1, pages 882–894. <https://www.nature.com/articles/nrd941>
- Berman, H. M., Bhat, T. N., Bourne, P. E., Feng, Z., Gilliland, G., Weissig, H., Westbrook, J.** (2000). The Protein Data Bank and the challenge of structural genomics. *Nature Struct. Biol.*, 7, 957–959. https://www.nature.com/articles/nsb1100_957#citeas
- Blundell, T. L., Jhoti, H., Abell, C.** (2002). High-throughput crystallography for lead discovery in drug design. *Nature Rev. Drug Discov.*, 1, 45–54. <https://www.nature.com/articles/nrd706>
- Gohlke, H., Klebe, G.** (2002). Approaches to the description and prediction of the binding affinity of small-molecule ligands to macromolecular receptors. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 41, 2644–2676. [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1521-3773\(20020802\)41:15%3C2644::AID-ANIE2644%3E3.0.CO;2-O](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1521-3773(20020802)41:15%3C2644::AID-ANIE2644%3E3.0.CO;2-O)
- Kitchen, D. B., Decornez, H., Furr, J. R., Bajorath, J.** (2004). Docking and Scoring in Virtual Screening for Drug Discovery: Methods And Applications. *NATURE REVIEWS | DRUG DISCOVERY*, 3, 935–949. <https://www.nature.com/articles/nrd1549>
- Kuntz, I. D., Blaney, J. M., Oatley, S. J., Langridge, R., Ferrin, T. E.** (1982). A geometric approach to macromolecule–ligand interactions. *J. Mol. Biol.*, 161, 269–288. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/002228368290153X?via%3Dihub>
- Langer, T., Hoffmann, R. D.** (2001). Virtual screening: an effective tool for lead structure discovery. *Curr. Pharm. Design*, 7, 509–527. <http://www.eurekaselect.com/article/10010>
- Walters, W. P., Stahl, M. T., Murcko, M. A.** (1998). Virtual screening—an overview. *Drug Discov. Today*, 3, 160–178. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S135964469701163X>
- Westbrook, J., Feng, Z., Chen, Li., Yang, H., Berman, H. M.** (2003). The Protein Data Bank and structural genomics. *Nucleic Acid Res.*, 31, 489–491. <https://academic.oup.com/nar/article/31/1/489/2401336?login=false>

El Mapeo Científico como herramienta de investigación, Caso: Sistema-Producto Mezcal

Artemio Pérez-López¹, Yesenia Manilla-Tellez¹, Erika Daniela Reyes-Carmona¹, Diana Laura Ozuna-Moreno²

Resumen

El mezcal es una bebida alcohólica destilada mexicana que ha recobrado un valor sociocultural y económico en los últimos años. Por otra parte, en la literatura científica se ha observado que constantemente se publican una gran cantidad de artículos científicos dentro de un abanico muy amplio de áreas de investigación, sin que se haya realizado una síntesis de esta información con la finalidad de dar a conocer un panorama global de los avances científicos y su impacto en la industria del mezcal. En este sentido, se plantea como objetivo recopilar y analizar el conjunto de datos bibliográficos registrados en la literatura científica del sistema-producto mezcal, basado en las herramientas de la revisión sistemática y el mapeo científico. Los resultados demuestran que el sistema producto mezcal es un tema emergente y poco estudiado en diversos contextos. Se ha generado pocas publicaciones con respecto al tema a lo largo del tiempo lo que da pauta a realizar un análisis más profundo para conocer el factor que está ocasionando esta baja producción científica en torno al tema. Asimismo, el enfoque que se expone mayormente en las publicaciones es el tema de manejo, propagación y conservación genética de los agaves originarios de México en donde hace llamado a hacer uso adecuado de los recursos naturales presentes en el medio de producción. Por lo cual, se abre una brecha en el ámbito de la investigación para hacer propuestas novedosas que despierten la importancia que reviste el tema del sistema producto mezcal en todas sus dimensiones.

Palabras clave: Mezcal; mapeo científico; proceso artesanal.

Abstract

Mezcal is a Mexican distilled alcoholic beverage that has regained sociocultural and economic value in recent years. On the other hand, in the scientific literature it has been observed that many scientific articles are constantly published within a very wide range of research areas, without a synthesis of this information having been carried out in order to publicize a global overview of scientific advances and their impact on the mezcal industry. In this sense, the objective is to collect and analyze the set of bibliographic data registered in the scientific literature of the mezcal product-system, based on the tools of systematic review and scientific mapping. The results show that the mezcal product system is an emerging and understudied topic in various contexts.

¹Posgrado en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria. Departamento de Ingeniería Agroindustrial. Universidad Autónoma Chapingo. Correo: aperezl.dia@gmail.com.

²Instituto Tecnológico de Acapulco, Acapulco de Juárez, Guerrero. Correo: yes.matez.456@gmail.com, danireyesc@gmail.com, dianaozunna97@gmail.com

Few publications have been generated regarding the subject over time, which gives rise to a deeper analysis to know the factor that is causing this low scientific production on the subject. Likewise, the approach that is exposed mostly in the publications is the issue of management,

propagation and genetic conservation of agaves originating in Mexico, where it calls for the proper use of natural resources present in the production environment. Therefore, a gap is opened in the field of research to make innovative proposals that awaken the importance of the issue of the mezcal product system in all its dimensions.

Keywords: Mezcal; scientific mapping; craft process.

Introducción

El mezcal es una bebida alcohólica destilada mexicana de maguey o agave cocidos (DOF, 2017). El mezcal se clasifica en tres categorías: mezcal, mezcal artesanal y mezcal ancestral de acuerdo con la técnica de elaboración. El volumen de producción y de envasado de mezcal ha crecido para el mercado nacional e internacional (CRM, 2020). Estos datos demuestran que la bebida ha recobrado su valor sociocultural y económico. La evidencia documental, en los últimos años, la indica que han llamado la atención las temáticas relacionadas con la sobre explotación del maguey silvestre (Torres-García et al., 2020), los volúmenes de los desperdicios de biomasa durante el proceso (Pérez-Zavala et al., 2020) y la demanda energética en las operaciones del proceso de elaboración. En la literatura científica se ha observado que constantemente se publican una gran cantidad de artículos científicos dentro de un abanico muy amplio de áreas de investigación, sin que se haya realizado una síntesis de esta información con la finalidad de dar a conocer un panorama global de los avances científicos y su impacto en la industria del mezcal. En este sentido, el estudio plantea como objetivo recopilar y analizar el conjunto de datos bibliográficos registrados en la literatura científica dentro del dominio sistema-producto mezcal, basado en las herramientas de la revisión sistemática y el mapeo científico, para visualizar las etapas evolutivas de las especialidades involucradas, reconocer patrones potencialmente perspicaces a partir de signos codificados visualmente y sintetizar la información para capturar su estado del arte.

Materiales y métodos

Se empleó el enfoque metodológico de las revisiones sistemáticas y meta-análisis plasmados en la declaración PRISMA (Page et al., 2021) y la herramienta del mapeo científico (Chen, 2017). El primero aporta transparencia y replicabilidad en el proceso de la revisión de literatura y el segundo brinda un conjunto de herramientas analíticas visuales, métricas e indicadores que pueden resaltar patrones y tendencias potencialmente significativos entre disciplinas, campos de estudio, documentos y autores.

Los datos de entrada fueron un compendio de artículos científicos obtenidos de Elsevier Scopus® y Clarivate Web of Science© (WoS). La cadena de consulta fue guiada con palabras clave referentes a los tipos de “mezcal” o “mescal” y los nombres comunes y científicos de seis especies de maguey más importantes para la elaboración de la bebida.

Se realizó un cribado (screening) de la información bajo ciertos criterios de elegibilidad y exclusión como son: tipo de documento, estado de la publicación, áreas temáticas, idioma, año de publicación. Los documentos seleccionados en Scopus (n=107) y WoS (n=45) se exportaron

11° Congreso Internacional de Investigación en Ciencias Básicas y Agronómicas
Universidad Autónoma Chapingo, 22 y 23 de septiembre de 2022
Chapingo, México

a Microsoft Excel® 365 en formato *.CSV. Posteriormente se sometieron a un algoritmo de fusión en el lenguaje de programación R en la plataforma de RStudio. En la nueva base de datos se removieron nuevamente los artículos duplicados (n=39) mediante código de R, por lo que, la base datos final consta de 113 artículos científicos.

Resultados

A partir de la búsqueda de información en las bases de datos se recuperó un total de 253 artículos en la base de Scopus y 73 en WoS. Tras aplicar los criterios de inclusión/exclusión y eliminación de artículos repetidos quedaron 113 artículos para el análisis final. La tabla 1 muestra información principal de los artículos científicos publicados sobre el tema, que comprenden un periodo desde 1995 a 2022. Los documentos que se incluyeron en este análisis se publicaron en 77 revistas científicas indizadas en las bases de datos mencionadas. Se publica en promedio un artículo relacionado con este tema cada 5 años y cada publicación tiene en promedio 2.5 citas. Cada año un documento es citado 0.33 veces. Los documentos analizados se distribuyen en 445 autores, lo que representa 0.254 artículos por autor. En cada documento publicado aparecen mas de 3 autores, esto representa el índice de colaboración y son el número de autores que firma cada documento publicado.

Cuadro 1. Información general de los documentos incluidos en el análisis.

Description	Results
MAIN INFORMATION ABOUT DATA	
Timespan	1995:2022
Sources (Journals, Books, etc)	77
Documents	113
Average years from publication	5.7
Average citations per documents	2.584
Average citations per year per doc	0.3329
References	1341
DOCUMENT CONTENTS	
Keywords Plus (ID)	0
Author's Keywords (DE)	582
AUTHORS	
Authors	445
Author Appearances	543
Authors of single-authored documents	0
Authors of multi-authored documents	445
AUTHORS COLLABORATION	
Single-authored documents	0
Documents per Author	0.254
Authors per Document	3.94
Co-Authors per Documents	4.81
Collaboration Index	3.94

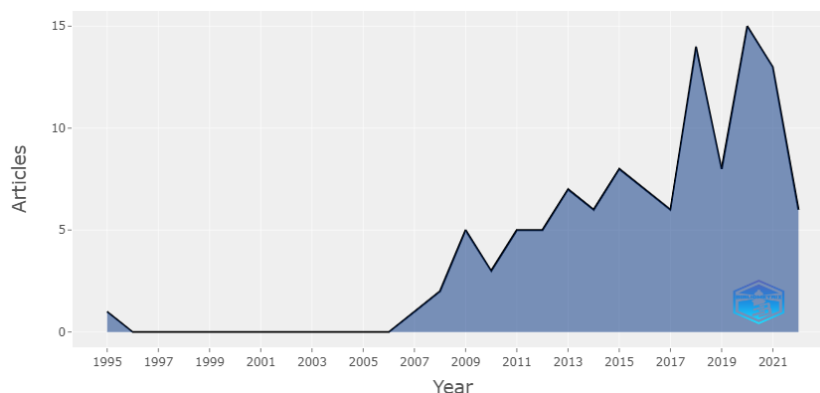


Figura 1. Producción Científica Anual

Las primeras publicaciones de la temática de estudio aparecen desde el año 1995. Hay un periodo en que no se registra ninguna publicación (1996-2006) y posteriormente hay un crecimiento casi exponencial (figura 1). Este fenómeno esta asociado con que la industria mezcalera ha recobrado importancia económica y comercial en el ámbito nacional e internacional.

En cuanto al área temática de los documentos, 13 artículos (28 %) se centraron en ciencias agrícolas y biológicas donde la mayoría de ellos analizaron la reproducción, regeneración y crecimiento de los agaves más utilizados para elaborar mezcal.

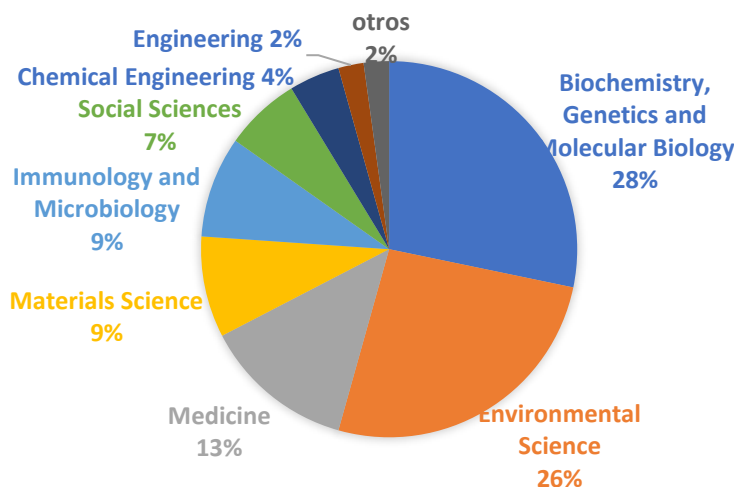


Figura 2. Áreas temáticas que se abordan en los los documentos.

El área temática de ciencia ambiental se abordó en 12 artículos (26 %), abarcando el manejo y cuidado de los agaves implementando el uso de hongos micorrícicos, bacterias fijadoras de nitrógeno, conservación de polinizadores, que garanticen la diversidad genética, conservación y uso sustentable de los recursos. El resto de los artículos se enfocaron en el estudio de múltiples atributos vinculados al aprovechamiento de los residuos de agave y sus propiedades antioxidantes del bagazo (Figura 3).

El análisis de la producción científica muestra autores de 3 países diferentes que contribuyeron a la publicación de los artículos recuperados en este estudio. México se posiciona como el país con más citas en sus documentos publicados, seguido de Estados Unidos de América con 75 citas quedando en tercer lugar Francia con 0 citas hasta el momento (Tabla 2). En el mapa de la figura 4 se observa claramente mediante colores, la distribución de los países en donde se han publicado documentos del área temática del sistema producto mezcal, por consiguiente, a manera de resaltar los países con mayor número de citas y documentos publicados, se colorean de una tonalidad más oscura a diferencia de los que poseen menor número de citas y documentos.

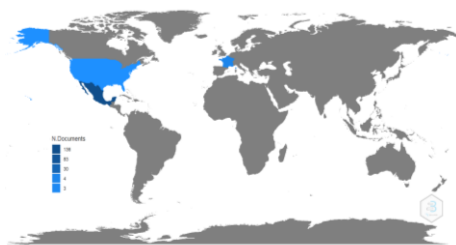


Figura 3. Mapa de producción científica por país

Existe un indicador además del total de citas que evalúa la prolificidad y relevancia de la comunidad científica tal es el caso del índice H, esta unidad de medida es una métrica a nivel de autor que intenta evaluar tanto la productividad como el impacto de las citas de las publicaciones de un científico. Con base a esta métrica se observa en el cuadro 3 a los 10 autores más relevantes que han contribuido en la publicación de documentos dentro del área temática del sistema producto mezcal, presentan un índice H que oscila entre 2 a 6. De los autores más prolíficos por el número de citas en sus publicaciones realizadas en los años 2013 y 2007 se encuentra Casas A. y Zizumbo-Villareal D., encabezando la lista con un índice H de 6.

Estas publicaciones hablan de manera general del conocimiento y manejo tradicional para el aprovechamiento sustentable de agave en México. Cabe resaltar que se nota una tendencia menor en el índice H cuando la publicación es más reciente, este comportamiento de la información científica deja dos escenarios para analizar que: La temática es incipiente en el interés de los investigadores a nivel mundial o que la temática no es relevante en la investigación científica. En ambos casos se abre una brecha para hacer propuestas novedosas que despierten la importancia que reviste el tema del sistema producto mezcal.

Cuadro 2. Países que publican con respecto al tema y su producción científica.

Cuadro 3. Los 10 autores contribuido en la publicación área temática del sistema producto mezcal.	País	Citas	más relevantes que han de documentos dentro del
	México	475	
	Estados Unidos	75	
	Francia	0	

Número	Autores	H índice	Número de citas	Año publicación
1	CASAS A	6	139	2013
2	ZIZUMBO-VILLARREAL D	6	169	2007
3	COLUNGA-GARCÍAMARÍN P	5	140	2007
4	VARGAS-PONCE O	5	124	2007
5	DELGADO-LEMUS A	3	77	2014
6	EGUIARTE LE	3	84	2013
7	TORRES I	3	80	2013
8	BLANCAS J	2	60	2013
9	CABALLERO-CABALLERO M	2	16	2018
10	CHIMAL-SÁNCHEZ E	2	6	2018

Por otra parte, al evaluar la relevancia de un autor dentro de un campo concreto de investigación, se deben tener en cuenta dos aspectos relevantes: productividad e impacto.

Dicho lo anterior en la figura 4, se consideran ambos aspectos que ofrecen una visión general de los 10 autores más productivos en los últimos años. La productividad se evaluó con respecto al número de artículos publicados por autor en un periodo de tiempo dado. Así mismo a la inversa se evaluó el número de citas recibidas por año. Se puede observar que Casas A. y Zizumbo-Villarreal D., son los autores más productivos en cuanto a la publicación de artículos, mientras que Zizumbo-Villarreal D. y Colunga-Garcíaamarín P., recibieron el mayor número de citas por año.

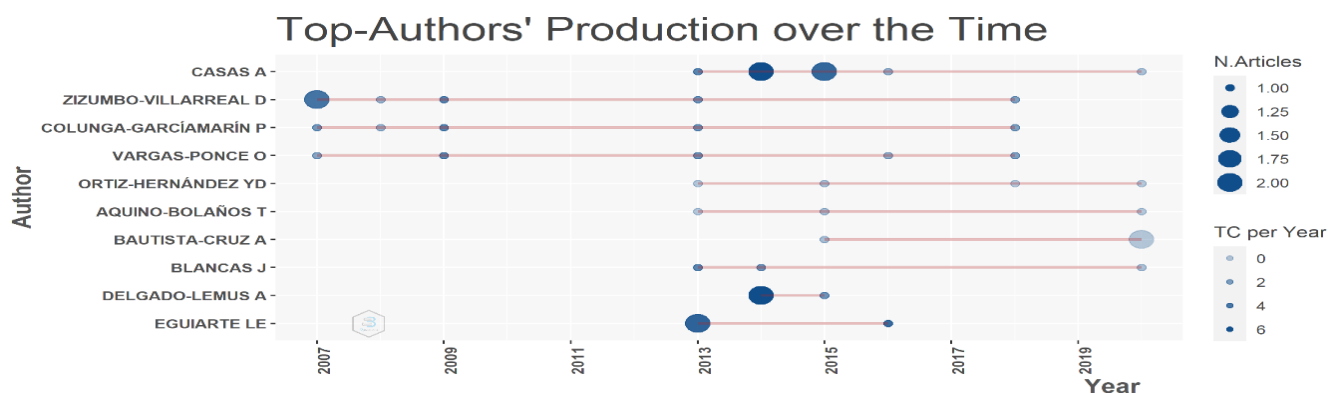


Figura 4. Producción científica de los principales autores a lo largo del tiempo (2007-2019)

La figura 5 permite a los investigadores destacar las conexiones que ocurren entre los términos que aparecen en una colección específica, es decir co-ocurrencias. En el presente estudio las co-ocurrencias se definieron entre las palabras clave más empleadas en los documentos recopilados. Así las 40 palabras clave se conectaron entre sí siguiendo el logaritmo de cluster Louvain.

De manera que mientras más co-ocurrencias entre las palabras clave se identificaron, más cercanas al centro del mapa se situaron, así mismo cuantas más palabras clave eran utilizadas al mismo tiempo por los autores, mayor era su burbuja y proximidad dando lugar a vínculos más estrechos y sólidos. Los diferentes colores definen cada grupo, en este caso se pueden distinguir 5 cluster: Los tipos de agaves y lugares de origen (cluster azul), Mezcal y su composición alcohólica (cluster morado), Morfología y derivados del agave (cluster verde), Propagación y variación genética de agaves (cluster rojo), Biodiversidad y recursos naturales (cluster amarillo).

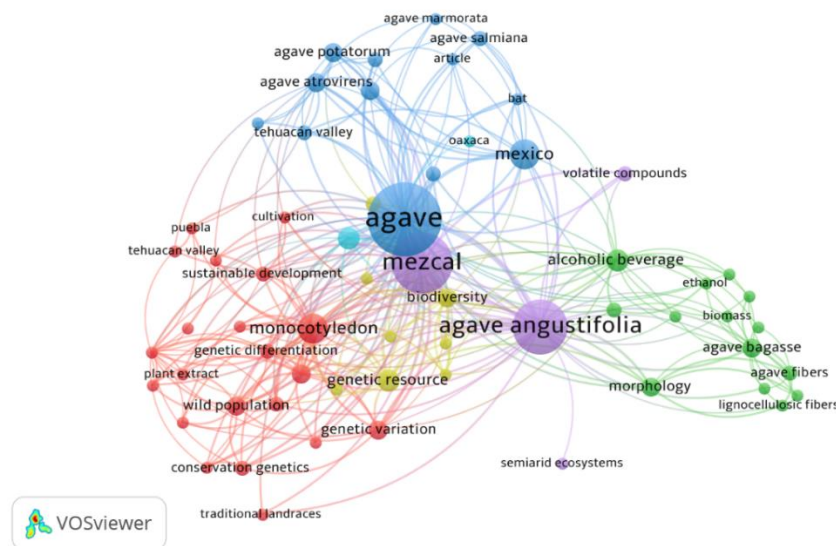


Figura 5. Co-ocurrencias de palabras clave en forma de gráfico de red (VOSviewer, 2022)

Conclusiones

El análisis de los artículos seleccionados da a conocer que el sistema producto mezcal es un tema emergente que se ha estudiado en diversos contextos. Sin embargo, se han venido generando pocas publicaciones con respecto al tema a lo largo del tiempo lo que da pauta a realizar un análisis más profundo para conocer el factor que está ocasionando esta baja producción científica en torno al tema. Por otra parte, el enfoque que se expone mayormente en las publicaciones es el tema de manejo, propagación y conservación genética de los agaves originarios de México, por lo que se hace un llamado a hacer uso adecuado de los recursos naturales presentes en el medio de producción. Por lo cual, se abre una brecha en el ámbito de la investigación para hacer propuestas novedosas que despierten la importancia que reviste el tema del sistema producto mezcal en todas sus dimensiones.

Agradecimientos

Los autores agradecemos a la Dirección General de Investigación y Posgrado de la Universidad Autónoma Chapingo por el apoyo brindado a través de los proyectos de Desarrollo y Transferencia de Tecnología (22023-DTT-62) y Convencional (22137-C-62), respectivamente. Asimismo, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por las Becas Nacionales de las estudiantes de la Maestría en Ciencia y tecnología Agroalimentaria.

Literatura Citada

- Chen, C.**, (2017). Science mapping: a systematic review of the literature. *J. Data Inf. Sci.* 2,1–40.
- NOM-070-SCFI-2016** (2017). NORMA Oficial Mexicana NOM-070-SCFI-2016, Bebidas alcohólicas-Mezcal-Especificaciones.
https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5472787&fecha=23/02/2017&print=true
- Mezcal Consejo Regulador (MCR)**, (2020). Denominación de origen. Oaxaca mio.
https://www.oaxaca-mio.com/mezcalesdeoaxaca/crm/#google_vignette
- Page, M. J., McKenzie, J., Bossuyt, P., Boutron, I., Hoffmann, T., mulrow, c. d., ... Moher, D.** (2020). The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews.
<https://doi.org/10.31222/osf.io/v7gm2>
- Pérez-Zavala, M. D. L., Hernández-Arzaba, J. C., Bideshi, D. K., & Barboza-Corona, J. E.** (2020). Agave: a natural renewable resource with multiple applications. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(15), 5324-5333. doi:10.1002/jsfa.10586
- Torres-García, I., León-Jacinto, A., Vega, E., Moreno-Calles, A. I., & Casas, A.** (2020). Integral Projection Models and Sustainable Forest Management of Agave inaequidens in Western Mexico. *Frontiers in Plant Science*, 11. doi:10.3389/fpls.2020.01224

Formación de complejos solubles a partir de aislado de proteína de huauzontle y almidón modificado con OSA

Adriana Herrero Galindo¹, Consuelo Lobato-Calleros², Eleazar Aguirre-Mandujano², Blanca E. Hernández-Rodríguez²

Resumen

La coacervación compleja se da por la unión de dos biopolímeros, y está definida como la separación de dos fases líquidas una rica en dos biopolímeros y otra es la fase del sobrenadante la cual es pobre en biopolímeros, el objetivo de este trabajo es establecer el pH de interacción entre la proteína y el almidón modificado con OSA para la formación de complejos solubles. Las variables que se midieron fueron los valores críticos de pH, medición del potencial zeta, diámetro hidrodinámico y absorbancia. El pH para la formación de complejos solubles se da en pH 5.1, a partir de 5 se observó un mayor aumento, región considerada de los complejos insolubles. Respecto al potencial zeta se tiene que a partir de pH 4 las cargas negativas tienden a incrementar desde -20 hasta cercanas a -30 mV. De estos resultados es posible darles un uso a los complejos en la industria de los alimentos.

Palabras clave: Pseudocereales, coacervados complejos, almidón, potencial zeta, proteína modificada

Abstract

Complex coacervation occurs by the union of two biopolymers and is defined as the separation of two liquid phases, one rich in two biopolymers and the other is the supernatant phase which is poor in biopolymers. The objective of this work is to establish the pH of interaction between protein and starch modified with OSA for the formation of soluble complexes. The variables measured were the critical pH values, zeta potential measurement, hydrodynamic diameter, and absorbance. The pH for the formation of soluble complexes is given at pH 5.1, from pH 5 onwards a greater increase was observed, a region considered for insoluble complexes. Regarding the zeta potential, from pH 4 the negative charges tend to increase from -20 to close to -30 mV. From these results it is possible to give a use to the complexes in the food industry.

Keywords: Pseudocereals, complex coacervates, starch, zeta potential, modified protein.

¹Maestría en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, Departamento de Ingeniería Agroindustrial, Universidad Autónoma Chapingo, Km 38.5 Carretera México-Texcoco, 56230, Texcoco, México. Correo: Adris10aap00@gmail.com.

²Departamento de Preparatoria Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo, Km 38.5 Carretera México-Texcoco, 56230, Texcoco, México. Correo: consuelobato@yahoo.com, eleagman@yahoo.com, blancaeli_hr@yahoo.com.mx

Introducción

Un número importante de investigaciones se han realizado en torno a la interacción entre proteínas y polisacáridos, esto, por su gran utilidad en la industria alimentaria, así como, en la farmacéutica y cosmética. Se han empleado para proteger y liberar compuestos bioactivos, geles, estabilizadores de emulsiones y dar textura a los alimentos (Turgeon, Schmitt & Sanchez, 2007). Durante los últimos años se ha despertado el interés sobre las proteínas de origen vegetales para la elaboración de productos alimentarios. Estas proteínas se obtienen a partir de cereales, pseudocereales, de semillas oleaginosas y tubérculos (Loveday, 2020). Son utilizadas como ingredientes funcionales por su composición química y sus secuencias únicas de aminoácidos, se emplean para la formación de espumas, gelificación y aumento de la viscosidad, se han aplicado diversos tratamientos que ayuden a mejorar las propiedades funcionales, uno de estos métodos es combinándola con polisacáridos. Principalmente la baja solubilidad que presenta a un pH cercano al punto isoelectrónico (pI), las bajas propiedades interfaciales en emulsiones y espumas (Einhorn-Stoll, Archut, Eichhorn & Kastner, 2021). Se han utilizado diversos polisacáridos para probar si mejora la limitada funcionalidad de las proteínas. Entre los polisacáridos más utilizados se encuentran los almidones, sin embargo, al igual que la proteína presenta limitaciones como la reducida solubilidad en el agua y una mayor tenencia a la retrogradación (Bajaj, Singh & Kaur, 2019). El tipo de modificación va a estar en función de lo que se desee mejorar o alterar, estas técnicas de modificación tienen la finalidad de mejorar las propiedades funcionales.

Los pseudocereales han cobrado importancia por sus características botánicas, son dicotiledóneas, es decir, sus granos no contienen endospermo, sino un embrión que encierra el perispermo, (Alvarez-Jubete, Arrendet & Gallagher, 2010). Definen a los pseudocereales como cereales no verdaderos, sin embargo, sus semillas se manejan en función y composición de los cereales verdaderos además de ser comestibles, entre los pseudocereales que han contribuido a la dieta humana, por lo que ha sido motivo de investigación entre los que se encuentran el amaranto, la chía y la quinua, entre otros. Uno de los pseudocereales poco estudiado es el huauzontle (*Chenopodium nuttalliae* Saff.), el cual pertenece a la familia *Chenopodiaceae* al igual que la quinua de la que se han realizado diversos trabajos relacionados a la funcionalidad y calidad nutricional de la proteína. (López-Monterrubio, Lobato-Calleros, Alvarez-Ramirez & Vernon-Carter, 2020) investigaron las propiedades fisicoquímicas y funcionales de aislado de proteína de huauzontle, reportaron que existe un alto contenido de aminoácidos esenciales, respecto a las propiedades funcionales los resultados fueron favorables, así como un alto porcentaje de su digestibilidad, de acuerdo al comportamiento de los resultados evaluado de las diferentes variables se tiene que el aislado de proteína de huauzontle puede ser empleada como un ingrediente funcional y potencial para la industria alimentaria. Los almidones modificados con OSA cambian su carácter hidrofílico a hidrofóbico, mediante la sustitución de grupos hidroxilo por octenilo. La complejación entre proteínas vegetales y polisacáridos se ha empleado para la modulación de proteínas, ensamblaje y el diseño de nuevas partículas de importancia en la industria alimentaria (Nikbakht Nasrabadi, Sedaghat, Mezzenga, 2021). Este trabajo tiene como objetivo, establecer condición de pH adecuado para la formación de complejos solubles a partir del aislado de proteína de huauzontle y almidón modificado con OSA y su caracterización.

Materiales y métodos

Los biopolímeros para la formación de complejos solubles son proteína de huauzontle y almidón modificado con OSA, la proteína se aisló de la semilla de huauzontle la cual fue adquirida de productores del estado de Morelos, el almidón modificado con OSA (PURITY GUM® ULTRA 32236110) fue donado por Ingredion. Los reactivos grado analítico como la solución de hidróxido de sodio (NaOH), ácido clorhídrico (HCl) serán comprados en REACTIVOS QUÍMICA MEYER (Química Suastes, S.A. de C.V. Ciudad de México). Toda el agua utilizada fue destilada y desionizada.

Preparación de soluciones stock

La proteína se dispersó en agua desionizada a una concentración del 2 % (20 mg/mL), y se ajustó a pH 11 con NaOH al 1 M, se dejó en agitación durante 2 h posteriormente se ajustó el pH a 7 con HCl al 0.5 M, se agitó durante 2 horas y luego se almacenó durante toda la noche a 4 °C para asegurar su completa hidratación. Transcurrido el tiempo de hidratación se la proteína se centrifugó a 3000 rpm por 30 min. El almidón modificado se dispersó el día que se iba a utilizar para evitar la sinéresis.

Medición del potencial zeta

Se midió el potencial zeta de la proteína y el almidón modificado-OSA en un Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Ltd., Malvern, Worcestershire, Reino Unido) para determinar la ventana de mayor interacción entre los biopolímeros, las soluciones madre de los compuestos se diluyeron hasta una concentración de 0.05 % (0.5 mg/mL) utilizando agua desionizada y HCl y NaOH o al 0.1 N para ajustar el pH (3-7). El software del equipo va a convertir las mediciones de la movilidad electroforética en valores de ζ -potencial utilizando el modelo matemático Smoluchowski (Sze et al. 2003).

Formación de complejos

El valor de pH en el que se produjo la mayor diferencia de cargas positivas de la proteína y cargas negativas del almidón modificado con OSA fue el que se eligió para impulsar la interacción entre ambos biopolímeros. Una vez selecciona el pH al que se van a formar los complejos, se va a preparó una dispersión de proteína de huauzontle y almidón modificado con OSA a una concentración de 2 % (20 mg/mL), cada uno de los biopolímeros se ajustó a pH 3.5 y se mezclaron en diferentes relaciones (1:0.25, 1:0.50, 1:1, 1:2, 1:4), por último, se dejaron reposar por 24 h a 4 °C para su posterior caracterización.

Caracterización de complejos

El diámetro hidrodinámico y potencial zeta de los complejos se determinó con un Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Ltd., Malvern, Worcestershire, Reino Unido). La absorbancia de los complejos se midió antes y después de centrifugar (Centrifuge 5810 R, Eppendorf, AG, Hamburg, Germany) a 1600 rpm por 30 min. La absorbancia se midió a 600 nm en espectrofotómetro Genesys 10S UV-VIS.

Obtención de los valores críticos de pH

Para obtener los valores críticos de pH se realizó mediante la metodología (Weinbreck, F. Nieuwenhuijse, H. Robinj G. W. & Kruif C. G. 2004). Para ello se ajustó a pH 7 la proteína de

huauzontle y almidón modificado con OSA y la relación empleada fue de 1:2 para mezclarlos y la absorbancia se midió a una longitud de onda de 600 nm.

Análisis de datos

Los análisis se realizaron por triplicado con un diseño experimental aleatorio, se sometieron a un análisis de varianza y en los casos que así lo requerían se realizó un análisis de comparación de medias de Tukey con un nivel de significancia de 0.05. El paquete estadístico empleado para el análisis de los datos fue Minitab versión 19.

Resultados y discusión

Potencial zeta (ζ)

La interacción entre biopolímeros cargados positiva y negativamente permite la formación de complejos solubles e insolubles, lo que da nuevas y mejores características estructurales, superficiales y funcionales (Nikbakht Nasrabadi, Sedaghat, Mezzenga, 2021). El potencial zeta mide la cargas interfaciales de los biopolímeros, lo que permite elegir el pH de mayor interacción entre ellos, en la figura 1 se presenta los valores obtenidos del aislado de proteína de huauzontle y almidón modificado con OSA, donde se observa que la proteína a pH ácidos sus cargas son positivas y a medida que va incrementando el pH, las cargas se van neutralizando hasta alcanzar el punto isoeléctrico (pI), es decir, la neutralización total de sus cargas, después del pI sus cargas son predominantemente negativas, siendo a pH cercano a 4. López-Monterrubio et al. (2020) reportan valores de potencial zeta de proteína nativa a pH 3.5 muy cercanos a cero y un punto isoeléctrico a pH 3.6.

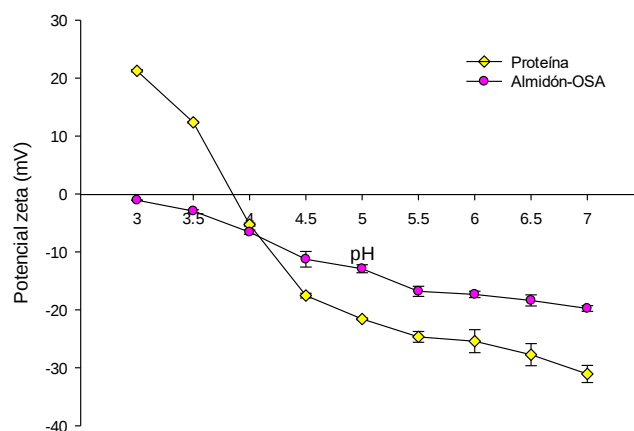


Figura 1. Potencial zeta de aislado de proteína de huauzontle y almidón modificado con OSA

Absorbancia APH/AM-OSA a diferentes relaciones

En la figura 2 se presenta la absorbancia de las diferentes relaciones empleadas para la mezcla de los biopolímeros, aislado de proteína de huauzontle y almidón modificado con OSA, a pH de 3.5, ventana de mayor interacción entre estos biopolímeros, en la figura se observa que desde la relación 1 de proteína y 0.25 de almidón hay una interacción entre estos biopolímeros debido a que las cargas del complejo al medir potencial zeta son negativas y a medida que se incrementa

la cantidad de almidón aumenta el número de cargas negativas. La absorbancia se midió en las mezclas de los biopolímeros 24 h después, la relación 1:2 presento la mayor absorbancia por lo fue la elegida para formar los complejos. Diversos autores mencionan la relación que existe entre la absorbancia y la formación de complejos solubles e insolubles. (Hernández-Rodríguez, Lobato-Calleros, Pimentel-González & Vernon-Carter, 2014) mencionan que la turbidez de la mezcla proteína y polisacárido es considerado como un indicador de la formación y disociación de complejos en solución. (Cuevas-Bernardino et al., 2018) considera que la mayor absorbancia produce la máxima formación de complejos solubles y la absorbancia baja se debe a que existe un tamaño de partícula menor.

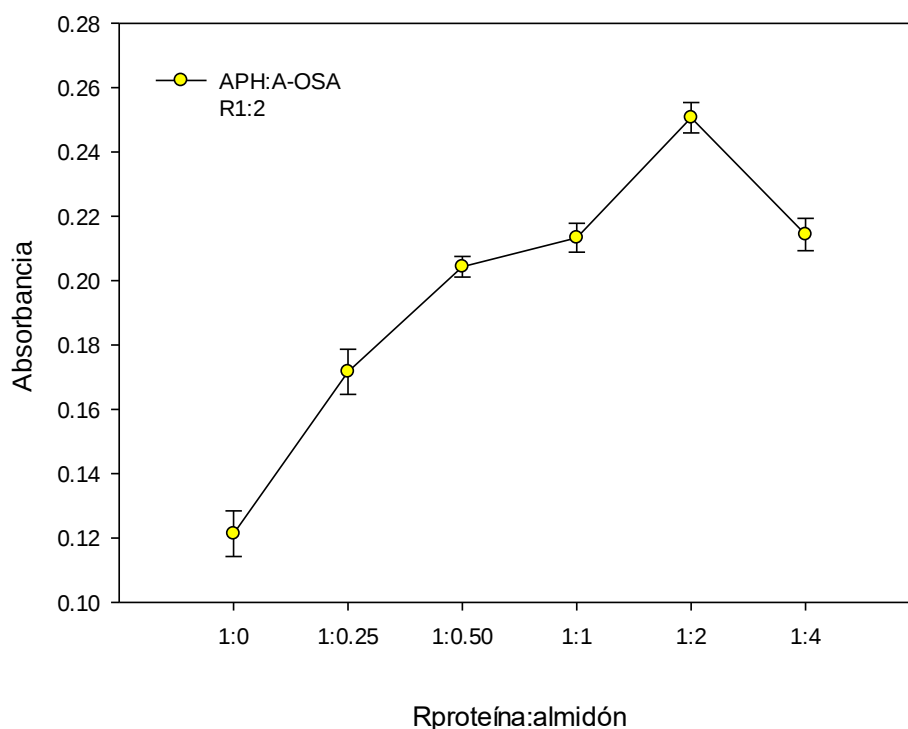


Figura 2. Absorbancia de complejos APH/A-OSA a pH 3.5 en diferentes relaciones

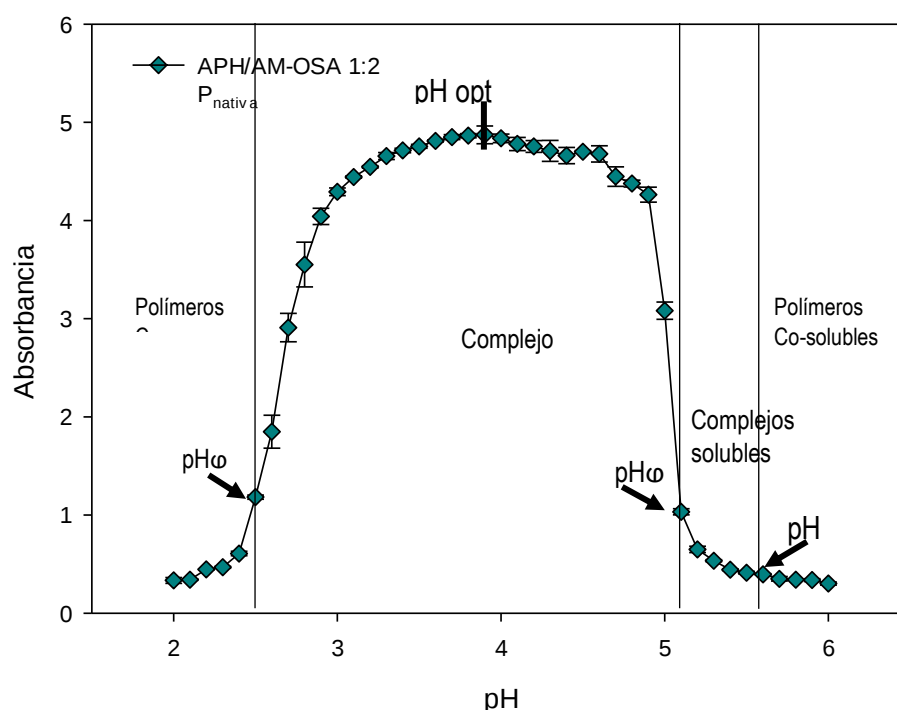
Valores críticos de pH

En la figura 3, se identificaron los valores críticos de pH, mediante la turbidez frente al pH en la mezcla de aislado de proteína de huauzontle y almidón modificado con OSA empleando la relación 1:2. Al modificar el pH de la mezcla de pH 6 a 2, donde el cambio de turbidez fue clave para identificar los puntos críticos de pH. La región que comprende el rango de pH de 6 a 5.4 se mantiene constante a lo que considera como una zona en la que los biopolímeros están de manera individual en el medio, a partir de pH de 5.4 se inicia un ligero aumento de la turbidez, así como la formación de complejos solubles en la zona pH_c , (Niu et al., 2014) reportan que a pH 4.18 inicia un ligero aumento de la turbidez considerando la formación de complejos solubles debido a que la proteína y el polisacárido tienen una carga neta negativa similar y por lo tanto se repelen, en un trabajo realizado por (Xu et al., 2021) representan cuatro puntos de transición al ir acidificando la mezcla de almidón modificado con OSA y quitosano, observaron que a pH de 8.4 o pH_c punto donde la turbidez se mantuvo constante, consideraron que los

grupos carboxilos disociados de almidón modificado con OSA le proporcionaron una alta carga negativa, dando lugar a una débil interacción electrostática, por lo que las mezclas se mantuvieron co-solubles. A este pH_c se considera el punto de partida para la formación de complejos solubles (Ru, Wang, Lee, Ding & Huang, 2012). En la zona donde se observa un aumento brusco de la absorbancia se inicia en la formación de complejos solubles, en esta región

Figura 3. Valores críticos de pH en un rango de 2 a 6 de aislado de proteína de huauzontle y almidón modificado con OSA

también se encuentra el pH_{opt} (pH 4). (Niu et al., 2014) mencionan que comportamiento se debe a que la carga neta de la proteína y el polisacárido se vuelve opuesta y se logran una equivalencia eléctrica a este pH. A pH 3 inicia a disminuir la turbidez de la mezcla debido a la carga negativa baja del polisacárido resultado de la protonación de los grupos carboxilo lo que limita la interacción proteína y polisacárido (Xu et al., 2021). Esta zona es conocida como punto de



disociación del complejo insoluble ($pH_{\omega 2}$) y la complejación termina.

Absorbancia

En la figura 4 se presenta la absorbancia frente al pH, se ajustó cada biopolímero a pH 7 a una relación 1:2 y se fue acidificando mediante la adición de HCl, estos complejos formados a diferente pH se almacenaron por 24 horas, posteriormente se midió la absorbancia que de acuerdo a (Cuevas-Bernardino et al., 2018; Hernández-Rodríguez et al., 2014); consideran que la mayor absorbancia después de centrifugar son complejos solubles ya que los complejos insolubles se caracterizan por presentar una baja absorbancia en el sobrenadante, debido a que

las partes de la proteína cargadas positivamente y el polisacárido cargado negativamente están sujetas a interacciones electrostáticas más fuertes que dan lugar a complejos estrechamente empaquetados con baja carga negativa (Xu et al., 2021). (Ghosh & Bandyopadhyay, 2012) nos permiten comprender este comportamiento mediante la siguiente descripción, la unión entre polisacáridos y proteínas aniónicas, a un pH ligeramente superior al pI de la proteína, la interacción que se da es entre los numerosos sitios reactivos del polisacárido y los pocos sitios reactivos de las proteínas, dando lugar a la formación de agregados aniónicos sueltos (proteína y polisacáridos), es decir, complejos solubles.

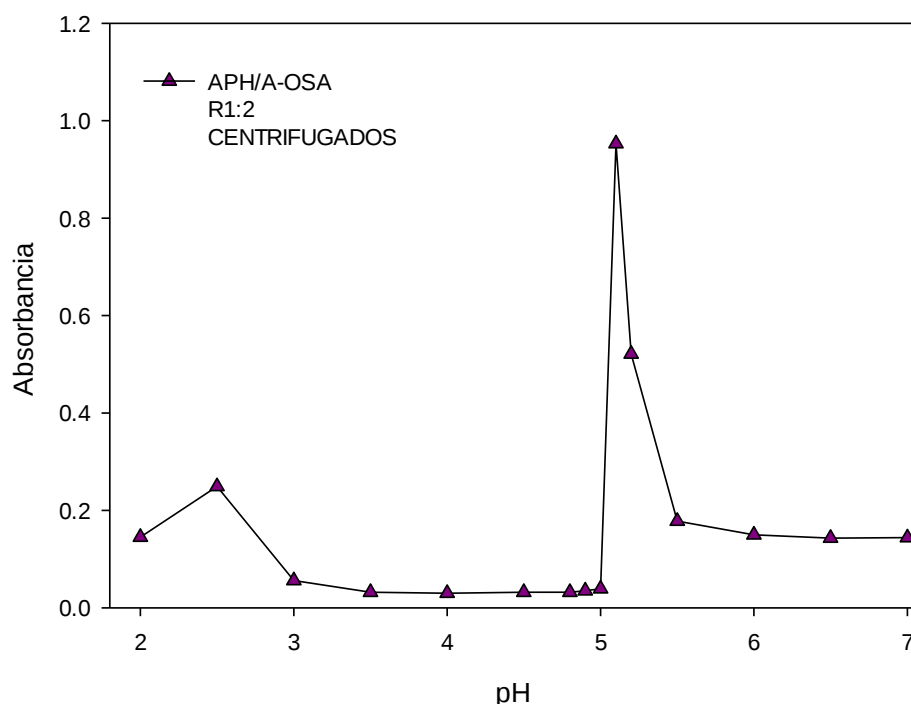


Figura 4. Absorbancia de la mezcla de aislado de proteína de huauzontle y almidón modificado con OSA en un rango de pH

Conclusiones

De la investigación se encontró que a pH 3.5 observó la mayor interacción entre el APH y AM-OSA, el cambio el pH puede afectar la formación de complejos solubles e insolubles al ser modificado, de la curva de turbidez se identificaron cuatro fases denominadas como valores críticos de pH, variable que permitió establecer el pH óptimo de formación de complejos solubles entre la proteína y el almidón modificado con OSA. Por otro lado, el uso de diferentes concentraciones permitió la caracterización de los complejos donde se obtuvo que el mayor número de cargas negativas pertenecen a la formación de complejos solubles, así como menor tamaño de partícula después de la centrifugación donde los complejos insolubles precipitan y los solubles se mantienen en el medio.

Literatura Citada

- Alvarez-Jubete, L., Arendt, E. K., & Gallagher, E.** (2010). Nutritive value of pseudocereals and their increasing use as functional gluten-free ingredients. In *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 21, Issue 2, pp. 106–113). <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2009.10.014>
- Bajaj, R., Singh, N., & Kaur, A.** (2019). Properties of octenyl succinic anhydride (OSA) modified starches and their application in low fat mayonnaise. *International Journal of Biological Macromolecules*, 131, 147–157. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.054>
- Cuevas-Bernardino, J. C., Leyva-Gutierrez, F. M. A., Vernon-Carter, E. J., Lobato-Calleros, C., Román-Guerrero, A., & Davidov-Pardo, G.** (2018). Formation of biopolymer complexes composed of pea protein and mesquite gum – Impact of quercetin addition on their physical and chemical stability. *Food Hydrocolloids*, 77, 736–745. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.11.015>
- Einhorn-Stoll, U., Archut, A., Eichhorn, M., & Kastner, H.** (2021). Pectin - Plant protein systems and their application. In *Food Hydrocolloids* (Vol. 118). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106783>
- Hernández-Rodríguez, L., Lobato-Calleros, C., Pimentel-González, D. J., & Vernon-Carter, E. J.** (2014). Lactobacillus plantarum protection by entrapment in whey protein isolate: κ -carrageenan complex coacervates. *Food Hydrocolloids*, 36, 181–188. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.09.018>
- López-Monterrubio, D. I., Lobato-Calleros, C., Alvarez-Ramirez, J., & Vernon-Carter, E. J.** (2020). Huauzontle (*Chenopodium nuttalliae* Saff.) protein: Composition, structure, physicochemical and functional properties. *Food Hydrocolloids*, 108. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106043>
- Loveday, S. M.** (2020). Plant protein ingredients with food functionality potential. In *Nutrition Bulletin* (Vol. 45, Issue 3, pp. 321–327). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/nbu.12450>
- Nikbakht Nasrabadi, M., Sedaghat Doost, A., & Mezzenga, R.** (2021). Modification approaches of plant-based proteins to improve their techno-functionality and use in food products. In *Food Hydrocolloids* (Vol. 118). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106789>
- Niu, F., Su, Y., Liu, Y., Wang, G., Zhang, Y., & Yang, Y.** (2014). Ovalbumin-gum arabic interactions: Effect of pH, temperature, salt, biopolymers ratio and total concentration. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 113, 477–482. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.08.012>
- Ru, Q., Wang, Y., Lee, J., Ding, Y., & Huang, Q.** (2012). Turbidity and rheological properties of bovine serum albumin/pectin coacervates: Effect of salt concentration and initial protein/polysaccharide ratio. *Carbohydrate Polymers*, 88(3), 838–846. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.01.019>
- The Complex World of Polysaccharides. (2012). In *The Complex World of Polysaccharides*. InTech. <https://doi.org/10.5772/2947>
- Turgeon, S. L., Schmitt, C., & Sanchez, C.** (2007). Protein-polysaccharide complexes and coacervates. In *Current Opinion in Colloid and Interface Science* (Vol. 12, Issues 4–5, pp. 166–178). <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2007.07.007>
- Weinbreck, F., Nieuwenhuijse, H., Robijn, G. W., & de Kruif, C. G.** (2004). Complexation of whey proteins with carrageenan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(11), 3550–3555. <https://doi.org/10.1021/jf034969t>

Xu, T., Jiang, C., Zhou, Q., Gu, Z., Cheng, L., Tong, Y., & Hong, Y. (2021). Complexation behavior of octenyl succinic anhydride starch with chitosan. *Food Hydrocolloids*, 119. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106848>

Digestibilidad, propiedades fisicoquímicas y estructurales del almidón de huauzontle modificado con anhídrido octenil succínico y ácido cítrico

*López-Monterrubio Diana I.¹, Lobato-Calleros Consuelo², Vernon-Carter E. Jaime³,
Alvarez-Ramirez Jose³*

Resumen

El almidón de huauzontle se modificó utilizando ácido cítrico y anhídrido octenilsuccínico. Los valores del grado de sustitución (DS) aumentaron significativamente junto con el incremento de la cantidad de ácido cítrico (AC) y anhídrido octenil succínico (OSA). Los gránulos de almidón de huauzontle son de forma irregular, angular y poligonal, con superficies casi lisas, con pocos poros en la superficie con un diámetro promedio de $1.37 \pm 0.09 \mu\text{m}$, que luego de la modificación tuvieron un incremento significativo. El contenido de almidón resistente aumentó con la modificación OSA, mientras que el contenido de almidón de digestión rápida disminuyó. Por otro lado, las propiedades de solubilidad, poder de hinchamiento y capacidad de retención de agua del almidón de huauzontle se mejoraron con ambas modificaciones.

Palabras clave: Huauzontle, anhídrido octenil succínico, ácido cítrico

Abstract

Huauzontle starch was modified using citric acid and octenylsuccinic anhydride. The substitution degree (DS) values increased significantly along with the increase in the amount of citric acid (CA) and octenyl succinic anhydride (OSA). Huauzontle starch granules are irregular, angular and polygonal in shape, with almost smooth surfaces, with few pores on the surface with average diameter of $1.37 \pm 0.09 \mu\text{m}$, which after modification had a significant increase. Resistant starch content increased with the OSA modification, while rapidly digestible starch content decreased. On the other hand, the solubility properties, swelling power and water retention capacity of huauzontle starch were improved with both modifications.

Keywords: Huauzontle, octenyl succinic anhydride, citric acid

¹Posgrado en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, Universidad Autónoma Chapingo. Km. 38.5 Carr. México-Texcoco, Texcoco, Estado de México, México, 56230. Correo: ixelmonterrubio@gmail.com

²Departamento de Preparatoria Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. Km. 38.5 Carr. México-Texcoco, Texcoco, Estado de México, México, 56230. Correo: consuelobato@yahoo.com

³Departamento de Ingeniería de Procesos e Hidráulica, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Av. San Rafael Atlixco No. 186, Col. Vicentina, Delegación Iztapalapa, CDMX, México, 09340. Correo: jvc@xanum.uam.mx, jjar1963@gmail.com

Introducción

El almidón es una de las macromoléculas más abundantes en la naturaleza y juega un papel muy importante en diversas aplicaciones industriales, como la fabricación de papel, empaques, textiles

y alimentos, por nombrar algunos. Y aunque los almidones nativos generan buenas propiedades de pegado y reológicas en el calentamiento a altas temperaturas, su modificación nos ayuda a mejorar sus propiedades funcionales incluso a temperaturas bajas, mejorando así sus usos potenciales y relevancia (Ayo-Omogie et al., 2022). En este sentido, el ácido cítrico (ácido 2-hidroxipropano-1,2,3-tricarboxílico) es un compuesto orgánico generalmente reconocido como seguro (GRAS) (Miskeen et al., 2021), y la modificación del almidón con ácido cítrico produce ésteres de almidón al hacer reaccionar el grupo hidroxilo del almidón con el grupo carboxílico del ácido cítrico para formar un enlace covalente (Zehra et al., 2020). Este tipo de modificación ha demostrado ser eficiente para mejorar las propiedades mecánicas e hidrofóbicas de los almidones nativos (Miskeen et al., 2021). Por su parte, la esterificación con anhídrido octenil succínico (OSA) mejora las propiedades emulsionantes y anfífilas de los almidones, donde los grupos hidroxilo del almidón son reemplazados por componentes hidrofóbicos.

Por otro lado, las principales fuentes de almidón para la industria han sido el maíz, el arroz, el trigo, la patata y la yuca (Khurshida et al., 2021). Sin embargo, según las perspectivas socioeconómicas, en las últimas décadas se ha buscado el aprovechamiento de cultivos subvalorados ya que podrían ser fuentes no convencionales valiosas para la obtención de biopolímeros, diversificando así el uso de recursos botánicos y promover la economía de los productores de bajos ingresos, así como promover la reducción de los problemas de sobreexplotación y contaminación (García-Valle et al., 2021). Una ventaja adicional es que son de bajo costo, abundantes en la naturaleza y de carácter hipoalergénico (Li et al., 2021). En este sentido, el huauzontle es un pseudocereal de origen mexicano subvaluado, con un alto contenido de almidón (50 % peso seco) y con un tamaño de gránulo relativamente pequeño (0.5-2 μm) (Hernández-Barrueta, et al., 2020; Assad- Bustillos et al., 2014). Existen pocos estudios sobre el almidón de huauzontle y menos aún sobre su modificación. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar las características estructurales, fisicoquímicas, funcionales y nutricionales del almidón de huauzontle nativo, modificado con ácido cítrico y anhídrido octenilsuccínico.

Materiales y métodos

Se obtuvieron semillas de huauzontle (*Chenopodium nuttalliae* saff.) de un productor local de la comunidad de Tepoztlán, Morelos, México, con coordenadas GPS de 18° 59' 7" N y 99° 5' 59" W y una elevación sobre el nivel del mar de 1706 metros. El anhídrido octenil succínico (OSA) se adquirió de Sigma Aldrich (St Louis, MO, EE. UU.). El ácido cítrico (CA) se adquirió de Merck (Naucalpan, Estado de México, México). El agua utilizada en todos los experimentos fue destilada y desionizada.

Aislamiento de almidón de huauzontle

El almidón se extrajo mediante la metodología utilizada por Medina et al. (2010), con algunas modificaciones. Las semillas de huauzontle se limpiaron manualmente para eliminar las impurezas y se remojaron en agua destilada durante 1 hora en una relación de masa/volumen de 1:6. Posteriormente se molieron en una licuadora (Oster 465-15, Newell Brands de México S.A.

de C.V., Ciudad de México, México) durante 1 minuto, obteniéndose una lechada que posteriormente se filtró a través de muselina tres veces. La suspensión se centrifugó a 6500 rpm durante 10 min, a 21 °C en una centrífuga (Modelo 5810R, Eppendorf, Hamburgo, Alemania), se eliminó el sobrenadante y el sedimento se lavó con agua destilada y se centrifugó a 6500 rpm durante 10 min. , a 21 °C, tres veces más. El almidón se secó en una estufa de circulación de aire a 40 °C durante 24 horas (HCF-62, Riossa Digital, Puebla, Estado de Puebla, México).

Composición química

Los análisis de humedad, cenizas, fibra bruta, proteína total y lípidos totales se realizaron utilizando los métodos de la AOAC (2000). Los carbohidratos libres de nitrógeno totales se calcularon por la diferencia {100 - (% proteína + % lípidos + % fibra + % ceniza)}. La proteína total se determinó por el método de Kjeldhal (N: 6.25). El almidón total se estimó utilizando el kit GPOD (reactivo de glucosa oxidasa/peroxidasa). De acuerdo con las instrucciones del kit, el contenido de glucosa se determinó a 540 nm (Marboh & Mahanta, 2021). El contenido aparente de amilosa se determinó según el método de unión de yodo (Zhu et al., 2008).

Preparación de almidones modificados

Modificación del almidón de huauzontle con OSA

El almidón de huauzontle se modificó con OSA siguiendo la metodología de López-Silva et al. (2019). Brevemente, se dispersó almidón de huauzontle (30 g, peso seco) en 100 ml de agua destilada con agitación suave. El pH de la suspensión se ajustó a 8.75 utilizando una solución de NaOH 0.1M (potenciómetro modelo pH120, Conductronic, Puebla, Estado de Puebla, México). Se añadió lentamente una cantidad pesada de OSA (1.5 % y 3.0 % de la base de almidón seca) mientras se controlaba el pH a 8.75. Se permitió que la reacción prosiguiera durante un total de 6 horas a 25 °C. Después de la reacción, el pH se ajustó a 7 con una solución de HCl (1 M). La mezcla se centrifugó y se lavó dos veces con agua destilada y una vez con acetona. El almidón modificado con OSA se secó en estufa a 35 °C durante 24 h. A continuación, el almidón seco se molió con un mortero y se almacenó en recipientes herméticos.

Modificación del almidón de huauzontle con ácido cítrico

El almidón de huauzontle se modificó con ácido cítrico con el procedimiento descrito por Alimi y Workneh (2018). Se dispersó almidón de huauzontle nativo (50 g) en agua destilada (67 mL) para formar una suspensión. La suspensión se llevó a pH alcalino (alrededor de 9) mediante la adición de 10 ml de NaOH 1 M y se mantuvo durante 30 min. La suspensión se agitó intermitentemente durante el período de mantenimiento. Se preparó una solución ácida (100 ml, 15 % de ácido cítrico y 1 % de ácido sulfúrico en peso seco de almidón) y se añadió a la suspensión alcalina. La mezcla se dejó durante 5 h en las condiciones predominantes en el laboratorio. Luego la mezcla se lavó con 600 mL de agua destilada y se centrifugó a 5000 rpm por 5 min para eliminar el exceso de líquido y se secó en una estufa de aire caliente convectivo a 50 °C por 24 h. Los sólidos secos se molieron, empaquetaron y almacenaron en recipientes herméticos.

Grado de sustitución (DS)

El DS se determinó mediante un método de titulación (Lopez-Silva et al., 2020). Brevemente, se dispersó almidón modificado (1.25 g) agitando durante 30 min en 12.5 ml de una solución de HCl 0.1 M. Posteriormente, la muestra se centrifugó a 3000g durante 10min. El precipitado se

lavó con etanol (90 %) y con agua destilada, en proporciones 1:2. El almidón se resuspendió en 75 mL de agua destilada y se sometió a un baño de agua hirviendo durante 10 min y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Luego, se tituló con una solución estándar de NaOH 0.1 N hasta pH 8.3 y como referencia se tituló almidón nativo. El DS se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$DS = \frac{0.162 \times \frac{A \times M}{W}}{1 - \left(Z \times \frac{A \times M}{W} \right)} \quad (1)$$

donde A es el volumen de titulación de la solución de NaOH (mL), M es la molaridad de la solución de NaOH, W es el peso seco (g) del almidón modificado y Z es el peso molecular de OSA o AC.

Morfología de los gránulos

Distribución del tamaño de las partículas

La distribución de tamaños de los gránulos de almidón se determinó mediante análisis de difracción láser (Mastersizer 3000, Malvern Instruments Ltd., Malvern, Reino Unido). La muestra de almidón crudo (50 mg, peso seco) se suspendió en 5 ml de agua y se agitó suavemente para dispersar los gránulos de almidón. La suspensión se añadió lentamente a Mastersizer y el oscurecimiento estuvo en el intervalo de 15-20 %.

Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Se utilizó microscopía electrónica de barrido para evaluar la morfología y el aspecto general de los gránulos de almidón. El microscopio se hizo funcionar con un voltaje de aceleración de 5 kV con un aumento de 10000×. El almidón seco se montó sobre soportes de aluminio y se cubrió con una fina capa de oro (5 nm) y luego se observó en un microscopio electrónico de barrido (JSM-6390LV, JEOL, Tokio, Japón).

Digestibilidad del almidón in vitro

El día de la determinación se preparó una solución enzimática según Ye et al. (2019). Brevemente, se suspendió α -amilasa pancreática (0,0225 g, 10 U/mg) en 7,5 ml de agua destilada con agitación magnética durante 30 min y luego se centrifugó a 1500 xg durante 5 min. El sobrenadante se transfirió a un vaso de precipitados y se mezcló con 0,75 ml de amiloglucosidasa (260 U/ml). El HS crudo (0,5 g) se dispersó en 25 ml de agua desionizada y se equilibró a 37 °C durante 30 min con agitación en un baño de agua.

La digestión in vitro del almidón de huauzontle se realizó mediante la metodología utilizada por Lee & Chang (2019) con ligeras modificaciones. Se agregaron 0.75 mL de la solución enzimática a cada muestra. Las muestras de almidón se incubaron a 37 °C con ligera agitación durante 120 min. Se tomaron alícuotas a los tiempos 0 min, 20 min y 120 min. Para la determinación cuantitativa de azúcares reductores se utilizó el método DNS (Miller, 1959). Se obtuvo una curva estándar midiendo la absorbancia a 540 nm de concentraciones conocidas de soluciones de glucosa. Las mediciones se realizaron por duplicado para cada muestra y los datos proporcionados son un promedio de estos resultados. Para la determinación de la digestibilidad en almidón gelatinizado: el almidón de huauzontle (0.5 g) se dispersó en 25 mL de agua

destilada y se calentó (90 °C, 10 min) con agitación suave continua hasta la gelatinización completa de los gránulos de almidón. Posteriormente, la dispersión se enfrió a 37 °C para proceder con las pruebas de digestibilidad in vitro mediante el procedimiento utilizado para las muestras crudas descrito anteriormente.

Los porcentajes de las fracciones RDS (almidón de digestión rápida), SDS (almidón de digestión lenta) y RS (almidón resistente) en las muestras se calcularon utilizando las siguientes ecuaciones:

$$RDS = \frac{(G_{20}-FG) \times 0.9}{TS} \quad (2)$$

$$SDS = \frac{(G_{120}-G_{20}) \times 0.9}{TS} \quad (3)$$

$$RS = \frac{TS-RDS-SDS}{TS} \quad (4)$$

donde FG es el contenido de glucosa libre, TS es el contenido total de almidón, G20 y G120 representan las cantidades de glucosa liberada en 20 y 120 min de hidrólisis de la muestra.

Poder de hinchamiento y solubilidad

El poder de hinchamiento y la solubilidad de las muestras de almidón se determinaron a temperaturas de 60, 70, 80 y 90 °C según el método descrito por de Castro et al. (2018). Muestras de almidón de huauzontle (25 mg) se pesaron por triplicado en tubos de ensayo de polipropileno de 15 mL previamente tarados, se les añadió 10 mL de agua destilada y se homogeneizaron en vortex durante 30 s. Posteriormente los tubos se colocaron al baño maría a temperaturas de 60, 70, 80 y 90 °C por 30 min, aplicando homogeneización cada 10 min. Luego, las dispersiones de almidón se centrifugaron a 3200 rpm durante 15 min. El sobrenadante se recolectó, se colocó en un vaso de precipitados previamente pesado y se llevó a la estufa a 105 °C por 24 h, para determinar el peso de almidón soluble. El índice de solubilidad y el poder de hinchamiento se calcularon usando las ecuaciones que se dan a continuación:

$$Solubility(\%) = \frac{Weight\ of\ dried\ supernatant}{Weight\ of\ sample} \times 100 \quad (5)$$

$$Swelling\ power\ \left(\frac{g}{g}\right) = \frac{Weight\ of\ sediment\ paste}{Weight\ of\ sample \times (100 - \% Solubility)} \quad (6)$$

Capacidad de retención de agua

Para determinar la capacidad de retención de agua del almidón de huauzontle se utilizó el método de Beuchat (1977). Se colocó una muestra de almidón crudo (1 g) en un tubo de centrífuga y se le añadieron 10 ml de agua destilada. La suspensión se homogeneizó en vortex durante 30 s y se dejó reposar durante 30 min. Posteriormente, el tubo se centrifugó durante 15 min a 3000 rpm y se descartó el sobrenadante. Se secaron las paredes externas de los tubos y se pesaron estos últimos. La masa de agua absorbida se expresó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$WHC = (Weight\ of\ tube\ with\ wet\ sample - weight\ of\ tube\ with\ dry\ sample) \times 100 \quad (7)$$

Resultados

Características químicas del almidón nativo

La composición química del almidón nativo de huauzontle (**Cuadro 1**) mostró que el contenido de carbohidratos (97.35 ± 0.10 %) fue muy superior al contenido de proteína (1.43 ± 0.01 %) y grasa (0.30 ± 0.02 %). Esto es indicativo de un buen proceso de aislamiento (Felisberto et al., 2019). Un parámetro importante es la pureza de la muestra, por lo cual se realizó la determinación del almidón total. En este caso, el contenido de almidón total fue de 93.50 ± 1.52 %, lo cual denota una alta pureza en la muestra (Patiño-Rodríguez et al., 2020).

El contenido de amilosa y amilopectina fue de 10.58% y 89.42%, respectivamente. Esto concuerda con lo reportado por Assad-Bustillos et al. (2014) para almidón de huauzontle (10 %), y superior a lo informado por Remanan y Zhu (2020) para almidón de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd., 6.3 %) pero inferior a lo informado por Leal-Castañeda et al. (2018) para amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*, 22.3 ± 0.3 %). El contenido de amilosa depende de las características de la cadena amilosa-amilopectina en cada almidón (Zabot et al., 2019), lo cual está influenciado por las características botánicas y los métodos de determinación (de Castro et al., 2018).

Cuadro 1. Composición química del almidón nativo de semilla de huauzontle

Componente	% en base seca
Cenizas	0.68 ± 0.02
Proteína	1.43 ± 0.01
Grasa	0.30 ± 0.02
Carbohidratos totales	97.35 ± 0.10
Amilosa	10.58 ± 0.05
Amilopectina	89.42 ± 0.05
Almidón total	93.50 ± 1.52

Grado de sustitución (DS)

Se utilizaron dos concentraciones de ácido cítrico (15 % y 30 %) y dos concentraciones del reactivo OSA (1.5 % y 3.0 %) para determinar la influencia de la concentración sobre el grado

de sustitución del almidón de huauzontle, estos datos se muestran en la **Cuadro 2**. Como era de esperarse, los valores de DS aumentaron significativamente junto con el incremento de los porcentajes de AC y OSA. Este resultado de acuerdo con Wu et al. (2020a), quienes informaron que los valores de DS en el almidón de canna aumentaron significativamente de 0.079 a 0.239 a medida que el ácido cítrico aumentaba del 20 % al 40 %. Asimismo, Krolikowska et al. (2017), que los valores de DS en almidón de papa aumentaron de 0.0115 a 0.0277 a medida que la OSA aumentó de 3 a 9 %.

Cuadro 2. Grado de sustitución y tamaño de almidones de huauzontle nativos y modificados

Tratamiento	DS	Tamaño (μm)
Native	-	1.37 ± 0.09^d
OSA 1.5	0.0086 ± 0.0004^b	1.43 ± 0.08^d
OSA 3.0	0.0101 ± 0.0004^a	1.79 ± 0.13^c
AC 15	0.0074 ± 0.0007^b	2.55 ± 0.22^b
AC 30	0.0109 ± 0.0004^a	2.89 ± 0.18^a

a,b,c,d Las medias en la misma columna con diferentes superíndices fueron significativamente diferentes ($p \leq 0.05$).

Propiedades morfológicas

La estructura de los almidones de huauzontle nativo y modificado se presentan en la Figura 1. Los gránulos de almidón de huauzontle nativo presentan forma irregular, angular y poligonal, con superficies casi lisas (**Figura 1**). Después de la esterificación con OSA, se observaron cavidades en las superficies de los gránulos. Yu et al. (2019), obtuvieron resultados similares y sugirieron que la modificación de la superficie de los gránulos fue causada por el efecto del tratamiento con NaOH durante la esterificación. Por su parte, el almidón modificado con ácido cítrico mostró pérdida de estructura de gránulos y aglomeración de gránulos, que fue más notable con el aumento de la concentración de ácido cítrico. La adición de hidróxido de sodio durante el tratamiento ácido cítrico provocó el hinchamiento de los gránulos, lo que indujo tensión en los cristales adyacentes y deformó los gránulos de almidón (Zehra et al., 2020).

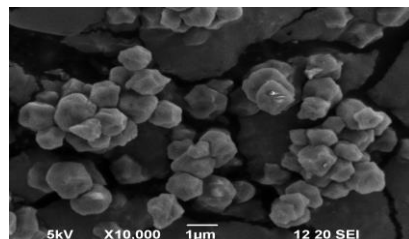
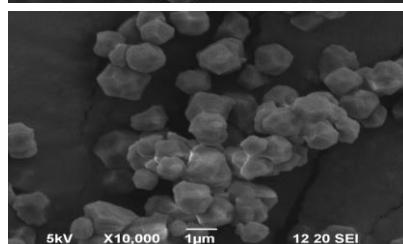
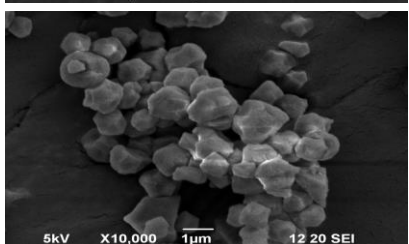
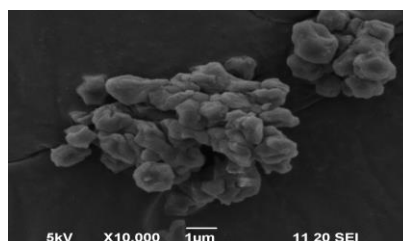
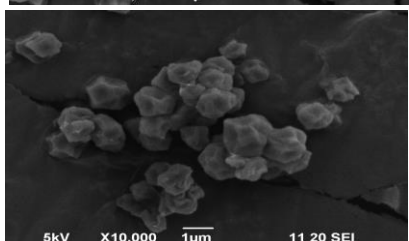


Figura 2.- Microscopía electrónica de barrido de almidones de huauzontle nativos y modificados. a) Almidón nativo, b) CA15, c) CA30, d) OSA1.5, e) OSA3.0.



Los gránulos de almidón nativo de huauzontle presentaron un diámetro promedio de $1.37 \pm 0.09 \mu\text{m}$, lo que lo clasifica como un gránulo muy pequeño (Yao *et al.*, 2020), y fue similar al tamaño que presentaron los almidones nativos de *Chenopodium quinoa* y *Amaranthus caudatus* ($1-2 \mu\text{m}$, Fuentes *et al.*, 2019). El almidón de huauzontle modificado con ácido cítrico y OSA exhibió un tamaño de gránulo medio significativamente mayor en comparación con el almidón nativo (Cuadro 2), pero exhibió una distribución de tamaño gaussiana. El aumento en el tamaño medio de los gránulos fue significativamente mayor para los almidones modificados con ácido cítrico que para los modificados con OSA. El aumento de tamaño medio podría atribuirse a la hidrólisis ácida suave de los gránulos de almidón (Shaikh *et al.*, 2019). Para los tratamientos de OSA, el aumento de tamaño podría ser el resultado del aumento de la hidrofobicidad superficial de los gránulos de almidón resultantes de las regiones hidrofóbicas de la molécula de OSA (Li *et al.*, 2019b).

Digestibilidad *in vitro*

El porcentaje de fracciones RDS, SDS y RS para el almidón de huauzontle nativo y modificado (crudo y gelatinizado) se puede observar en la Cuadro 3. En este trabajo, se encontró que la fracción RDS para los almidones crudos nativos y modificados con OSA era extremadamente baja ($< 7\%$), mientras que la fracción RS era extremadamente alta ($> 90\%$) en comparación con la de sus contrapartes gelatinizadas. Esto fue similar a lo reportado por Chávez-Salazar *et al.* (2022) para plátanos verdes, donde los almidones nativos crudos tenían una fracción de RS de 90.0 ± 1.5 y los almidones crudos modificados con (3 % OSA) tenían una fracción de RS de 92.2 ± 0.2 , sus contrapartes gelatinizadas tenían un contenido de RS de 25.2 ± 0.5 y 28.5 ± 1.6 respectivamente. El aumento de la fracción RS en almidones modificados con OSA se ha relacionado previamente con la sustitución de grupos OH por grupos voluminosos de octenil succinato, dando como resultado una estructura que dificulta el reconocimiento enzimático (Chávez-Salazar *et al.*, 2022). Resultados similares fueron encontrados por No *et al.* (2019), quienes informaron que el almidón de arroz modificado con OSA mostró un aumento significativo del contenido de la fracción RS y una disminución del contenido de la fracción RDS.

Cuadro 3. Digestibility of native and modified huauzontle starches.

Almidón crudo				
Sample	RDS	SDS	RS	SDS+RS
Nativo	6.01 ± 0.04^c	28.60 ± 1.37^a	65.39 ± 1.41^b	93.99 ± 0.04^b
OSA 1.5	4.30 ± 0.03^d	4.31 ± 0.57^d	91.38 ± 0.53^a	95.7 ± 0.03^a
OSA 3.0	3.84 ± 0.01^d	3.88 ± 0.06^d	92.28 ± 0.07^a	96.16 ± 0.01^a
AC15	18.87 ± 0.56^b	14.59 ± 0.45^c	67.54 ± 1.02^b	82.13 ± 0.56^c
AC30	26.30 ± 0.35^a	23.32 ± 0.60^b	50.37 ± 0.94^c	73.70 ± 0.35^d
Almidón gelatinizado				
Nativo	37.06 ± 1.21^b	37.78 ± 0.14^a	25.16 ± 1.07^c	62.94 ± 1.21^c
OSA 1.5	29.61 ± 0.35^{cd}	35.82 ± 2.91^a	34.56 ± 3.26^{ab}	70.39 ± 0.35^{ab}
OSA 3.0	25.84 ± 2.81^d	34.29 ± 2.78^a	39.87 ± 0.03^a	74.16 ± 2.81^a
AC15	34.67 ± 0.94^{bc}	33.28 ± 2.30^a	32.05 ± 1.36^{bc}	65.33 ± 0.94^{bc}

AC30	51.70 ± 0.38^a	9.91 ± 1.02^b	38.39 ± 1.39^{ab}	48.30 ± 0.38^d
-------------	--------------------	-------------------	-----------------------	--------------------

^{a,b,c,d} Las medias en la misma columna con diferentes superíndices fueron significativamente diferentes ($p \leq 0.05$).

A diferencia de otros estudios, el almidón de huauzontle modificado con 30 % de ácido cítrico mostró un contenido menor de la fracción RS que su contraparte nativa. Esto podría deberse a la pérdida de la estructura cristalina durante la modificación ácida, lo que facilitaría la actividad enzimática.

Después de la cocción, todos los tratamientos tendieron a presentar un aumento en las fracciones RDS y SDS y una disminución en la fracción RS. Lo cual se puede atribuir a la descomposición de la estructura del gránulo durante el proceso de cocción, facilitando así la actividad enzimática (Wang et al., 2017). Durante el proceso de cocción, la doble hélice que forma los cristallitos de almidón sufre una ruptura y/o reorientación, lo que afecta las proporciones de las fracciones RDS, SDS y RS durante la digestión (Zhang et al., 2017).

Poder de hinchamiento y solubilidad

En general, el poder de hinchamiento de los almidones aumentó con el aumento de la temperatura de calentamiento. El calentamiento provoca la lixiviación de la amilosa, favoreciendo así la absorción de agua y el hinchamiento del gránulo de almidón; durante este proceso se disuelve la estructura cristalina del almidón y se exponen los grupos hidroxilo de la amilosa y la amilopectina, promoviendo la unión de las moléculas de agua (Zehra et al., 2020). Se puede observar en la **Figura 2** que los almidones de huauzontle modificados con ácido cítrico y OSA exhibieron un poder de hinchamiento relativamente mayor que el almidón nativo. El mayor poder de hinchamiento de los almidones esterificados se puede atribuir a la mejor percolación del agua debido al impedimento estérico y la repulsión de los grupos OSA agregados (Park et al., 2020), así como a la incorporación de múltiples grupos carboxilo presentes en el ácido cítrico, aumento la percolación de agua en el interior (Zehra et al., 2020).

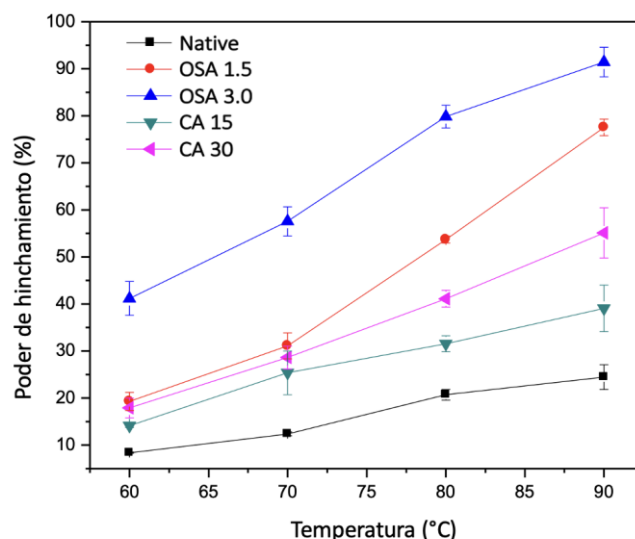


Figura 2. Poder de hinchamiento de almidones nativos y modificados de huauzontle a diferentes temperaturas.

La solubilidad de los almidones de huauzontle nativos y tratados se muestra en la **Figura 3**. El aumento de la solubilidad con el aumento de la temperatura se observó tanto en los almidones nativos como en los modificados, como resultado de la lixiviación de las cadenas de amilosa (Mei et al., 2015). Cuando el almidón se modificó con ácido cítrico, se produjo una leve hidrólisis parcial (Shaikh et al., 2019), produciendo un mayor contenido de amilosa de cadena corta que se disocia y difunde fácilmente, favoreciendo así la solubilidad del gránulo de almidón (Duyen et al., 2020). La modificación OSA provocó una reorganización estructural y la ruptura de los enlaces en la zona amorfa del gránulo de almidón por efecto del impedimento estérico, favoreciendo así una rápida penetración del agua y una mayor lixiviación de la amilosa (Li et al., 2019c; Zhang et al., 2021).

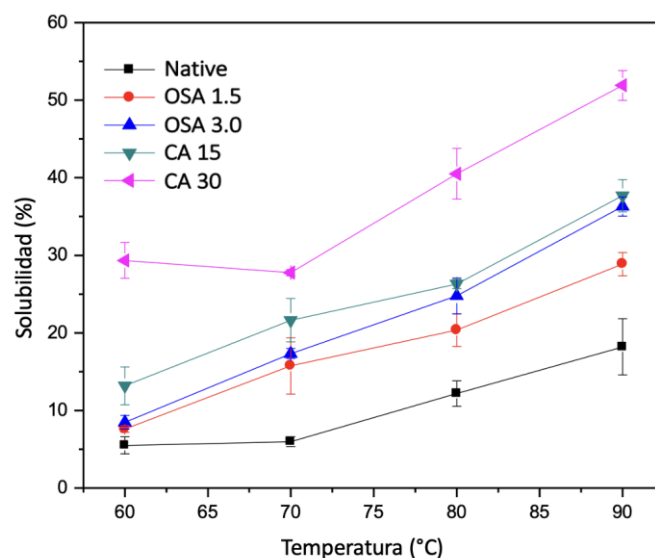


Figura 3. Solubilidad de almidones nativos y modificados de huauzontle a diferentes temperaturas.

Capacidad de retención de agua

La alta capacidad de absorción de agua que presenta el almidón de huauzontle (**Figura 4**) podría deberse a su reducido tamaño de partícula, ya que los tamaños de partícula pequeños favorecen una alta absorción de agua (Zabot et al., 2019). Una molécula de ácido cítrico tiene tres grupos carboxílicos que al reaccionar con la molécula de almidón forma una estructura entrecruzada, estos entrecruzamientos se forman cuando dos grupos carboxílicos de una molécula de ácido cítrico esterifican dos cadenas de almidón diferentes, dejando un grupo carboxílico del ácido cítrico libre para interactuar con una molécula de agua, favoreciendo así la capacidad de retención de agua del almidón (Zehra et al., 2020). Por otro lado, la modificación con OSA indujo cadenas carbonadas hidrofóbicas en las regiones amorfas del almidón, debilitando los puentes de hidrógeno que mantienen unidas las moléculas de almidón, aumentando considerablemente su capacidad de hidratación (Yao et al., 2020).

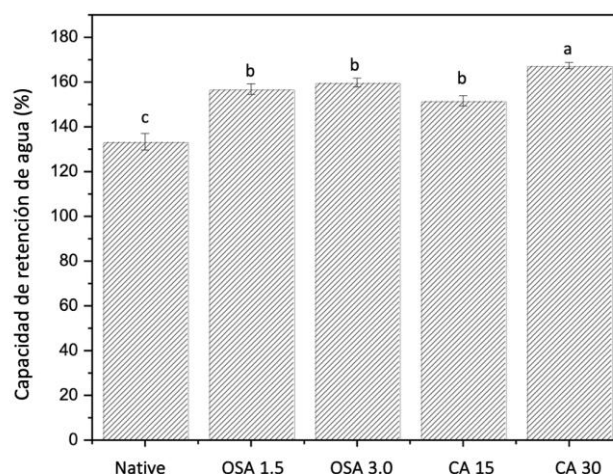


Figura 4. Capacidad de retención de agua de los almidones de huauzontle nativos y modificados

Conclusiones

En este estudio se encontró que el grado de sustitución de los almidones modificados influyó en las propiedades tecnofuncionales, nutricionales y estructurales del gránulo. El poder de hinchamiento y la capacidad de retención de agua fue mayor para los almidones modificados en comparación con el almidón nativo de huauzontle. La fracción de RS, fue mayor en almidones modificados con OSA en comparación con los del almidón nativo, mientras que los almidones modificados con ácido cítrico mostraron un comportamiento contrario, se necesitan más estudios sobre la influencia de la modificación química del ácido cítrico. El estudio morfológico mostró que el almidón de huauzontle es un gránulo muy pequeño, de forma poligonal con superficies casi lisas, características ideales para su aplicación en productos ricos en grasas como sustituto de grasas. Los mayores valores de poder de hinchamiento que presentan en los almidones OSA los que los hace ideales para su aplicación como espesantes alimentarios.

Literatura Citada

- Ayo-Omogie, H. N., Johnson, O. O., Awolu, O. O., & Oluwajuyitan, T. D. (2022). Physicochemical, Functional, Pasting Properties and Fourier Transform Infrared Spectroscopy of Pure and Modified Cardaba Banana (*Musa ABB*) Starches. *Food Chemistry Advances*. 100076. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2022.100076>
- Alimi, B. A., & Workneh, T. S. (2018). Structural and physicochemical properties of heat moisture treated and citric acid modified acha and iburu starches. *Food Hydrocolloids*, 81, 449-455. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.03.027>
- Assad-Bustillos, M., Ramírez-Gilly, M., Tecante, A., & Chaires-Martínez, L. (2014). Physicochemical, functional, thermal and rheological characterization of starch from huauzontle seeds (*Chenopodium berlandieri* spp. *nuttalliae*). *Agrociencia*, 48(8).
- Beuchat, L. R. (1977). Functional and electrophoretic characteristics of succinylated peanut flour protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 25(2), 258-261. <http://dx.doi.org/10.1021/jf60210a044>

- Chávez-Salazar, A., Álvarez-Barreto, C. I., Hoyos-Leyva, J. D., Bello-Pérez, L. A., & Castellanos-Galeano, F. J.** (2022). Drying processes of OSA-modified plantain starch trigger changes in its functional properties and digestibility. *LWT*, 154, 112846. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112846>
- de Castro, D. S., dos Santos Moreira, I., de Melo Silva, L. M., Lima, J. P., da Silva, W. P., Gomes, J. P., & de Figueirêdo, R. M. F.** (2018). Isolation and characterization of starch from pitomba endocarp. *Food Research International*, 124, 181-187. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.06.032>
- Duyen, T. T. M., Huong, N. T. M., Phi, N. T. L., & Van Hung, P.** (2020). Physicochemical properties and in vitro digestibility of mung-bean starches varying amylose contents under citric acid and hydrothermal treatments. *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, 651-658. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.187>
- Felisberto, M. H. F., Beraldo, A. L., Costa, M. S., Boas, F. V., Franco, C. M. L., & Clerici, M. T. P. S.** (2019). Physicochemical and structural properties of starch from young bamboo culm of *Bambusa tuldoidea*. *Food Hydrocolloids*, 87, 101-107. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.07.032>
- García-Valle, D. E., Agama-Acevedo, E., del Carmen Nuñez-Santiago, M., Álvarez-Ramírez, J., & Bello-Pérez, L. A.** (2021). Extrusion pregelatinization improves texture, viscoelasticity and in vitro starch digestibility of mango and amaranth flours. *Journal of Functional Foods*, 80, 104441. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104441>
- Hernández-Barrueta, T., Martínez-Bustos, F., Castaño-Tostado, E., Lee, Y., Miller, M. J., & Amaya-Llano, S. L.** (2020). Encapsulation of probiotics in whey protein isolate and modified huauzontle's starch: An approach to avoid fermentation and stabilize polyphenol compounds in a ready-to-drink probiotic green tea. *LWT*, 124, 109131. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109131>
- Khurshida, S., Das, M. J., Deka, S. C., & Sit, N.** (2021). Effect of dual modification sequence on physicochemical, pasting, rheological and digestibility properties of cassava starch modified by acetic acid and ultrasound. *International Journal of Biological Macromolecules*, 188, 649-656. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.08.062>
- Królikowska, K., Fortuna, T., Pietrzyk, S., & Gryszkin, A.** (2017). Effect of modification of octenyl succinate starch with mineral elements on the stability and rheological properties of oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids*, 66, 118-127. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.12.012>
- Leal-Castañeda, E. J., García-Tejeda, Y., Hernández-Sánchez, H., Alamilla-Beltrán, L., Téllez-Medina, D. I., Calderón-Domínguez, G., ... & Gutiérrez-López, G. F.** (2018). Pickering emulsions stabilized with native and lauroylated amaranth starch. *Food Hydrocolloids*, 80, 177-185. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.01.043>
- Lee, Y. K., & Chang, Y. H.** (2019). Structural and in vitro digestibility properties of esterified maca starch with citric acid and its application as an oil-in-water (O/W) pickering emulsion stabilizer. *International journal of biological macromolecules*, 134, 798-806. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.05.081>
- Li, S., Zhang, B., Tan, C. P., Li, C., Fu, X., & Huang, Q.** (2019b). Octenylsuccinate quinoa starch granule-stabilized Pickering emulsion gels: Preparation, microstructure and gelling mechanism. *Food Hydrocolloids*, 91, 40-47. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.01.001>

- Li, G., Xu, X., & Zhu, F.** (2019). Physicochemical properties of dodecenyl succinic anhydride (DDSA) modified quinoa starch. *Food chemistry*, 300, 125201. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125201>
- Liang, S., Hong, Y., Gu, Z., Cheng, L., Li, C., & Li, Z.** (2021). Effect of debranching on the structure and digestibility of octenyl succinic anhydride starch nanoparticles. *LWT*, 141, 111076. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111076>
- Lopez-Silva, M., Bello-Perez, L. A., Agama-Acevedo, E., & Alvarez-Ramirez, J.** (2019). Effect of amylose content in morphological, functional and emulsification properties of OSA modified corn starch. *Food Hydrocolloids*, 97, 105212. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105212>
- Lopez-Silva, M., Bello-Perez, L. A., Castillo-Rodriguez, V. M., Agama-Acevedo, E., & Alvarez-Ramirez, J.** (2020). In vitro digestibility characteristics of octenyl succinic acid (OSA) modified starch with different amylose content. *Food chemistry*, 304, 125434. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125434>
- Marboh, V., & Mahanta, C. L.** (2021). Physicochemical and rheological properties and in vitro digestibility of heat moisture treated and annealed starch of sohphlang (*Flemingia vestita*) tuber. *International Journal of Biological Macromolecules*, 168, 486-495. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.12.065>
- Medina, C., Paredes, A., Rodríguez, M. E., Moreno, M., Belén-Camacho, D., García, D., & Ojeda, C.** (2010). Evaluación de dos métodos de extracción de almidón a partir de cotiledones de mango. *Bioagro*, 22(1), 67-74.
- Mei, J. Q., Zhou, D. N., Jin, Z. Y., Xu, X. M., & Chen, H. Q.** (2015). Effects of citric acid esterification on digestibility, structural and physicochemical properties of cassava starch. *Food Chemistry*, 187, 378-384. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.076>
- Miskeen, S., Hong, J. S., Choi, H. D., & Kim, J. Y.** (2021). Fabrication of citric acid-modified starch nanoparticles to improve their thermal stability and hydrophobicity. *Carbohydrate Polymers*, 253, 117242. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117242>
- Patiño-Rodríguez, O., Agama-Acevedo, E., Ramos-Lopez, G., & Bello-Pérez, L. A.** (2020). Unripe mango kernel starch: Partial characterization. *Food Hydrocolloids*, 101, 105512. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105512>
- Remanan, M. K., & Zhu, F.** (2020). Encapsulation of rutin using quinoa and maize starch nanoparticles. *Food Chemistry*, 353, 128534. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128534>
- Shaikh, F., Ali, T. M., Mustafa, G., & Hasnain, A.** (2019). Comparative study on effects of citric and lactic acid treatment on morphological, functional, resistant starch fraction and glycemic index of corn and sorghum starches. *International journal of biological macromolecules*, 135, 314-327. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.05.115>
- Wang, S., Li, P., Zhang, T., Yu, J., Wang, S., & Copeland, L.** (2017). In vitro starch digestibility of rice flour is not affected by method of cooking. *LWT*, 84, 536-543. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.06.023>
- Yao, T., Wen, Y., Xu, Z., Ma, M., Li, P., Brennan, C., ... & Corke, H.** (2020). Octenylsuccinylation differentially modifies the physicochemical properties and digestibility of small granule starches. *International journal of biological macromolecules*, 144, 705-714. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.129>
- Ye, J., Luo, S., Huang, A., Chen, J., Liu, C., & McClements, D. J.** (2019). Synthesis and characterization of citric acid esterified rice starch by reactive extrusion: A new method of

producing resistant starch. Food Hydrocolloids, 92, 135-142.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.01.064>

Yu, Z. Y., Jiang, S. W., Zheng, Z., Cao, X. M., Hou, Z. G., Xu, J. J., ... & Pan, L. J. (2019). Preparation and properties of OSA-modified taro starches and their application for stabilizing Pickering emulsions. International journal of biological macromolecules, 137, 277-285.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.230>

Zabot, G. L., Silva, E. K., Emerick, L. B., Felisberto, M. H. F., Clerici, M. T. P. S., & Meireles, M. A. A. (2019). Physicochemical, morphological, thermal and pasting properties of a novel native starch obtained from annatto seeds. Food Hydrocolloids, 89, 321-329.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.10.041>

Zehra, N., Ali, T. M., & Hasnain, A. (2020). Comparative study on citric acid modified instant starches (alcoholic alkaline treated) isolated from white sorghum and corn grains. International journal of biological macromolecules, 150, 1331-1341.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.10.143>

Zhu, T., Jackson, D. S., Wehling, R. L., & Geera, B. (2008). Comparison of amylose determination methods and the development of a dual wavelength iodine binding technique. Cereal Chemistry, 85(1), 51-58. <https://doi.org/10.1094/CHEM-85-1-0051>

Propiedades fisicoquímicas, estructurales y funcionales de almidón modificado de maíz cacahuacintle

*Diana Edith López-Vázquez¹, Eleazar Aguirre-Mandujano², Consuelo Lobato-Calleros²,
Landy Hernández-Rodríguez²*

Resumen

El almidón es un ingrediente ampliamente utilizado por su gran versatilidad en la industria alimentaria, cuya fuente principal de obtención es el maíz. México cuenta con una gran variedad de genotipos de maíz, así como aquellos nativos y mejorados. Sin embargo, al existir diferentes variedades de este cereal, no hay estudios referentes a la extracción de almidón de maíz cacahuacintle. Es por ello que el objetivo de la presente investigación fue determinar las propiedades fisicoquímicas, estructurales y funcionales de almidones aislados de maíz cacahuacintle de una variedad nativa y mejorada, y comparar dichas características con un almidón comercial de maíz. Se obtuvo un rendimiento de extracción superior al 50 %, con bajos contenidos de proteína y grasa, pero alto contenido de carbohidratos, indicando con ello que la extracción fue adecuada. En cuanto a la morfología de los gránulos de almidón mostraron estructuras poliédricas. La solubilidad y poder de hinchamiento fueron mayores en los almidones de maíz cacahuacintle con respecto al almidón de maíz comercial.

Palabras clave: Almidón, maíz cacahuacintle, propiedades fisicoquímicas, propiedades funcionales

Abstract

Starch is a widely used ingredient due to its great versatility in the food industry, whose main source is corn. Mexico has a wide variety of maize genotypes, as well as native and improved ones. However, as there are different varieties of this cereal, there are no studies regarding the extraction of cacahuacintle corn starch. The objective of this research was to determine the physicochemical, structural and functional properties of starches isolated from cacahuacintle corn from a native and improved variety, and to compare these characteristics with a commercial corn starch. An extraction yield greater than 50% was obtained, with low protein and fat content, but high carbohydrate content, indicating that the extraction was adequate. Regarding the morphology of the starch granules, they showed polyhedral structures. The solubility and swelling power were higher in cacahuacintle corn starches compared to commercial corn starch.

Keywords: Starch, cacahuacintle corn, physicochemical properties, functional properties.

¹Universidad Autónoma Chapingo, Doctorado en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria. Carretera México-Texcoco km 38.5, Chapingo, Estado de México, C. P. 56230, MÉXICO.

²Universidad Autónoma Chapingo, Departamento de Preparatoria Agrícola. Carretera México-Texcoco km 38.5, Chapingo, Estado de México, C. P. 56230, MÉXICO.

Correo: dianae.lopez.vazquez@gmail.com, eleagman@yahoo.com, consuelobato@yahoo.com; landy14hr@yahoo.com.mx

Introducción

El maíz (*Zea mays* L.) es uno de los cereales de gran importancia económica, social y cultural en el territorio mexicano. México es considerado el centro de origen y de diversidad genética, domesticación y diversificación del maíz, que se agrupan en 68 razas de maíz (Caballero-García et al., 2019). Esta diversidad es producto del conocimiento tradicional de los pueblos mexicanos y prácticas agrícolas que junto con los avances de la biotecnología e ingeniería genética han contribuido al mejoramiento genético del maíz (Fernández-Suarez, Morales-Chavez & Gálvez Mariscal, 2013). Las variedades mejoradas han mostrado ser notablemente superiores a las nativas con respecto al alto rendimiento de maíz por hectárea (Hellin, Keleman, & Bellon, 2010). Por su parte, las variedades nativas poseen una gran variabilidad de tamaño, densidad y dureza del grano. En este sentido, la amplia gama de germoplasma de maíz ofrece una oportunidad para aprovecharse en la obtención de almidón (Liu et al., 2020). Dentro de estos maíces destaca el maíz cacahuacintle, ya que su grano se caracteriza por ser de color blanco, textura harinosa y de tamaño grande, que es empleado en la cocina mexicana para la elaboración de pozole, atoles, pinoles, esquites, etc. Los estudios han demostrado que el maíz cacahuacintle presenta niveles superiores de aminoácidos esenciales como lisina y triptófano (3.7 y 0.78 g/100 g de proteína, respectivamente), en comparación de otros maíces que son deficientes en este tipo de aminoácidos, además cabe resaltar que contiene un alto contenido de almidón siendo aproximadamente del 70.8 %, por lo que tiene potencial para la obtención de dicho ingrediente (Téllez-Silva et al., 2016, Vázquez y Santiago, 2013). Ante la demanda de la industria alimentaria en la búsqueda de ingredientes funcionales, resulta interesante investigar fuentes novedosas de almidones. En consecuencia, este trabajo tuvo como objetivo caracterizar las propiedades fisicoquímicas, morfológicas y funcionales de almidón de maíz cacahuacintle nativo y mejorado, además de su comparación con un almidón de maíz comercial.

Materiales y métodos

Materiales

Los granos de maíz cacahuacintle de una variedad mejorada ARR-11 (*Zea mays* L.) se obtuvieron de un productor local de la comunidad de Juchitepec, Estado de México, México, con coordenadas GPS de 19° 52' 28" N y 98° 52' 54" O y una elevación sobre el nivel del mar de 2 511 m; mientras que los granos de maíz cacahuacintle nativo se obtuvo de la localidad de Santa María Nativitas del municipio de Calimaya, Estado de México, con coordenadas GPS 17° 40' 00" N y 97° 20' 00" O. El ácido clorhídrico (HCl), el hidróxido de sodio (NaOH) y el etanol eran de calidad analítica y se adquirieron de J.T. Baker (Xalostoc, Estado de México, México). El almidón de maíz comercial se obtuvo de Sigma Aldrich (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA.).

Extracción de almidón de maíz cacahuacintle

El almidón de maíz cacahuacintle nativo (AMC_N) y el almidón de maíz cacahuacintle de la variedad mejorada ARR-11 (AMC_M) se obtuvieron por el método descrito por Mir et al., (2016)

con ligeras modificaciones. Se sumergieron 200 g de granos de maíz en 200 mL de solución bisulfito de sodio al 0.16% (p/p) durante 24 h. Posteriormente se drenó la solución de bisulfito de sodio y los granos de maíz se lavaron con 200 mL de agua destilada y se molieron en una licuadora (Oster, México). La mezcla se filtró mediante una tela nylon y el sedimento se mezcló con una solución de hidróxido de sodio al 0.2% (p/p). Después, la suspensión de almidón se lavó repetidamente con agua destilada hasta que el pH de la suspensión de almidón llegó a 7. El sobrenadante se desechó y la capa de almidón sedimentado se resuspendió en agua destilada y se colocó en una centrífuga (5810R, Eppendorf, Hamburgo, Alemania) a $5000 \times g$ por 10 min. Posteriormente, la capa blanca se recogió y se secó en una estufa de aire forzado (HCF-62, Riossa Digital, Puebla, México) a 40 °C durante 24 h. El rendimiento de extracción se calculó como la cantidad de almidón seco obtenido (g) por la masa de grano inicial (g).

Análisis proximal de almidones de maíz cacahuacintle y almidón de maíz comercial

El contenido de humedad, proteínas (utilizando un factor de conversión de N x 6.25), cenizas, lípidos y fibra cruda en los almidones de maíz comercial (AM_{Co}), almidón de maíz cacahuacintle nativo (AM_{CN}) y almidón de maíz cacahuacintle mejorado (AM_{CM}) se determinó mediante los métodos aprobados de la AOAC, 2000. Los carbohidratos totales se determinaron por diferencia.

Contenido de amilosa

El contenido aparente de amilosa en las muestras de AM_{Co}, AM_{CN} y AM_{CM} se determinó por la metodología ISO, (1987). Se pesó 0.1 g de cada muestra de almidón, se dispersó en 1 mL de etanol (96 % p/v) y 10 mL de NaOH (1 M), con agitación constante durante 1 h. La solución se llevó a un volumen final de 100 mL con agua destilada. Se tomó una alícuota de 2 mL, añadiéndose 50 mL de agua destilada y 100 µL de fenolftaleína (1 % p/v) y se mezcló con 2 mL de ácido clorhídrico (0.1 M). Posteriormente, 2 mL de solución de yoduro (2 g de yoduro de potasio y 0.2 g de yodo en 100 mL de agua destilada) fueron adicionados para neutralizar la solución y el volumen fue completado a 100 mL con agua destilada. La solución se dejó reposando 30 min en oscuridad, se leyó la absorbancia a 510 nm y 620 nm en un espectrofotómetro (Spectronic Genesys 2, Thermo Electron Corporation, Madison, WI, USA).

Análisis FTIR

Las estructuras ordenadas de la región externa del almidón se analizaron en un espectrómetro infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) (Cary 630, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA.) equipado con un accesorio de reflectancia total atenuado universal. Cada muestra de almidón (~0.01 g) se colocó en contacto con el cristal de diamante. Las mediciones para cada muestra, el espectro representó un promedio de 32 escaneos, obtenidos en un rango de 4000-400 cm⁻¹ a una resolución de 4 cm⁻¹ (Gómez-Luría et al., 2019).

Microscopía óptica

Se prepararon dispersiones (0.01 g de almidón con 0.05 mL de agua destilada) y se tiñeron con solución de yodo (0.1 N). Las muestras se observaron en un microscopio óptico (Olympus BX45, Olympus Optical Co., Tokio, Japón). Las micrografías fueron capturadas con una cámara digital (Olympus C3030, Olympus America Inc., Center Valley, Pensilvania, EE. UU.)

Micrografías ópticas representativas se presentan a 40× con fines ilustrativos (Hsieh et al., 2019).

Solubilidad y poder de hinchamiento

Se determinaron la solubilidad y el poder de hinchamiento, según lo descrito por Zheng et al., 2020. Cada muestra se mezcló en agua destilada (2.0 %, p/v) y se calentó a 95 °C durante 30 min. Después de centrifugar a 4000 ×g durante 10 min, se recogió el sobrenadante y se secó a 105 °C hasta peso constante. La solubilidad (S_1) y el poder de hinchamiento (S_2) se calcularon mediante la ecuación. (1) y la ecuación (2), respectivamente:

$$S_1(\%) = \frac{A}{W} \times 100 \quad (1)$$

$$S_2(\%) = 100 \times P/[M(100 - S_1)] \quad (2)$$

donde A es el peso constante del sobrenadante seco; y M, W y P representan el peso de la muestra, la suspensión de almidón y el sedimento, respectivamente.

Resultados y discusión

Rendimiento de extracción y características químicas del almidón

El rendimiento de extracción y la composición química de almidones obtenidos de maíz cacahuacintle nativo y mejorado, y almidón comercial de maíz se muestran en el Cuadro 1. El rendimiento obtenido del proceso de extracción fue mayor para el AMCM, en comparación del AMCN, esto se puede deber a diversos factores entre ellos el genotipo de maíz (Timm et al., 2020). Cabe resaltar que el rendimiento de extracción fue más alto que en otras especies de maíz, por ejemplo Ziegler et al., 2019 obtuvieron rendimientos de almidón de maíz palomero rojo en un rango de 19.18 a 32.32 %. Por su parte Timm et al., 2023 encontraron un rendimiento del 16.42 a 23.09 % al utilizar maíz amarillo pedernal (Pioneer P3016 VYHR). La composición química proximal un alto contenido de carbohidratos en todas las muestras de almidón analizadas, además se encontró un bajo contenido de proteína, lípidos y cenizas, por lo cual se puede considerar que son almidones con suficiente pureza (Felisberto et al., 2019).

Cuadro 1. Rendimiento y composición química proximal de almidones de maíz cacahuacintle y almidón comercial de maíz.

Componente	Tipo de almidón de maíz		
	AMCo	AMCN	AMCM
Rendimiento (%)	-	54.12 ± 0.93 ^a	58.27 ± 0.81 ^b
Cenizas (%)	0.02 ± 0.00 ^a	0.02 ± 0.01 ^a	0.22 ± 0.01 ^b
Proteína (%)	1.26 ± 0.00 ^b	1.01 ± 0.11 ^{ab}	0.80 ± 0.00 ^a
Lípidos (%)	0.18 ± 0.03 ^a	0.22 ± 0.13 ^a	0.42 ± 0.20 ^a
Carbohidratos (%)	98.54 ± 0.00 ^a	98.75 ± 0.03 ^a	98.56 ± 0.21 ^a
Amilosa (%)	20.08 ± 1.35 ^a	20.44 ± 0.27 ^a	20.53 ± 0.84 ^a

Los valores son promedios ± desviación estándar. Diferentes letras en el mismo renglón indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$). AMCo: almidón de maíz comercial, AMCN: almidón de maíz cacahuacintle nativo y AMCM: Almidón de maíz cacahuacintle mejorado.

Contenido de amilosa

El contenido de amilosa en las muestras de almidón no mostró diferencias significativas entre ellas ($p \geq 0.05$). Estas muestras de almidón pueden ser clasificadas como almidones normales, debido al contenido de amilosa que va de 20 a 35 % de acuerdo con lo reportado por Tester et al., (2004). Los resultados obtenidos concuerdan con lo reportado por Mir et al., (2016) para almidones de maíz de diferentes cultivares que variaron en un rango de 20.74 a 30.32 % de amilosa. Aunado a esto, la amilosa influye en las propiedades de gelatinización, solubilidad, características de pegado y retrogradación (Morales-Trejo et al., 2021).

Análisis FTIR

Se utilizó espectroscopia FTIR para el análisis vibracional de los principales grupos funcionales presentes en las muestras de almidón de maíz. La Figura 3 muestra los espectros FTIR de los AM_{Co} , AM_{CN} y AM_{CM} , en la cual se muestra una banda ancha en un rango de $3600-3000\text{ cm}^{-1}$ que se atribuye al estiramiento del O-H, que involucra los grupos hidroxilo del almidón y también se relaciona con la contribución de las moléculas de agua a las estructuras de almidón (Reyes, Hernandez-Jaimes, Meraz, Vernon-Carter & Alvarez-Ramirez, 2021). El doblete a 2928 y 2880 cm^{-1} corresponde a la vibración de estiramiento antisimétrico y al estiramiento simétrico de los grupos alifáticos CH_2 y CH_3 , y pueden atribuirse a ácidos grasos libres (Wei et al., 2020). La banda a $1700-1600\text{ cm}^{-1}$ está vinculada a la expresión de proteínas de Amida I, lo que sugiere que existe la presencia de proteína contenida en la superficie del gránulo de almidón. Las señales a 1046 y 1080 cm^{-1} están asociadas a estructuras ordenadas de almidón, mientras que la banda a 1022 cm^{-1} está vinculada a estructuras amorfas de almidón (Li, Tian, Fang & Hunag, 2021). La banda de absorción a 992 cm^{-1} está relacionada con la interacción agua-almidón, y su intensidad de absorción es producida por las vibraciones de flexión $C - O - H$ (Mapengo, Ray & Emmambux, 2021). Por su parte, la señal alrededor de 928 y 760 cm^{-1} se asoció al enlace glicosídico α ($1 \rightarrow 4$) y a los enlaces $C - C$, respectivamente (Rahaman et al., 2021).

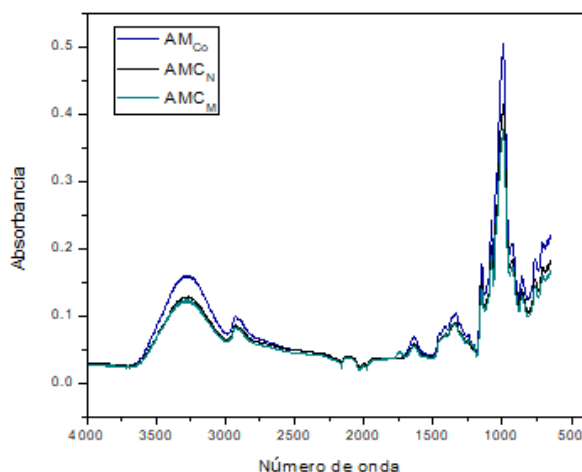


Figura 1. Espectro FTIR de diferentes tipos de almidón de maíz. AM_{Co} : Almidón de maíz comercial; AM_{CN} : Almidón de maíz cacahuacintle nativo y AM_{CM} : Almidón de maíz cacahuacintle mejorado.

Morfología

En la Figura 2 se presenta la morfología de los almidones de los dos genotipos de maíz cacahuacintle y del maíz comercial tomadas por microscopía óptica. Se puede apreciar claramente que los gránulos de almidón de maíz comercial presentan una forma poliédrica bien definida, con superficies lisas que es el resultado de una matriz proteica que rodea al endospermo vitreo. Por su parte, los gránulos de almidón cacahuacintle tanto nativo como mejorado tienden a ser esféricos, estas diferencias en la morfología (esféricos o poliédricos) se deben a los genotipos (da Silva et al., 2020). Por su parte Bajaj et al., (2018) sugieren que estas características se están asociadas con la fuente botánica, genética, origen y fisiología de la planta.

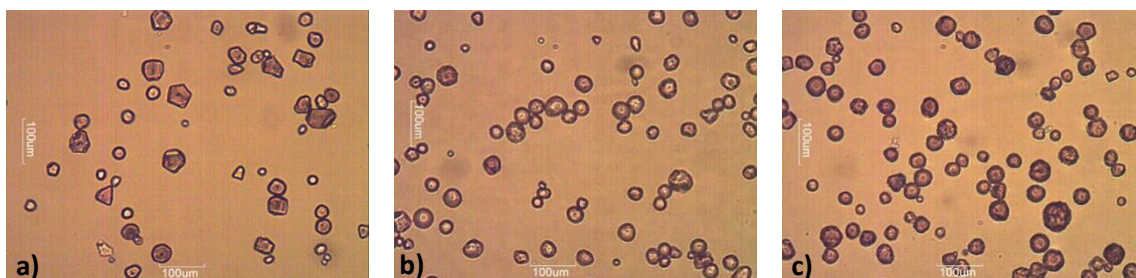


Figura 2. Morfología de gránulos de almidón observados a 40 x. a) Gránulos de AM_{Co}: Almidón de maíz comercial; b) gránulos de AM_{CN}: Almidón de maíz cacahuacintle nativo y c) gránulos de AM_{CM}: Almidón de maíz cacahuacintle mejorado.

Solubilidad y poder de hinchamiento

La solubilidad en agua es un indicador de degradación de los componentes moleculares del almidón. En el presente estudio se encontró que la solubilidad a 90°C fue 14.95 ± 0.92 , 19.54 ± 0.64 y 20.67 ± 1.15 % para el AM_{Co}, AM_{CN} y AM_{CM}, respectivamente. Ambos almidones de maíz cacahuacintle presentaron la mayor solubilidad ya que al presentar menor contenido de proteínas en la superficie de los gránulos de almidón y presentar mayor pureza se mejora la exposición del gránulo a las moléculas de agua (Cortés-Viguri et al., 2022). Además, el aumento de la solubilidad podría ser el resultado de los cambios en la estructura molecular o de un mecanismo independiente que promovió la movilidad de las cadenas poliméricas, lo que resultó en la lixiviación de amilosa o amilopectina (Soler et al., 2020).

La estructura helicoidal del almidón se pierde cuando se calienta con agua y, por lo tanto, se exponen los grupos hidroxilo que se unen al agua a través de enlaces de hidrógeno, lo que da como resultado un hinchamiento granular (Kizhakedathil et al., 2022). El poder de hinchamiento para los almidones AM_{Co}, AM_{CN} y AM_{CM} fue 16.61 ± 0.36 , 23.27 ± 0.90 y 23.11 ± 0.36 g/g, respectivamente. Los valores de poder de hinchamiento para los almidones de maíz cacahuacintle fueron mayores que el AM_{Co}, lo que indica una alta capacidad de hidratación a una alta temperatura y exceso de agua.

Conclusiones

La extracción de almidón maíz cacahuacintle especialmente de la variedad mejorada ARR-11, posee una alta pureza, con apariencia granular esférica y propiedades funcionales superiores al almidón de maíz comercial, por lo tanto, tiene gran potencial para su aprovechamiento en la industria alimentaria, además de incentivar al desarrollo y diversificación de este cultivo.

Literatura Citada

- Caballero-García, M. A., Córdova-Téllez, L., & López-Herrera, A. D. J.** (2019). Validación empírica de la teoría multicéntrica del origen y diversidad del maíz en México. *Revista fitotecnia mexicana*, 42(4), 357-366.
- Cortés-Viguri, V., Hernández-Rodríguez, L., Lobato-Calleros, C., Cuevas-Bernardino, J. C., Hernández-Rodríguez, B. E., Álvarez-Ramírez, J., & Vernon-Carter, E. J.** (2022). Annatto (*Bixa orellana* L.), a potential novel starch source: antioxidant, microstructural, functional, and digestibility properties. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 16(1), 637–651. <https://doi.org/10.1007/s11694-021-01228-7>
- Felisberto, M. H. F., Beraldo, A. L., Costa, M. S., Boas, F. V., Franco, C. M. L., & Clerici, M. T. P. S.** (2019). Physicochemical and structural properties of starch from young bamboo culm of *Bambusa tuldoidea*. *Food Hydrocolloids*, 87, 101-107.
- Fernandez Suarez, R., Morales Chavez, L. A., & Galvez Mariscal, A.** (2013). Importance of mexican maize landraces in the national diet: An essential review. *Revista fitotecnia mexicana*, 36, 275-283.
- Gómez-Luría, D., Vernon-Carter, E. J., Álvarez-Ramírez, J., & Cruz-Sosa, F.** (2019). Insights of the ability of gelatinized fractions from non-chemical modified corn, rice, wheat, and waxy corn starches to stabilize O/W emulsions. *Food Hydrocolloids*, 89, 726–734. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.11.045>
- Hsieh, C. F., Liu, W., Whaley, J. K., & Shi, Y. C.** (2019). Structure and functional properties of waxy starches. *Food Hydrocolloids*, 94, 238–254. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.03.026>
- Kizhakedathil, M. P. J., Belur, P. D., Wongsagonsup, R., Suphantharika, M., Agoo, E. M. G., & Janairo, J. I. B.** (2022). Evaluation of Enzymatic and Chemical Treatments to Produce Oxalate Depleted Starch from a Novel Variety of *Colocasia esculenta* Grown in Joida, India. *Starch/Staerke*, 74(1–2). <https://doi.org/10.1002/star.202000231>
- Soler, A., Valenzuela-Díaz, E. D., Velazquez, G., Huerta-Ruelas, J. A., Morales-Sanchez, E., Hernandez-Gama, R., & Mendez-Montealvo, G.** (2020). Double helical order and functional properties of acid-hydrolyzed maize starches with different amylose content. *Carbohydrate Research*, 490. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2020.107956>
- Timm, N. da S., Coradi, P. C., Lang, G. H., Ramos, A. H., Cañizares, L. da C. C., Ferreira, C. D., & de Oliveira, M.** (2023). Effects of drying temperature of corn from the center and extremities of the corncob on morphology and technological, thermal, and pasting properties of isolated starch. *Journal of Food Engineering*, 336, 111215. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2022.111215>
- Timm, N. da S., Ramos, A. H., Ferreira, C. D., Biduski, B., Eicholz, E. D., & Oliveira, M. de.** (2020). Effects of drying temperature and genotype on morphology and technological,

thermal, and pasting properties of corn starch. *International Journal of Biological Macromolecules*, 165, 354–364. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.09.197>

Zheng, Y., Tian, J., Kong, X., Yang, W., Yin, X., Xu, E., Chen, S., Liu, D., & Ye, X. (2020). Physicochemical and digestibility characterisation of maize starch–caffeic acid complexes. *LWT*, 121. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108857>

Ziegler, V., Da, N., Timm, S., Ferreira, C. D., Goebel, J. T., Scherer Pohndorf, R., & de Oliveira, M. (2019). *Effects of drying temperature of red popcorn grains on the morphology, technological, and digestibility properties of starch.* <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.198>

Comparación de la actividad citotóxica del aceite esencial de las hojas de varias muestras de laurel aromático (*Litsea glaucescens*)

Verónica V. Tepixtle-Colohua,¹ Benito Reyes-Trejo², Ma Rosa Gonzalez-Tepale², Diana Guerra-Ramirez²

Resumen

Se se empleó el bioensayo de *Artemia salina* para valorar la actividad citotóxica del aceite esencial de los aceites esenciales obtenidos de varias muestras de laurel aromático (*Litsea glaucescens*) especie vegetal forestal no maderable (PFNM) aprovechada ampliamente en México. Actualmente se encuentra registrado en la Norma Oficial Mexicana (NOM-059-SEMARNAT- 2019), con la categoría de P (en peligro de extinción) y se emplea para el tratamiento de enfermedades frías, dolores de cabeza y también la parálisis. La muestra de aceite esencial obtenido del centro comercial Soriana en la prueba de *Artemia salina* exhibió la mayor actividad citotóxica con una CL₅₀ de 53.8 µg/mL y la de menor actividad correspondió a la muestra de aceite preparado a partir de la colecta de Nopalillo, Hidalgo (Bosque de oyamel) con una CL₅₀ de 451.6 µg/mL El análisis en Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, evidenció la presencia de: 34.99 % de Eucaliptol (1,8-cineol), 7.45% de 1R- α -Pino, 6.51% de L-Limoneno, 5.26 % de trans-dihidrocarvona, 4.62% de (-)- β -Pino, 4.46 % de acetato de bormilo, 4.11 % de trans-4-Tujanol, 3.85 % de Canfeno, 3.06 % de γ -terpineno y 2.91% de Cariofileno, Estos resultados indican la posibilidad de utilizar los aceites esenciales de *L. glaucescens*, por sus propiedades citotóxicas para el tratamiento de enfermedades relacionadas con el cáncer

Palabras clave: citotoxicidad, *Artemia salina*, laurel aromático, cromatografía de gases

¹División de Ciencias Forestales, Universidad Autónoma Chapingo. Km 38.5 Carretera México- Texcoco. 56230, Texcoco, Edo. de México, México. Tel. 01 (55) 5133-1108 Ext 5760.

²Laboratorio de Productos Naturales, Área de Química, Departamento de Preparatoria Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo. Km 38.5 Carretera México- Texcoco. 56230, Texcoco, Edo. de México, México.

Correo: breyest@chapingo.mx; breyest@chapingo.com, al13125404@chapingo.mx, mgonzalez@chapingo.mx, dguerrar@chapingo.mx

Abstract

The bioassay of *Artemia salina* known as Brine Shrimp lethality Test, was used to assess the cytotoxic activity of the essential oils obtained from several samples of aromatic laurel (*Litsea glaucescens*) plant species non-timber forest (NWFP) widely used in Mexico. Currently it is registered in the Official Mexican Standard (NOM-059- SEMARNAT- 2019), with the category of P (in danger of extinction) and is used for the treatment of cold diseases, headaches and also paralysis. The sample of essential oil obtained from the Soriana marked in the Brine Shrimp lethality Test exhibited the highest cytotoxic activity with a CL_{50} of 53.8 $\mu\text{g/mL}$ and the one with the lowest activity corresponded to the oil sample prepared from the collection of Nopalillo, Hidalgo (oyamel forest) with a CL_{50} of 451.6 $\mu\text{g/mL}$. The analysis in Gas chromatography coupled to mass spectrometry, evidenced the presence of: 34.99% eucalyptol (1,8-cineole), 7.45% 1R- α -Pinene, 6.51% L-Limonene, 5.26% trans-dihydrocarvone, 4.62% (-)- β -Pinene, 4.46% bornyl acetate, 4.11% trans-4-Thujanol, 3.85% Canphene, 3.06% γ -terpinene and 2.91% caryophyllene. These results indicate the possibility of using the essential oils of *L. glaucescens*, for their cytotoxic properties, offering an alternative to use as antimicrobial and against several cancer treatments.

Keywords: cytotoxicity, *Artemia salina*, aromatic laurel, gas chromatography

Introducción

La familia de las lauráceas cuenta con aproximadamente 50 géneros con una distribución tropical y subtropical de todo el mundo (Van der Werff y Lorea, 1997) y en especial el género *Litsea* engloba aproximadamente a 400 especies (Azhar et al 2022), donde está incluido el laurel aromático (*Litsea glaucescens*). Actualmente en México se encuentran 10 géneros y 13 especies de esta familia, el aguacate (*Persea americana* Mill.) y la canela (*Cinnamomum verum* Presl) son algunos considerados de gran importancia comercial (Lorea-Hernández, 2002). Desde el siglo XVI se habla del uso de *Litsea glaucescens* para el tratamiento de varios padecimientos, Francisco Hernández en su publicación “La Historia de las plantas de la Nueva España” describe a una planta llamada “ecapatli” con características similares al laurel de Europa, a diferencia en el tamaño de sus hojas (Valdés y Flores, 1985).

Antiguamente esta planta se usaba para el tratamiento de enfermedades como epilepsia y la parálisis, los cuales están relacionados con problemas del sistema nervioso (Guzmán-Gutiérrez et al., 2012).

En el libro “Florilegio Medicinal” escrito por Juan de Esteyneffer en 1712, describe una combinación entre la medicina tradicional de Europa y la del nuevo Mundo, en él se hace mención del uso del laurel para curar enfermedades frías, dolores de cabeza y también la parálisis, haciendo uso de los vapores de las hojas de laurel, además para el tratamiento de otras enfermedades con diversas recetas donde el principal ingrediente son las hojas de laurel (Esteyneffer, 1978; Jiménez-Pérez et al., 2011).

Actualmente esta especie es utilizada ampliamente en México como condimento para la elaboración de platillos, y debido a sus antecedentes y propiedades se le podría atribuir gran utilidad en la industria de alimentos, perfume y medicamentos (Montañez-Armenta, 2006)

Estudios actuales se han enfocado a conocer sus propiedades fitoquímicas, con el fin de lograr la identificación y posterior aislamiento de sus componentes químicos para así lograr evaluar su actividad como antibacteria, antifúngicas, antiinflamatoria, antiespasmódica y antioxidante y conocer el potencial que la especie (Osuna et al., 2005; Jiménez Pérez et al., 2011).

Por toda la importancia que representa el laurel aromático a nivel cultural y a los pocos estudios fitoquímicos realizados sobre la especie en México, el objetivo del presente trabajo es contribuir al conocimiento de las propiedades citotóxicas del aceite esencial de laurel aromático.

Materiales y métodos

Recolecta de la planta

Para el desarrollo de este trabajo se realizó un muestreo en el área de estudio, el ejido “El Nopalillo”, Epazoyucan, estado de Hidalgo. Además, se recolectaron muestras de Chignahuapan, Pue., Zongolica, Ver., San Andrés Metla, Mex., entre los meses de junio a octubre de 2021, ejemplares de herbario fueron identificados y depositados en el Herbario-Hortorio “Jorge Espinoza Salas” del departamento de Preparatoria Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo. Se adquirieron muestras comerciales de la tienda “Soriana”, Tex., Mex., tienda naturista “Los cedros”, Tex., Mex., tienda naturista “Yerberero Antigüita”, mercados

locales de Salitrería, Tex., Mex. Y Texcoco Centro, un aspecto de cada colecta se muestra en la figura 1.

Aceite esencial de laurel aromático

El aceite esencial fue obtenido por hidrodestilación, empleando un equipo tipo Clevenger (Sundararajan et al., 2018), se colocó en un matraz bola de base plana de 1 L la cantidad de 100g de hojas secas ó fresca perfectamente trituradas de Laurel aromático, se agregaron aproximadamente 300 mL de agua destilada y se calentó a ebullición durante 60 min. Finalmente, el aceite fue colectado y se guardó en frasco ámbar y bajo refrigeración a 4 °C hasta su uso. Esta operación se repitió con todas las muestras estudiadas: Chignahuapan, Pue., El Nopalillo Hgo. (Pino-Encino), El Nopalillo Hgo. (Oyamel), El Nopalillo Hgo. (Bosque Mixto), Zongolica, Ver., Tienda Naturista “Los cedros”, Centro comercial Soriana, Mercado Centro Texcoco Méx., San Andrés Metla Edo, San Andrés Metla Edo., Mercado Salitrería, Tex. Méx., Tienda Naturista Yerbero, Tienda Naturista Antigüita y Zongolica, Ver. (Hoja con semilla).



Figura 1. Muestras obtenidas para el estudio: A) Chignahuapan, Pue., B) Nopalillo, C) Zongolica, Ver., D) tienda naturista “Los cedros”, E) centro comercial “Soriana”, Tex, F) Mercado Texcoco Centro, G) San Andrés Metla, Mex., H) Mercado Salitrería, Tex., Mex., I) tienda naturista “Yerbero Antigüita”.

Evaluación citotóxica: Prueba con *Artemia salina*

La prueba de citotoxicidad se realizó por el método de Meyer et al. 1982 y Michael *et al.*, 1956, con algunas modificaciones. Se evaluaron los extractos obtenidos de hojas de *Litsea glaucescens* a concentraciones de 1, 10, 100, 1,000 y 10,000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, de cada tratamiento se preparó una solución madre a una concentración de 10,000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de cada uno de los aceites esenciales, disolviendo 50 mg de aceite en 5 mL de acetona. De cada tratamiento se tomaron 0.5 mL y se depositaron en un vial de cristal, considerando tres repeticiones por cada concentración. El disolvente se evaporó a temperatura ambiente durante un periodo de 24 horas. Como tratamiento testigo se usó 0.5 mL de acetona. con la ayuda de una pipeta Pasteur de cristal se tomaron 10 larvas y se depositaron en cada uno de los viales que contenían cada concentración de prueba. Se aforó a un volumen de 5 mL con agua salada que se hallaba a una concentración de 28 g/L. Posteriormente los viales se colocaron en una incubadora donde se controló la temperatura y la aireación y se colocó un foco de 60 watts. Al cabo de 24 horas se contabilizó el número de larvas muertas en cada vial, lo que permitió estimar la Concentración Letal 50 (CL₅₀), el análisis se llevó a cabo empujando la función Probit en el programa estadístico SAS y R Studios. Para la clasificación de toxicidad se empleó lo descrito por Meyer et al. 1982 y las recomendaciones de CYTED, 2014 (Ciencia y Tecnología para el Desarrollo), como se indica en la tabla 1

Tabla 1. Clasificación de toxicidad empleada en el trabajo.

I	Extrema	1-10	$\mu\text{g/mL}$
II	Alta	10-100	$\mu\text{g/mL}$
III	Moderada	100-500	$\mu\text{g/mL}$
IV	Ligera	500-1000	$\mu\text{g/mL}$
V	No tóxico	1000-1500	$\mu\text{g/mL}$
VI	Relativamente inocuo	>1500	$\mu\text{g/mL}$

Fuente CYTED, 2014

Resultados

Rendimiento de extracto

Para el análisis de antioxidantes y actividad citotóxica del aceite esencial de laurel aromático (*Litsea glaucescens*), se colectaron 12 muestras diferentes de hoja de laurel obtenido de distintos sitios naturales, así como establecimientos comerciales y mercados de la zona de Texcoco de Mora. En la tabla 2, se muestra la información de fechas de colecta de cada muestra, así como su rendimiento en porcentaje, considerando la cantidad en gramos de cada muestra utilizada y la cantidad de aceite esencial en mL obtenida en el proceso por hidrodestilación, empleando un equipo tipo Clevenger.

Para calcular el rendimiento se utilizó la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Rendimiento} = \left(\frac{\text{Masa del aceite}}{\text{masa de las hojas}} \right) \times 100$$

11° Congreso Internacional de Investigación en Ciencias Básicas y Agronómicas
Universidad Autónoma Chapingo, 22 y 23 de septiembre de 2022
Chapingo, México

Tabla 2. Rendimiento en porcentaje del aceite esencial de laurel aromático (*Litsea glaucescens*).

	Lugar de colecta	Fecha de colecta	Fecha de proceso	Fresco o seco de 100 g	Cantidad (ml)	% en peso
1	El Nopalillo Hgo. Oyamel	10/10/2020	11/12/2020	Seco	1.43±0.404	1.43
2	El Nopalillo Hgo. Pino-Encino	10/10/2020	11/12/2020	Seco	1.37±0.289	1.37
3	El Nopalillo Hgo. Bosque Mixto	10/10/2020	11/12/2020	Seco	1.32±0.161	1.32
4	Centro comercial "Soriana"	10/12/2020	11/12/2020	Seco	1.32±0.355	1.32
5	Mercado "Texcoco Centro"	02/11/2020	03/11/2020	Seco	1.2±0.2	1.2
6	Mercado "Salitreria, Texcoco "	10/12/2020	11/12/2020	Fresco	1.17±0.153	1.17
7	Tienda Naturista "La Antiguita"	04/02/2021	05/02/2021	Seco	1.13±0.153	1.13
8	Chignahuapan, Puebla	01/10/2020	02/12/2020	Seco	1.02±0.225	1.02
9	San Andrés Metla Edo. Méx	05/02/2021	05/02/2021	Fresco	0.97±0.252	0.97
10	Tienda Naturista "Los Cedros"	04/02/2021	05/02/2021	Seco	0.78±0.029	0.78
11	Zongolica, Veracruz.	11/01/2021	02/02/2021	Seco	0.63±0.153	0.63
12	Zongolica, Veracruz (Hoja-Semilla).	25/04/2021	28/05/2021	Seco	0.27±0.029	0.27

El rendimiento obtenido de las muestras de laurel oscila entre 1.43% a 0.27%, el rendimiento más bajo se presentó en la muestra de hoja de laurel obtenidas en la región de Zongolica Veracruz y el rendimiento más alto lo presenta las muestras del ejido "El Nopalillo Hgo.", con 1.43%, 1.37% y 1.33%.

Determinación de la citotoxicidad del aceite esencial

El resultado de la evaluación de la concentración letal media (CL₅₀) para las muestras de aceite esencial de *Litsea glaucescens* empleando el bioensayo de *Artemia salina*, exhibió una citotoxicidad CL₅₀ en el intervalo de 53.8 µg/mL a 451.6 µg/mL, datos que están concentrados en la tabla 3.

11° Congreso Internacional de Investigación en Ciencias Básicas y Agronómicas
Universidad Autónoma Chapingo, 22 y 23 de septiembre de 2022
Chapingo, México

Tabla 3. Evaluación de la toxicidad (CL₅₀) de extractos *Litsea glaucescens* mediante el modelo de *Artemia salina*

Aceites esenciales	% de <i>Artemias</i> muertas a las 24 horas, en las concentraciones evaluadas en µg/ml					Límites al 95%			Grado de toxicidad
	10000	1000	100	10	1	CL ₅₀ (µg/mL)	LI	LS	
Centro comercial “Soriana”	100	60	50	36	30	53.8	2.4	110.0	Alta
Zongolica, Ver. (hojas)	100	56	50	36	23	59.0	5.7	123.6	Alta
San Andrés Metla, Mex.	100	53	43	40	30	73.7	22.4	169.7	Alta
Zongolica, Ver. (HOJAS-Semilla)	100	56	46	33	26	86.4	3.7	176.5	Alta
Nopalillo, Hgo. (Mixto)	100	50	46	33	23	94.8	27.4	216.9	Alta
Chignahuapan, Pue.	100	46	36	33	26	175.5	66.9	418.0	Moderada
Tienda Naturista “Los cedros”	100	46	36	30	26	198.9	61.6	459.3	Moderada
Mercado Texcoco (centro)	100	46	36	30	26	198.9	61.6	459.3	Moderada
Texcoco “Salitrería”	100	56	33	26	23	202.8	9.1	414.7	Moderada
Nopalillo, Hgo. (Pino-Encino)	100	46	36	33	16	223.9	36.7	484.4	Moderada
Tienda Naturista “La antigüita”	100	46	33	30	16	283.1	26.4	592.5	Moderada
Nopalillo, Hgo. (Oyamel)	100	43	26	23	23	451.6	95.0	998.2	Moderada
Eucalipto	97	34	30	26	16	683.0	188.4	1309.6	Ligera

LI.- Límite inferior

LS.- límite superior

Análisis por Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas

Los aceites esenciales obtenidos de varias fuentes de laurel aromático, fueron analizados por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas y mostraron una presencia predominante de los siguientes compuestos: 34.99 % de Eucaliptol (1,8-cineol), 7.31 % de 1R- α -Pineno, 6.01% de L-Limoneno, 2.76 % de *trans*-dihidrocarvona, 4.62 % de (-)- β -Pineno, 4.46 % de acetato de bornilo, 4.11 % *trans*-4-Thujanol, 3.85 % de canfeno, 3.06 % de γ -terpineno y 2.91% de Cariofileno, relacionados en la tabla 4.

Tabla 4. Composición de aceites esenciales de laurel aromático (*Litsea glaucescens*)

Discusión de resultados

El rendimiento obtenido de aceite esencial de *Litsea glaucescens* en este estudio es aún más alto que lo reportado por Jiménez et al, 2011, que con el método de hidrodestilación utilizando un equipo Clevenger obtuvo un rendimiento de 0.1% a 1.15% en aceite esencial de laurel aromático. Asimismo, rendimientos del 0.4% de aceite se han obtenido de otras colectas

Compuesto	Tiempo de retención	% V/V	IK calculado	IK teórico
Thujeno	5.503	0.96	925.75	925
1 <i>R</i> - α -pineno	5.749	7.31	934.69	922
Camfeno	6.226	3.85	952.04	967
Sabineno	6.829	1.23	973.96	967
(-)- β -Pineno	7.048	4.62	981.93	965
<i>nor</i> -pineno	7.226	1.49	988.4	980
Borneno	8.304	1.53	1018.44	932
<i>o</i> -Cimeno	8.59	2.25	1025.39	1042
L-Limoneno	8.784	6.01	1030.11	1018
Eucaliptol	8.955	34.99	1034.26	1059
γ -Terpineno	9.927	3.06	1057.89	1051
<i>trans</i> -4-Thujanol	15.978	4.11	1182.19	1075
<i>trans</i> -Dihidrocarvona	16.947	2.76	1200.56	1200
Acetato de bornilo	21.872	4.46	1284.52	1269
D-Limoneno	25.504	1.24	1360.07	118
carveol	26.03	0.83	1371.66	1206
Cariofileno	27.806	2.91	1425.51	1493
Pulegona	29.461	1.51	1517.03	1212

(Andreatta et al., 2012; Camacho et al., 2011). En general, lo anterior es congruente con el rendimiento de la mayoría de los aceites esenciales que se encuentra entre 0.01% y 2.00% (Moreno et al., 2010) tal como se puede observar en este trabajo. Cabe resaltar que entre las muestras evaluadas existe una diferencia entre rendimientos, esto se debe a que las muestras fueron obtenidas de lugares con condiciones ambientales diferentes, como la altitud, clima, suelo, temperatura, precipitación, época de recolección y etapas fenológicas de la planta y el manejo en cosecha y postcosecha, así como, como técnicas de cultivo y métodos de extracción de los aceites (Stashenko et al., 1997; Vásquez et al., 2001), sin embargo, estas muestras se colectaron en diferentes estratos de vegetación (Pino-encino, Oyamel y Bosque Mixto), en donde los factores de intensidad de luz, densidad de vegetación y niveles altitudinales marcan una ligera diferencia en los valores de CA. Para hacer una comparación en su capacidad antioxidante, se analizó una muestra con alto contenido de 1,8-cineol como el aceite esencial de eucalipto dólar (*Eucalyptus cinerea*) ya que este metabolito es uno de los principales componentes reportados en el laurel aromático con 22% (López et al., 1995). Los resultados obtenidos de la CL₅₀ de los aceites esenciales de laurel aromático se encuentran con un valor II

altamente tóxico (10-100 µg/ mL) y III moderadamente tóxico (100-500 µg/ mL), las muestras que presentaron una moderada toxicidad se encuentran en un rango de 175.5 µg/mL a 451.6 µg/mL, mientras que los de una alta toxicidad se encuentran entre 53.8 µg/mL a 94.8 µg/mL. La muestra analizada de aceite esencial de eucalipto mostró un valor de 683 µg/mL, que lo clasifica de toxicidad moderada. El potencial citotóxico de los aceites esenciales preparados, también se observa en otras especies de la familia laurácea, además se han hecho estudios de los posibles beneficios que poseen este grupo de plantas, (De et al. 2009) Por ejemplo, del aceite esencial de *Litsea canella* y *Aniba canelilla*, las cuales presentaron niveles altos de bencenoides (benzoato de bencilo y 1-nitro-2-feniletano, respectivamente), también realizó una prueba contra *Leishmania amazonensis* donde *L. canella* resulto ser más activo. Se menciona que además, cuentan con efectos antidiarreicos significativos, junto con efectos antioxidantes y efectos trombolíticos ligeros (Uddin et al. 2020).

Se ha evaluado la citotoxicidad *in vitro* contra células MCF-7; e inhibición de la cisteína proteasa cruzina, donde los aceites de *Cinnamomum paratriplinerve* y *Ocotea endresiana* fueron notablemente citotóxicos en las células MCF-7 (> 97 % de muerte a 100 µg/ml), además el aceite de *O. endresiana* mostró inhibición de la cruzina (IC₅₀ <20 µg/ml). (Agius et al., 2007). Por otro lado, en estudios de *Litsea angulata*, demostraron que el aceite esencial es no toxico, pero podría considerarse como un agente antimicrobiano potencial contra patógenos orales como *Staphylococcus mutans* y *S. sobrinus* (Kuspradini et al., 2018.) Así mismo, se han efectuado estudios en aceite esencial de *litsea cubeba*, (Hammid y Ahmad, 2015.) cuyos resultados en los ensayos con *Artemia salina* exhibieron una alta toxicidad, además se observó un amplio espectro de inhibición (19.5 y 46.7 mm) contra microorganismos como *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, en cuanto a levaduras y hongos su alcance fue de 10.5 y 90.0 mm. Estos estudios indican la importancia que la familia laurácea presenta en el ámbito bioquímico y los posibles usos a desarrollar.

Finalmente, del análisis de los aceites esenciales de laurel aromático por cromatografía de gases, el contenido de metabolitos volatiles, de uno de los aceites de la colecta de Zongolica, Veracruz, muestra similitudes con otras especies de la familia Laurácea como: *Ocotea bicolor* (Damasceno et al. 2017), *litsea cubeba* (Hammid y Ahmad, 2015.), *Litsea angulata* (Kuspradini et al., 2018), *Licaria canella* y *Aniba canelilla* (De et al. 2009). También es comparable y muy diferente al análisis de aceite esencial de laurel aromático obtenidos de Veracruz se observaron algunas diferencias en la cantidad de metabolitos como o-cimeno (25.86%), eucaliptol (26.06%), terpinen-4-ol (5.08%) y s-carvona (1.85%), sin embargo, de una la muestra colectada de Huitzila, Veracruz, se observa solo el compuesto β -ocimeno, como compuesto más abundante. (Guzmán-Gutiérrez et al, 2012). De manera contrastante de una colecta de una muestra adquirida en el mercado local del municipio de Apan, Hidalgo (México), no se reporta la presencia de eucaliptol como en nuestro estudio y los principales componentes son, linalool, γ -terpineno, β - cimeno, 2-norpineno, (-)-terpinen-4-ol y (-)- β -pineno (Lazcano-Torres et al, 2019).

Conclusiones

El potencial citotóxico de los aceites analizados presenta un valor de alta toxicidad (CL₅₀: 53.8 µg/mL a CL₅₀: 94.8 µg/mL) y moderada toxicidad (175.5 µg/mL a 451.6 µg/mL), lo que hace que sea de importancia farmacológica para posteriores estudios. Es posible considerar que el aceite esencial de *L. glaucescens* podría utilizarse como aditivo antimicrobiano, antiinflamatorios, antiespasmódico y para el tratamiento del cáncer

Agradecimientos

La realización de esta investigación ha sido posible gracias al apoyo financiero del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y al apoyo recibido al proyecto de Desarrollo y Transferencia de Tecnología (21008-DTT-90) de la Dirección General de Investigación y Posgrado de la Universidad Autónoma Chapingo (UACH). También se agradece al personal técnico-académico del Laboratorio de Productos Naturales de la UACH por las facilidades y orientaciones hechas durante la fase experimental.

Literatura Citada

- Agius BR, Setzer MC, Stokes SL, Walker TM, Haber WA, Setzer WN.** (2007). Composition and bioactivity of essential oils of Lauraceae from Monteverde, Costa Rica. *Int J Essent. Oil Ther.*;1:167-171.
- Azhar, M.A.M., Salleh, W.M.N.H.W., Khamis S., Ghani. N.A.** (2022). Variation in essential oil composition of three *Litsea* species from Malaysia. *La rivista italiana delle sostanze grasse* - Vol. XCIX, 1-6. <https://www.researchgate.net/publication/360540412>
- Andreatta, E. A., Longo, B. M., Utrera, C., Saavedra, M. y Foco, G.** (2012). Caracterización de Aceites Esenciales del Departamento San Justo (Córdoba). *Jornadas de Ciencia y Tecnología*. Universidad Tecnológica Nacional de Villa María, Córdoba, Argentina. Disponible en: http://www.edutecne.utn.edu.ar/cytal_frv/cytal_2012/tf/tf008.pdf
- Camacho P, Cáceres A, Rodríguez J.** (2011). Extracción de aceite esencial de eucalipto. Recuperado de <https://es.scribd.com/doc/48247006/Extraccion-de-aceites-esenciales-informe>
- CYTED: Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo.** 2014. Consultado en: <http://www.cyt.org>. Accesado 24 de enero de 2022.
- Damasceno, Carolina Sette Barbosa, Letícia Freire de Oliveira, Ellis Marina Szabo, Ângela Maria Souza, Josiane Fatima Gaspari Dias, Marilis Dalarmi Miguel, and Obdúlio Gomes Miguel.** (2017). "Chemical Composition, Antioxidant and Biological Activity of *Ocotea Bicolor* Vattimo-Gil (LAURACEAE) Essential Oil." *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 53(4). doi: 10.1590/s2175-97902017000417298.
- De, Jefferson R., A. Silva, Dominique F. M. do Carmo, Érika M. Reis, Gérzia M. C. Machado, Leonor L. Leon, Bianca O. da Silva, José Luiz, P. Ferreira, Ana Claudia, and F. Amaral.** (2009). *Chemical and Biological Evaluation of Essential Oils with Economic Value from Lauraceae Species*. Vol. 20. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532009000600011>
- Esteyneffer, J.** 1978. (1712). *Florilegio medicinal*. Mexico: Academia nacional de medicina, 1978 Description: 2 vol. (XXIII-537 p.; XII-p. 543-973); 21 cm
- Guzmán Gutiérrez, S. L., Gómez- Cansino, R., Gracia- Zebadúa, J. C., Jiménez- Pere, N. C., y Reyes- Chilpa, R.** (2012). Atidepressant activity and Linalool as active principales. *Journal of ethnopharmacology*, 143(2), 673- 679. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.07.026>

- Hammid, Syaliza Abdul, y Fasihuddin Ahmad.** (2015). Chemotype of *Litsea Cubeba* Essential Oil and Its Bioactivity. *Nat. Prod. Commun.* 10, 1301–1304. Disponible en: <https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/1934578X1501000741>
- Jiménez Pérez, N.C., F.C. Lorea Hernández, C.K. Jankowski y R. Reyes Chilpa.** (2011). Essential oils in Mexican bays (*Litsea* spp., Lauraceae): taxonomic assortment and ethnobotanical implications. *Economic Botany* 65(2):178-189. DOI:10.1007/s12231-011-9160-5.
- Kuspradini, H., Wulandari, I., Putri, AS, Tiya, SY y Kusuma, IW** (2018). Propiedades fitoquímicas, antioxidantes y antimicrobianas de los extractos de *Litsea angulata*. *F1000Research*, 7, 1839. <https://doi.org/10.12688/f1000research.16620.2>
- Lazcano-Torres, C. I., Romero-López, M. D. R., Fuentes-Jiménez L., García-Zebadúa, J. C.** (2019), Perfil Aromático del Aceite Esencial de *Litsea glaucescens* y Revisión de la Capacidad Antimicrobiana para Conservación de Alimentos. *REIA*, 5: 5-10, ISSN: 2448-6817
- López, J., W. Barillas, J. Gómez, F. Lin, A. Al, M. Sharaf y P. Schiff.** (1995). Flavonoids of *Litsea glaucescens*. *Planta Médica* 61(2):198. DOI: 10.1055/s-2006-958054
- Lorea-Hernández, F. G.** (2002). La familia Lauraceae en el sur de México: diversidad, distribución y estado de conservación. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, (71), undefined-undefined. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=577/57707104>.
- Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.E., Jacobsen, L.B., Nichols, D. E., Nicols, J. L., McLaughlin, J.** (1982). Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *Planta Medica*. 45(5):31-4. DOI: 10.1055/s-2007-971236
- Michael, A. S., Thompson, C. G., Abramovitz, M.** (1956). *Artemia salina* as a test organism for a bioassay. *Science* 123: 464. DOI: 10.1126/ciencia.123.3194.464.a
- Montañez-Armenta, M. P.** (2006). Proceso de organización social para el aprovechamiento del Laurel silvestre (*Litsea glaucescens*) en la Sierra del Laurel, Aguascalientes. Instituto en Socioeconomía, Estadística e Informática, Desarrollo Rural. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Edo. de México. México. 110 p. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4471093>
- Moreno, J.; López, G.; Siche, R.** (2010). Modelación y optimización del proceso de extracción de aceite esencial de eucalipto (*Eucalyptus globulus*). *Scientia Agropecuaria* 1(2): 147-154. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=357633695005>
- Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2019.** (2019). Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio Lista de especies en riesgo. Disponible en: http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5173091&fecha=30/12/2010
- Osuna, L., M.E Tapia y A. Aguilar.** (2005). Plantas medicinales de la medicina tradicional mexicana para tratar afecciones gastrointestinales. Estudio 33 etnobotánico, fitoquímico y farmacológico. España. Universidad de Barcelona. 173p. Disponible en: <http://www.publicacions.ub.es/refs/indices/06499.pdf>
- Stashenko, E.E., Ferreira, C., Sequeda, G., Mateus, A., Cervantes, M. & Martínez, J.R.** (1997). “Desarrollo de un método para monitoreo de la degradación oxidativa en lípidos y evaluación de la actividad antioxidante de productos naturales”, *Arte y Ciencia Cosmética* 12: 20-27. Disponible en: <https://www.academia.edu/4147663/>
- Uddin, Mohammad Najim, Towsif Alam, Muhammad Azharul Islam, Tawhidul Amin Khan, Raihan Uz Zaman, Shofiul Azam, A. T. M. Mostafa Kamal, and Md Jakaria.** (2020). “Evaluation of Carbon Tetrachloride Fraction of *Actinodaphne Angustifolia* Nees (Lauraceae)

Leaf Extract for Antioxidant, Cytotoxic, Thrombolytic and Antidiarrheal Properties.” *Bioscience Reports* 40(6). DOI: 10.1042/BSR20201110

Valdés, J. and H. Flores. (1985). Comentarios a la historia de las plantas de la nueva España. In: Obras completas de Francisco Hernández, Tomo VII, 179. Universidad Nacional Autónoma de México, México.

Van der Werff, H., y Lorea Francisco. (1997). Flora del Bajío y de Regiones adyacentes: Familia *Lauraceae*. Instituto de Ecología A.C., Xalapa, Ver. México. Fascículo 56. pp. 25-31. DOI: <https://doi.org/10.21829/fb.259.1997.56>

Vásquez, O.; Alva, A.; Marreros, J. (2001). Extracción y caracterización del aceite esencial de Jengibre (*Zingiber officinale*). *Revista Amazónica de Investigación Alimentaria* 1(1): 38-42. Disponible en: <https://www.yumpu.com/es/document/read/12717797/>

Análisis de RMN de las fracciones enriquecidas en ciclopéptidos del extracto
metanólico de semillas de *Annona diversifolia*

**Murrieta-Dionicio Ulises¹, Reyes-Trejo Benito¹, Zuleta-Prada Holber¹, Guerra-Ramírez
Diana¹**

Resumen

Los ciclopéptidos se pueden obtener de diferentes fuentes animales, bacterianas, fúngicas y vegetales. Su importancia resalta por sus propiedades bioactivas como antimicrobianos, antifúngicos, antibacterianos, antitumorales, inmunosupresores entre otras. En el reino vegetal particularmente en la familia de las anonáceas, existen investigaciones en semillas de frutos con importancia comercial como *Annona muricata*, *cherimola*, y *squamosa*. Recientemente se encontraron cuatro nuevos ciclopéptidos a partir de semillas de *Annona globiflora* especie localizada en el sureste mexicano. Frente a este panorama las anonáceas nativas de México representan una fuente natural para la obtención de este tipo de moléculas. El objetivo de este trabajo fue obtener fracciones enriquecidas en ciclopéptidos mediante técnicas cromatográficas para su análisis con Resonancia Magnética Nuclear (RMN). Se inició con la obtención de diferentes extractos de semillas de *Annona diversifolia* utilizando disolventes de menor a mayor polaridad, posteriormente se empleó un sistema de extracción líquido-líquido, seguido de una purificación en cromatografía en columna para finalmente se llevar a un sistema de purificación flash y finalmente un sistema de extracción en fase sólida (SPE). Previamente se analizaron extractos y fracciones de obtenidas por cromatografía en columna, que contenían ciclopeptidos que al someterse a estudios de RMN se observó que estaban combinados con azúcares como sacarosa y glucosa en diversas proporciones Finalmente, se logró obtener una fracción enriquecida en ciclopéptidos y libres de la presencia de azúcares, concluyendo la presencia de este tipo de moléculas en extractos de mayor polaridad, que actualmente están siendo analizados por varias técnicas espectroscópicas y espectrométricas.

Palabras clave: *Annona diversifolia*, ciclopéptidos, RMN

Abstract

Cyclopeptides can be obtained from different animal, bacterial, fungal and plant sources. Its importance stands out for its bioactive properties such as antimicrobials, antifungals, antibacterials, antitumors, immunosuppressants among others. In the plant kingdom, particularly in the annonaceae family, there is research on commercially important fruit seeds such as *Annona muricata*, *cherimola*, and *squamosa*. Four new cyclopeptides were recently found from seeds of an *Annona globiflora* species located in southeastern Mexico. Against this background, the annonaceae native to Mexico represent a natural source for obtaining this type of molecules. The objective of this work was to obtain fractions enriched in cyclopeptides using chromatographic techniques for analysis with Nuclear Magnetic Resonance (NMR). It began

¹ Tomado en parte de la parte experimental de tesis doctoral de Ulises Murrieta Dionicio Laboratorio de Productos Naturales, Área de Química, Departamento de Preparatoria Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo, Km. 38.5 Carretera México- Texcoco, Texcoco 56230, Estado de México, México. Correo: murrieta.dionicio.091293@gmail.com, breyest@chapingo.com, honzuleta_13@hotmail.com, dguerrar@chapingo.mx

with the preparation of different extracts of *Annona diversifolia* seeds using solvents from lower to higher polarity, later a liquid-liquid extraction system was used, followed by a purification in column chromatography to finally be taken to a flash purification system and finally a solid phase extraction system (SPE). Previously, extracts and fractions obtained by column chromatography were analyzed, which contained cyclopeptides that when subjected to NMR studies it was observed that they were combined with sugars such as sucrose and glucose in various proportions. Finally, it was possible to obtain a fraction enriched in cyclopeptides and free of the presence of sugars, concluding the presence of this type of molecules in extracts of greater polarity, which are currently being analyzed by several spectroscopic and spectrometric techniques.

Keywords: *Annona diversifolia*, cyclopeptides, NMR

Introducción

Annona es el segundo género más grande de plantas perteneciente a la familia de las Annonaceas, cuenta con alrededor de 166 especies entre arbustos y árboles (Dahiya & Dahiya, 2021). En México, considerado un país megadiverso, se han documentado 20 especies pertenecientes a este género, dentro de las que destacan por su origen y grado de domesticación *A. muricata*, *A. cherimola* (especies No-Nativas), *A. globliflora*, *A. longiflora* (especies Endémicas), *A. squamosa*, y *A. diversifolia* (especies Nativas) por mencionar algunas (Escobedo-López et al., 2019). La mayoría de ellas se cultivan en traspatios o en áreas destinadas al pastoreo. Con respecto a los frutos estos se cosechan acorde con su temporada estacional y se destinan a comercios locales por lo que su valor económico se encuentra infravalorado por su lejanía de comercios urbanos (De la Cruz-Chacón et al., 2016). Asociado a su valor comercial, existe evidencia de la preparación de extractos y/o infusiones a partir de cortezas, hojas, raíces, tallos, semillas, y pulpa dentro de la medicina tradicional para el tratamiento de algunos padecimientos (Coria-Téllez et al., 2018). Por lo que resulta relevante una justificación científica, donde este tipo de evidencia pueda tener un uso comercial con aplicaciones industriales y farmacéuticas (Anaya-Esparza et al., 2020). A su vez, las plantas de este género son fuentes importantes de compuestos bioactivos que incluyen acetogeninas, alcaloides, compuestos fenólicos, carotenoides, aminoácidos, aceites esenciales, ciclopéptidos, antocianinas, vitaminas y minerales (Bhardwaj et al., 2020).

Los ciclopéptidos son compuestos de carácter cíclico conformados entre 5 a 14 aminoácidos y cuyo peso molecular ronda entre los 500 a 2 000 Da. Poseen una gran área de contacto debido a su tamaño y diversidad de grupos funcionales que de esta manera les confiere una alta selectividad, y amplio potencial para la formación de enlaces de hidrógeno que se traducen en una fuerte afinidad de unión con otras moléculas (Gang et al., 2018). Los estudios aplicados en especies del género *Annona* han demostrado la presencia de ciclopéptidos con una gran diversidad de tamaños que además incluyen potenciales bioactividades como antiproliferativos, antimicrobianos, antihelmínticos, antiinflamatorios, y citotóxicos. Debido a estas bio-propiedades, los ciclopéptidos de semillas de este género resultan ser atractivos para el proceso de elaboración e innovación de fármacos (Dahiya & Dahiya, 2021). Por lo que el objetivo de este trabajo fue obtener fracciones enriquecidas en ciclopéptidos y libres de azúcares como sacarosa y glucosa, mediante técnicas cromatográficas para su análisis con Resonancia Magnética Nuclear (RMN), para establecer bases de datos de moléculas tipo ciclopeptidos que exhiban diversas actividades biológicas.

Materiales y métodos

Material Vegetal

Se adquirieron frutos de *A. diversifolia* en el mercado de Tejupilco Estado de México (coordenadas geográficas 18° 53' 58" N y 100° 09' 01" O), en octubre de 2019. Se seleccionaron frutos en estado de madurez fisiológica. El fruto fue certificado por la botánica Ernestina Cedillo Portugal de la Universidad Autónoma de Chapingo (UACH) y algunos ejemplares fueron comparados con los depositados en el herbario (AN9702), "Herbario de plantas útiles Efraím Hernández X" de la UACH. Las semillas se separaron manualmente del fruto y se lavaron con agua corriente con el propósito de eliminar restos de mucilago y/o pulpa.

Finalmente se secaron a temperatura ambiente por 2 semanas. Se eliminaron aquellas semillas que presentaron pudriciones o daños por insectos, en la figura 1, se muestra el material vegetal utilizado



Figura 1. Aspecto de los frutos y semillas de *A. diversifolia*, utilizadas en este estudio.

Aislamiento y detección de ciclopéptidos

Las almendras fueron separadas manualmente de sus semillas utilizando unas pinzas mecánicas, posteriormente, 2 kg fueron molidas y colocadas en maceración con 3 L de disolvente por 3 días, posteriormente se decantó y filtró para separar el bagazo del disolvente. El disolvente se recuperó por evaporación a presión reducida utilizando un evaporador rotatorio (Büchi® Rotavapor R-300, Suiza), dicho disolvente se reincorporó nuevamente a las semillas (bagazo). Este proceso se repitió 2 veces más con el mismo tipo de disolvente. Se prepararon extractos a polaridad creciente con los disolventes: hexano, cloruro de metileno (CH_2Cl_2), acetato de etilo (AcOEt), acetona, metanol (MeOH). Subsiguientemente, al extracto metanólico se llevó a un proceso de extracción líquido-líquido utilizando hexano, CH_2Cl_2 , AcOEt , y agua. Cada una de las particiones obtenidas se evaporaron a presión reducida incluida también la fase acuosa, cuyo aspecto se muestra en la figura 2.



Figura 2. Maceración de semillas de *A. diversifolia*, y extractos obtenidos en este estudio.

Se efectuó un monitoreo para la detección de péptidos y ciclopéptidos en las particiones. Esta detección química involucró el uso de cromatografía en capa delgada (CCD) con una mezcla de elución con CH_2Cl_2 -MeOH- H_2O (5:4:1) adicionada con ácido acético glacial al (0.5 %), así como el revelado con una solución de ninhidrina/acetona al 0.1% para identificar presencia de péptidos lineales o aminoácidos libres y el uso de Cl_2 /o-tolidina para la detección de ciclopéptidos. Como testigos se usaron el aminoácido valina y el ciclopéptido 2,5-piperazindiona cuyas estructuras moleculares se muestran en la figura 3, (Sigma Aldrich) (Tan & Zhou, 2006). La fase acuosa (11.43 g), dio prueba positiva (ciclopéptidos), por lo cual fue llevada a un proceso de purificación en cromatografía en columna empacada con Silica Gel 60 (malla 70-230 ATSM, Merck®, Alemania) en una relación 1:30 p/p (extracto/gel). Como fase móvil se usó una mezcla de CH_2Cl_2 -MeOH con incrementos de 3 % en 3 % del disolvente más polar hasta llegar a un 50 %, después los incrementos fueron de 10 % (Welé et al., 2004), de igual manera se efectuó un monitoreo con CCD a las fracciones obtenidas. Las fracciones que presentaban cromóforos o r_f similares (Cl_2 /o-tolidina) se reunieron para una sucesiva purificación, en la figura 4, se muestran aspectos de la coloración observada y desarrollada por los reveladores.

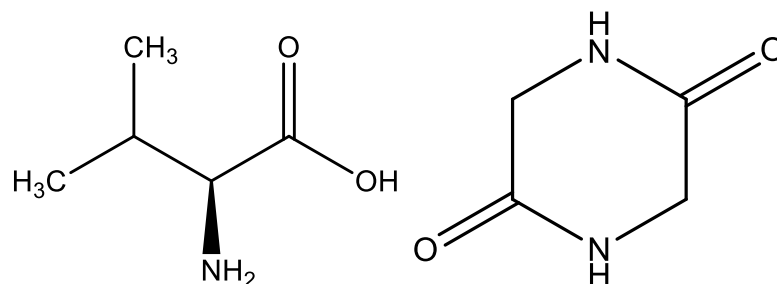


Figura 3. Estructuras moleculares de la L-valina y 2,4-piperazindiona, empleados como estándares de reconocimiento de aminoácidos y ciclopéptidos presentes en *A diversifolia*.

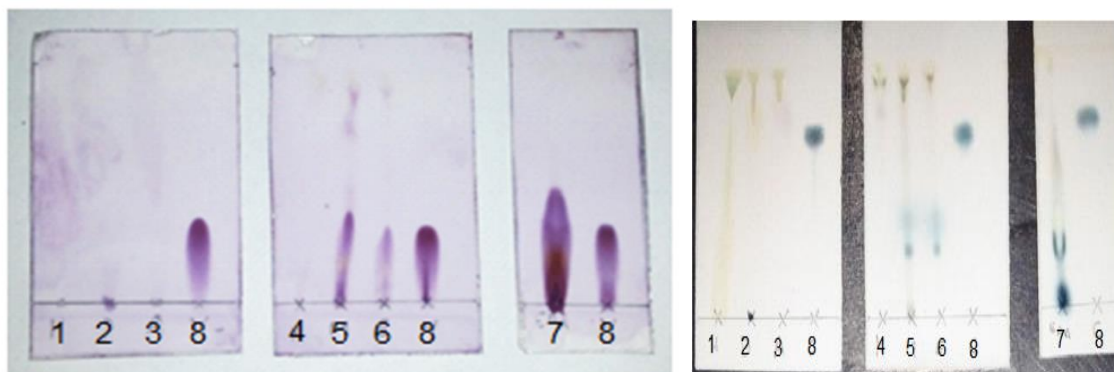


Figura 4. Cromatofolios de extractos de *A. diversifolia* revelados con ninhidrina (Izquierda) para la detección de péptidos y con o-tolidina (Derecha) para la detección de ciclopéptidos: 1) Extracto de Hexano, 2) Extracto de CH_2Cl_2 , 3) Extracto de AcOEt, 4) Extracto de acetona, 5) Extracto de metanol, 6) Extracto de etanol, 7) Extracto de EtOH/ H_2O /AcOH, 8) Valina.

Las fracciones F97 a F150 fueron reunidas y se llevaron a un sistema de purificación Isolera™ One Biotage®. Para ello se usó una columna SNAP KP-Sil 25g, con una mezcla CH_2Cl_2 -MeOH

como fase móvil. Las fracciones reunidas por detección del lector UV del sistema Isolera One Biotage® se sometieron finalmente a un proceso de purificación por extracción en fase sólida (SPE, por sus siglas en inglés). Para ello se utilizó un cartucho Strata™ C18-T, y como fase móvil se usó una mezcla H₂O-ACN (0.05 % TFA) con incrementos de 10 % del disolvente menos polar. Por último las fracciones se concentraron a presión reducida en un evaporador rotatorio.

Estudios de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Las fracciones obtenidas de la SPE se analizaron en un Espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear Agilent® DD2 a 400 MHz. Se determinaron espectros de RMN-¹H a 400 MHz y RMN-¹³C a 100 MHz. Las muestras se disolvieron en metanol deuterado (CD₃OD), como referencia interna se usó tetrametilsilano (TMS).

Resultados y discusión

Datos diagnósticos presentes en los espectros de RMN, ayudan tanto en la detección como en la identificación de ciclopéptidos, así en la figura 5, se muestran los desplazamientos químicos de RMN-¹H (izquierda) y de RMN-¹³C (derecha) que se observarían en ciclopéptidos, que en este caso corresponden de manera general a un ciclotripéptido.

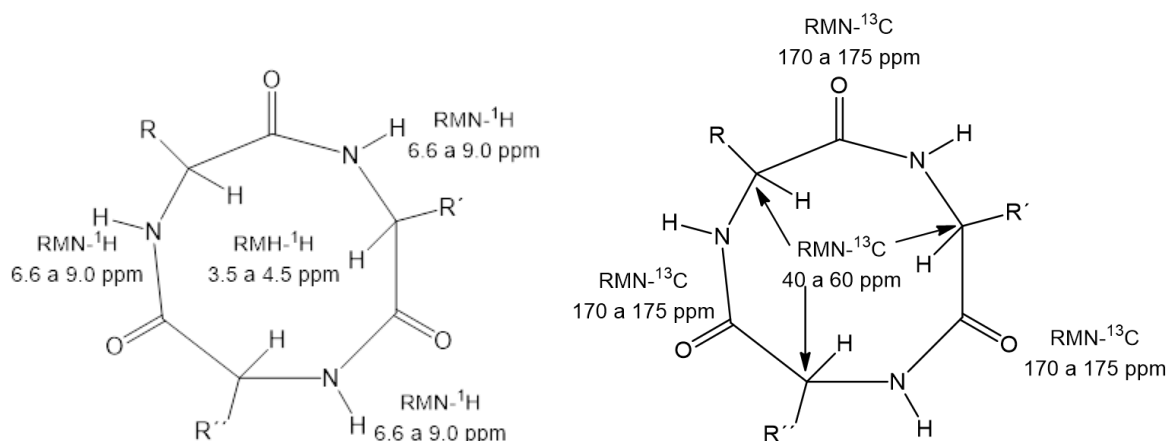


Figura 5. Desplazamientos de RMN -¹H (izquierda) y de RMN-¹³C (derecha) que se observarían en ciclopéptidos, en este ejemplo corresponden de manera general a un ciclotripéptido

Así, de las fracciones analizadas, la F:97-150-F.I:1-40-SPE:30 % ACN aportó información derivada a partir de su espectro de RMN-¹H, mostrado en la Figura 6, donde se observan un conjunto de señales dobles y triples en la región de 6.6–9.0 ppm (trazo superior) que corresponden a los hidrógenos del grupo amida (R-CO-NH-R') de los enlaces peptídicos que conforman a los ciclopéptidos. Por otra parte, en la región de 3.5–4.5 ppm se distinguen señales múltiples que corresponderían a los hidrógenos enlazados al carbono C_α al grupo carbonilo (C=O). En tanto que las señales comprendidas a campos más altos entre 0.5–1.5 ppm corresponden a cadenas laterales R de residuos de aminoácidos como valina, leucina, alanina,

isoleucina, o treonina con la presencia de grupos metilo ($-\text{CH}_3$). También es posible observar entre las 6.6–7.0 ppm (región aromática) la presencia de señales que atañen a hidrógenos de grupos fenilo correspondientes a aminoácidos como triptófano, fenilalanina o tirosina (Tan & Zhou, 2006).

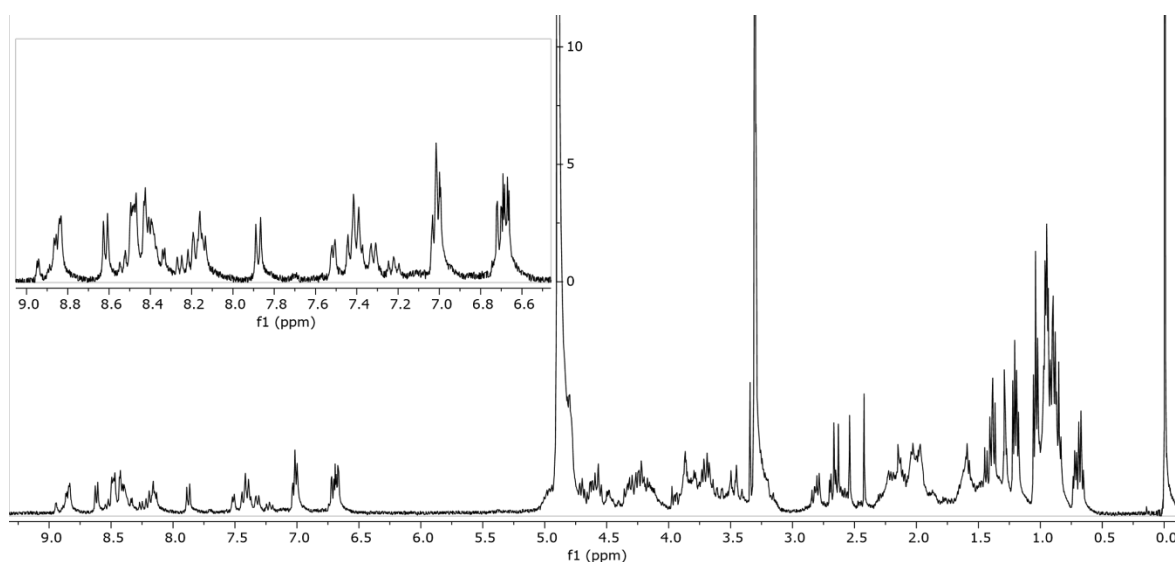


Figura 6. Espectro de RMN ^1H (CD_3OD , 400 MHz, TMS) de la fracción F:97-150-F.I:1-40-SPE:30 % ACN con presencia de ciclopeptidos (trazo inferior), el trazo superior es una expansión de 6.6 a 9.0 ppm, indicando presencia de $-\text{NH}$.

Por otro lado, el espectro de RMN- ^{13}C presentado en la figura 3, muestra información complementaria y confirmatoria de la presencia de ciclopeptidos, de esta manera en su expansión de 170.0–175.0 ppm señales pertenecientes a los grupos carbonilo ($\text{C}=\text{O}$) de los residuos de aminoácidos que conforman a los ciclopeptidos, así mismo la observación de señales en la región 40.0–60.0 ppm se corresponde a los carbonos C_α a los grupos carbonilos. En lo que respecta a los carbonos pertenecientes a aminoácidos conteniendo anillos aromáticos, estas señales se localizan cercanas a las 115 y 130 ppm. La región entre 15.0–20.0 ppm comprende señales de grupos $-\text{CH}_3$ presentes en aminoácidos ya mencionados en el análisis de la Figura 7.

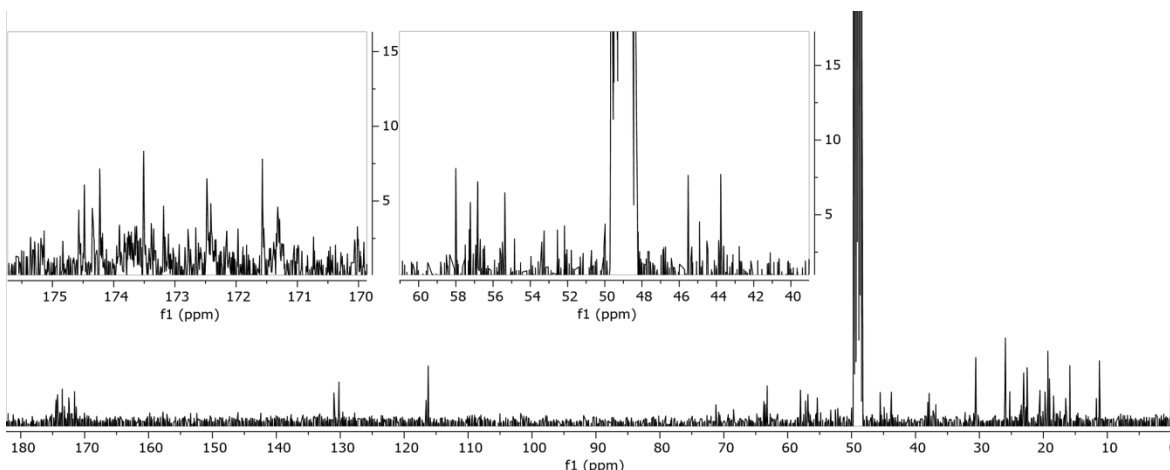


Figura 7. Espectro de RMN ^{13}C (CD_3OD , 100 MHz, TMS) de la fracción F:97-150-F.I:1-40-SPE:30% ACN con presencia de ciclopéptidos (trazo inferior), los trazos superiores son expansiones de 170-175 y 40-60 ppm, indicando la región de $\text{C}=\text{O}$ y C_α respectivamente.

Conclusiones

Se obtuvo una fracción enriquecida en ciclopéptidos la cual se examinó mediante estudios de RMN de ^1H y ^{13}C , indicando la ausencia de señales de los protones de azúcares, indicando que se trata de una mezcla de al menos dos ciclopéptidos conformados por residuos de aminoácidos con presencia de anillos aromáticos. La etapa final de este estudio incluye la búsqueda de una técnica de purificación que permita separar a los ciclopéptidos de dicha fracción, manejando por ejemplo el uso de un sistema HPLC.

Literatura Citada

- Anaya-Esparza, L. M., de Lourdes Garcia-Magana, M., Domínguez-Ávila, J. A., Yahia, E. M., Salazar-López, N. J., González-Aguilar, G. A., & Montalvo-González, E. (2020).** Annonas: Underutilized species as a potential source of bioactive compounds. *Food Research International*, 138, 109775.
- Bhardwaj, R., Pareek, S., Sagar, N. A., & Vyas, N. (2020).** Bioactive compounds of annona. In *Bioactive compounds in underutilized fruits and nuts* (pp. 37-62). Springer, Cham.
- Coria-Téllez, A. V., Montalvo-González, E., Yahia, E. M., & Obledo-Vázquez, E. N. (2018).** Annona muricata: A comprehensive review on its traditional medicinal uses, phytochemicals, pharmacological activities, mechanisms of action and toxicity. *Arabian Journal of chemistry*, 11(5), 662-691.
- Dahiya, R., & Dahiya, S. (2021).** Natural bioeffective cyclooligopeptides from plant seeds of Annona genus. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 214, 113221.
- De La Cruz Chacon, I., Castro Moreno, M., Luna Cazares, L. M., & Gonzalez Esquinca, A. R. (2016).** La familia Annonaceae Juss. en México.
- Escobedo-López, D., Campos-Rojas, E., Rubén Rodríguez-Núñez, J., Alia-Tejagal, I., & Núñez-Colín, C. A. (2019).** Priority areas to collect germplasm of Annona (Annonaceae) in Mexico based on diversity and species richness indices. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 66(2), 401-413.

Gang, D., Kim, D. W., & Park, H. S. (2018). Cyclic peptides: Promising scaffolds for biopharmaceuticals. *Genes*, 9(11), 557.

Tan, N. H., & Zhou, J. (2006). Plant cyclopeptides. *Chemical reviews*, 106(3), 840-895.

Wélé, A., Landon, C., Labbe, H., Vovelle, F., Zhang, Y., & Bodo, B. (2004). Sequence and solution structure of cherimolacyclopeptides A and B, novel cyclooctapeptides from the seeds of *Annona cherimola*. *Tetrahedron*, 60(2), 405-414.

Uso de la RMN para analizar dos acetogeninas activas contra la larva del mosquito transmisor del dengue (*Aedes aegypti*)

Benito Reyes-Trejo,¹ Holber Zuleta Prada,¹ Lino Reyes-Trejo,² Hussein Sánchez-Arroyo³

Resumen

A partir de los extractos preparados con disolventes orgánicos de las semillas de *Annona purpurea*, se estimó el porcentaje de mortalidad de dichos extractos en las larvas de *Aedes aegypti* L., del mosquito transmisor del dengue, el extracto de AcOEt fue evaluado a las 24 y 48 horas de exposición a las larvas, usando las concentraciones 1000, 100, 10 y 1 µg/mL., específicamente al segundo día de observación el porcentaje de mortalidad fue de 51.66 % a la concentración de 10 µg/mL. Este extracto fue analizado por cromatografía en columna y aportó la fracción F5, rica en dos acetogeninas, una de ellas correspondió a una acetogenina que contiene un grupo cetónico, por lo que esta fracción fue sometida a una repurificación empleando un cromatógrafo de líquidos, tipo Isolera Dalton con detección de lámpara de luz ultravioleta para dar una serie de fracciones ricas en una sola acetogenina, mismas que fueron analizadas por la técnica de RMN y aportó información que la composición química de estas debe corresponder a la estructura de acetogeninas α,β -insaturadas en el anillo de una γ -lactona, lo cual constituye una nueva aportación a la composición de esta planta

Palabras clave: *Annona purpurea*, Acetogeninas, Insecticida, recurso fitogenético

Abstract

From the extracts prepared with organic solvents of the seeds of *Annona purpurea*, the percentage of mortality of these extracts in the larvae of *Aedes aegypti* L., of the mosquito transmitting dengue, was estimated, the extract of AcOEt was evaluated at 24 and 48 hours of exposure to the larvae, using concentrations 1000, 100, 10 and 1 µg/mL. specifically on the second day of observation, the mortality rate was 51.66% at the concentration of 10 µg/mL. This extract was analyzed by column chromatography and provided the fraction F5, rich in two acetogenins, one of them corresponded to an acetogenin containing a ketone group, so this fraction was subjected to a repurification using a liquid chromatograph, type Isolera Dalton with detection of ultraviolet light lamp to give a series of fractions rich in a single acetogenin,

¹Laboratorio de Productos Naturales, Área de Química, Departamento de Preparatoria Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo. Km 38.5 Carretera México-Texcoco. 56230, Texcoco, Edo. de México, México. Tel. 01 (55) 5133-1108 Ext 5760. Correo: hozuleta_13@hotmail.com

²Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, UNAM, Ciudad Universitaria, Delegación Coyoacán. 04510, D.F. México. Correo: Linoj23@yahoo.com.mx

³Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Instituto de Fitosanidad. Km 36.5 Carretera México-Texcoco. 56230, Montecillo, Texcoco, Edo. de México, México. Correo: hussein@colpos.mx, benijovi@yahoo.com.mx

which were analyzed by the NMR technique and provided information that the chemical composition of these must correspond to the structure of acetogenins α,β -unsaturated in the ring of a γ -lactone, which constitutes a new contribution to the composition of this plant

Key words: *Annona purpurea*, Acetogenins, Insecticide, Phytogenetic Resources.

Introducción

Las estimaciones mundiales actuales indican que cada año pueden producirse entre cincuenta y cien millones de infecciones por el virus del dengue (WHO, 2017). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), dos quintas partes de la población mundial vive en riesgo de ser infectada por dengue y más de 100 países han sido afectados por epidemias de dengue o dengue hemorrágico. La OMS estima que anualmente ocurren más de 500,000 casos hospitalizados y alrededor de 20,000 defunciones. El 95% de los casos son niños. En México, según datos de la Dirección General Epidemiológica, en los últimos siete años se han registrado 291 305 casos y alrededor de 500 defunciones por este virus.

Por otro lado, la Organización Panamericana de la Salud recomienda que para el control del mosquito vector del dengue (*Aedes aegypti*) se lleven a cabo acciones de manejo ambiental, control biológico y el control químico (OPS, 2019). Siendo el más utilizado el control químico, sin embargo, el uso inadecuado de insecticidas ha conducido a la aparición de poblaciones resistentes. Y esta resistencia se ha detectado en todas las clases de insecticidas, lo que beneficia, directamente el resurgimiento de las enfermedades (Braga y Valle, 2007). Por lo que, una alternativa en el control de este vector es el uso de extractos vegetales, debido a su compleja cantidad de moléculas que muestran diversas bioactividades. Los niveles de toxicidad son elevados en relación a la acción de compuestos individuales químicamente puros y sin el riesgo de generar resistencia (Bobadilla *et al.*, 2005).

Muchas especies vegetales, especialmente las de la familia Annonaceae, han mostrado tener bioactividades insecticidas (De Mendonça *et al.*, 2005). Dicha actividad se produce gracias a un grupo de metabolitos secundarios distribuidos principalmente en la familia annonaceae llamadas acetogeninas (Zafra *et al.*, 1998). Sin embargo, no se han terminado de explorar todas las especies de la familia, como, por ejemplo, la chincuya (*Annona purpurea* L.) que es un frutal originario sureste de México, Centroamérica y el norte de Suramérica. Un caso particular ha sido publicado del estudio de extractos alcohólicos de las semillas de pimienta negra (*Piper nigrum*) y de semillas de guanábana (*Annona muricata*) para controlar larvas del mosquito causante del dengue (*Aedes aegypti*) y concluyó en que la actividad biológica se debió a la piperina y las acetogeninas de las semillas de guanábana (Grzybowski *et al.*, 2012). Por este motivo y con el propósito de incorporar un recurso alternativo para el control del mosquito *A. aegypti*, dentro de un manejo racional y sostenible de nuestro medio ambiente, la presente investigación tiene como objetivo evaluar la toxicidad de extractos de las semillas de *Annona purpurea* L. (chincuya) sobre larvas de *Aedes aegypti* L. (Díptera: Culicidae), para evitar la proliferación del principal vector del virus del dengue y finalmente elucidar la estructura molecular de los metabolitos secundarios de los que se presume radica la actividad larvicida, para aportar una nueva alternativa natural y sustentable para controlar al dengue.

Antecedentes

El fruto de *Annona purpurea* está ubicado en la familia de las anonáceas que cuenta con un gran número de especies frutales y productoras de aceites esenciales (León, 1969). Las cuales también se conocen porque contienen acetogeninas. Debido a que no forma parte de la dieta habitual, el uso de las semillas no representa un problema ético. En México los frutos de esta anonacea se utilizan principalmente como alimento: su pulpa se consume cruda o en jugo como bebida refrescante, también se emplea como remedio para la fiebre y la gripe, el extracto de la semilla se llega a utilizar como insecticida, sin embargo, la mayoría de las semillas se desechan. Diversas partes de la planta de esta especie han sido objeto de investigaciones previas, por ejemplo se ha descrito el contenido de alcaloides en las hojas y ramas de *A. purpurea* recolectadas en Puerto Rico (Sonnet y Jacobson, 1971), En otros estudios sobre anonáceas Wu *et al*, 2000, reportan los alcaloides: promucosina, romucosina F, y romucosina G, obtenidos de las ramas y de las semillas se ha obtenido el perfil de lípidos y flavonoides (Pérez *et al*, 1997), a partir de las semillas de frutos de la *A. purpurea* procedentes de México (Chávez y Mata, 1998), se obtuvieron las nuevas acetogeninas nombradas como Purpurediolina y Purpurenina además de otras conocidas como purpuracena, bulatacena, esquamocina, motrilina, anoglauca, xilomatenina y anonacina. A. recientemente de las raíces de este mismo espécimen se aislaron e identificaron nuevas acetogeninas nombradas como annopurpuricinas A, B, C, D y E, (Hernández-Fuentes *et al*, 2019)

Materiales y métodos

Material vegetal

Una muestra de frutos de *Annona purpurea* aportó las semillas previamente colectadas en el mes de septiembre del año 2019, en Cintalapa, poblado de Chicomuselo, del Estado de Chiapas.

Obtención de las semillas

Los frutos se despulparon y se obtuvieron las semillas, las cuales, se secaron a temperatura ambiente bajo sombra durante quince días. Posteriormente, con ayuda de un cascanueces se extrajeron las almendras de dichas semillas para continuar con el estudio.

Molienda de las semillas

Considerando un lote de 1.0 Kg de almendras de chuncuya, se procedió con el molido de las mismas empleando una licuadora doméstica tipo nutri-bullet, y se mantuvieron bajo refrigeración y abrigadas de la luz hasta el momento de su uso.

Obtención de extractos

A partir de 1.0 kg de almendras molidas de *A. purpurea*, se prepararon extractos de menor a mayor polaridad y por maceración, empezando con la adición de 5 L de hexano al material vegetal, manteniéndose durante 3 días, pasado este tiempo se separó el hexano por filtración y se recupera este disolvente por evaporación al vacío utilizando un rotavapor marca Buchi, el disolvente recuperado se reincorporó a las semillas molidas y se mantuvo así durante otros tres días, pasado el tiempo se filtró y evaporó el disolvente, esta operación se repitió por tercera ocasión para dar un extracto hexánico aceitoso y un residuo vegetal. A dicho residuo se le adicionaron 5 L de cloruro de metileno y se extrajo durante tres días (3 veces), al filtrar y

evaporar el disolvente se obtuvo un extracto de cloruro de metileno, y un segundo residuo vegetal. Este último residuo fue sometido a una extracción por maceración (3 veces por tres días cada una) empleando 5 L de acetato de etilo (AcOEt) al evaporar el disolvente se obtuvo un extracto de AcOEt y otro residuo vegetal, enseguida se efectuaron otras extracciones empleando el mismo procedimiento anterior con 5l de acetona, después con 5 L de etanol, enseguida con 5 L de etanol y al final con 5L de una mezcla de etanol-agua (1:1) acidulada con ácido acético al 1%.

Análisis por cromatografía en columna y de líquidos de la fracción F5

Se pesó 1.0 g de la fracción F5 procedente del extracto de acetato de etilo por desarrollar la segunda mayor actividad larvicida, y se sometió a una separación por cromatografía de columna o percolación. Para lo cual se empleó una columna de vidrio con 50 g de Silica gel 60 Merck (0.063-0.200 mm) (70-230 mesh ASTM). A la columna cromatográfica se le hizo pasar los disolventes CH₂Cl₂ y en combinación con MeOH en un orden creciente de polaridad terminando con metanol al 100 %; las acetogeninas fueron detectadas en las fracciones 80 a 92. Al evaporar los disolventes se obtuvieron 600 mg de esta fracción. El seguimiento de la cromatografía se efectuó usando placas cromatograficas de gel de sílice, una lámpara de luz UV como revelador físico no-destructivo y por medio de la aspersión de los reveladores vainillina-ácido sulfúrico y ácido fosfomolibdico, desarrollándose coloración o aparición de manchas en las cromatoplasmas analíticas, por medio de un calentamiento a 120 °C por 30 segundos.

Detección de metabolitos secundarios por RMN de ¹H y ¹³C

Las fracciones obtenidas de la cromatografía en columna del extracto de AcOEt, fueron sometidos a un análisis por Resonancia Magnética Nuclear de ¹H (RMN de ¹H) y de RMN de ¹³C, así mismo fueron sometidos a estudios de RMN bidimensional Heteronuclear de tipo HSQC y HMBC, entonces se pesaron 50 mg de cada extracto y se disolvieron en 0.75 mL de CDCl₃, y transferidos a un tubo de RMN (5 mm de diámetro x 150 mm de largo) y se determinaron sus espectros de RMN.

Bioensayo de la actividad insecticida-larvicida contra *Aedes aegypti*.

Proliferación del insecto

Para este trabajo se utilizó la cepa susceptible Nueva Orleans de *Aedes aegypti* L, obtenidas del Insectario del Programa de Fitosanidad: Entomología y Acaralogía del Colegio de Posgraduados, Texcoco, Edo de México. El ciclo de vida del mosquito se desarrolló en el laboratorio de Productos Naturales del Área de Química del Departamento de Preparatoria Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo.

Preparación de disoluciones por evaluar

Se prepararon las soluciones madre a una concentración del 1000 ppm utilizando 500 mg de extractos y se suspendieron en dimetil sulfoxido (DMSO) al 5% y 500 mL de agua potable, para tener sistemas homogéneos en lo posible se empleó un sonicador Cole-Palmer 8890®.

Bioensayo

Para los bioensayos de actividad larvicida se siguieron las recomendaciones del protocolo de la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2017). A vasos de precipitados de 250 mL, se les

adicionaron los extractos en concentraciones de 1000, 100, 10 y 1 µg/mL, con tres repeticiones por concentración. Preparados de la manera siguiente:

Suspensión madre de concentración a 1000 µg/mL.- Se pesaron 500 mg de cada fracción (F1 a F6) en un vaso de precipitados de 250 mL, se adicionaron 5 mL de Dimetil sulfóxido (DMSO) y se agitó vigorosamente utilizando una varilla de vidrio, enseguida se agregaron porciones de 5 mL de agua potable y se siguió agitando hasta tener aprox 50 mL de suspensión, seguidamente se sometió a un proceso de sonicación por 5 min o hasta obtener una mejor suspensión. El contenido del vaso se colocó en el interior de un matraz aforado de 500 mL, y se aforó a 500 mL con agua potable, se agitó finalmente de manera muy vigorosa.

Suspensión de concentración a 100 µg/mL.

Se tomó una alícuota de 50 mL de la solución madre (1000 µg/mL) y se colocó en el interior de un matraz aforado de 500 mL, se completó a la marca con agua potable y se agitó vigorosamente.

Suspensión de concentración a 10 µg/mL.- Se tomó una alícuota de 50 mL de la solución (100 µg/mL) y se colocó en el interior de un matraz aforado de 500 mL, se completó a la marca con agua potable y se agitó vigorosamente.

Una vez preparadas las suspensiones se repartieron 100 mL de las suspensiones de 1000, 100 y 10 µg/mL en vasos desechables de 250 mL (Del número 8) y se colocaron a cada vaso y con ayuda de una pipeta Pasteur, 20 larvas de *Aedes aegypti* de los estadíos tercero tardío y cuarto temprano. Se registró la mortalidad después de 24 y 48 horas de exposición a los extractos. Se consideró como muertas a las larvas que no llegaron a la superficie de la solución y las que puparon fueron descartadas para el análisis. Se incluyó una preparación como blanco que contuvo solamente una disolución de 5 mL de DMSO y 500 mL de agua potable a la que se le adicionaran 20 larvas de *Aedes aegypti*. todas las evaluaciones se ensayaron por triplicado

Resultados y discusión

Como se mencionó, un ensayo preliminar de la actividad larvica de los seis extractos preparados a partir de las semillas de chincuya o *Annona purpurea*, fueron evaluados en el bioensayo de la actividad larvica empleando larvas de *Aedes aegypti*, el extracto de acetato de etilo (AcOEt a las 24 y 48 hrs) provocaron los mayores porcentajes de mortalidad de dichas larvas tanto a las 24 como a las 48 hrs. específicamente al segundo día de observación los porcentajes de mortalidad fueron de 51.66 % a la concentración de 10 µg/mL, respectivamente (De Mendoza et al., 2005).

Respecto al análisis por cromatografía en columna empleando CH₂Cl₂ combinado con MeOH en proporción 95/5, se deduce que las fracciones de mezcla de dos acetogeninas F5 (representada por la fracción F 80-93), y sus purificaciones por cromatografía en columna aportó muchas subfracciones, observándose un enriquecimiento de una de las acetogeninas en las F97, F100 y F101, presentes en el extracto de AcOEt de semillas de frutos de chincuya (*Annona purpurea*). Estas cuatro fracciones, fueron analizadas por espectrometría de Resonancia Magnética Nuclear a 400 MHz (Figura 1), donde la acetogenina de la fracción F 101, con

desplazamiento químico 7.0 ppm es la mas abundante, el trazo verde inferior corrobora esta observación, ya que exhibe una disminución en la intensidad de la señal múltiple en 2.38 ppm.

Por otro lado, se reanalizó la fracción F 88 a 93 empleando un cromatógrafo de líquidos integrado con un detector de luz ultravioleta tipo Isolera Dalton, donde la fase móvil se seleccionó como Hexano/AcOEt en varias proporciones, esta nueva purificación aportó resultados más interesantes, ya que al comparar sus espectros de RMN de ^1H , en las fracciones F37, F39 y F45, se observa una disminución considerable en la señal múltiple a 2.38 ppm de los protones alfa y beta vecinos a la α -lactona de una de las acetogeninas, aspecto que se aprecia en la figura 2. Así mismo las señales de RMN (Figura 3) de lo hidrógenos vinílicos, son indicativas y corroboran el enriquecimiento de la acetogenina cuyo protón vinílico esta a 7.0 ppm que no contine grupos hidroxilo cercanos a la α -lactona de referencia.

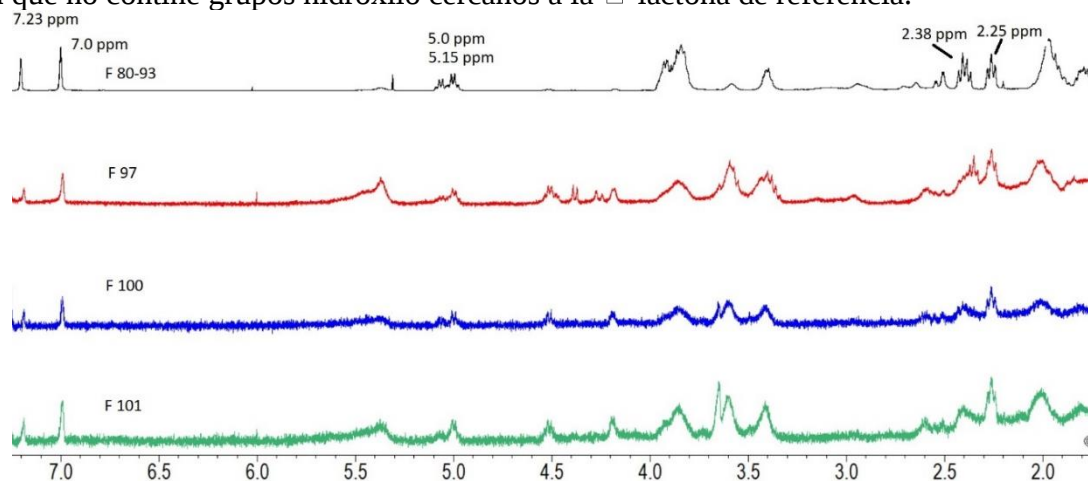


Figura 1.- Expansiones de los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno (RMN- ^1H , CDCl_3 , TMS) a 400 MHz de las fracciones de mezcla de dos acetogeninas F5, y sus purificaciones por cromatografía en columna en las fracciones F97, F100 y F101, del extracto de AcOEt de semillas de frutos de chincuya (*Annona purpurea*)

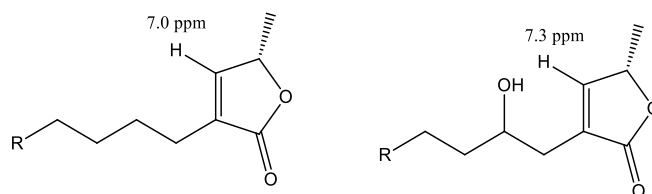


Figura 2. Estructuras parciales de acetogeninas que se deducen de la fracción F 88 a 93, por RMN de ^1H de procedente de la fracción F5 del extracto de AcOEt de *Annona purpurea*

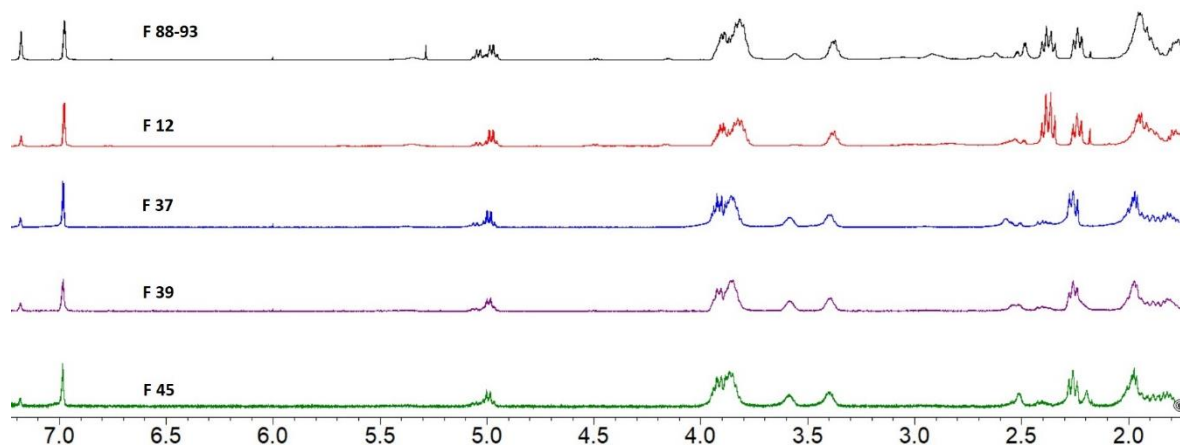


Figura 3.- Expansiones de los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno (RMN- ^1H , CDCl_3 , TMS) a 400 MHz de la fracción de la mezcla de dos acetogeninas F 88-93, y sus purificaciones por cromatografía de líquidos de las fracciones F12, F37, F39 y F45, del extracto de AcOEt de semillas de frutos de chincuya (*Annona purpurea*)

La acetogenina que se encuentra en la fracción F5 con grupo cetona no ha sido aislada ni identificada plenamente de *A. purpurea*. Ejemplos de acetogeninas conteniendo dos anillos no adyacentes de THF y un grupo carbonilo de cetona ($\text{C}=\text{O}$) son, la aromicina (1), aislado de la corteza de *Xilopia aromática* (Zeng et al, 1996) y la Rollinona (2) aislada de las raíces de *Rollinea papilionelia* (Ruprecht et al, 1990), mostradas en la figura 4.

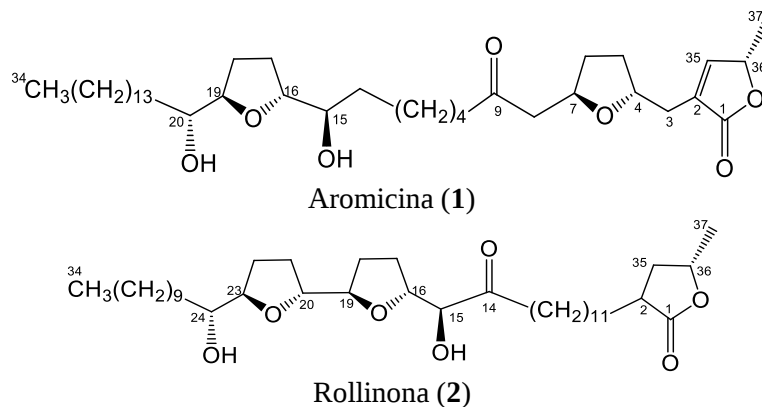


Figura 4. Fórmula de la aromicina (1) aislada de *Annona purpurea* y la rollinona (2) aislada de raíces de *Rollinea papilionelia*.

En complemento a lo anterior, en su espectro bidimensional heteronuclear HMBC se aprecia una correlación a tres enlaces de la señal del carbono carbonílico a 211.5 ppm con la señal múltiple de un grupo metileno ($-\text{CH}_2-$) en 2.25 y 2.33 ppm, asignables a los hidrógenos contiguos a una β -lactona, como se muestra en una expansión de este espectro en la figura 5, indicando con esto que la señal que disminuyo en intensidad mostrada en la figura 3, debe corresponder a la acetogenina minoritaria cuyo desplazamiento químico del hidrogeno vinílico

de la α -lactona, está desplazada 7.30 ppm, además que el grupo carbonilo debe estar ubicado en el carbono C-5 de esta molécula.

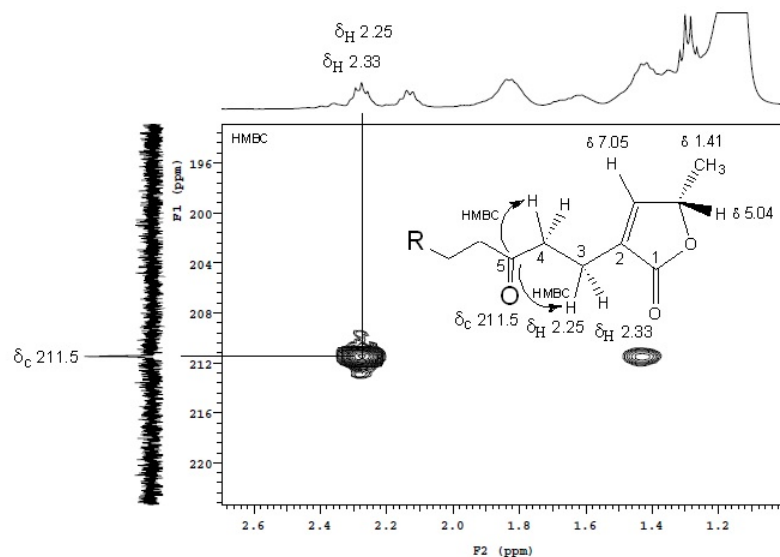


Figura 5. Expansión del espectro HMBC (100 MHz, CDCl_3 , TMS) de la partición F5 del extracto de AcOEt de semillas de *A. purpurea*, mostrando la correlación a tres enlaces del grupo carbonilo con la señal de proton en 2.35 ppm

Ejemplos de este tipo de acetogeninas con grupo carbonilo de cetona en C-5 han sido aisladas de las raíces de *Uvaria tonquinensis* (Chen et al, 1996, Neske et al, 2020) y fueron nombradas como tonquininas A, B y C (3), una de ellas se muestra en la figura 6.

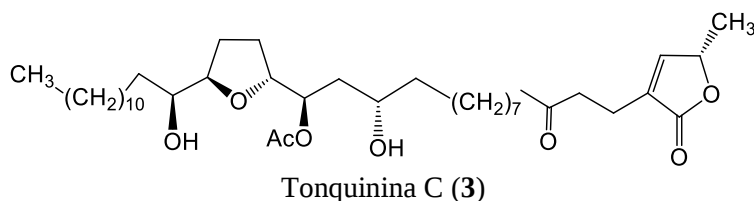


Figura 6. Fórmula de la tonquinina C (3) aislada de raíces de *Uvaria tonquinensis*

Conclusiones

Se analizó la composición de los metabolitos secundarios de la fracción F5 de las fracciones obtenidas de la partición de AcOEt del extracto de AcOEt de semillas de *Annona purpurea* empleando cromatografía en columna y de líquidos y haciendo un seguimiento por espectrometría de Resonancia Magnética Nuclear. Por cromatografía en columna se logró una separación muy pobre, en tanto que por cromatografía de líquidos fue posible obtener en aceptable cantidad una acetogenina que no contiene grupo carbonilo.

Literatura Citada

- Bobadilla, M., Zavala, F., Sisniegas, M., Zavaleta, G., Mostacero, J., Taramona, L.,** (2005). Evaluación larvicida de suspensiones acuosas de *Annona muricata* Linnaeus «guanábana» sobre *Aedes aegypti* Linnaeus (Diptera, Culicidae). *Rev. Peru. Biol.* 12, 145–152.
- Braga, I.A., Valle, D.,** 2007. *Aedes aegypti*: inseticidas , mecanismos de ação e resistência. *Epidemiol. e Serviços Saúde* 16, 279–293.
- Chávez, D., Mata R.** (1998) Purpurediolin and Purpurenin, Two New Cytotoxic Adjacent Bis-tetrahydrofuran Annonaceous from the seeds of *Annona purpurea*. *Journal of Natural Products.*, 61,580.
- Chen, Y.; Yun-Chen, R.; Quan-Yu, D.** (1996). Six acetogenins from *Uvaria tonkinesis*. *Phytochemistry*, 43(4), 793–801.
- De Mendonça, F.A.C., Da Silva, K.F.S., Dos Santos, K.K., Ribeiro Júnior, K.A.L., Santa Ana, A.E.G.,** (2005). Activities of some Brazilian plants against larvae of the mosquito *Aedes aegypti*. *Fitoterapia* 76, 629–36.
- Grzybowski, A.; Tiboni, M.; Da Silva, M.A.N.; Chitolina, R.F.; Passos, M.; Fontana, J.D.** (2012). The combined action of phytolarvicides for the control of dengue fever vector, *Aedes aegypti*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy.* 22(3), 549-557
- Hernandez-Fuentes, G.A., Garcia-Argaez, A.N., Peraza Campos, A.L., Delgado-Enciso, I.,Muniz-Valencia, R., Martinez-Martinez, F.J., Toninello, A., Gomez-Sandoval, Z.,Mojica-Sanchez, J.P., Dalla Via, L., Parra-Delgado, H., Hernandez-Fuentes, G.A.,Garcia-Argaez, A.N., Peraza Campos, A.L., Delgado-Enciso, I., Muniz-Valencia, R.,Martinez-Martinez, F.J., Toninello, A., Gomez-Sandoval, Z., Mojica-Sanchez, J.P.,Dalla Via, L., Parra-Delgado, H.,** (2019). Cytotoxic acetogenins from the roots of *Annona purpurea*. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 1870.
- León, J.** (1969). *Fundamentos Botánicos de Los Cultivos Tropicales*. Bogotá: IICA.OPS, 2019. Manual de Vigilancia y control de *Aedes aegypti*.
- Neske, A.; Ruiz, H. J.; Cabedo, N.; Cortes, D.** (2020). Acetogenins from Annonaceae family. Their potential biological applications. *Phytochemistry* 174, 112332.
- OPS,** 2019. Manual de Vigilancia y control de *Aedes aegypti*
- Perez, M. C.; González, A.; Garcia, A.; Bratoeff, E.; Labastida, C.** (1997) Oil composition and flavonoid profiles of the seeds of three *Annona* species. *Phyton* (Buenos Aires). 61(1-2): 77-80
- Ruprecht, J.K.; Hui, Y.H.; McLaughlin, J.L.** (1990). Annonaceous acetogenins: A review. *Journal of Natural Products.* 53, 2, 237-278
- Sonnet, P.E. y Jacobson, M.** (1971). Tumor inhibitors II: Cytotoxic alkaloids from *Annona purpurea*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 60, 1254-1256
- WHO,** 2017. Estadísticas sanitarias mundiales. Ginebra, Suiza.
- Wu, Y. C.; Chang F.R.; Chen, C.Y.; Wu, P. H.; Kuo R. Y.; Chang Y. C.** (2000). New Alkaloids from *Annona purpurea*. *Journal of Natural Products.* t., 63, 746-748.
- Zafra, P.M.C., Figadère, B., Gallardo, T., Tormo, J.R., Cortes, D.,** (1998). Natural acetogenins from annonaceae, synthesis and mechanisms of action. *Phytochemistry* 48, 1087–1117.
- Zeng, L.; Ye, Q.; Oberlies, N.H.; Shi, G.; Gu, Z, M.; He, K.; McLaughlin, J.L.** (1996). Recent Advances in Annonaceous Acetogenins. *Natural Product Reports*, 275-306

Caracterización estructural de ligninas aisladas de cáscara de cacao de tres variedades mediante por espectroscopía infrarroja (FTIR-ATR)

Sebastián García Fernández^{1,2}, Holber Zuleta Prada¹, Benito Reyes Trejo¹, Teodoro Espinosa Solares²

Resumen

La biomasa lignocelulósica es considerada una fuente potencial para la obtención de químicos y biomateriales, siendo la lignina uno de sus componentes mayoritarios. Este abundante polímero natural se encuentra ampliamente disponible en distintas fuentes de material lignocelulósico. La estructura aromática de la lignina acredita su uso como precursor para la obtención de compuestos de valor agregado. Por lo tanto, es necesario ampliar el conocimiento sobre fuentes de lignina de diversa naturaleza a través de la caracterización estructural por métodos analíticos. El material lignocelulósico de la cascara de cacao, un residuo abundante y subutilizado es atractivo como fuente de lignina para la obtención y elaboración de diferentes productos. En el presente trabajo se dan a conocer los resultados del análisis estructural por espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR), la cual es una herramienta valiosa para investigar la estructura química de los polímeros como la lignina. El trabajo de caracterización inicio con la extracción de la lignina tipo Klason en tres variedades de Cacao *Theobroma* L (Forastero, Carmelo y Trinitario). Se muestran los espectros de IR que revelan bandas típicas de los principales grupos funcionales; grupos –OH fenólicos, grupos metilo C-H₃ y metoxilo O-CH₃ los cuales forman parte del anillo aromático de la lignina y de los sistemas de conectividad alifática del polímero. De este análisis se subrayan dos aspectos importantes: Las tres variedades estudiadas presentan un contenido de lignina observable y valorable, además de que no se detectan diferencias estructurales significativas entre los tres tipos de lignina Klason obtenida

Palabras claves: Lignocelusa, *Theobroma cacao* L, Cascara de Cacao, Lignina

Abstract

Lignocellulosic biomass is considered a potential source for obtaining chemicals and biomaterials, with lignin being one of its main components. This abundant natural polymer is widely available in different sources of lignocellulosic material. Lignin is widely available in biomass sources, and the aromatic structure can justify its use as a precursor for obtaining value-added compounds. Therefore, is necessary to increase the information about lignin sources of diverse nature through structural characterization by analytical methods. Lignocellulosic material of cocoa pod husk, an abundant and wasted residue, is attractive source of

¹Laboratorio de Productos Naturales, AP 74 Oficina de Correos Chapingo, Universidad Autónoma Chapingo. Km. 38.5 Carretera México-Texcoco. Texcoco, Estado de México, 56230. Correo: hzuletap@chapingo.mx, breyest@chapingo.mx

²Departamento de Ingeniería Agroindustrial, Universidad Autónoma Chapingo, Km 38.5 Carretera México-Texcoco, 56230, Chapingo, Estado de México, México Correo: al20125457@chapingo.mx, tespinosas@chapingo.mx

lignin to get and making different products. In the present work, the results of the structural analysis by Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) are reported, IR is a valuable tool

to investigate the chemical structure of polymers such as lignin. This work began with the extraction of Klason-type lignin in three varieties of Cacao *Theobroma* L (Forastero, Carmelo and Trinitario). IR spectra shown typical bands of the main functional groups; phenolic –OH groups, methyl C-H₃ and methoxy O-CH₃ groups which are part of the lignin aromatic ring and aliphatic connectivity of polymer system. Two important aspects are highlighted from this analysis: The three varieties studied have an observable and measurable lignin content, in addition to the fact that no significant structural differences are detected between the three types of Klason lignin obtained.

Keywords: Lignocellulosic residues, *Theobroma cacao* L, Cocoa pod Husk, Lignin

Introducción

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es un cultivo económicamente importante en países en desarrollo (Lu, y otros, 2018). La producción de cacao en 2019-2020 fue de 4,735 millones de toneladas en todo el mundo, siendo el continente africano el que aporta mayor cantidad 74.9 %, seguido de América con 19.1 % y Asia y Oceanía con 6% (International Cocoa Organization , 2022). Durante el procesamiento del cacao, se desecha entre el 70% y el 80% de la fruta como biomasa residual, incluidas las cáscaras de vaina de cacao (CPH, del ingles Cocoa Pod Husk) (de Souza, y otros, 2022). En otras palabras, se generan diez toneladas de CPH húmedo por cada tonelada de cacao en grano seco (Vriesmann, Teófilo, & Petkowics, 2011). Esta generación a gran escala de biomasa residual representa un problema medioambiental crítico para los países productores de cacao (Vásques, y otros, 2019). La CPH está infraexplotado como recurso renovable rico en lignina (Yapo, Besson, Koubala, & Koffi, 2013). La lignina tiene un gran potencial en diferentes industrias como fuente de productos químicos, combustibles y otros bioproductos (Welker, y otros, 2015), el aprovechamiento de estos subproductos podría generar ingresos para los agricultores, promoviendo así el desarrollo económico (Vriesmann, Teófilo, & Petkowics, 2011). La lignina nativa es un polímero amorfo y tridimensional de unidades de fenilpropanoides unidas mediante enlaces éter y enlaces carbono-carbono. (Mao, Holtman, Scott, Kadla, & Schmidt-Rohr, 2006), además, la estructura química de la lignina depende de la especie vegetal y el método de extracción (Glasser & Sarkanen, 1989). La caracterización molecular de la lignina es difícil debido a que esta es una red de macromoléculas enlazadas covalentemente a polisacáridos en la pared celular y es solamente parcialmente soluble en un rango amplio de disolventes (Holtman, y otros, 2010). El uso de técnicas instrumentales como: la espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) ha atraído cada vez más la atención como un medio para lograr análisis simples y rápidos para determinar características estructurales de material lignocelulósico. Esta técnica es versátil, rápida y confiable en la caracterización de ligninas (Faix, 1992) por lo que su caracterización mediante esta técnica de la lignina aislada de CPH de las variedades Forastero, Carmelo y Trinitario producidos en México es el primer paso para valorizar este subproducto como una fuente importante de lignina.

Materiales y métodos

Las muestras de las cascaras de cacao de las variedades forastero, Carmelo y trinitario se colectaron en el municipio de Cunduacán, Tabasco, México. Las cascaras se prepararon para la determinación de lignina de acuerdo a la norma TAPPI T264 cm-97. El ácido sulfúrico fue adquirido de High Purity ®, la trietilamina y el anhídrido acético fueron adquiridos de Sigma Aldrich®, mientras que el hexano, diclorometano, metanol y agua destilada fueron adquiridos de Reactivos y Productos Químicos Finos, S.A. de C.V. Las ligninas aisladas (100 mg) fueron acetiladas con anhídrido acético /trietilamina (1:1, v/v) a temperatura ambiente con agitación constante durante 24 horas en un matraz bola de 50 mL. Una vez transcurrido el tiempo de reacción se realizaron extracciones con diclorometano y se filtró la fase orgánica para separar esta del residuo sólido de la reacción. La fase orgánica se lavó con agua y se hizo pasar por sulfato de sodio anhídrido para posteriormente concentrarla en un rotavapor Buchi R-300. El residuo sólido se lavó con agua. Para la caracterización por FTIR se utilizó un equipo FTIR Cary 630 Agilent Technologies. El Diseño experimental para la determinación de lignina se realizó por triplicado usando un diseño experimental completamente al azar, además, se realizó

una comparación de medias empleando la prueba Tukey con un nivel de confiabilidad de $p \leq 0.05$

Resultados y discusión

En todas las variedades el rendimiento es diferente (Cuadro 1) y es superior a las reportadas para trigo integral (14.8 %) y salvado de maíz (9.9 %) (Bunzel, Schüßler, & Tchetssebu Saha, 2011). La variedad con mejor rendimiento fue la variedad Forastero, muy similar al contenido de lignina en el aserrín de madera de pino reportado en este estudio y al reportado por Bunzel et al., 2011 para el kale $28.7 \pm 0.5\%$ mientras las variedades Carmelo y Trinitario tiene un contenido de lignina similar al reportado para la pera $22.8 \pm 0.7\%$ por Bunzel et al., 2011.

Cuadro 1. Determinación de lignina de CPH en distintas variedades de cacao

Variedad	Lignina (%)
Forastero	30.25 ± 0.78 a
Carmelo	22.00 ± 0.54 c
Trinitario	24.83 ± 0.82 b
Aserrín	29.50 ± 0.36 a

^z Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa

En comparación con otros datos reportados para CPH tenemos que el rendimiento de lignina de la variedad Forastero, Carmelo y Trinitario es superior a la reportada por Asiedu, Abunde, & Addo (2019) 18.19%. mientras que solo la lignina aislada de CPH de la variedad Forastero es superior a la reportada por Sandesh, Shishir, & Vaman (2020) 24.16%.

Caracterización mediante FTIR.

Los espectros de FTIR de las ligninas aisladas de CPH de la variedad Forastero (LKF), Carmelo (LKC), Trinitario (LKT) y aserrín de madera de pino (LKA) son mostrados en la Figura 1. Solo algunos grupos de frecuencias y bandas pueden ser asignadas inequívocamente y otras tantas pueden ser interpretadas de varias maneras. (Faix, 1992). La bandas en $3400-3200\text{ cm}^{-1}$ se atribuyeron a la vibración de estiramiento -OH, mientras que las bandas en 2900 cm^{-1} se asignaron a la vibración simétrica C-H del grupo metileno (-CH₂). Los picos en 1600 cm^{-1} están relacionados con las vibraciones de estiramiento del carbonilo no conjugado y el carbonato conjugado, respectivamente, de los grupos ácido carboxílico y cetona. La interpretación de las bandas debajo de 1430 cm^{-1} es más difícil, en esta zona casi todas las bandas son complejas, con contribuciones diferentes en los modos de vibración (Faix, 1992).

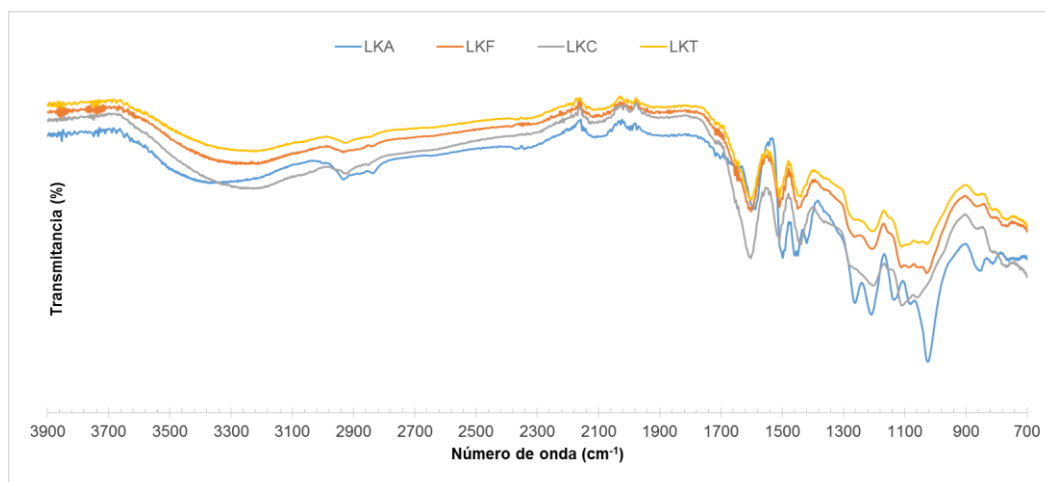


Figura 1. Espectros de IR de las ligninas aisladas de CPH. Lignina Klason aislada de aserrín de madera de pino (LKA), Lignina Klason aislada de la variedad Forastero (LKF), Lignina Klason aislada de la variedad Carmelo (LKC) y Lignina Klason aislada de la variedad Trinitario (LKT).

Los efectos de la acetilación de las ligninas aisladas de CPH tanto de la fase orgánica de la variedad Forastero (FOLKAF), Carmelo (FOLKAC), Trinitario (FOLKAT) y aserrín de madera de pino (FOLKAA) son mostrados en la Figura 2 como del residuo sólido de la acetilación de la lignina de la variedad Forastero (RSLKAF), Carmelo (RSLKC), Trinitario (RSLKAT) y aserrín de madera de pino (RSLKAA) son mostrados en la Figura 3. Para ambos casos las bandas en $3400\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$ asociadas al estiramiento -OH desaparecen, las bandas 2900 cm^{-1} asociada al estiramiento C-H se conservan y aparecen bandas asociadas al grupo acetoxil en 1720 cm^{-1} (aromático) y 1600 cm^{-1} (alifático).

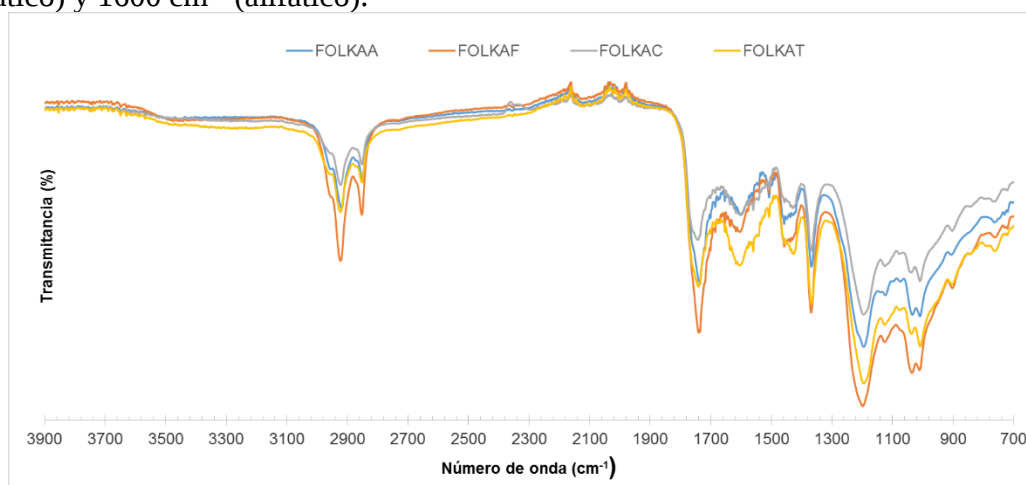


Figura 2. Espectros de IR de las ligninas acetiladas aisladas de CPH. Fracción Orgánica de Lignina Klason acetilada aislada de aserrín de madera de pino (FOLKAA), Fracción Orgánica de Lignina Klason acetilada aislada de CPH variedad Forastero (FOLKAF), Fracción Orgánica de Lignina Klason acetilada aislada de CPH variedad Carmelo (FOLKAC) y Fracción Orgánica de Lignina Klason acetilada aislada de CPH variedad Trinitario (FOLKAT).

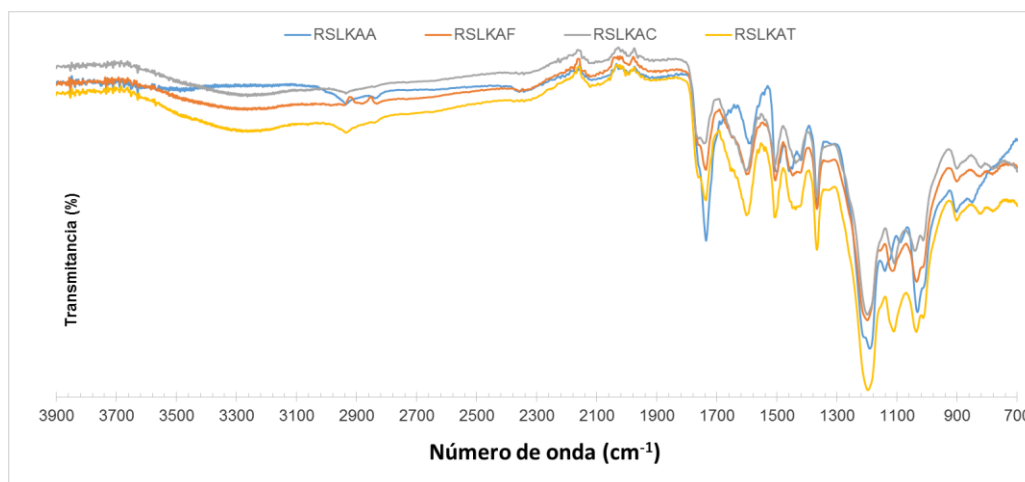


Figura 3. Espectros de IR del residuo sólido de las ligninas acetiladas de CPH. Residuo Sólido de Lignina Klason Acetilada aislada de aserrín de madera de pino (RSLKAA), Residuo Sólido de Lignina Klason Acetilada aislada de CPH variedad Forastero (RSLKAF), Residuo Sólido de Lignina Klason Acetilada aislada de CPH variedad Carmelo (RSLKAC), Residuo Sólido de Lignina Klason Acetilada aislada de CPH variedad Trinitario (RSLKAT).

Conclusiones

La lignina es el segundo componente más abundante en CPH variedad forastero, además, el porcentaje de lignina es superior en comparación con lo reportado para otros CPH de distintas regiones. La variedad con mayor rendimiento de extracción de lignina fue la variedad Forastero, lo que la posiciona como la fuente más abundante de lignina para su aprovechamiento respecto a las otras variedades. Los espectros de IR para las ligninas aisladas de la cascara de cacao, ligninas acetiladas y de los residuos sólidos de la acetilación de las ligninas, muestran patrones similares siendo solo diferentes en la región de la huella dactilar. lo anterior constituye una notable observación que encamina los objetivos del proyecto hacia sus metas finales.

Literatura Citada

- Zhang, D. Z., & Peng, Z. R.** (2014). Near-road fine particulate matter concentration estimation using artificial neural network approach. *International Journal of Environmental Science and Technology*. 11(8): 2403–2412. <https://doi.org/10.1007/s13762-014-0565-4>
- Asiedu, N., Neba, F., & Addo, A.** (2019). Modeling the attainable regions for catalytic oxidation of renewable biomass to specialty chemicals: Waste biomass to carboxylic acids. *South African Journal of Chemical Engineering*, 1-14. [doi:https://doi.org/10.1016/j.sajce.2019.07.003](https://doi.org/10.1016/j.sajce.2019.07.003)
- de Souza, L., Valladares, K., Amaro, G., Murawski, A., Sarmiento, S., Zwiercheczewski, P., Soccol, C.** (2022). Added-value biomolecules' production from cocoa pod husks: A review. *Bioresource Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126252>.
- Faix, O.** (1992). Fourier Transform Infrared Spectroscopy. En S. Lin, & C. Dence, *Methods in Lignin Chemistry* (págs. 83-109). Berlin: Springer-Verlag. [doi:10.1007/978-3-642-74065-7](https://doi.org/10.1007/978-3-642-74065-7)
- Glasser, W., & Sarkanen, S.** (1989). *Lignin, properties and materials*. Washington: ACS Symposium Series American Chemical Society. [doi:10.1021/bk-1989-0397](https://doi.org/10.1021/bk-1989-0397)

Holtman, K., Chen, N., Chappell, M., Kadla, J., Xu, L., & Mao, J. (2010). Chemical Structure and Heterogeneity Differences of Two Lignins From Loblolly Pine As Investigated by Advanced Solid-State NMR Spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 9882-9892. doi:10.1021/jf101258x

International Cocoa Organization . (28 de Febrero de 2022). ICCO. Obtenido de ICCO Statistics: https://www.icco.org/wp-content/uploads/Production_QBCS-XLVIII-No.-1.pdf

Lu, F., Rodriguez, J., Van Damme, I., Westwood, N., Shaw, L., Robinson, J., Charalampopoulos, D. (2018). Valorisation strategies for cocoa pod husk and its. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 80-88. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2018.07.007>

Mao, J., Holtman, K., Scott, J., Kadla, J., & Schmidt-Rohr, K. (2006). Differences between lignin in unprocess wood, milled wood, mutant wood, and extracted lignin detected by ¹³C solid-state NMR. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 9677-9686. doi:10.1021/jf062199q

Norma TAPPI. T 204 cm-97. Solvent extractives of Wood and Pulp.

Norma TAPPI. T 222 om-97. Acid-insoluble lignin in Wood and Pulp.

Norma TAPPI. T 264 cm-97. Preparation of Wood for chemical analysis.

Sandesh, K., Shishir, R., & Vaman Rao, C. (2020). Optimization and comparison of induction heating and LPG assisted acid pretreatment of cocoa pod for ABE fermentation. *Fuel*, 262. doi:https://doi.org/10.1016/j.fuel.2019.116499

Vásques, Z., de Carvalho, P., Pereira, G., Vandenberghe, L., de Oliveira, P., Tiburcio, P., Soccol, C. (2019). *Biotechnological approaches for cocoa waste management: A review*. Waste Management, 72-83. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.04.030>

Vriesmann, L., Teófilo, R., & Petkowics, C. (2011). Optimization of nitric acid-mediated extration of pectin from cacao pod husks (*Theobroma cacao* L.) using surface methology. *Carbohydrate Polymers*, 1230-1236. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.04.018>

Welker, C., Balasubramanian, V., Petti, C., Rai, K., DeBolt, S., & Mendu, V. (2015). Engineering Plant Biomass Lignin Content and Composition for Biofuels and Bioproducts. *Energies*, 7654-7676. doi:10.3390/en8087654

Yapo, B., Besson, V., Koukala, B., & Koffi, K. (2013). Adding Value to Cacao Pod Husks as a Potential Antioxidant-Dietary Fiber Source. *American Journal of Food and Nutrition*, 28-16. doi:10.12691/ajfn-1-3-4

Influencia de purificación sobre las propiedades fisicoquímicas y funcionales de goma de semilla de chirimoya

Jairo O. Ramírez-Rojas¹, Consuelo Silvia Olivia Lobato-Calleros², Jose Alvarez Ramirez³, Eleazar Aguirre Mandujano², Landy Hernández-Rodríguez²

Resumen

Durante el procesamiento de la chirimoya (*Annona cherimolla* Mill) se generan distintos residuos como la semilla. Las semillas extraídas de plantas son una fuente de gomas, destacándose por ser no tóxicas, biodegradables y biocompatibles. Los objetivos del presente trabajo fueron establecer los métodos de extracción de la goma contenida en las semillas de chirimoya, determinar el rendimiento y sus propiedades fisicoquímicas. Además de contribuir al aprovechamiento de las semillas de chirimoya que actualmente son un desecho agroindustrial y sentar las bases para el uso de la GSC a partir del conocimiento de sus propiedades funcionales. Se utilizaron semillas de chirimoya, las cuales fueron secadas previamente, molidas y tamizadas para luego determinar su composición química proximal. Se establecieron los métodos de extracción de GSC con distintos grados de pureza, a las cuales se les determinaron rendimiento, color y análisis proximal. Se espera que los conocimientos generados contribuyan al aprovechamiento de este residuo agroindustrial del cual sus propiedades funcionales no han sido exploradas.

Palabras clave: *Annona cherimola*, color, goma de semilla de chirimoya, grado de pureza

Abstract

During the processing of custard apple (*Annona cherimolla* Mill), different residues are generated, such as the seed. The seeds extracted from plants are a source of gums, standing out for being non-toxic, biodegradable and biocompatible. The aims of the present work were to establish the extraction method of the gum contained in custard apple seeds (CSG) and to determine the yield and its physicochemical properties. In addition to contributing to the use of custard apple seeds, which are currently an agro-industrial waste, and laying the foundations for the use of GSC based on the knowledge of its functional properties. Custard apple seeds were used, which were previously dried, ground and sieved to then determine their proximal chemical composition. GSC extraction methods with different degrees of purity were established, to

¹Maestría en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, Departamento de Ingeniería Agroindustrial, Universidad Autónoma Chapingo, Km 38.5 Carretera México-Texcoco, 56230, Texcoco, México. Correo: jairo.omar_jes@hotmail.com

²Departamento de Preparatoria Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo, Km 38.5 Carretera México-Texcoco, 56230, Texcoco, México. Correo: consuelobato@yahoo.com, eleagman@yahoo.com, landy14hr@yahoo.com.mx

³Departamento de Procesos e hidráulica, Universidad Autónoma Metropolitana, Av. San Rafael Atlixco No. 186, Col. Vicentina, Delegación Iztapalapa, 09340, Ciudad de México, México. Correo: jjar1963@gmail.com

which yield, color and proximal analysis were determined. It is expected that the generated knowledge will contribute to the use of this agro-industrial waste whose functional properties have not been explored.

Key words: *Annona cherimola*, custard apple seed gum, color, degree of purity

Introducción

Las gomas de semillas de plantas (GSP) se han estudiado recientemente por sus características como biopolímeros emergentes, sus propiedades funcionales (espesante, ligante de agua, gelificante, estabilizante y emulsionante), así como su potencial de aplicación en la industria farmacéutica e industria alimentaria (Archana et al., 2013; Soukoulis et al., 2018). Además, las GSP son ampliamente disponibles, no tóxicas, biodegradables y biocompatibles (Avachat et al., 2011). De esta manera, las semillas de plantas procedentes de las industrias de procesamiento agroalimentario son una fuente interesante y económica de gomas con una amplia variedad de funciones útiles para la manufactura de productos de valor añadido (Chandra et al., 2018; Ravindran y Jaiswal, 2016).

La familia de plantas *Annonaceae* incluye alrededor de 130 géneros y 2,300 especies distribuidas principalmente en zonas tropicales y subtropicales (Quílez et al., 2018). La semilla de chirimoya es un subproducto de la industria de la pulpa de chirimoya. Dentro del género *Annona*, las especies que han alcanzado mayor desarrollo comercial son: guanábana (*Annona muricata* L.), chirimoya (*Annona cherimola* Mill) y saramuyo o anona (*Annona squamosa* L.) (Vidal et al., 2014). El uso de las gomas en la industria alimentaria es muy extenso: helados, confitería, jugos de fruta, cerveza, vinos, quesos, mermeladas, aderezos, embutidos, productos dietéticos, entre otros. En cada caso, las gomas desempeñan un papel muy característico, gracias a las propiedades funcionales que desarrollan; estas últimas dependen de diversos factores, como: la concentración de la goma, las sales minerales en el medio, el pH, el uso individual o combinado de gomas (Badui, 2006).

Las gomas vegetales de uso generalizado son los galactomananos de semillas de guar y algarrobo europeo, los exudados de acacia y karayay, goma arábiga y tragacanto, las de las algas, carragenanos y alginatos. Todas ellas son conocidas por sus aplicaciones tecnológico-alimentarias en todo el mundo (Mumtaz, 2019). La goma de semilla de chirimoya (GSC) por su parte, se puede considerar como un biopolímero prometedor con posibles aplicaciones como estabilizante, espesante, agente de viscosidad, emulsionante, gelificante, vehículo de fármacos, retardante en la liberación de compuestos bioactivos y agente aglutinante en las industrias farmacéutica y de alimentos (Joseph et al., 2012; Mirhosseini y Amid, 2012).

Recientemente, la demanda de alimentos naturales por parte de los consumidores ha incentivado la búsqueda de fuentes alternativas de gomas alimenticias, una de esas fuentes puede ser las semillas. Las gomas así obtenidas deben ser caracterizadas para determinar sus posibles aplicaciones. En este contexto, los objetivos del presente trabajo fueron: establecer el método de extracción de la goma contenida en las semillas de chirimoya, determinar el rendimiento y sus propiedades fisicoquímicas. Además de contribuir al aprovechamiento de las semillas de chirimoya que actualmente son un desecho agroindustrial y sentar las bases para el uso de la GSC a partir del conocimiento de sus propiedades funcionales.

Materiales y métodos

Materiales

Se utilizó como solvente de extracción alcohol etílico, pureza 96 % (Ferandelh, S.A. de C.V., Texcoco, Edo. México). Todos los reactivos utilizados fueron grado analítico y en todos los casos se utilizó agua destilada desionizada (ADD).

Material vegetal

Los frutos de chirimoya (*Annona cherimola*) se obtuvieron del Municipio de Ocuituco, Morelos, México (18° 52' 41" LN, 98° 46' 31" LO) y altitud media de 1933 m). Se cosecharon en estado de madurez fisiológica, considerando la firmeza, tamaño, color uniforme y ausencia de daños físicos.

Lugar de estudio

La investigación se desarrolló en el Laboratorio de Tecnología de Alimentos 2 del Departamento de Preparatoria Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco de Mora, Edo. México.

Diseño experimental

Los análisis se llevaron a cabo por triplicado de muestras independientes, usando un diseño experimental completamente al azar en la determinación de variables biométricas de los componentes del fruto de chirimoya y la composición química proximal.

Caracterización del fruto de chirimoya

Se seleccionó aleatoriamente una muestra de 30 frutos y se trasladaron al laboratorio, donde se evaluaron variables biométricas como: peso del fruto (g), pulpa (g) y semillas por fruto (g); número de semillas por fruto, peso medio de las semillas (g) e índice de semillas (número de semillas en 100 g de pulpa). Además, se midió el largo (cm), ancho (cm) y grosor de la semilla (cm), considerando una muestra de 10 semillas; utilizando un micrómetro digital (MCD-1'' PJ, Mitutoyo Corporation, Kanagawa, Japón).

Índice de semillas

El índice de semillas fue expresado como número de semillas por 100 g de pulpa. (Jalikop y Kumar, 2007), siguiendo la Ecuación 1.

$$\text{Índice de semillas} = \frac{NS}{PF} \times 100 \quad (1)$$

Donde:

NS: Número de semillas

PF: Peso del fruto (g)

Obtención y caracterización de la harina de semilla de chirimoya

La obtención de la harina de semilla de chirimoya con testa (HSCt) y sin testa (HSC) se realizó de acuerdo con lo informado por Cardoso et al. (2016) con algunas modificaciones. Las semillas de chirimoya se retiraron manualmente de la pulpa, se lavaron con agua corriente y se desinfectaron con NaClO al 1 % v/v. Posteriormente las semillas fueron secadas hasta alcanzar un peso constante en estufa (Riossa Digital, HCF-62, Ciudad de México, México) a 40 °C por

72 h. Las semillas secas se pulverizaron en una licuadora (mod. 465-15/13 2V, motor de 500 W, Osterizer, Sunbeam Mexicana, S.A. de C.V, Ciudad de México, México) durante dos lapsos de 1 min cada uno y después se sometieron a un segundo ciclo de trituración en un procesador de alimentos (Ultra Bullet, motor de 700 W, Marcas de Renombre, S.A. de C.V., Ciudad de México, México) durante intervalos de 20 s hasta completar 1 min y se pasaron a través de tamices tipo industrial marca MONTINOX del N° 20 (abertura de 0.840 mm) para obtener HSCt; para el caso de la HSC se siguió un proceso similar salvo previo retirado de testa antes pulverizar en licuadora. Las harinas se sometieron a análisis químico proximal determinando humedad, proteína cruda, extracto etéreo, fibra cruda, cenizas y carbohidratos (AOAC, 2005). Finalmente, las harinas se almacenaron en frascos de vidrio cubiertos con aluminio, en un desecador hasta su uso.

Extracción de goma de semilla de chirimoya (GSC)

Las semillas de chirimoya secas se sometieron a tres procedimientos de purificación (Figura 1): una goma de pureza baja (GSC_{PB}), extraída de semillas completas desgrasadas; una goma de pureza media (GSC_{PM}), extraída del grano (almendra) desgrasado, y una goma de pureza alta (GSC_{PA}) extraída del grano desgrasado y de la cual se eliminó la proteína soluble mediante modificación de pH.

La muestra (60 g) de polvo de semilla de chirimoya se colocó en un vaso de precipitados de 2 L y se añadió agua destilada en una proporción de 1:30 p/v. La mezcla resultante se homogeneizó en una parrilla magnética (Mod. SP131635, Thermo Scientific CimarecTM, Essex, Reino Unido) aplicando un nivel 9 de agitación, durante 10 minutos; se calentó a 80 °C durante 30 minutos y se dejó reposar a 20 °C durante 24 h para asegurar la liberación de la goma. La mezcla se agitó (Mod. RO 15 P S1, IKA-WERKE, GMBH & CO. KG, Staufen, Alemania) a 6 000 rpm durante 10 minutos. Posteriormente, el material no disuelto se eliminó mediante centrifugación (Centrifuge 5810 R, Eppendorf, AG, Hamburgo, Alemania) a 10 °C durante 15 minutos a 524×g. La goma se precipitó del sobrenadante mediante la adición de etanol al 96 % v/v en una relación 1:3 v/v, aplicando agitación constante (5 000 rpm) durante 10 minutos y la mezcla se dejó reposar durante 2 horas a temperatura ambiente (20 ± 2 °C). Se decantó la mezcla para eliminar el sobrenadante. Subsecuentemente, se realizó un segundo ciclo de centrifugación a las mismas condiciones; el precipitado resultante fue secado a 35 °C durante 18 h (Bansal & Kumar, 2014) y triturado con un mortero hasta obtener un polvo fino al cual se le denominó GSC_{PB}.

Para el caso de la GSC_{PM}, las semillas de chirimoya se molieron parcialmente en una licuadora y los granos se separarán manualmente de la testa. Los granos fueron triturados y molidos, como se describió anteriormente. El polvo del grano se desgrasó en un equipo Soxhlet, utilizando hexano como solvente, a 80 °C durante 6 h. La muestra (60 g) de polvo de grano desgrasado se procesó de la misma manera que se describió anteriormente para GSC_{PB} hasta obtener GSC_{PM}.

Finalmente, para obtener GSC_{PA}, se dispersaron 60 g de polvo de grano desgrasado en agua destilada a una proporción de 1:10 p/v durante 10 minutos a 800 rpm. El pH se ajustó a 9.0 usando NaOH 0.1 y/o 1 N y se agitó a temperatura ambiente (20-22 °C) a nivel 7 durante 30 minutos. El extracto alcalino se centrifugó a 437×g durante 15 minutos a 4 °C, y el sedimento se separó del sobrenadante que contenía la proteína solubilizada (Martínez et al., 2018). El

sedimento se colocó en un vaso de precipitado de 2 L, se adicionó agua destilada en una proporción de 1:30 p/v, y el pH se ajustó a 6.8 con HCl 0.1 y/o 1N. Posteriormente, la mezcla se sometió al mismo procedimiento que para las GSC_{PB} y GSC_{PM}, para obtener GSC_{PA}.

Rendimiento de la GSC

El rendimiento se expresó como porcentaje de la cantidad de goma seca obtenida a partir de 100 g de semillas de chirimoya secas (Alpizar-Reyes et al., 2017a), siguiendo la Ecuación (2).

$$\text{Rendimiento (\% p/p)} = \frac{\text{peso seco de goma (GSC) en g}}{\text{peso seco de semillas de chirimoya(SC) en g}} \times 100 \quad (2)$$

Análisis químico proximal de GSC

Se determinó contenido de humedad, extracto etéreo, cenizas, fibra cruda y proteína de la goma de semilla de chirimoya de acuerdo con los métodos estándar de la AOAC (2002): 925.23, 920.39, 945.46 y 920.105 respectivamente; el contenido de carbohidratos se realizó por diferencia.

Color de la GSC

El color de las GSC_{PB}, GSC_{PM} y GSC_{PA} se evaluó utilizando un colorímetro (CR 400, Konica Minolta, Inc., Tokio, Japón). La muestra de GSC (5 g) se colocó en cajas Petri (5 cm de diámetro) y los parámetros de color Hunter L, a y b correspondientes a la luminosidad (L*), verde (- a*) o rojo (+ a*) y azul (- b*) o amarillo (+ b*); se determinaron a temperatura ambiente y los valores fueron reportados en C* (croma) y h (hue) (Martínez et al., 2018). Se usó como referencia un patrón de calibración blanco (Y = 87.3, x = 0.3153, y = 0.3226).

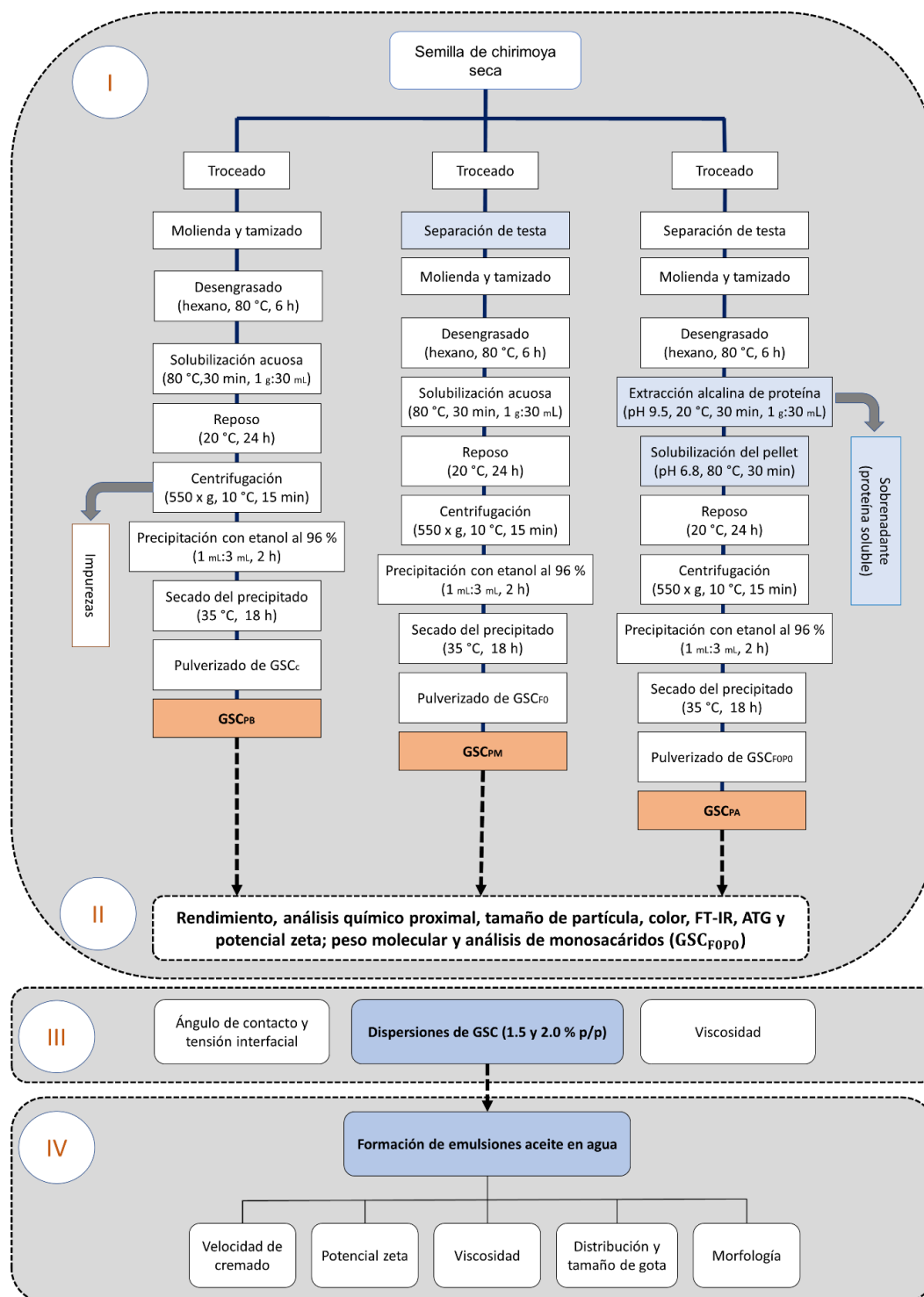


Figura 1. Proceso de extracción de la goma de semilla de chirimoya (GSC) como función del grado de purificación.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos se analizarán de acuerdo con el Diseño experimental propuesto y se someterán a análisis de varianza de clasificación simple, en casos pertinentes se realizará prueba

de comparación de medias por el método de Tukey, el nivel de significancia se establecerá en $p \leq 0.05$. El análisis estadístico se realizará con el paquete estadístico Statgraphics Centurion XVI (Statistical Graphics Corp., Manugistics, Inc., Cambridge, MA, EE. UU.).

Resultados y discusión

Caracterización de las fracciones del fruto de chirimoya

De un kilogramo de chirimoya, la pulpa representó el $51.15 \% \pm 7.29$, la cáscara el $34.29 \% \pm 5.16$ y la semilla el $10.28 \% \pm 3.17$. Por cada kilogramo de chirimoya se obtuvieron alrededor de 138 semillas, lo que se traduce en 81.33 g de semilla (peso fresco). Jalikop y Ravindra (2007) mencionan que el número de semillas en la fruta influye en el tamaño, forma y grosor de cáscara: a mayor número de semillas, mayor tamaño en fruto, menor porcentaje en pulpa y mayor grosor en cáscara. Por otro lado, Apolonio et al. (2015) realizaron un estudio para observar la variabilidad de datos entre variedades y sus cruza, obteniendo rangos de 78.03 – 93.71 % para pulpa, 1.96 – 15.41 % en cáscara y 4.30 – 8.75 % para semilla. Las diferencias encontradas pueden deberse a las características genéticas, estado de madurez, prácticas agrícolas y lugar de procedencia de los frutos (Perfectti y Pascual, 2005; Scheldeman et al., 2006).

El ancho, largo y grosor (cm) de las semillas de chirimoya ($n = 100$) fueron 0.94 ± 0.09 , 1.63 ± 0.09 y 0.66 ± 0.05 , respectivamente. Con las dimensiones anteriores, se determinaron el tamaño y forma de las semillas, los cuales fueron 1.08 cm y 1.00 cm, respectivamente. Estos valores concuerdan con los reportados por Pinto y Silva (1996): largo: 1.5-2 cm y ancho: ~ 1 cm. La determinación de los parámetros anteriores es importantes debido a que el estudio de las características biométricas de las semillas establece una información de gran importancia en la ingeniería, ya que estos datos sirven como referencia para el diseño, operación y optimización de equipos que pueden estar involucrados en el procesamiento de estos residuos orgánicos (Rojas, 2010).

Índice de semillas

El índice de semillas obtenido fue de 36.80 ± 3.16 semillas $\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de pulpa. El valor obtenido es superior a lo reportado por Apolonio (2013) en frutos de chirimoya cultivares 'Campas', 'Bonita' y 'White', con un índice de semillas de 8.1, 8.0 y 9.9 semillas $\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de pulpa, respectivamente. Esta diferencia pudo haberse dado por las características genéticas, estado de madurez, prácticas agrícolas y lugar de procedencia de los frutos (Scheldeman et al., 2006).

Obtención y caracterización de la harina de semilla de chirimoya (HSC)

En el Cuadro 1 se muestran las características fisicoquímicas de la harina de semilla de chirimoya con testa (HSCt) y sin testa (HSC); exhibiendo los valores más altos en extracto etéreo y carbohidratos.

Cuadro 1. Análisis químico proximal de las harinas de semilla de chirimoya con testa (HSCt) y sin testa (HSC).

Componente (%)	HSCt		HSC	
	Valor		Valor	
	Base húmeda	Base húmeda	Base húmeda	Base seca
Humedad	6.43 ± 0.53a ^z	—	6.21 ± 0.19a	—
Cenizas	1.83 ± 0.06b	1.96 ± 0.06b	2.72 ± 0.03a	2.90 ± 0.05a
Proteína cruda	19.60 ± 0.02b	20.94 ± 0.01b	27.08 ± 0.21a	28.87 ± 0.22a
Extracto etéreo	5.30 ± 0.04b	5.66 ± 0.04b	6.06 ± 0.54a	6.47 ± 0.57a
Fibra cruda	38.19 ± 0.40a	40.82 ± 0.42a	24.10 ± 0.52b	25.69 ± 0.54b
Carbohidratos	28.66 ± 0.97b	30.63 ± 0.45b	33.86 ± 1.06a	36.09 ± 0.94a

^z Media ± desviación estándar. Diferente letra (a,b) en cada fila presentan diferencias significativas, Tukey ($p \leq 0.05$).

La composición química de la semilla de chirimoya (*A. cherimolla* Mill) es semejante a lo informado por Amoo et al. (2008): cenizas 0.81 %, proteína cruda 17.36 %, fibra cruda 32.46 %, carbohidratos 10.32 % en base húmeda). Las variaciones pueden deberse al estado de madurez fisiológico del fruto, prácticas agrícolas (Scheldeman et al., 2006) y lugar de procedencia (Perfectti y Pascual, 2005). Es importante señalar que la HSC exhibió un incremento significativo de proteína, extracto etéreo y carbohidratos en comparación con HSCt, no siendo así para fibra cruda, esto se explica debido a que se retiró la testa, misma que posee el mayor contenido fibroso de la semilla.

Composición química y rendimiento de las gomas

El contenido de humedad de las GSC varió de 7.42 a 9.54 %, la composición proximal se expresó en base seca (Cuadro 2). La composición química de las GSC fue afectada significativamente ($p \leq 0.05$) por el procedimiento de purificación utilizado para obtenerlas, observándose una disminución de carbohidratos a mayor grado de pureza.

El rendimiento de la extracción de goma de semilla de chirimoya se evaluó considerando la muestra de masa seca inicial de semilla utilizada antes del proceso de extracción; estos valores son consistente con los resultados reportados para el mucílago de *Opuntia* sp. con rendimiento de 8-20 % (Sepúlveda et al., 2007), goma de semilla de *Lepidium perfoliatum* 10.83-28.60 % y en goma de lino 7.9 % (Cui et al., 1994) y goma Yanang 4.54 % (Singthong et al., 2009).

Cuadro 2. Rendimiento y características fisicoquímicas de la goma de semilla de chirimoya (base seca), sometida a diferentes grados de purificación.

	Goma de semilla de chirimoya		
	GSC _{PB} ^Y	GSC _{PM}	GSC _{PA}
Rendimiento (%)	8.89 ± 0.56b ^Z	16.02 ± 0.85a	3.89 ± 0.48c
Cenizas (%)	6.14 ± 0.03c	6.64 ± 0.15b	9.76 ± 0.24a
Proteína cruda (%)	68.94 ± 0.60a	66.44 ± 1.09b	39.44 ± 0.33c
Extracto etéreo (%)	1.91 ± 0.04c	5.22 ± 0.13b	6.46 ± 0.20a
Fibra cruda (%)	0.55 ± 0.01b	0.34 ± 0.00c	43.97 ± 0.24a
Carbohidratos (%)	22.47 ± 0.58a	21.37 ± 1.10a	0.37 ± 0.52b

^Z Media ± desviación estándar. Diferente letra (a,b,c) en cada fila presentan diferencias significativas, Tukey ($p \leq 0.05$).

^Y GSC_{PB}: goma de semilla de chirimoya de pureza baja; GSC_{PM}: goma de semilla de chirimoya de pureza media; GSC_{PA}: goma de semilla de chirimoya de pureza alta.

Color de GSC

Los parámetros de color L*, a* y b* de GSC se vieron afectados por el grado de purificación, tal como se observa en el Cuadro 3. Se observaron valor de L* significativamente menores ($p \leq 0.05$) a medida que se involucran más pasos de purificación (Figura 1).

El incremento de operaciones unitarias en los procesos de purificación incrementó los valores de a* y b*. Los tonos de a* pueden deberse a la presencia de pigmentos asociados con la testa de la semilla (Bagul et al., 2015) y endocarpio coráceo; por otro lado, los valores en b* exhiben una tendencia al color amarillo, atribuido a lípidos (Nagajothi et al., 2017) y tocoferol (Albuquerque et al., 2016; García-Carmona et al., 2020).

C* y h muestran un incremento en la saturación debido mayormente a lípidos y vitamina E. De acuerdo con datos de Chiralt et al. (2007), los valores de tono exhibieron tonalidad amarilla-rojiza ($< 90^\circ$). Valores similares fueron reportados por Phimolsiripol et al. (2011) en goma cruda de nuez malva L*: 47.02, a*: 6.60, b*: 12.20.

Cuadro 3. Parámetros de color de la goma de semilla de chirimoya.

	Goma de semilla de chirimoya		
	GSC _{PB} ^Y	GSC _{PM}	GSC _{PA}
L*	26.58 ± 0.47c ^Z	33.05 ± 0.28b	34.12 ± 0.35a
a*	4.65 ± 0.02c	6.02 ± 0.07b	6.17 ± 0.07a
b*	10.24 ± 0.12c	13.24 ± 0.08a	12.25 ± 0.11b
C*	11.25 ± 0.11c	14.55 ± 0.06a	13.72 ± 0.12b
h	65.61 ± 0.23a	65.55 ± 0.36a	63.27 ± 0.05b

^Z Media ± desviación estándar. Diferente letra (a,b,c) en cada fila presentan diferencias significativas, Tukey ($p \leq 0.05$).

^Y GSC_{PB}: goma de semilla de chirimoya de pureza baja; GSC_{PM}: goma de semilla de chirimoya de pureza media; GSC_{PA}: goma de semilla de chirimoya de pureza alta.



Figura 1. Color de las gomas de semilla de chirimoya (GSC) en polvo de acuerdo con su grado de purificación: GSC_{PB} (pureza baja), GSC_{PM} (pureza media), GSC_{PA} (pureza alta).

Conclusión

Las semillas de chirimoya constituyen una alternativa para el manejo sustentable de desechos provenientes de la agroindustria de este fruto, de los cuales destaca el valor agregado que se les puede dar como extracción de goma que puede ser utilizada en diversas aplicaciones en las industrias alimentaria y/o farmacéutica.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el financiamiento otorgado para los estudios de Maestría.

A la Universidad Autónoma Chapingo, al Posgrado en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, al Departamento de Ingeniería Agroindustrial y al Departamento de Preparatoria Agrícola por las facilidades brindadas para la realización de esta investigación.

Literatura Citada

- Albuquerque, T. G., Santos, F., Sanches-Silva, A., Beatriz Oliveira, M., Bento, A. C., & Costa, H. S.** (2016). Nutritional and phytochemical composition of *Annona cherimola* Mill. fruits and by-products: Potential health benefits. *Food Chemistry*, 193, 187-195. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.044>
- Amoo, I.A., Emenike, A.E. y Akpambang, V.O.E.** (2008). Compositional Evaluation of *Annona cherimoya* (Custard Apple) Fruit. *Trends in Applied Science Research*, 3(2), 216-220. DOI: 10.3923 / tasr.2008.216.220
- AOAC.** (2002). Association of official analytical chemists. (18th ed.). Arlington: Association of Official Analytical Chemists. Washington, DC. <http://www.eoma.aoac.org>.
- Apolonio I.** (2013). Influencia de la fuente de polen sobre el amarre y calidad de frutos de chirimoya (*Annona cherimola* Mill.) [tesis de maestría, Universidad Autónoma del Estado de México]. **Repositorio Institucional UAEM.** <http://hdl.handle.net/20.500.11799/64350>
- Apolonio, I., Castañeda, A., Franco, O., Morales, E. J. & González, A.** (2015). Influencia de la fuente de polen y su efectividad en la calidad de frutos de chirimoya (*Annona cherimola* Mill.), *Agronomía Costarricense*, 39 (1), 61-69.

- Archana G., K. Sabina, S. Babuskin, K. Radhakrishnan, M. A. Fayidh y P. A. Saravana.** (2013). Preparation and characterization of mucilage polysaccharide for biomedical applications. *Carbohydrate Polymers*, 98, 89-94. DOI: [10.1016/j.carbpol.2013.04.062](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.04.062)
- Avachat A. M., R. R. Dash y S. N. Shrotriya.** (2011). Recent investigations of plant based natural gums and mucilages in novel drug delivery systems. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 45, 86-89.
- Badui, S.** (2006). *Química de los alimentos*. Estado de México, México: Pearson Educación.
- Bagul M., S. K. Sonawane y S. S. Arya** (2015). Tamarind seeds: chemistry, technology, applications and health benefits: A review. *Indian Food Industry Magazine* 34: 28-35.
- Chandra-Mohan C., K. Harini, B. Vajiha-Aafrin, U. Lalitha-Priya, P. Maria-Jenita, S. Babuskin, y M. Sukumar.** (2018). Extraction and characterization of polysaccharides from tamarind seeds, rice mill residue, okra waste and sugarcane bagasse for its biothermoplastic properties. *Carbohydrate Polymers*, 186, 394-401. DOI: [10.1016/j.carbpol.2018.01.057](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.01.057).
- Crispín-Isidro, G., L. Hernández-Rodríguez, C. Ramírez-Santiago, O. Sandoval-Castilla., C. Lobato-Calleros y E. J. Vernon-Carter.** (2019). Influence of purification on physicochemical and emulsifying properties of tamarind (*Tamarindus indica* L.) seed gum. *Food Hydrocolloids*, 93, 402-412. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.02.046>
- Cui, W., Mazza, G., Oomah, B.D. y Biliaderis, C.G.** (1994). Optimization of an Aqueous Extraction Process for Flaxseed Gum by Response Surface Methodology. *Food Science and Technology* 27 (4), 363-369. DOI: <https://doi.org/10.1006/fstl.1994.1074>
- García-Carmona, M., L., Márquez-Sn Emeterio, M.P., Reyes-Martín, I., Ortiz-Bernard, M., Sierra y E., Fernández-Ondoño.** (2020). Changes in nutrient contents in peel, pulp, and seed of cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) in relation to organic mulching on the Andalusian tropical coast (Spain). *Scientia Horticulturae*, 263, 1-7. DOI: [10.1016/j.scienta.2019.109120](https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.109120).
- Hamdani, A. M, I. A. Wani y N. A. Bhat.** (2019). Sources, structure, properties and health benefits of plant gums: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 135, 46-61. DOI: [10.1016/j.ijbiomac.2019.05.103](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.05.103)
- Jalikap, S. H. y Kumar, R.** (2007). Pseudo-xenic effect of Allied *Annona* spp. Pollen in Hand Pollination of cv. 'Arka Sanh' [(*A. cherimola* x *A. squamosa*)]. *HortScience*, 42 (7), 1534-1538. DOI: <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.42.7.1534>
- Joseph J., S. N. Kanchalochana, G. Rajalakshmi, V. Hari y R.D. Durai.** (2012). Tamarind seed polysaccharide: A promising natural excipient for pharmaceuticals. *International Journal of Green Pharmacy*, 6, 270-278. DOI: [10.4103/0973-8258.108205](https://doi.org/10.4103/0973-8258.108205)
- Mirhosseini H. y B. T. Amid.** (2012). A review study on chemical composition and molecular structure of newly plant gum exudates and seed gums. *Food Research International*, 46, 387-398. DOI: [10.1016/j.foodres.2011.11.017](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.11.017)
- Mumtaz A., Ahmed, I. y Ahmad, N.** (2019). Sources, structure, properties and health benefits of plant gums: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 135, 46-61. DOI: [10.1016/j.ijbiomac.2019.05.103](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.05.103)
- Nagajothi M. S., A. Balasubramanian y N. Thombare.** (2017). Effect of different seed sources on tamarind kernel powder and seed gum yield. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6, 318-323. DOI: [10.20546/ijcmas.2017.607.037](https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.607.037)
- Perfectti, F. y Pascual, L.** (2005). Genetic Diversity in a Worldwide Collection of Cherimoya Cultivars. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 52(7), 959-966. DOI: [10.1007/s10722-003-6093-6](https://doi.org/10.1007/s10722-003-6093-6)

- Phimolsiripol Y., U. Siripatrawan y C. J. K. Henry.** (2011). Pasting behaviour, textural properties and freeze–thaw stability of wheat flour–crude malva nut (*Scaphium scaphigerum*) gum system. *Journal of Food Engineering*, 105, 557-562. DOI: [10.1016/j.jfoodeng.2011.03.022](https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.03.022)
- Quílez A. M., M. A. Fernández-Arche, M. D. García-Giménez y R. De la Puerta.** (2018). Potential therapeutic applications of the genus *Annona*: Local and traditional uses and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, 225, 244-270. DOI: [0.1016/j.jep.2018.06.014](https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.06.014)
- Ravindran R. y A. K. Jaiswal.** (2016). Exploitation of food industry waste for high-value products. *Trends in Biotechnology*, 34, 58-69. DOI: [10.1016/j.tibtech.2015.10.008](https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.10.008).
- Razmkhah, S., Razavi, S. M. A., & Mohammadifar, M. A.** (2016). Purification of cress seed (*Lepidium sativum*) gum: A comprehensive rheological study. *Food Hydrocolloids*, 61, 358-368. DOI: [10.1016/j.foodhyd.2016.05.035](https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.05.035)
- Rojas, A.** (2010). Caracterización físico–mecánica de la semilla de vitabosa (*Mucuna deeringiana*) [tesis de maestría, Universidad Nacional de Colombia]. Repositorio Institucional UNAL. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/3367>
- Scheldeman, P., Van Damme, J., Romero-Motoche y Urena-Alvarez, J. V.** (2006). Germplasm collection and fruit characterisation of cherimoya (*Annona cherimola*) in Loja Province, Ecuador, an important centre of biodiversity. *Belgian Journal of Botany*, 139 (1), 27-38. DOI: [10.2307/20794592](https://doi.org/10.2307/20794592)
- Sepúlveda E., Sáenz, C., Aliaga, E. y Aceituno, C.** (2007). Extraction and characterization of mucilage in *Opuntia* spp. *Journal of Arid Environments*, 68, 534-545. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2006.08.001>
- Singthong, J., Ningsanond, S. y Cui, S. W.** (2009). Extraction and physicochemical characterisation of polysaccharide gum from Yanang (*Tiliacora triandra*) leaves. *Food Chemistry*, 114 (4), 1301-1307. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.11.008>
- Soukoulis C., C. Gaiani y L. Hoffmann.** (2018). Plant seed mucilage as emerging biopolymer in food industry applications. *Current Opinion in Food Science*, 22, 28-42. DOI: [10.1016/j.cofs.2018.01.004](https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.01.004)
- Vidal H. L., M. López, N. A. Vidal, B. Ruiz, R. Castillo y C. Chiquito.** (2014). La situación de las Annonaceae en México: principales plagas, enfermedades y su control. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 36, 44-54.

Caracterización reológica de complejos coacervados de aislado de proteína de amaranto-pectina cítrica

**Karla García-de la Rosa¹, Landy Hernández-Rodríguez², Consuelo Lobato-Calleros²,
Eleazar Aguirre-Mandujano²**

Resumen

Para hacer uso de complejos coacervados en la agroindustria, formados con aislado de proteína de amaranto por sus propiedades nutricionales, es necesario determinar sus características por ello el objetivo fue investigar las propiedades reológicas de los coacervados. Se formaron complejos coacervados por interacción electrostática entre aislado de proteína de amaranto (APA) y pectina cítrica (PC) a diferentes relaciones de peso APA:PC (3:1, 5:1 y 7:1) y pH (3.5 y 4.5). La viscosidad aparente de los coacervados aumentó a medida que incrementó la relación en peso APA:PC y disminuyó el pH. Todas las variaciones de coacervados presentaron valores de G' (módulo de almacenamiento) más altos que los valores de G'' (módulo de pérdida), mostrando un comportamiento reológico predominantemente elástico. El conocimiento generado sobre las propiedades reológicas de los coacervados podría contribuir a su aplicación en la industria alimentaria.

Palabras clave: *Amaranthus hypochondriacus*, propiedades reológicas, coacervados.

Abstract

To make use of coacervates complexes in the agroindustry, formed with amaranth protein isolate for its nutritional properties, it is necessary to determine its characteristics, therefore, the objective was to investigate the rheological properties of the coacervates. Complex coacervates were formed by electrostatic interaction between amaranth protein isolate (APA) and citrus pectin (PC) at different APA:PC weight ratios (3:1, 5:1 and 7:1) and pH (3.5 and 4.5). The apparent viscosity of the coacervates increased as the APA:PC weight ratio increased and the pH decreased. All the coacervate variations presented values of G' (storage modulus) higher than the values of G'' (loss modulus), showing a predominantly elastic rheological behavior. The knowledge generated about the rheological properties of coacervates could contribute to their application in the food industry.

Keywords: *Amaranthus hypochondriacus*, rheological properties, coacervates.

¹ Universidad Autónoma Chapingo, Departamento de Ingeniería Agroindustrial, , Km. 38.5, Carretera México-Texcoco, Texcoco 56230, México. Correo: krlgr.gr@gmail.com

² Universidad Autónoma Chapingo, Departamento de Preparatoria Agrícola, Km. 38.5, Carretera México-Texcoco, Texcoco 56230, México, Correo: lhernandezr@chapingo.mx, consuelobato@yahoo.com, eleagman@yahoo.com

Introducción

Las principales propiedades funcionales de las proteínas en los alimentos son solubilidad, viscosidad, absorción de agua, gelación, adhesión-cohesión, elasticidad, emulsificación, espumado, capacidad de ligar grasa y sabores (Zhu et al., 2019). Sin embargo, las proteínas presentan poca estabilidad al estrés ambiental, como pH, calor y congelamiento; lo anterior puede contrarrestarse mediante el acomplejamiento de las proteínas con otros biopolímeros, como los polisacáridos (Huang et al., 2009). La formación de estos complejos se puede llevar a cabo de manera controlada mediante coacervación, la cual se define como la separación de dos fases líquidas en un sistema coloidal, obteniendo una fase rica en biopolímeros y otra fase sérica en equilibrio (Bosnea et al., 2016).

La coacervación compleja involucra biopolímeros con carga opuesta, es formada por interacción electrostática y es influenciada por variaciones en pH, fuerza iónica, grupos funcionales, hidrofobicidad, relación en peso proteína-polisacárido, concentración total de biopolímeros, relación molar, estrés mecánico, temperatura, densidad de carga superficial de las proteínas, densidad de carga y rigidez del polisacárido. Los parámetros señalados son importantes porque influyen en la formación, estructura y estabilidad de los complejos coacervados (Muriel et al., 2019).

Se ha abordado el estudio de complejos coacervados formados principalmente por proteínas de origen animal, tales como gelatina de pescado (Anvari y Chung, 2016), grenetina (Ifeduba et al., 2016), proteína de lactosuero (Hernández-Rodríguez et al., 2014), caseinato de sodio (Koupantsis et al., 2014), β -lactoglobulina (Comert et al., 2016), α -lactoalbúmina (Ach et al., 2015) y ovoalbúmina (Souza y Garcia-Rojas, 2015). Sin embargo, se debe considerar que las proteínas de origen animal, a pesar de que son de alta calidad biológica, se han relacionado con intolerancia digestiva o alergias alimentarias. Por su parte, las proteínas de origen vegetal se consideran como una alternativa a aquellas de origen animal, por su alta biodisponibilidad y su bajo costo de producción (Condés et al., 2012; Nesterenko et al., 2013). No obstante, son pocos los estudios realizados sobre proteínas de origen vegetal para la formación de coacervados, las proteínas más utilizadas han sido soya, chícharo y linaza (Moschakis y Biliaderis, 2017). En este sentido resulta interesante explorar la formación y la caracterización de coacervados a partir de proteína de amaranto, la cual presenta un alto valor nutricional debido al balance adecuado de sus aminoácidos esenciales y alta biodisponibilidad (Motta et al. 2018).

La relevancia del estudio sobre la formación y las propiedades de coacervados reside en su amplio potencial de aplicación; por ejemplo, en la elaboración de películas comestibles, como material encapsulante o de entrapamiento para la liberación de compuestos bioactivos como vitaminas, probióticos, colorantes, antioxidantes y soluciones oleosas (Hernández-Rodríguez et al., 2014, Lan et al., 2020). Se ha demostrado también la utilidad de los coacervados como sustitutos de grasa, estabilizantes, emulsificantes, gelantes y modificadores de viscosidad en matrices alimentarias para el desarrollo de productos funcionales (Niu et al. 2018; Perry y Blocher, 2016). Con base en lo expuesto, los objetivos de este proyecto fueron formar complejos coacervados a partir de aislado de proteína de amaranto (APA) y pectina cítrica de alto metoxilo (PC) y evaluar las propiedades reológicas de los complejos obtenidos.

Materiales y métodos

Materiales

Se obtuvieron semillas de *Amaranthus hypochondriacus* L. variedad Revancha de un productor local en la comunidad de San José Atlán, Huichapan, Hidalgo, México, con coordenadas GPS de 20° 20' 26.4192" N, 99° 41' 39.7356" O y una elevación sobre el nivel del mar de 2150 m. Las semillas fueron procesadas para obtener harina de amaranto para su posterior desengrasado y aislamiento proteico.

Se utilizó pectina cítrica (PC) CEDROSA® para formar complejos coacervados proteína-polisacárido, con un grado de esterificación de 74.2%, suministrado por Central de drogas S.A. de C.V., Naucalpan, Estado de México, México. El ácido clorhídrico (HCl) y el hidróxido de sodio (NaOH) se adquirieron de J.T. Baker, Xalostoc, Estado de México, México. El hexano fue suministrado por MEYER® Chemical Reagents, Tláhuac, Ciudad de México. El agua utilizada en los experimentos fue destilada y desionizada (DDW).

Preparación de los coacervados complejos

Se añadieron dispersiones de APA (15 g; 3, 5 y 7 % p/p) a 15 g de solución de PC (1 % p/p), ajustando el pH a 3.5 o 4.5, utilizando HCl 0.1 N. Las mezclas se mantuvieron a 4 ± 1 °C durante 48 h para asegurar la completa formación de los coacervados complejos. Posteriormente, se centrifugaron a 121 xg, a temperatura ambiente (22 ± 3 °C), durante 15 min para separar los complejos coacervados. Estos últimos fueron codificados como APA-PC_{a/b}, donde “a” representa la relación en peso entre APA y PC (3:1, 5:1 y 7:1) y “b” el valor de pH de la precipitación (3.5 o 4.5).

Propiedades reológicas

El comportamiento reológico de APA-PC_{a/b} se determinó mediante ensayos dinámicos (curva de flujo) y oscilatorios (barridos de amplitud) en un reómetro Physica MCR 301 (Anton Paar, Messtechnik, Stuttgart, Alemania) utilizando una geometría de placa cónica (1°, 50 mm de diámetro). La temperatura se mantuvo a 4 °C durante las mediciones con un sistema de medición y control de temperatura Physica TEK 150P. El APA-PC_{a/b} (~1,5 g) se colocó en la placa a 22 ± 3 °C y se mantuvo en reposo durante 30 min para recuperar la estructura. Las curvas de flujo del APA-PC_{a/b} se obtuvieron a un barrido de velocidad de corte de 10-3 a 103 s⁻¹, registrando los valores de viscosidad aparente del APA-PC_{a/b}. El software del equipo ajustó los datos al modelo de Ellis (Ecuación 1), que describe el comportamiento de los fluidos independiente del tiempo. Para la prueba oscilatoria se realizaron barridos de amplitud en un rango de deformación de 0.01 – 100 % a una frecuencia de 1 Hz para caracterizar la región viscoelástica lineal (RVL) (Hernández-Rodríguez et al., 2014).

Modelo de Ellis con la siguiente ecuación (1)

$$\eta = \frac{\eta_0}{[1+(\lambda\dot{\gamma})^2]^p} \quad (1)$$

Donde: η = viscosidad aparente; $\dot{\gamma}$ = tasa de corte; η_0 = viscosidad a baja velocidad de corte; λ = constante de tiempo asociada al tiempo de relajación de los biopolímeros en solución, y p = índice de comportamiento al corte, que tiende a un valor de $1-n$, donde n es el índice de flujo del modelo de ley de potencia.

Análisis de datos

Todas las mediciones se realizaron por triplicado utilizando un diseño completamente al azar de tres experimentos independientes. Los datos se sometieron a análisis de varianza y, cuando correspondía, a la prueba de comparación de medias de Tukey. La significación se estableció en $p \leq 0,05$ y los datos se analizaron con el software Statgraphics 7 (Statistical Graphics Corp., Manugistics Inc., Cambridge, MA, EE. UU.).

Resultados y discusión

Propiedades reológicas de los complejos coacervados

Las curvas de flujo del APA-PC_{a/b} mostraron una región newtoniana a velocidades de cizallamiento bajas ($0,001 - 0,0016 \text{ s}^{-1}$), seguida de una región de adelgazamiento por cizallamiento a velocidades de cizallamiento intermedias ($0,0016 - 100 \text{ s}^{-1}$) (Figura 1).

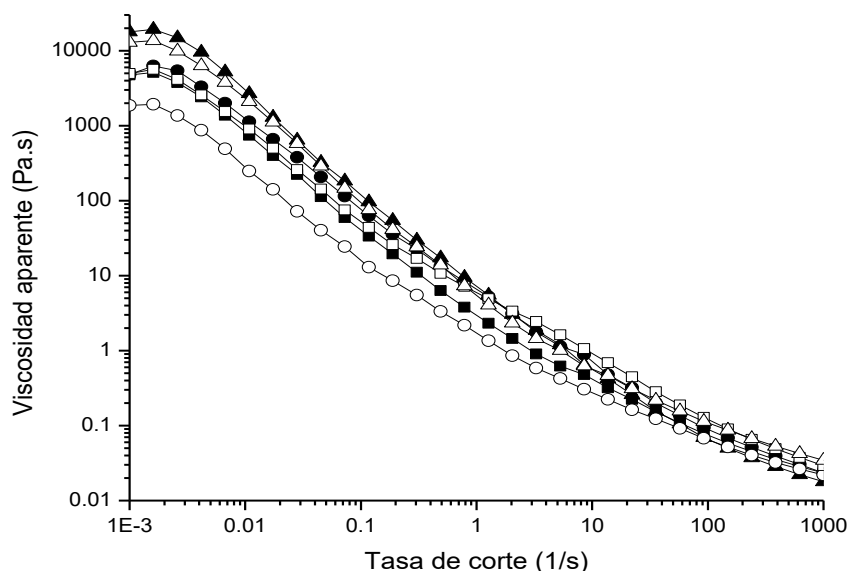


Figura 1. Curvas de flujo de complejos coacervados a diferentes relaciones y pH. APA-PC_{3:1/3.5} (●), APA-PC_{5:1/3.5} (■), APA-PC_{7:1/3.5} (▲), APA-PC_{3:1/4.5} (○), APA-PC_{5:1/4.5} (□), APA-PC_{7:1/4.5} (Δ).

Este comportamiento de flujo es propio de materiales caracterizados por una viscosidad estructural y se debe a la formación o reordenamiento de la estructura de red en la que al aplicar un esfuerzo cortante se rompe, presentando un comportamiento dependiente del corte que podría recuperarse en condiciones de reposo o equilibrio.

De acuerdo con lo mencionado, los coacervados serían partículas densas en una dispersión, donde las cadenas de polisacáridos colapsan en lugar de desplegarse, en cuyo caso, el

adelgazamiento por cizallamiento será el resultado de la ruptura temporal de interacciones atractivas dando lugar a la reorganización de la estructura de los complejos coacervados. (Murillo-Martínez et al., 2011; Wee et al., 2014). Los coacervados que presentaron una viscosidad relativamente superior a 3500 Pa·s a bajas velocidades de cizallamiento ($0,001 \text{ s}^{-1}$) fueron aquellos formados a pH 3.5. APA-PC_{7:1/3.5} tuvo la viscosidad más alta, mientras que APA-PC_{3:1/4.5} tuvo la viscosidad más baja (Figura 1).

Los datos experimentales de viscosidad aparente se ajustaron ($R^2 > 0.97$) al modelo de Ellis. De acuerdo con los valores de los parámetros del modelo de Ellis (Cuadro 1), el tiempo de relajación (λ), el índice de adelgazamiento por cizallamiento (p) y la viscosidad a baja velocidad de corte (η_0) aumentaron a medida que la relación en peso de APA:PC aumentaba. Esto se debe a que hay más moléculas de proteína disponibles para interactuar con las moléculas de polisacárido, formando una red más fuerte (Lobato-Calleros et al., 2004).

Los valores de λ y η_0 fueron más altos a pH 3.5 que a pH 4.5, lo que puede deberse a una mayor atracción entre las cargas de signo opuesto de APA y PC a pH 3.5 que a pH 4.5. La formación de los complejos depende en gran medida del pH, donde la estructura de los complejos a valores por encima o por debajo del pH óptimo no está completamente estructurada. Por lo tanto, la red formada en los coacervados del complejo APA-PC_{a/b} a pH 3.5 presentaría una red más estructurada e interconectada que las formadas a pH 4.5 (Liu et al., 2017). Así, el complejo APA-PC_{7:1/3.5} presentó los valores más altos en todos los parámetros reológicos, y el APA-PC_{3:1/4.5} los valores más bajos.

Cuadro 1. Valores medios de los parámetros del modelo de Ellis.

APA-PC _{a/b}	λ (s)	p	η_0 (Pa.s)
APA-PC _{3:1/3.5}	701.26 ± 90.30 ^d	0.52 ± 0.0 ^c	8124.30 ± 121.40 ^e
APA-PC _{5:1/3.5}	1068.50 ± 125.10 ^{cd}	0.53 ± 0.0 ^c	19541.00 ± 156.20 ^c
APA-PC _{7:1/3.5}	2907.20 ± 74.80 ^a	0.55 ± 0.0 ^b	36281.00 ± 127.30 ^a
APA-PC _{3:1/4.5}	368.74 ± 17.10 ^d	0.49 ± 0.0 ^d	2004.50 ± 78.40 ^f
APA-PC _{5:1/4.5}	1707.50 ± 68.20 ^{bc}	0.59 ± 0.0 ^a	14121.00 ± 84.80 ^d
APA-PC _{7:1/4.5}	2024.20 ± 635.50 ^b	0.60 ± 0.0 ^a	35381.00 ± 341.10 ^b

Los superíndices diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre las medias ($p \leq 0.05$). η_0 : viscosidad a baja tasa de corte; λ : tiempo constante asociado al tiempo de relajación de los biopolímeros en solución; p : índice de comportamiento al corte.

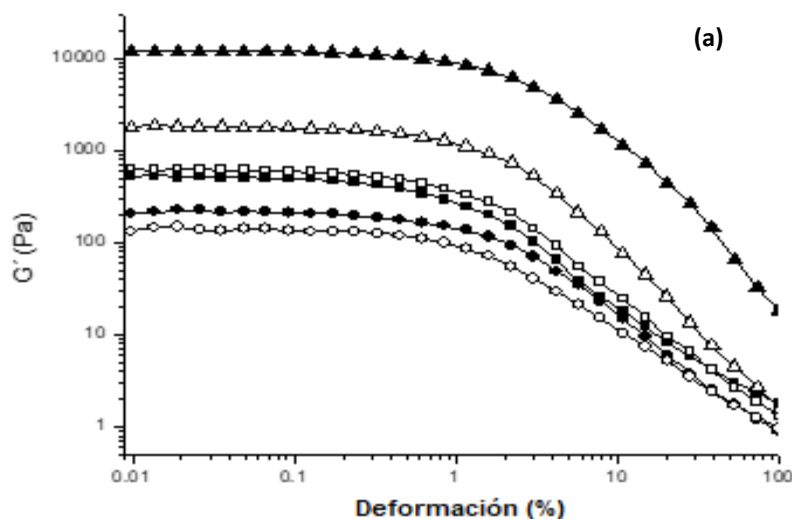
El parámetro λ proporciona un orden de la velocidad de corte crítica que marca el final de la región newtoniana y el comienzo de la región de adelgazamiento por corte (Hernández-Rodríguez et al., 2014). En los APA-PC_{a/b}, a medida que aumentaba la relación en peso APA:PC, λ aumentaba y η disminuía, por lo que la región de adelgazamiento por cizallamiento se desplazó hacia la derecha a un pH designado, exhibiendo un cambio más marcado a pH 4.5 (Figura 1).

Este adelgazamiento por cizallamiento en los coacervados suele ser el resultado de que el biopolímero se deshaga y, posteriormente, se alinee con el flujo de cizallamiento; por lo tanto, se requiere una alta concentración de proteína para contribuir significativamente a la viscosidad

(Wee et al., 2014). Así, si el parámetro p se aproxima a un valor de 1^{-n} , donde n es el caudal del modelo de ley de potencia. Por lo tanto, valores de p más altos significan que n tendrá valores más bajos, lo que describe un comportamiento de adelgazamiento por cizallamiento más amplio (Rao, 1999).

En estas circunstancias, a medida que aumentaba la proteína, el valor de p aumentaba exponiendo una mayor disipación viscosa y arrastre de los coacervados dando un comportamiento de adelgazamiento por cizallamiento más pronunciado a altas velocidades de cizallamiento (Crispín-Isidro, et al. 2019). Para la potencial aplicación de los coacervados en sistemas alimentarios como agentes estructurantes, se requiere que presenten una alta viscosidad de cizallamiento cero, adelgazamiento por cizallamiento a altas velocidades de cizallamiento y una viscoelasticidad significativa donde predomine la componente elástica (G') sobre la viscosa (G'') (Hernández-Rodríguez et al., 2014).

El espectro mecánico del % de deformación de G' y G'' de los APA-PC_{a/b} (Figura 2) se caracterizó por una RVL donde G' y G'' presentaron valores constantes a pequeños valores de % de deformación, seguido de una RVL donde se produjo una inflexión hacia abajo de los valores de G' y G'' a valores de % de deformación más altos. Por lo tanto, las curvas del módulo los APA-PC_{a/b} son típicas de geles débiles que mostraban un comportamiento de adelgazamiento por deformación.



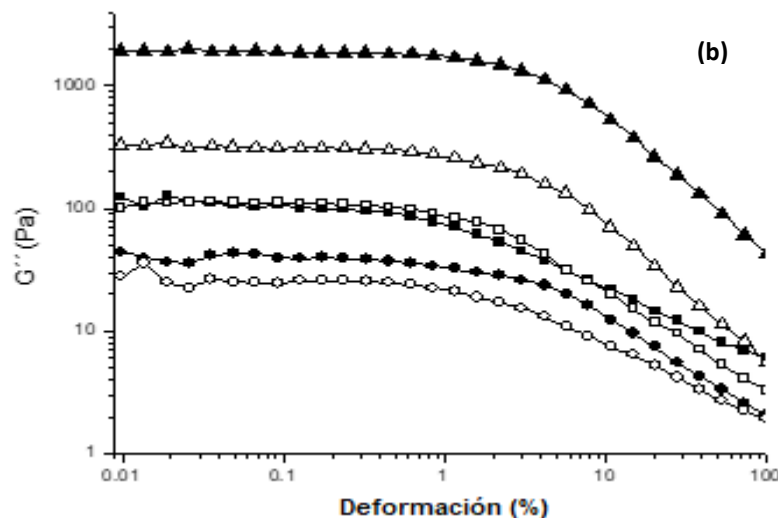


Figura 2. (a). Variación del módulo de almacenamiento (G') como función del % de deformación de los complejos coacervados de aislado de proteína de amaranto-pectina cítrica a diferentes relaciones y diferente pH. APA-PC_{3:1/3.5} (●), APA-PC_{5:1/3.5} (■), APA-PC_{7:1/3.5} (▲), APA-PC_{3:1/4.5} (○), APA-PC_{5:1/4.5} (□), APA-PC_{7:1/4.5} (Δ). (b). Variación del módulo de pérdida (G'') como función del % de deformación de los complejos coacervados de aislado de proteína de amaranto-pectina cítrica a diferentes relaciones y diferente pH. APA-PC_{3:1/3.5} (●), APA-PC_{5:1/3.5} (■), APA-PC_{7:1/3.5} (▲), APA-PC_{3:1/4.5} (○), APA-PC_{5:1/4.5} (□), APA-PC_{7:1/4.5} (Δ).

Los datos de G' (Figura 2a) indicaron que la RVL de los APA-PC_{a/b} ocurrió hasta una deformación máxima de 0.174%. Los datos variaron de la siguiente manera de mayor a menor: APA-PC_{3:1/3.5} (0.174 %) > APA-PC_{5:1/3.5} (0.174 %) > APA-PC_{3:1/4.5} (0.174 %) > APA-PC_{5:1/4.5} (0.174 %) > APA-PC_{7:1/4.5} (0.173 %) > APA-PC_{7:1/3.5} (0.163 %). Estas pruebas oscilatorias mostraron que el pH y la relación en peso APA:PC influyeron en la respuesta viscoelástica de los coacervados; ya que la ruptura y reformación de enlaces que ocurren a diferentes velocidades dependerán de una red más estructurada e interconectada; se puede decir que a bajo % de deformación en los APA-PC_{a/b} se produce una resistencia a la ruptura y a mayor % de deformación se produce una deformación permanente sobre los coacervados (Crispin-Isidro et al., 2015). Los valores del módulo de almacenamiento (G') en el LVR del APA-PC_{a/b} variaron de la siguiente manera: APA-PC_{3:1/4.5} (133.0 Pa) < APA-PC_{3:1/3.5} (205.0 Pa) < APA-PC_{5:1/3.5} (463.0 Pa) < APA-PC_{5:1/4.5} (560.0 Pa) < APA-PC_{7:1/4.5} (1690.0 Pa) < APA-PC_{7:1/3.5} (11400.0 Pa).

En términos generales, cuanto mayor es el número de interacciones que tienen lugar entre las cadenas de biopolímeros, mayor es el número de uniones y mayor el elasticidad de los APA-PC_{a/b}. Los valores de G' fueron siempre mayores que los valores de G'' en todo el rango de deformaciones estudiado, lo que indica que las propiedades sólidas predominaron en los APA-PC_{a/b}, es decir, las propiedades elásticas predominaron sobre las propiedades viscosas de los APA-PC_{a/b}. Se ha informado un comportamiento predominantemente elástico similar para coacervados complejos formados por aislado de proteína de arroz y goma de linaza (Hasanvand y Rafe, 2019) y aislado de proteína de canola y goma arábiga (Stone et al., 2014). Por el contrario, los complejos de coacervados obtenidos a partir de aislado de proteína de guisante-

alginate de sodio exhibieron un comportamiento predominantemente viscoso ($G'' > G'$) (Mession et al., 2012).

Los valores de G'' en la RVL variaron de la siguiente manera: APA-PC_{3:1/4.5} (25.8 Pa) < APA-PC_{3:1/3.5} (40.0 Pa) < APA-PC_{5:1/3.5} (99.7 Pa) < APA-PC_{5:1/4.5} (110.0 Pa) < APA-PC_{7:1/4.5} (313.0 Pa) < APA-PC_{7:1/3.5} (1860.0 Pa). Los resultados dinámicos y oscilatorios indicaron que una relación de peso APA:PC relativamente alta y un pH bajo dieron como resultado una respuesta mecánica más resistente, con parámetros reológicos mejorados, debido al aumento de las interacciones atractivas entre los biopolímeros APA y PC.

Conclusiones

Tanto la relación en peso APA:PC como el valor de pH de formación influyeron en las propiedades reológicas de los coacervados. A medida que se incrementó la relación en peso APA:PC a un pH de formación constante, los coacervados formados presentaron mayores parámetros viscoelásticos y viscosos. Cuando el valor de pH de la formación se elevó de 3.5 a 4.5, los coacervados obtenidos presentaron propiedades reológicas más bajas. Así, el coacervado que presentó mejores propiedades mecánicas fue el formado a pH 3.5 y con una relación en peso APA:PC de 7:1. Todos los complejos coacervados mostraron viscosidad estructural y exhibieron un comportamiento de adelgazamiento por cizallamiento a velocidades de cizallamiento bajas e intermedias ($0.0016 - 100 \text{ s}^{-1}$). El predominio del módulo de almacenamiento (G') sobre el módulo de pérdida (G'') en todo el rango de deformación estudiado, indicó propiedades predominantemente sólidas de la estructura gelatinosa de los coacervados complejos. Esta información podría contribuir a ampliar los usos de los coacervados complejos en diversos productos alimenticios, como sustitutos de grasas, agentes estructurales y sistemas protectores bioactivos, entre otros.

Literatura Citada

- Ach, D., Briançon, S., Dugas, V., Pelletier, J., Broze, G. and Chevalier, Y.** (2015). Influence of main whey protein components on the mechanism of complex coacervation with acacia gum. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 481, 367-74. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2015.06.006>
- Anvari, M. and Chung, D.** (2016). Dynamic rheological and structural characterization of fish gelatin-Gum arabic coacervate gels cross-linked by tannic acid. *Food Hydrocolloids* 60, 516-524. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.04.028>
- A.O.A.C** (1996). Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemist. Washintong, DC.
- Bosnea, L.A., Moschakis, T., Nigam, P.S. and Biliaderis, C.G.** (2016). Growth adaptation of probiotics in biopolymer-based coacervate structures to enhance cell viability. *LWT - Food Science and Technology* 16, 730-58. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.11.056>
- Condés, M. C., Speroni, F., Mauri, A. y Añón, M. C.** (2012). Physicochemical and structural properties of amaranth protein isolates treated with high pressure. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 14, 11-17. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2011.12.006>

- Comert, F., Malanowski, A. J., Azarikia, F., y Dubin, P. L.** (2016). Coacervation and precipitation in polysaccharide-protein systems. *Soft Matter* 12, 4154–61. <https://doi.org/10.1039/C6SM00044D>
- Crispín-Isidro, G., Lobato-Calleros, C., Espinosa-Andrews, H., Alvarez-Ramirez, J. and Vernon-Carter, E. J.** (2015). Effect of inulin and agave fructans addition on the rheological, microstructural and sensory properties of reduced-fat stirred yogurt. *LWT–Food Science and Technology* 62(1), 438–444. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2014.06.042>
- Hasanvand, E. and Rafe, A.** (2019). Development of vanillin/ β -cyclodextrin inclusion microcapsules using flax seed gum-rice bran protein complex coacervates. *International Journal of Biological Macromolecules* 131, 60–66. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.066>
- Hernández-Rodríguez, L., Lobato-Calleros, C., Pimentel-González, D. J. y Vernon-Carter, E. J.** (2014). *Lactobacillus plantarum* protection by entrapment in whey protein isolate: k-carrageenan complex coacervates. *Food Hydrocolloids*, 36, 181–188. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.09.018>
- Huang, Q.R., Given, P. and Qian, M.** (2009). *Micro/nanoencapsulation of active food ingredients*. ACS symposium Series Washington DC: American Chemical Society.
- Ifeduba, E.A. and Akoh, C.C.** (2016). Microencapsulation of stearidonic acid soybean oil in Maillard reaction-modified complex coacervates. *Food Chemistry* 199, 524–32. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.12.011>
- Koupantsis, T., Pavlidou, E. and Paraskevopoulou, A.** (2014). Flavour encapsulation in milk proteins - CMC coacervate-type complexes. *Food Hydrocolloids* 37, 134–42. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.01.007>
- Lan, Y., Ohm, J.B., Chen, B. and Rao, J.** (2020). Phase behavior, thermodynamic and microstructure of concentrated pea protein isolate-pectin mixture: Effect of pH, biopolymer ratio and pectin charge density. *Food Hydrocolloids* 101, 105556. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105556>
- Liu, J., Shim, Y.Y., Shen, J., Wang, Y. and Reaney, M.J.** (2017). Whey protein isolate and flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) gum electrostatic coacervates: Turbidity and rheology. *Food Hydrocolloids* 64, 18–27. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.10.006>
- Lobato-Calleros, C., Martínez-Torrijos, O., Sandoval-Castilla, O., Pérez-Orozco, J.P. and Vernon-Carter, E.J.** (2004). Flow and creep compliance properties of reduced fat yogurts containing protein-based fat replacers. *International Dairy Journal* 14, 777–82. <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.02.012>
- Mession, J.-L., Assifaoui, A., Lafarge, C., Saurel, R. and Cayot, P.** (2012). Protein aggregation induced by phase separation in a pea proteins-sodium alginate-water ternary system. *Food Hydrocolloids* 28, 333–343. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.12.022>
- Moschakis, T. and Biliaderis, C.G.** (2017). Biopolymer-based coacervates: Structures, functionality and applications in food products. *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 28, 96–109. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2017.03.006>
- Motta, C., Castanheira, I., Gonzales, G. B., Delgado, I., Torres, D., Santos, M., y Matos, A. S.** (2018). Impact of cooking methods and malting on amino acids content in amaranth, buckwheat and quinoa. *Journal of Food Composition and Analysis*, 76. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2018.10.001>
- Muriel, M.J.L., Liu, J., Tan, Y., Zhou, H., Zhang, Z. and McClements, D.J.** (2019). Characterization of electrostatic interactions and complex formation of γ -poly-glutamic acid

(PGA) and ϵ -poly-lysine (PLL) in aqueous solutions. *Food Research International* 128, 108781. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108781>

Murillo-Martínez, M.M., Pedroza-Islas, R., Lobato-Calleros, C., Martínez-Férez, A. and Vernon-Carter, E.J. (2011). Designing W1/O/W2 double emulsions stabilized by protein-polysaccharide complexes for producing edible films: rheological, mechanical and water vapour properties. *Food Hydrocolloids* 5, 577-585. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.06.015>

Nesterenko, A., Alric, I., Silvestre, F., y Durrieu, V. (2013). Vegetable proteins in microencapsulation: A review of recent interventions and their effectiveness. *Industrial Crops and Products*, 42, 469-479. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.06.035>

Niu, F., Kou, M., Fan, J., Pan, W., Zhi-Juan F., Su, Y., Yang, Y. y Zhou, W. (2018). Structural characteristics and rheological properties of ovalbumin-gum arabic complex coacervates. *Food Chemistry*, 260, 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.141>

Perry, L. S., y Blocher, C. W. (2016), Complex Coacervate-based Materials for Biomedicine. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 835. <https://doi.org/10.1002/wnan.1442>

Rao, M.A. (1999). Rheology of fluid and semisolid foods. Gaithersburg: Aspen Publishers, Inc.

Souza, C.J.F. and Garcia-Rojas, E.E. (2015). Effects of salt and protein concentrations on the association and dissociation of ovalbumin-pectin complexes. *Food Hydrocolloids* 47, 124-9. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.01.010>

Wee, M.S., Nurhazwani, S., Tan, K.W., Goh, K.K., Sims, I.M. and Matia-Merino, L. (2014). Complex coacervation of an arabinogalactan-protein extracted from the *Meryta sinclarii* tree (puka gum) and whey protein isolate. *Food Hydrocolloids* 42, 130-138. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.03.005>

Zhu, Y., Bhandari, B., Pang, Z., Liu, X., y Prakash, S. (2019). Protein concentration and hydrocolloid effect on the rheological and tribological behaviour of resulting protein solution. *LWT- Food Science and Technology*, 100, 150-157. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.10.042>

Propiedades Reológicas de Películas Biopoliméricas Basadas en Quitosano, Ácido Oleico y Aceite Esencial de Tomillo

Mitzy Nayeli Estrada-Ramírez¹, Salvador Valle-Guadarrama¹, Eleazar Aguirre-Mandujano²

Resumen

El desarrollo de recubrimientos y películas comestibles ha adquirido mayor importancia debido a la demanda de disponer de estrategias de conservación para aumentar la vida de anaquel de productos frescos. El objetivo del trabajo fue caracterizar recubrimientos de quitosano (Q) y ácido oleico (AO) enriquecidos con aceite esencial de tomillo (AET). Se prepararon emulsiones con Q, AO y AET en concentraciones de 1.0, 0.0-2.4 y 0.1 %, respectivamente. Se determinó el color, el tamaño de partícula y el comportamiento reológico de las emulsiones. El tamaño de gota osciló entre 0.89-2.45 μm y todas las emulsiones exhibieron un comportamiento adelgazante al corte. Las emulsiones se vaciaron sobre superficies sólidas y formaron películas que se evaluaron en términos de sus propiedades mecánicas y de barrera. Se registraron valores de esfuerzo de tensión entre 10.7-14.3 MPa con porcentajes de elongación entre 8.4-17.1 %. El espesor fue mayor a medida que aumentó la concentración de ácido oleico. De manera contraria, la permeabilidad a vapor de agua disminuyó con el aumento del ácido oleico.

Palabras clave: Comportamiento reológico, películas biopoliméricas, permeabilidad a vapor de agua.

Abstract

The development of edible films has acquired importance because of the demand to dispose preservation strategies to increase shelf-life of fresh produce. The aim of this work was to develop and characterize chitosan (Q) and oleic acid (OA) films enriched with thyme essential oil (TEO). Emulsions with Q, OA, and TEO in concentration of 1.0, 0.0-2.4, and 0.1 %, respectively, were prepared. Color, particle size, and rheological behavior were determined. The drop size varied between 0.89-2.45 μm and all emulsions showed shear-thinning behavior. Emulsions were cast on solid surfaces and formed films that were evaluated in terms of their mechanical and barrier properties. Tensile strength varied between 10.7-14.3 MPa and elongation capacity between 8.4-17.1 %. Thickness was higher as concentration of OA increased. In contrast, water vapor permeability decreased when OA was present in higher concentration.

Key words: Edible films, rheological behavior, water vapor permeability.

Introducción

¹Departamento de Ingeniería Agroindustrial. ²Departamento de Preparatoria Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. México- Texcoco km 38.5, Chapingo, 56230, Texcoco de Mora, MÉXICO.
Correo: mner007@gmail.com; svalleg@taurus.chapingo.mx; eleagman@yahoo.com

Las películas y recubrimientos comestibles se han utilizado ampliamente para retener la calidad y prolongar el tiempo de vida útil de algunas frutas y vegetales. Recientemente se ha incrementado el interés en el desarrollo de estas tecnologías, debido a las preocupaciones ambientales que genera el uso de materiales de empaque no biodegradables (Elsabee & Abdou, 2013). Varios materiales son utilizados para elaborar películas y recubrimientos, los cuales generalmente se pueden incluir en tres categorías: hidrocoloides (polisacáridos y proteínas), lípidos (ácidos grasos y ceras) y compuestos. La mayoría de los recubrimientos compuestos están asociados a matrices estructurales hidrofílicas y a compuestos lipídicos hidrofóbicos, lo cual da como resultado el incremento de la efectividad de la película, especialmente en sus propiedades de barrera al vapor de agua (Galus & Kadzińska, 2015). El quitosano es uno de los materiales más atractivos para la elaboración de recubrimientos comestibles, ya que, además de ser biodegradable, confiere buenas propiedades mecánicas a las películas y se ha demostrado su capacidad para inhibir el crecimiento de bacterias y hongos (Pereda, Amica, & Marcovich, 2012). Sin embargo, su principal inconveniente es su pobre barrera a la humedad, la cual puede ser mejorada a través de la incorporación de compuestos lipídicos como el ácido oleico, el cual al ser un ácido graso insaturado está asociado a varios efectos benéficos a la salud (Pereda et al., 2012). Enfoques actuales contemplan la incorporación de aceites esenciales a las formulaciones de los recubrimientos con la finalidad de extender sus propiedades funcionales, debido a que estos extractos poseen propiedades antimicrobianas y antioxidantes (Peng & Li, 2014). En este sentido, la elaboración de recubrimientos comestibles utilizando quitosano como material estructural, ácido oleico como regulador del balance hidrofílico-lipòfilico y aceite esencial de tomillo como ingrediente activo representa una mezcla multicomponente que no ha sido reportada y que por lo tanto exige su caracterización en términos de su tamaño de partícula, sus propiedades reológicas, así como de sus propiedades mecánicas y de permeabilidad al vapor de agua. En tal contexto, el objetivo del trabajo fue caracterizar recubrimientos de quitosano (Q) y ácido oleico (AO) enriquecidos con aceite esencial de tomillo (AET).

Materiales y métodos

Materiales

Se utilizó quitosano de peso molecular medio (Sigma-Aldrich Química, S.A. de C.V., México) como matriz estructural durante la formación de emulsiones aceite en agua (O/W). La fase oleosa estuvo constituida por ácido oleico (Meyer®, S.A de C.V México, D.F), aceite esencial de tomillo (Droguería Cosmopólita S.A. de C.V., México) y Tween 80 (Hycel de México S.A. de C.V., Mexico) como emulsificante. Otros reactivos utilizados fueron ácido acético glacial (J.T. Baker, S.A. de C.V. México) e hidróxido de sodio (NaOH) 1N (Sigma Aldrich Inc., USA). En todos los experimentos se utilizó agua destilada como disolvente.

Preparación de las emulsiones

Se prepararon seis emulsiones aceite en agua, a partir de una solución acuosa de quitosano (1 % p/p), dispersado en ácido acético glacial (1 % p/p). La fase lipídica estuvo constituida por aceite esencial de tomillo a una concentración constante de 0.1 % (p/p) y ácido oleico, cuya concentración varió entre 0 y 2.4 %, considerando una relación quitosano:fase lipídica de 1.0:0.1

a 1:2 (Cuadro 1). Se adicionó Tween 80 (0.1 % p/p en relación a la fase lipídica) como emulsificante y se ajustó el pH de la solución de quitosano a 5.2 con NaOH 1N.

Caracterización de emulsiones

Se evaluó color de las emulsiones con un colorímetro (HunterLab, MiniScan® XE Plus, USA), con resultados expresados como ángulo de matiz, cromaticidad y luminosidad. Se determinó tamaño de gota de las emulsiones mediante una técnica de dispersión de luz láser con un equipo Master Sizer 3000® (Malvern Instruments, Ltd. Worcs., Inglaterra) y se expresó como diámetro medio ponderado por la superficie ($d_{3,2}$). Se realizó la caracterización reológica de las emulsiones por medio de construcción de curvas de flujo aplicando tasas de corte en el rango de 10^{-3} a $10^3 \cdot s^{-1}$ en un reómetro MRC 301 (Anton Paar, Messtechnik, Stuttgart, Alemania) a temperatura de 4 °C (Physica TEK 150P), usando una geometría cono-plato, con diámetro de 50 mm y ángulo de 1° en el cono (CP50-1-SN29993).

Caracterización de películas biopoliméricas

Se usó una técnica de vaciado en placa para la preparación de las películas biopoliméricas. Se vertieron 10 g de cada emulsión en placas de plástico de 9 cm de diámetro. Se secaron en un horno de convección (Thermo Scientific, USA) a 30 ± 2 °C durante 12 h. Se removieron las películas con ayuda de pinzas de disección y se mantuvieron almacenadas a una humedad relativa de (65 %) por 24 h previas a su caracterización. Se evaluó espesor de las películas con un micrómetro manual (Starret, model 216, USA). Se realizaron pruebas enfocadas a la determinación del esfuerzo de tensión (ET) y el porcentaje de elongación (%E). Las mediciones se realizaron de acuerdo con el método ASTM-882 reportado por Galus y Lenart (2013), utilizando un texturómetro TA-XT2i (Stable Micro Systems UK, Surrey RU), con una celda de 5 kg. Se midió permeabilidad a vapor de agua con el método de la copa, definido como método gravimétrico estándar de la ASTM, E 96-80 (ASTM, 1989).

Análisis de datos

El desarrollo experimental se condujo como con un diseño completamente al azar, considerando la formulación o las películas como única fuente de variación. Los datos se sometieron a análisis de varianza complementado con rutinas de comparación de medias con el estadístico de Tukey (0.05).

Resultados y discusión

Color

Se registraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en las variables de color medidas en las emulsiones (Cuadro 1). El aumento en la concentración de ácido oleico generó valores más altos de luminosidad que confirieron una apariencia blanca a las emulsiones 4, 5 y 6, mientras que la emulsión 1, al poseer un valor más bajo de luminosidad, se mostró ligeramente transparente. Los atributos de color influyen ampliamente en la aceptabilidad del consumidor. En este sentido, las películas y recubrimientos comestibles deben ser incoloros en lo posible para no alterar el aspecto del producto al que se van a aplicar (Galus & Lenart, 2013).

Los valores del ángulo de tono (hue) indicaron que las emulsiones se encuentran en el rango que va de los tonos amarillos, para las dos primeras emulsiones, hasta los tonos naranja para las

emulsiones restantes. Respecto a la saturación del color, los valores fueron bajos, lo cual indica que las tonalidades que representa el valor de hue son poco intensas.

Cuadro 1. Composición, parámetros de color en términos de luminosidad (L^*), ángulo de matiz (H^*) y saturación de color (C^*) y diámetro de gota ($d_{3,2}$) de emulsiones de quitosano (Q), aceite esencial de tomillo (AET) y ácido oleico (AO).

Emulsión	Q (%)	AET (%)	AO (%)	L^*	H^*	C^*	$d_{3,2}$ (μm)
1	1.0	0.1	0.0	69.07 $\pm$ 1.19cb	64.24 $\pm$ 4.58a	1.47 $\pm$ 0.09bc	0.89 $\pm$ 0.09d
2	1.0	0.1	0.4	67.29 $\pm$ 1.66c	64.51 $\pm$ 4.52a	2.16 $\pm$ 0.42a	1.42 $\pm$ 0.19c
3	1.0	0.1	0.9	72.24 $\pm$ 1.62ab	53.06 $\pm$ 2.24b	1.63 $\pm$ 0.11b	1.77 $\pm$ 0.43bc
4	1.0	0.1	1.4	73.83 $\pm$ 2.54a	51.37 $\pm$ 2.49b	1.39 $\pm$ 0.02bc	2.08 $\pm$ 0.58ab
5	1.0	0.1	1.9	76.33 $\pm$ 1.94a	49.48 $\pm$ 1.60b	1.38 $\pm$ 0.04bc	2.11 $\pm$ 0.46ab
6	1.0	0.1	2.4	75.74 $\pm$ 2.36a	48.10 $\pm$ 4.58b	1.21 $\pm$ 0.06c	2.45 $\pm$ 0.35a

Letras iguales indican diferencia no significativa (Tukey, 0.05).

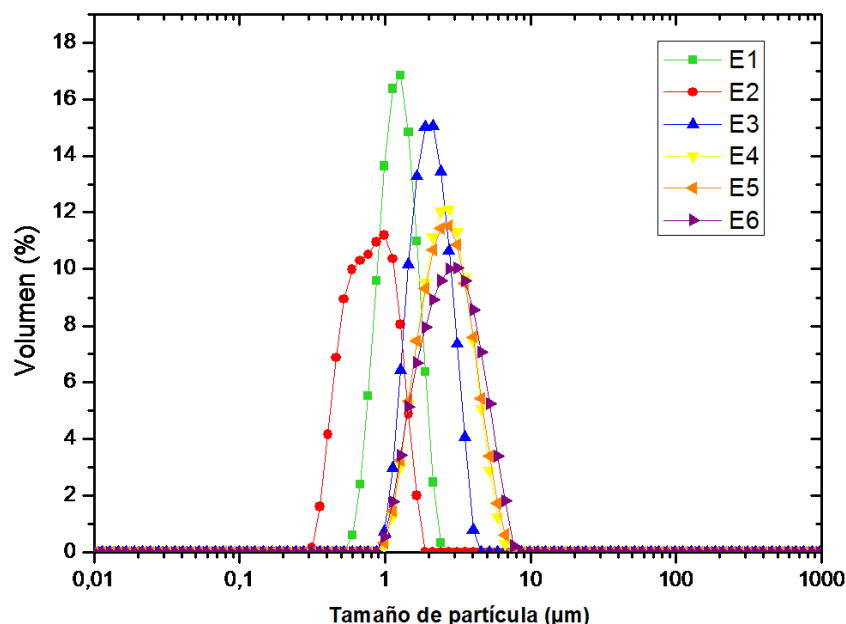


Figura 1. Distribución del tamaño de partícula de las emulsiones.

Tamaño y distribución de las partículas de las emulsiones

Conforme aumentó la concentración de ácido oleico (AO) se incrementó significativamente el tamaño de gota de las emulsiones, que varió en un rango de 0.89 a 2.45 μm . Vargas et al. (2009) reportaron valores entre 0.4 y 10 μm para emulsiones de quitosano y ácido oleico, mostrando la misma tendencia a aumentar de tamaño conforme aumentó la cantidad de AO. El tamaño de gota es un factor determinante para la estabilidad de una emulsión, así como para la apariencia, el sabor y la textura (Galus & Kadzińska, 2015). En la Figura (1) se muestra la distribución del tamaño de partícula. Todas las emulsiones presentaron una distribución unimodal, lo cual indicó que la fase lipídica en cada emulsión se distribuyó en forma homogénea en la fase dispersante. Estos resultados se pueden correlacionar con el tamaño de los glóbulos de lípido, ya que entre

menor es éste más homogénea es la distribución. Además, Galus y Kazinska (2015) mencionaron que un alto grado de compatibilidad de los componentes de una emulsión es responsable de este tipo de comportamiento, lo cual favorece la formación de películas con menores defectos estructurales.

Comportamiento de flujo de las emulsiones

Los perfiles de viscosidad aparente contra tasa de corte para las distintas emulsiones se muestran en la Figura 2. Todas las emulsiones presentaron patrones de comportamiento similares en donde sólo se presentó una región con comportamiento adelgazante al corte, ya que la viscosidad disminuyó gradualmente con el aumento de la tasa de corte, lo cual indica ruptura de enlaces estructurales que provocan la alineación de las moléculas en dirección al flujo y la disminución de la viscosidad (Murillo-Martínez, Pedroza-Islas, Lobato-Calleros, Martínez-Ferez, & Vernon-Carter, 2011). Típicamente, las curvas de flujo se caracterizan por tres regiones: una pequeña región Newtoniana, donde la viscosidad aparente fue constante; una región media, donde la viscosidad cambió con la tasa de corte y la última región donde la pendiente de la curva se volvió constante. Resultados similares han sido reportados por Hayati, Ching y Rozaini (2016), donde las curvas de flujo de emulsiones de goma guar y goma xantana no presentaron región Newtoniana para la estimación de la viscosidad limitante a tasa de corte cero.

Espesor y propiedades mecánicas de las películas comestibles

El espesor de las películas es una característica importante ya que puede modificar las propiedades mecánicas y la permeabilidad al vapor de agua (Zamudio-Flores et al., 2015). La película elaborada con la concentración más alta de ácido oleico (2.4 %, emulsión E6) presentó mayor grosor respecto a las películas elaboradas a partir de las emulsiones E1 y E2, que contenían sólo aceite de tomillo al 0.1 % y ácido oleico al 0.4 %, respectivamente (Cuadro 2), lo que indicó que la adición de ácido oleico afectó significativamente esta variable. Los valores de esfuerzo o resistencia a la tensión (ET) y el porcentaje de elongación al corte (%E) de las películas comestibles se muestran en el Cuadro 2. Ninguna de estas propiedades mecánicas se vio afectada significativamente por el incremento en la concentración de ácido oleico, lo cual de debió probablemente a que la diferencia de concentración entre emulsiones varió poco (0.5 mL). Resultados similares han sido reportados por Ghanbarzadeh y Almasi (2011) en películas de carboximetilcelulosa y ácido oleico a concentraciones de 0.3, 0.6 y 0.8 %. Por otro lado, Vargas et al. (2009) caracterizaron películas de quitosano con concentraciones de 1, 2 y 4 % de ácido oleico y reportaron valores de esfuerzo de tensión de 7.4-18.0 MPa, mientras que el porcentaje de elongación varió entre 11 y 17 %. Respecto a este último, en el presente estudio se registraron valores bajos, que pueden ser consecuencia de la falta de un material plastificante, distinto al ácido oleico, dentro de la formulación de las emulsiones. En contraste, Fabra et al. (2008), mencionaron que el ácido oleico puro o combinado con cera de abeja ejerce un efecto plastificante en las películas elaboradas con caseinato de sodio, aumentando su elasticidad y flexibilidad. Varios autores han estudiado el efecto de adicionar aceites esenciales a películas de quitosano basadas en emulsiones y han concluido que todas las propiedades mecánicas disminuyen cuando a una película de quitosano se le incorpora un lípido (Sánchez-González, Chiralt, González-Martínez, & Cháfer, 2011). Dada la amplia variación entre los resultados reportados en la literatura acerca de estas propiedades, Pereda et al. (2012) concluyeron que este comportamiento se puede atribuir al grado de desacetilación y al peso molecular del quitosano,

a la humedad relativa, a la presencia de diversos plastificantes y a la temperatura de secado de las películas, entre otros factores.

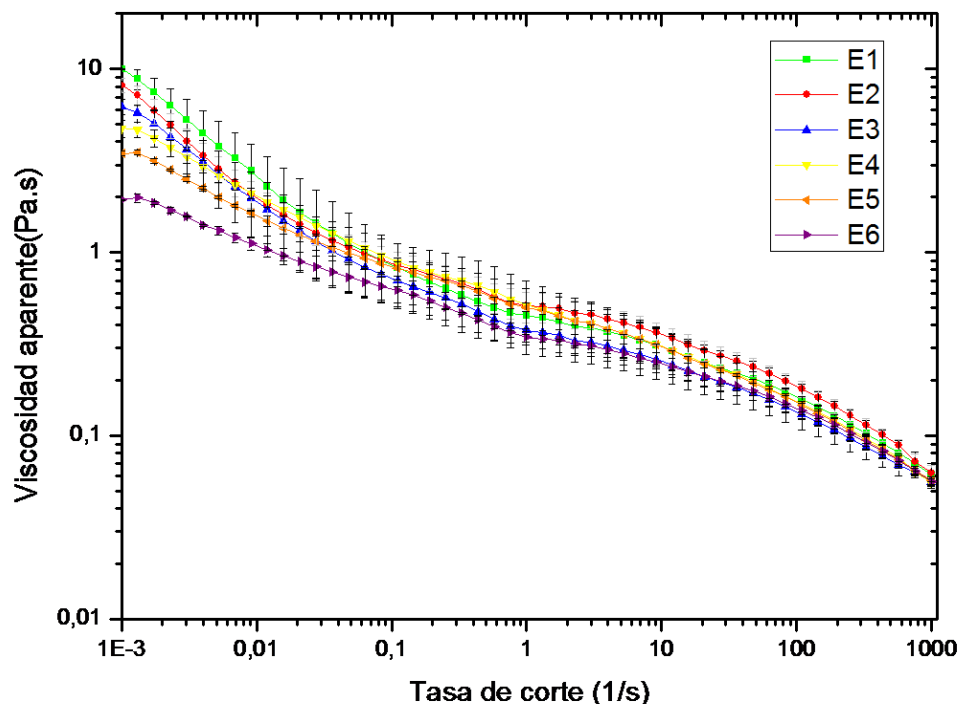


Figura 2. Cambios en la viscosidad aparente en función de la tasa de corte de las emulsiones.

Permeabilidad a vapor de agua de las películas

Los valores de permeabilidad al vapor de agua de las películas registraron diferencias estadísticamente significativas (Cuadro 2). Las películas hechas a base de las emulsiones con las relaciones más altas de quitosano:fase lipídica, es decir 1:2 y 1:2.5, presentaron los valores más bajos de PVA, lo cual ocurrió dado que la fracción lipídica de la emulsión está constituida por aceite de tomillo y ácido oleico. Este último es un ácido graso insaturado que debido a su naturaleza hidrofóbica tiene la función de bloquear el transporte de humedad a través de la película, impartiendo hidrofobicidad a la misma e incluso constituyendo una red a lo largo de la cadena polimérica que aumenta las propiedades de barrera (Fabra, Jiménez, Atarés, Talens, & Chiralt, 2009). Aunado a lo anterior, la película hecha a partir de la emulsión E6 fue la que presentó el mayor grosor y varios autores han mencionado que existe una relación inversamente proporcional entre este parámetro y la PVA (Zamudio-Flores et al., 2015). La PVA de las películas varió entre 1.97×10^{-11} y $3.21 \times 10^{-11} \text{ g m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$. Vargas et al. (2009) mostraron resultados similares en películas de quitosano con ácido oleico, mientras que Leceta et al. (2013) reportaron valores en películas de quitosano y glicerol del orden de 8.07×10^{-11} - $10.2 \times 10^{-11} \text{ g m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$. Por su parte, Peng y Li (2014) obtuvieron 7.52×10^{-11} - $9.36 \times 10^{-11} \text{ g m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$ en películas de quitosano con aceite esencial de tomillo, de limón y de canela.

Cuadro 2. Espesor, permeabilidad a vapor de agua (PVA), resistencia a la tensión (ET) y capacidad de elongación de películas comestibles formuladas a base de quitosano, ácido oleico y aceite esencial de tomillo.

Película	Espesor (mm)	PVA (g m ⁻¹ s ⁻¹ Pa ⁻¹)	ET (MPa)	Elongación (%)
E1	0.029±0.013b	3.18 x10 ⁻¹¹ ab	14.30±1.27a	8.40±1.29b
E2	0.031±0.006b	3.21 x10 ⁻¹¹ a	11.04±2.57a	12.55±3.27ab
E3	0.037±0.012ab	2.89 x10 ⁻¹¹ ab	12.14±0.72a	17.18±2.53a
E4	0.045±0.024ab	2.90 x10 ⁻¹¹ ab	11.03±2.92a	15.10±4.77ab
E5	0.063±0.013ab	1.97 x10 ⁻¹¹ b	11.01±5.37a	12.01±0.65ab
E6	0.076±0.016a	2.29 x10 ⁻¹¹ ab	10.72±1.00a	9.94±3.38b

Letras iguales indican diferencia no significativa (Tukey, 0.05). Los datos indican medias ± desviación estándar.

Conclusiones

La incorporación de ácido oleico a las emulsiones de quitosano y aceite esencial de tomillo afectó significativamente las variables de luminosidad y tamaño de partícula. El aumento en la concentración de ácido oleico aumentó significativamente el espesor y como consecuencia redujo la permeabilidad al vapor de agua. Las propiedades mecánicas de las películas no se vieron afectadas por el aumento en la concentración de la fase lipídica de las emulsiones. Además, se comprobó que el ácido oleico no confirió flexibilidad a las películas comestibles.

Literatura Citada

- ASTM.** (1989). Standard test methods for water vapor transmission of materials E 96-80. In *Annual book of ASTM Standards* (pp. 15, 745–754). Filadelfia, USA: American Society for Testing and Materials.
- Elsabee, M. Z., & Abdou, E. S.** (2013). Chitosan based edible films and coatings: A review. *Materials Science and Engineering: C*, 33(4), 1819–1841. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.01.010>
- Fabra, M. J., Jiménez, A., Atarés, L., Talens, P., & Chiralt, A.** (2009). Effect of fatty acids and beeswax addition on properties of sodium caseinate dispersions and films. *Biomacromolecules*, 10(6), 1500–1507. <https://doi.org/10.1021/bm900098p>
- Fabra, Maria José, Talens, P., & Chiralt, A.** (2008). Tensile properties and water vapor permeability of sodium caseinate films containing oleic acid–beeswax mixtures. *Journal of Food Engineering*, 85(3), 393–400. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.07.022>
- Galus, S., & Kadzińska, J.** (2015). Food applications of emulsion-based edible films and coatings. *Trends in Food Science and Technology*, 45(2), 273–283. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.07.011>
- Galus, S., & Lenart, A.** (2013). Development and characterization of composite edible films based on sodium alginate and pectin. *Journal of Food Engineering*, 115(4), 459–465. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.03.006>

- Ghanbarzadeh, B., & Almasi, H.** (2011). Physical properties of edible emulsified films based on carboxymethyl cellulose and oleic acid. *International Journal of Biological Macromolecules*, 48(1), 44–49. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2010.09.014>
- Hayati, N. I., Ching, W. C., & Rozaini, M. Z. H.** (2016). Flow properties of o/w emulsions as affected by xanthan gum, guar gum and carboxymethyl cellulose interactions studied by a mixture regression modelling. *Food Hydrocolloids*, 53, 199–208. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.04.032>
- Leceta, I., Guerrero, P., Ibarburu, I., Dueñas, M. T., & de la Caba, K.** (2013). Characterization and antimicrobial analysis of chitosan-based films. *Journal of Food Engineering*, 116(4), 889–899. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.022>
- Murillo-Martínez, M. M., Pedroza-Islas, R., Lobato-Calleros, C., Martínez-Ferez, A., & Vernon-Carter, E. J.** (2011). Designing W1/O/W2 double emulsions stabilized by protein–polysaccharide complexes for producing edible films: Rheological, mechanical and water vapour properties. *Food Hydrocolloids*, 25(4), 577–585. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.06.015>
- Peng, Y., & Li, Y.** (2014). Combined effects of two kinds of essential oils on physical, mechanical and structural properties of chitosan films. *Food Hydrocolloids*, 36, 287–293. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.10.013>
- Pereda, M., Amica, G., & Marcovich, N. E.** (2012). Development and characterization of edible chitosan/olive oil emulsion films. *Carbohydrate Polymers*, 87(2), 1318–1325. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.09.019>
- Sánchez-González, L., Chiralt, A., González-Martínez, C., & Cháfer, M.** (2011). Effect of essential oils on properties of film forming emulsions and films based on hydroxypropylmethylcellulose and chitosan. *Journal of Food Engineering*, 105(2), 246–253. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.02.028>
- Vargas, M., Albors, A., Chiralt, A., & González-Martínez, C.** (2009). Characterization of chitosan–oleic acid composite films. *Food Hydrocolloids*, 23(2), 536–547. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.02.009>
- Zamudio-Flores, P. B., Ochoa-Reyes, E., Ornelas-Paz, J. J., Tirado-Gallegos, J. M., Bello-Pérez, L. A., Rubio-Rioz, A., & Cardenas-Felix, R. G.** (2015). Caracterización fisicoquímica, mecánica y estructural de películas de almidones oxidados de avena y plátano adicionadas con betalaínas. *Agrociencia*, 49(5), 483–498.

Capacidad antioxidante del espárrago bajo diferentes métodos de cultivo

**Adela Guadalupe Rosas Rosas¹, Juan Guillermo Cruz Castillo², Diana Guerra Ramírez³,
Ana María Castillo González¹**

Resumen

El contenido de fenoles totales, flavonoides, FRAP y ABTS se determinaron en turiones de espárrago cultivados bajo diferentes métodos; se cosecharon turiones en la localidad de San Salvador Atenco, Estado de México, una muestra se tomó del cultivo tradicional con fertilización química (AQ) y otra de una parcela donde se utilizan alternativas orgánicas como el bocashi y el uso de químicos, un cultivo semi-orgánico (ASO). Las otras muestras se obtuvieron en el municipio de Huatusco, Veracruz; una muestra se tomó de una parcela que está en asociación con el cultivo de frijol (HF) y finalmente una muestra de una parcela bajo sombra (HS), estos últimos no se aplica ningún tipo de fertilizante y la producción es para autoconsumo. Los datos se analizaron bajo un diseño completamente al azar, para fenoles totales, ASO y AQ fueron estadísticamente iguales con 6.0748 y 6.0748 mg EAG/g respectivamente, pero diferentes a HS y HF. En cuanto a fenoles, ASO fue estadísticamente superior a HS y HF con 3.3457 mgEC/g. En los ensayos FRAP y ABTS se presentó una superioridad estadística de ASO en comparación con HS y HF, con un contenido de 25.75 $\mu\text{mol ET/g}$ y 201.77 $\mu\text{mol Trolox/g}$ respectivamente. Si bien, los resultados fueron estadísticamente iguales entre ASO y AQ, se puede tomar la forma semi-orgánica de cultivo como una alternativa viable para obtener la calidad deseada en el producto; en cuanto a HF y HS, se tiene un área de oportunidad para obtener turiones de calidad comercial y no solamente de autoconsumo.

Palabras clave: fenoles, flavonoides, *Asparagus officinalis*, clorofilas, antioxidantes.

Abstract

The content of total phenols, flavonoids, FRAP and ABTS were determined in asparagus shoots grown under different methods; shoots were harvested in the town of San Salvador Atenco, State of Mexico, one sample was taken from the traditional crop with chemical fertilization (AQ) and another from a plot where organic alternatives such as bocashi and the use of chemicals are used, a semi-organic crop (ASO). The other samples were obtained in the municipality of Huatusco, Veracruz; one sample was taken from a plot that is in association with the cultivation of beans (HF) and finally a sample from a plot under shade (HS), the latter is not applied any type of fertilizer and the production is for self-consumption. Data were analyzed under a completely randomized design, for total phenols, ASO and AQ were

¹Universidad Autónoma Chapingo, Departamento de Fitotecnia. Carretera México-Texcoco km 38.5, Chapingo, Estado de México, C. P. 56230, MÉXICO.

²Centro Regional Universitario Oriente, Km. 6 Carretera Huatusco – Jalapa, Huatusco, Veracruz.

³Universidad Autónoma Chapingo, Departamento de Preparatoria Agrícola. Carretera México-Texcoco km 38.5, Chapingo, Estado de México, C. P. 56230, MÉXICO.

Correo: rosasag18@gmail.com; jcruc@chapingo.mx; dguerrar@chapingo.mx; acastillog@chapingo.mx

statistically equal with 6.0748 and 6.0748 mg EAG/g respectively, but different from HS and HF. For phenols, ASO was statistically superior to HS and HF with 3.3457 mg EAG/g. In the

FRAP and ABTS trials, ASO was statistically superior to HS and HF, with a content of 25.75 $\mu\text{mol ET/g}$ and 201.77 $\mu\text{mol Trolox/g}$, respectively. Although the results were statistically equal between ASO and AQ, the semi-organic form of cultivation can be taken as a viable alternative to obtain the desired quality of the product; as for HF and HS, there is an area of opportunity to obtain commercial quality shoots and not only for self-consumption.

Keywords: phenols, flavonoids, *Asparagus officinalis*, chlorophylls, antioxidants.

Introducción

El espárrago (*Asparagus officinalis* L.) es una planta herbácea perenne, el cultivo permanece en el suelo de 8 a 10 años. La planta está formada por una parte subterránea y una aérea; la “garra” es la parte subterránea y está conformada por un rizoma principal, el cual es un tallo modificado que actúa como unión entre el sistema radical y la parte aérea, y unas raicillas secundarias.

La parte aérea es denominada helecho o follaje y está constituida por tallos erectos y hojas modificadas. Es aquí donde se desarrollan las flores y los frutos y cumple la función de convertir sustancias químicas en materia orgánica para poder elaborar las reservas necesarias que durante el año siguiente harán posible el desarrollo de los espárragos o “turiones” (Figura 1) (del Pozo-L, 1999).

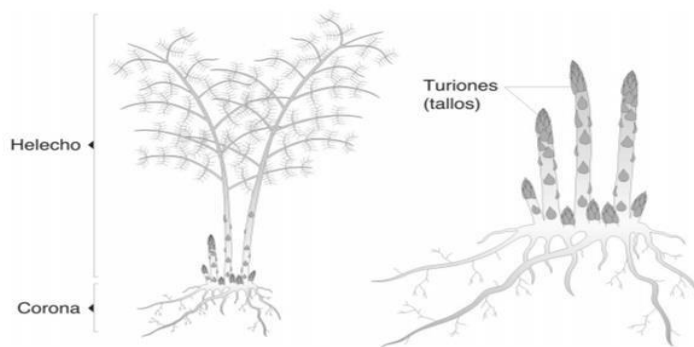


Figura 1. Anatomía de la planta de espárrago

Durante los últimos años, la producción de espárragos ha tenido un alza notable, debido a la preferencia del mercado internacional, lo que permite a los productores obtener elevados beneficios monetarios de este cultivo. A nivel mundial, una de cada cien toneladas cosechadas proviene del campo mexicano, China es el mayor productor con 7,984,812 t, lo cual representa el 88% del volumen total (SIAP, 2018).

México es el tercer productor mundial con 277,682 t, de las cuales Sonora aporta la mayoría con un volumen de 174,811 t, que significa 6,049,000 de pesos por su venta (Figura 2). Estados Unidos es el principal consumidor y al cual se le exporta el 90% de la producción nacional; además, se exporta a países como España, Chile, Japón, Belice, Nueva Zelanda, Panamá, China y Costa Rica (SIAP, 2018).

Rank	Entidad federativa	Región	Volumen (toneladas)	Variación (%) 2017-2018
	Total nacional		277,682	13.0
1	Sonora	Noroeste	174,811	19.1
2	Guanajuato	Centro-Occidente	36,847	10.9
3	Baja California	Noroeste	33,444	6.9
4	Baja California Sur	Noroeste	21,436	-11.2
5	Querétaro	Centro-Occidente	6,592	5.8
6	Michoacán	Centro-Occidente	1,899	8.3
7	Durango	Noreste	841	27.4
8	Sinaloa	Noroeste	581	58.9
9	San Luis Potosí	Centro-Occidente	336	42.4
10	Jalisco	Centro-Occidente	260	-0.7
	Resto		637	-18.7

Figura 2. Producción de espárrago en México

Nutrición y métodos de cultivo

La planta de espárrago tiene ciertas demandas de nutrimentos sin las cuales no se desarrolla de forma favorable; en el caso del nitrógeno, es absorbido en grandes cantidades, sobre todo en los primeros años de la planta, la falta de este nutrimento reduce el crecimiento y disminuye el contenido de clorofila; en el caso del fósforo, va a estimular el crecimiento radicular y a regular el vigor de la planta, por lo que es muy importante su presencia; el potasio es necesario para el proceso de absorción y translocación hacia las zonas de reserva, así como para el transporte de carbohidratos; así mismo, requiere micronutrimentos en pequeñas cantidades pero de suma importancia, tales como el calcio que ayuda al crecimiento del sistema radicular y el boro que es necesario para las paredes celulares (Ramírez, 2009).

Debido a la creciente demanda por regresar a una agricultura sostenible, en donde se dañe lo menos posible al ambiente, se han buscado alternativas de nutrición de una manera orgánica, tal es el caso de bocashi, el cual es un abono orgánico utilizado por los japoneses desde hace años, su composición varía según la materia disponible en la región, pero un ejemplo puede ser el que se compone de carbón vegetal, estiércol, paja, melaza, levadura, cal y agua; estos elementos se someten a un proceso aeróbico de descomposición y posteriormente son integrados al suelo para aumentar la cantidad de microorganismos en este, además de mejorar las características físicas y aportar nutrimentos a las plantas que se verán reflejados en su calidad nutricia y nutraceutica (Boudet et al, 2015).

Compuestos bioactivos con valor nutraceutico en el espárrago.

Los fitoquímicos son metabolitos de origen vegetal que tienen compuestos preventivos de las enfermedades, a pesar de que tienen baja potencia como compuestos bioactivos (comparado con los medicamentos farmacéuticos), pero si son ingeridos regularmente y en cantidades significativas como parte de la dieta, pueden tener un efecto fisiológico perceptible a largo plazo (Espín et al., 2007).

Los nutraceuticos se definen como sustancias químicas que se pueden encontrar en los componentes naturales de los alimentos, se ha determinado que benefician a la salud, ya que previenen alguna enfermedad o mejoran el estado fisiológico del individuo, es decir, que este tipo de sustancias proporcionan beneficios más allá de su papel esencial en el crecimiento normal o mantenimiento del cuerpo humano, por ejemplo, las propiedades antioxidantes de las vitaminas C y E (Wildman, 2001).

El espárrago verde proporciona un aporte calórico bajo, alrededor de 22-35 kcal/100 g, por lo que se le considera un alimento ideal para su inclusión en dietas de adelgazamiento, además tienen una importante presencia de minerales, vitaminas, ácido fólico y proteínas calidad. Respecto a los compuestos bioactivos, en la herbolaria tradicional china se han usado extractos de espárrago como tónico, laxante, diuréticos, etc. (Kamat *et al.* 2000). Esta hortaliza contiene fitoquímicos como fenoles, saponinas, esteroides, polisacáridos, oligosacáridos, flavonoides y fibra dietética; además de propiedades antioxidantes, antiepilépticas, antitumorales y ayuda a disminuir los niveles de colesterol en el organismo (Qingbig *et al.*, 2020).

Algunos de estos compuestos otorgan propiedades antioxidantes al espárrago, tal es el caso de la alta concentración de flavonoides, especialmente la rutina; así mismo algunas saponinas ayudan a este poder antioxidante. (Montaño-Leyva *et al.*, 2019)

La calidad de los productos es uno de los factores que permiten obtener un producto diferenciado y así competir con el resto en el mercado. En cuanto a espárragos se refiere, la FAO menciona en la norma para el espárrago (CODEX STAN 225-2001) que, dentro de las disposiciones relativas a la calidad, los requisitos mínimos implican: espárragos enteros, sanos y exentos de podredumbre o deterioro que hagan que no sean aptos para el consumo; libres de cualquier materia extraña visible, de plagas y de daños por los mismos, libres de humedad externa anormal y cualquier olor/sabores extraños; aspecto y olor frescos. Así mismo los turiones no deberán estar huecos, partidos, pelados ni quebrados. Dentro de la misma norma se establecen criterios para categorizar la calidad del espárrago. Según las disposiciones establecidas existen tres categorías; *extra*, *categoría I* y *II*. Aunque si bien es cierto que obtener una producción de categoría extra depende de un adecuado manejo integrado del cultivo, los nutrientes juegan un papel importante dentro de los factores que influyen en la producción final. Existen diferentes parámetros físicos y bioquímicos que pueden ser potencializados con los nutrientes adecuados. Se ha demostrado que la producción de turiones de primera calidad presenta una estrecha relación con el contenido de nutrientes que se almacenaron a lo largo del desarrollo de la esparraguera, por tal motivo la aplicación de fertilizantes es una herramienta que permite asegurar un adecuado crecimiento y por ende mayor almacenamiento de carbohidratos

Como ejemplo de la importancia de la disponibilidad de los nutrientes durante el desarrollo de la planta se pueden mencionar: niveles o dosis de nitrógeno y potasio elevados provocan el incremento en el contenido de nutrientes en la hoja y la producción de turiones son de primera calidad; la influencia de P, el cual permite reducir la fibrosidad de los turiones y al mismo tiempo tiene influencia favorable sobre el sabor de este (Moreau y Zuang, 1977). Morales (1990), observó que en suelos donde el contenido de K no era suficiente, los nutrientes en la primera hoja disminuyen y por ende la producción de turiones de primera se veía deteriorada.

Por lo anterior, es importante obtener turiones de la calidad demandada por el mercado, así como con el contenido de nutrientes y de compuestos bioactivos que los caracterizan, esto se puede lograr tomando en cuenta el método de cultivo bajo el que se desarrollen, por lo anterior el presente trabajo tiene como objetivo hacer una comparación de estos compuestos que otorgan una característica antioxidante a los espárragos, según el medio en el que fueron cultivados.

Materiales y métodos

Se obtuvo el material vegetal de dos sitios distintos: Huatusco, Veracruz y San Salvador Atenco, Estado de México; en el primer sitio se obtuvieron dos muestras, una bajo sombra u otra en asociación con frijol. En el segundo sitio también se obtuvieron dos muestras, una fertilizada de manera semi-orgánica y la otra con fertilizante química.

Las muestras fueron llevadas al laboratorio de Productos Naturales en el área de Química de Preparatoria Agrícola, en la Universidad Autónoma Chapingo, se pesaron 100 g, se picaron y se colocaron en tubos falcon, se ingresaron en nitrógeno líquido para posteriormente liofilizarlas (Liofilizador LABCONCO) durante cinco días.

Obtención de extracto

En un tubo falcon se mezcló un gramo de muestra liofilizada con 25 mL de metanol al 80 %, se agitó en vortex de la marca Symphony™ por un minuto, posteriormente se ajustó el pH a 3, se agitó en vortex nuevamente por 3 minutos, después se sonicó durante 15 minutos, y se agitó en incubadora durante 30 minutos, finalmente se centrifugó durante 15 minutos y el sobrenadante se aforó a 10 mL con metanol al 80%.

Fenoles totales

La determinación de fenoles se realizó por el método de Folin-Ciocalteu (Singleton & Rossi, 1965), las lecturas se realizaron en un lector de microplacas equipado con bombas de inyección automática y el software de análisis de datos Gen5™data®; en cada pozo de la microplaca se colocaron 25 µL de extracto, 125 µL de agua destilada, 20 µL de disolución de Folin-Ciocalteu (reactivo marca Sigma-Aldrich) y 30 µL de Na₂CO₃ al 20 %. Se dejó reposar 30 minutos en la oscuridad y se leyó a una absorbancia de 760 nm.

Flavonoides

Los flavonoides fueron determinados por el método de la quercetina descrito por Kubola & Siriamonrpun en el 2011, con modificaciones. Se realizó una curva patrón de quercetina con 10 mg de quercetina (marca Sigma-Aldrich), aforada a 10 mL de metanol al 80 %.

En tubos falcon, se colocaron 0.5 mL de la muestra o curva, 4.3 mL de agua destilada, 0.1 mL de una disolución de cloruro de aluminio hexahidratado al 10% y 0.1 mL de acetato de potasio 1M; estas diluciones se llevaron al vortex a 3000 rpm durante tres minutos. Se dejaron reposar durante

30 minutos para finalmente colocar 200 µL de la dilución en los pozos de la microplaca y leer a una absorbancia de 415 nm.

Ensayo ABTS

El ensayo ABTS se realizó con el método descrito por Re, Pellegrini, Proteggente, Pannala, Yang & Rice-Evans en 1999, se preparó una disolución de 40.6 mg de reactivo ABTS marca Sigma- Aldrich, aforado a 10 mL de agua destilada y otra de 17.57 mg de persulfato de potasio marca Baker, aforado a 25 mL de agua destilada. Se mezclaron 10 mL de cada una de estas disoluciones y esta mezcla se dejó reposar durante 16 horas para obtener la disolución del radical ABTS.

Se realizó una curva de Trolox, se pesaron 12.5 mg de Trolox marca Sigma-Aldrich y se aforó a 50 mL con metanol al 80 %. Para la medición de la absorbancia en la microplaca se colocaron 20 μ L del extracto y se completó con 180 μ L de la disolución radical ABTS, se dejó reposar durante 10 minutos y se realizaron las mediciones de la absorbancia a 734 nm.

Ensayo FRAP

Para este ensayo se utilizó la misma curva patrón de Trolox que en el ensayo ABTS. Se realizó con la técnica propuesta por Benzie & Strain en 1996, se preparó la disolución de FRAP con 10 mL de buffer de acetato (300 mM), 1 mL de solución TPTZ (10 mM) y 1 mL $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (20 mM). Se colocaron 20 μ L de extracto, 180 μ L de disolución de FRAP y 60 μ L de agua destilada en la microplaca, se dejó reposar 10 minutos y se midió la absorbancia a 595 nm.

Diseño experimental

Para el análisis de los datos se utilizó un diseño completamente al azar, la unidad experimental constó de 100 g de material fresco por tratamiento (método de cultivo), los ensayos se hicieron por triplicado. Los datos obtenidos se analizaron con el programa estadístico SAS 9.0.

Resultados y discusión

Fenoles totales y flavonoides

El contenido de fenoles totales en los turiones de espárrago analizados en este estudio está en el rango de los 3.6326 y 6.0748 mg EAG/g (Figura 3-A). Las diferencias mínimas significativas en fenoles totales se determinaron entre tratamientos, los tratamientos superiores estadísticamente fueron ASO y AQ y los tratamientos estadísticamente inferiores fueron HS y HF; similar reportado por Slatnar et al (2018), de 4.45 a 6.85 mg EAG/g y superior a lo reportado por Véliz (2018) de 2.38 mg EAG/g en espárrago blanco. Fan eta al (2014) reporta un total de 4.43 mg EAG/g; sin embargo, no hay información al respecto que compare distintos métodos de cultivo, pero dado a que el clima idóneo para producir espárragos es templado, se puede decir que este puede afectar en el caso de los espárragos colectados en Huatusco ya que es un clima tropical, además de la falta de nutrimentos en el suelo.

Al igual que los fenoles, los flavonoides se determinaron entre tratamientos, HF fue estadísticamente inferior a todos los demás con contenido de 1.0291 mgEC/g, ASO y AQ fueron estadísticamente iguales con 3.3457 y 2.9109 mgEC/g respectivamente (Figura 3-D). Alventosa (2009) reporta un contenido de 0.6 a 1.8 mg EC/g en harina de espárrago, es posible que el tratamiento térmico al que se sometió el espárrago para hacer la harina, mermara el contenido de flavonoides.

Actividad antioxidante por ABTS y FRAP

Al igual que las determinaciones anteriores, ASO y AQ son estadísticamente iguales en cuanto a ABTS y FRAP, En el caso de HS y HF son estadísticamente iguales en FRAP con u contenido de 16.546 y 12.823 $\mu\text{mol ET/g}$ respectivamente, no igual para el caso de ABTS, donde HF es estadísticamente inferior con 124.16 respecto a HS con 148.29 $\mu\text{mol Trolox/g}$. Veliz (2018) reporta en contenido de 34.49 $\mu\text{mol Trolox/g}$ para ABTS, un valor inferior a lo obtenido en este ensayo, sin embargo, se puede deber a que es espárrago blanco. Fan et al (2014) reportan un total de 105 $\mu\text{mol Trolox/g}$, inferior a lo obtenido en este ensayo

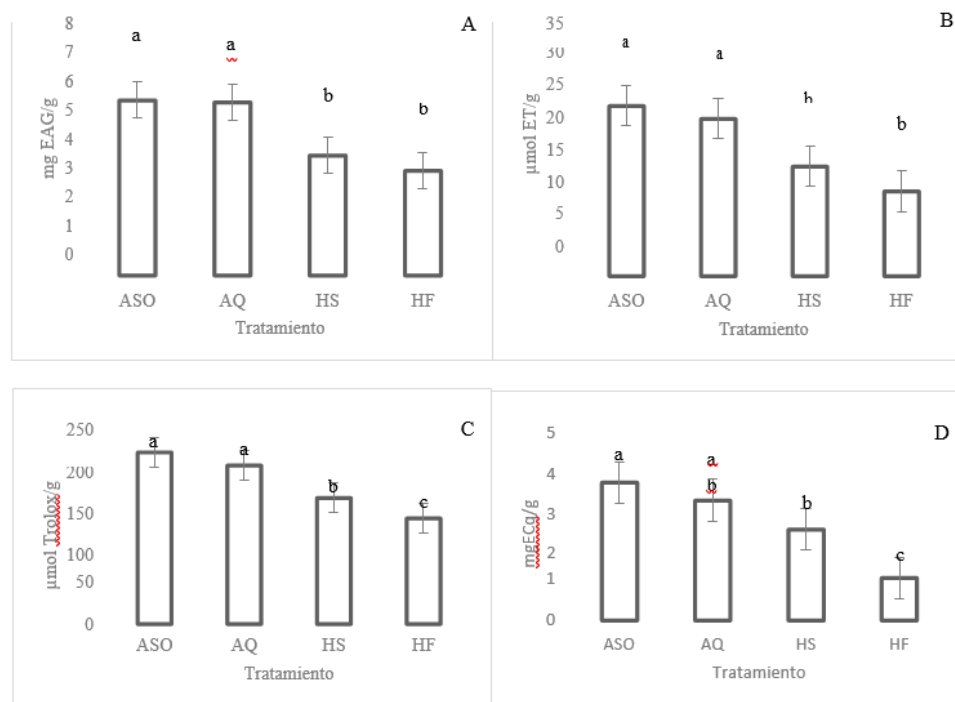


Figura 3. Fenoles totales (A), FRAP (B), ABTS (C) y Flavonoides(D), en espárrago bajo diferentes métodos de cultivo: Atenco Semi-orgánico (ASO), Atenco Químico (AQ), Huatusco bajo sombra (HS) y Huatusco en asociación con frijol (HF). Letras diferentes (a-c) significan una diferencia estadística significativa entre los espárragos de diferentes métodos de cultivo, por la prueba de la Diferencia Mínima Significativa con un $\alpha=0.005$.

Conclusiones

La actividad antioxidante y el contenido de fenoles totales, así como de flavonoides, son estadísticamente superiores en espárragos cultivados en San Salvador Atenco, ya sea química o semi-orgánicamente, en comparación con los cultivados en Huatusco, Veracruz. La asociación con frijol presenta los resultados menos favorables. La falta de un manejo integral en la producción de Huatusco se ve reflejada en la calidad de sus turiones, lo que representa un área de oportunidad para aumentar los rendimientos y la calidad del producto en esta zona.

Literatura Citada

- Benzie, I. & Strain, J.** (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1): 70-76.
- Boudet, A., Chinchilla, V., Boicet, T., González, G.** (2015). Efectos de diferentes dosis de abono orgánico tipo bocashi en indicadores morfológicos y productivos del cultivo de pimiento (*Capsicum annuum* L.) var. California Wonder. *Centro agrícola*, 42(4).
- Del Pozo-L., A.** (1999). Morfología y funcionamiento de la planta. En: *El cultivo del espárrago* (pp. 9-28). Boletín INIA N° 6. Chillán, Chile: Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA)- Ministerio de Agricultura.
- Espín J. C., García-Conesa M.T., Tomás-Barberán F.A.** (2007). Nutraceuticals: Facts and fiction. *Phytochem.* 68, 2986–3008.
- FAO.** (2001). NORMA PARA EL ESPÁRRAGO (CODEX STAN 225-2001). 6p. Disponible: https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/es/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCXS%2B225-2001%252FCXS_225s.pdf
- Kubola, J. & Siriamonrpnun, S.** (2011). Phytochemicals and antioxidant activity of different fruit fractions (peel, Pulp, aril and seed) of Thai gac (*Momordica cochinchinensis* Spreng). *Food Chemistry*, 121, 1138-1145.
- Montaño-Leyva, B., Quintero Vargas, J., Ortega-García, J., Lugo-Sepúlveda, R., González, R., & Valencia-Rivera, D.** (2019). Actividad antioxidante y antiproliferativa del extracto metanólico de *Asparagus officinalis*. *Biotecnia*. XXI (1):148-153.
- Moreau B. and Zuang H.** (1977). Paris, Institut National de Vulgarisation Pour les Fruits, Legumes et Champignons Inutilisables. p. 212.
- Moreira A. M. A., González M. W.,** (2002). Manejo y análisis económico del cultivo de espárrago para condiciones tropicales: una experiencia de diez años de investigación. Editorial de la universidad de Costa Rica. 1er ed. San José, Costa Rica. pp. 13-31
- Qingbin G., Nifei, W. Huanhuan L., Zhenjing, L., Laifeng, L. y Changlu, W.** (2020). The bioactive compounds and biological functions of *Asparagus officinalis* L. – A review. *Journal of Functional Foods*. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103727>.
- Ramírez J. A. M. & Sadeghian K. S.** (2009). Respuesta del espárrago a nitrógeno, fósforo y potasio en la zona cafetera central de Colombia. *Cenicafé*. 60(3):269-281
- Re, R., Pellegrini, A., Proteggente, A. Pannala, M., Yang, M. & Rice-Evans** (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 26(9/10): 1231-1237.
- Singleton, V. & Rossi, J.** (1965). Colorimetry of Total phenolics with phosmolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16:144-158.
- Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP)**, 2020. Disponible: <https://www.gob.mx/siap/documentos/panorama-agroalimentario-2020>
- Véliz, E. Universidad Nacional Agraria La Molina** (2018). Capacidad antioxidante y compuestos fenólicos durante el procesamiento de espárrago blanco (*Asparagus officinalis*) encurtido por método directo. Tesis de posgrado. Disponible: <https://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12996/3402/veliz-berneo-elmer-obed.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Wildman R. E. C.** (2001). En: *Handbook of nutraceuticals and functional foods*. CRC Series In Modern Nutrition, Chapter 1, 1-12.

Propuesta de material didáctico audiovisual para promover el aprendizaje
significativo de rapidez de reacción

Nadia Alejandra Romero-Huerta¹ y Graciela Huerta Miranda²

Resumen

El aprendizaje de la química es difícil, pues requiere que el estudiante sea capaz de relacionar el mundo macroscópico que percibe con un mundo nanoscópico basado en átomos y moléculas que no puede percibir, y debe, además, poder aprender un sistema de símbolos necesarios para su representación. Nakamutsu (2012). El presente trabajo aborda la creación de un material didáctico de carácter constructivista cognitivo, en formato de página web y recursos audiovisuales que concilia los tres niveles de pensamiento químico propuestos por Johnstone (1991), con el objetivo de promover el aprendizaje significativo de rapidez de reacción en los estudiantes de nivel medio superior (NMS). Los objetivos incluyen a) describir y evaluar cómo los alumnos modelan y atribuyen significado sobre el tema b) describir las características del material didáctico que promueven el aprendizaje significativo y c) comparar los resultados obtenidos al utilizar el material con dos poblaciones distintas de NMS. Se trabajó con un total de 53 alumnos: 18 pertenecen al Colegio de Ciencias y Humanidades, y 35 alumnos de la Escuela Nacional Preparatoria 5 "José Vasconcelos", quienes presentaron instrumentos de evaluación pre y post test en torno a 2 tipos de investigación: Semi experimental: Se compararon conocimientos sobre rapidez de reacción y factores que la modifican. No experimental: Se comparó la autopercepción del conocimiento, su aplicación, argumentación y modelos realizados por los alumnos. El uso de este material didáctico redujo la presencia de concepciones alternativas, estimuló la motivación y participación estudiantil, mejoró la autopercepción y conocimiento en ambas poblaciones.

Palabras clave: Aprendizaje significativo, rapidez de reacción, niveles de pensamiento químico.

Abstract

Learning chemistry is difficult because it requires the students to be able to relate the macroscopic world they perceive to a nanoscopic world based on atoms and molecules that they cannot perceive, and must also be able to learn a system of symbols necessary for its representation. Nakamutsu (2012). The present work deals with the creation of a didactic material of a cognitive constructivist nature, in the format of a web page and audiovisual resources that reconciles the three levels of chemical thinking proposed by Johnstone (1991),

¹ Maestría en Docencia para la Educación Media Superior, MADEMS. Especialidad en química. Universidad Nacional Autónoma de México UNAM. Av. Universidad 3000, Universidad Nacional Autónoma de México, C.U., Delegación Coyoacán, C.P. 04510, Ciudad de México. Correo: nadiaromero@gmail.com

² Universidad Autónoma Chapingo. Preparatoria Agrícola. Carretera México-Texcoco km 38.5, Chapingo, Estado de México, C. P. 56230, MÉXICO. Correo: alexgraciela@gmail.com

with the objective of promoting the significant learning of reaction speed in high school students (HSS). The objectives include a) to describe how students model and attribute meaning on the

topic b) to describe the characteristics of the didactic material that promote meaningful learning and c) to compare the results obtained when using the material with two different populations of HSS. We worked with a total of 53 students: 18 belong to the Colegio de Ciencias y Humanidades, and 35 students from the Escuela Nacional Preparatoria 5 "José Vasconcelos", who presented pre and post test evaluation instruments around 2 types of research: (a) Semi-experimental: Knowledge of reaction speed and factors that modify it were compared. b) Non-experimental: The self-perception of knowledge, its application, argumentation and models made by the students were compared. The use of this didactic material reduced the presence of alternative conceptions, stimulated student motivation and participation, improved self-perception and knowledge in both populations.

Keywords: Meaningful learning, reaction speed, Johnstone's triangle

Introducción

La química es una rama de la ciencia de vital importancia. En su enseñanza, se incorporan conceptos abstractos que, de acuerdo con Taber (2002), son centrales para el aprendizaje posterior tanto de química como de otras ciencias. Los principios de la química se encuentran en la biología, física, geología, astronomía, medicina, ingeniería y otras. Incluso si los alumnos no pretenden estudiar alguna carrera del área científica, tener un entendimiento básico de la química les permite comprender el mundo y los fenómenos que experimentan en su vida diaria; además, como resalta Nakamatsu (2012), les permite enterarse del desarrollo tecnológico y científico que afecta diariamente nuestras vidas.

A pesar de su importancia, diversos autores (Anders y Berg 2005, Jegede 2007, Salta y Kouloughliotis 2012, Galaj 2014) indican bajos niveles de motivación en los alumnos en el aprendizaje de la química, fenómeno que traspasa fronteras.

Un factor que se repite como causal es la dificultad inherente a su aprendizaje. Nakamatsu (2012), con base en la propuesta del triángulo de Johnstone (1991), refiere que el aprendizaje de la química es difícil, pues requiere que el estudiante sea capaz de relacionar el mundo macroscópico que percibe con un mundo nanoscópico basado en átomos y moléculas que no puede percibir, y debe, además, poder aprender un sistema de símbolos necesarios para su representación. Son numerosas las investigaciones que reportan dificultades en los aprendizajes debido a las exigencias del manejo simultáneo de estos niveles (Treagust y Chandrasegaran, 2009 Van Berkel, Pilot y Bulte, 2009), además, los estudiantes tienen una comprensión limitada de la triple relación entre las representaciones macroscópicas, nanoscópicas y simbólicas en química (Andersson, 1986; Ben-Zvi, Eylon y Silberstein, 1986, 1987; Gabel, 1998, 1999; Gabel, Samuel y Hunn, 1987; Johnstone, 1993; Nakhleh y Krajcik, 1994).

El tema por desarrollar aborda la creación de un material didáctico en formato de página web y recursos audiovisuales que concilia los tres niveles de pensamiento químico propuestos por Johnstone en 1991, con el objetivo de promover el aprendizaje significativo de rapidez de reacción en los estudiantes de nivel medio superior.

Se describe y evalúa el material didáctico audiovisual y los aprendizajes logrados sobre rapidez de reacción por alumnos de dos poblaciones con características muy distintas entre sí; una cuyos alumnos han seleccionado la materia de Química IV como optativa de estudio del Área 2 (Ciencias biológicas y de la salud) Grupo A, y otra cuyos alumnos pertenecen a un grupo de Programa de Apoyo al Egreso, en el que se encuentran cursando Química III pues han reprobado la materia con anterioridad, Grupo B. Los grupos pertenecen a la Escuela Nacional Preparatoria (ENP) y al Colegio de Ciencias y Humanidades (CCH) y respectivamente.

Planteamiento del Problema

El triángulo de Johnstone es una representación de los tres niveles en los que la química puede enseñarse: sensorial (nivel macroscópico), átomos y moléculas (nanoscópico) y combinaciones de símbolos y signos (simbólico). Este carácter multi representacional de la naturaleza de la química es una poderosa herramienta para interpretar los fenómenos naturales (Tsaparlis, Kolioulis, y Pappa, 2010) como también una potencial barrera para los aprendizajes.

Gabel (1999) sugirió que el principal obstáculo para la comprensión de la química no es sólo la existencia de las tres formas de representación, sino también que la enseñanza de la química se basa predominantemente en el tipo más abstracto: el simbólico.

En la educación media superior ya se requiere que los alumnos transiten entre los tres niveles por lo que es necesario facilitar su comprensión y traducción; una forma de hacerlo es mediante la incorporación de materiales didácticos específicos para este fin.

Justificación

Sobre la Enseñanza de Cinética Química a Nivel Medio Superior

La cinética química es el área de la química que tiene relación con la rapidez con la que ocurre una reacción química, que es el cambio en la concentración de un reactivo o de un producto con respecto al tiempo (Chang, 2003). La cinética química es un concepto introductorio importante en los cursos de química, abarca muchos conceptos químicos fundamentales; rapidez de reacción, energía de activación, factores que afectan a la rapidez de reacción, teoría de las colisiones, catalizadores y, en niveles más avanzados, entalpía y mecanismo de reacción.

Sobre la Conciliación del Triángulo de Johnstone

Johnstone en su artículo “La enseñanza de la química, ¿lógica o psicológica?” indica lo siguiente: “Es una locura psicológica presentar a los alumnos ideas en los tres niveles simultáneamente. Aquí está el origen de muchos conceptos erróneos. “El químico entrenado puede mantener estos tres niveles en equilibrio, pero no el alumno” (Johnstone, 2000, p.9). Al-Balushi (2013) afirma que la principal dificultad de la enseñanza de la química es que los estudiantes deben realizar traducciones entre los niveles nanoscópico y macroscópico y ser capaces de construir una representación para un determinado fenómeno utilizando el nivel simbólico.

Contrario a esta declaración de Johnstone, y tomando en consideración la afirmación de Al-Balushi, me permito plantear la hipótesis de que el problema radica precisamente en la enseñanza segmentada de la química, que se concentra en uno o dos niveles de pensamiento simultáneamente, dejando al alumno la responsabilidad de realizar las traducciones entre ellos.

Desde mi punto de vista, las dificultades de aprendizaje y el surgimiento de concepciones alternativas se encuentran en la inadecuada traducción entre niveles y los intentos en solitario de los alumnos para unir estas piezas que le han sido concedidas por separado.

La dificultad asociada a la traducción de esta experiencia sensorial al nivel simbólico y nanoscópico es evidente al pedirle al alumno que reconozca o escriba la ecuación química que corresponda, utilice signos o haga modelos para explicar el fenómeno presenciado, o que justifique lo sucedido utilizando términos como “átomos”, “moléculas”, “iones”, etcétera. Me parece insensato esperar que los alumnos puedan realizarlo con éxito si únicamente han enfrentado cada una de estas pruebas por separado o en distintos momentos del curso.

El objetivo de este material didáctico es facilitar dichas asociaciones en alumnos de nivel medio superior al utilizar las múltiples representaciones simultáneamente.

Para el cumplimiento de los objetivos del presente trabajo, se decidió que el material didáctico fuera de tipo audiovisual dado que la experimentación, por sí sola, no permite al alumno acceder al papel que tienen las colisiones entre entidades nanoscópicas y abstractas en la explicación de los cambios reales y visibles de la rapidez de reacción.

Es a través de las simulaciones que se presenta un modelo teórico más alejado de la realidad perceptiva, necesario para comprender que los cambios en la rapidez de reacción no se producen simplemente por las diferentes dimensiones físicas de, por ejemplo, los trozos de zinc utilizados, los cambios de temperatura o los cambios en la concentración de los reactivos. Como refieren Cachapuz y Maskill (1987), los cambios producidos en la frecuencia de colisión son la idea fundamental que hay que comprender. Esta superposición de niveles de representación únicamente se podría lograr mediante videos por tratarse de un material accesible para la mayoría de la población estudiantil.

Sobre la Elección de Material Didáctico Audiovisual

El video didáctico tiene una intención motivadora ya que más que transmitir información exhaustiva y sistematizada sobre el tema, pretende abrir interrogantes, suscitar problemas, despertar el interés de los alumnos, inquietar y generar una dinámica participativa.

Jacobs (2012) demostró que el uso de videos podía conducir a la participación en el aula en un contexto de educación superior. Además, varios estudios han revelado que el uso de videos educativos en el aula como enfoque clave puede mejorar la participación de los estudiantes. Este enfoque se recomienda en todas las disciplinas de educación superior (Sherin, M. y Elizabeth V., 2009; Sherin, M. y Han, 2004; Zhang, Zhou, Briggs, y Nunamaker, 2006).

Otras experiencias exitosas en el uso de los videos con fines educativos son los trabajos realizados por (De la Fuente, Hernandez, y Pra, 2018), (Rodríguez y Fernández, 2017) y (Ramírez, 2010), quienes los utilizaron para desarrollar procesos de enseñanza aprendizaje de asignaturas con componentes cuantitativos como las finanzas, la matemática y la estadística.

El material audiovisual reúne experimentos y simulaciones, involucra la formulación de predicciones, la observación directa, la síntesis de las ideas o conceptos comprendidos de los fenómenos naturales, en este caso, relacionados con la cinética química. En suma, el material didáctico generado no se limita a ser un video, o una colección de estos. Es una página web que permite al docente y al alumno acceder a una diversidad de experiencias, a una hoja de trabajo que hace de guía, a evaluaciones, a materiales extra como ejercicios y a una presentación para

la socialización de los aprendizajes. El material se encuentra enriquecido por dos personajes que guían a los alumnos en su exploración sobre la rapidez de reacción y facilitan la contextualización de sus aprendizajes.

Conceptualización Psicopedagógica

Ausubel acuña el concepto de “aprendizaje significativo” para distinguirlo del repetitivo o memorístico (Ausubel, 1963) a partir de la idea de Piaget sobre el papel que desempeñan los conocimientos previos en la adquisición de nueva información y conocimientos.

Novak (1982), a partir de los trabajos de Ausubel sobre la asimilación de los conocimientos, nos dice que “el nuevo aprendizaje depende de la cantidad y de la calidad de las estructuras de organización cognoscitivas existentes en la persona”. Así, para Ausubel y Novak, lo fundamental, por lo tanto, es conocer las ideas previas de los alumnos. En consecuencia, según la posición constructivista, el conocimiento no es una copia fiel de la realidad, sino una construcción del ser humano.

Dicho proceso de construcción, de acuerdo con lo recuperado con Tünnermann (2011), depende de dos aspectos fundamentales: a). De los conocimientos previos o representación que se tenga de la nueva información, o de la actividad o tarea a resolver. b). De la actividad externa o interna que el aprendiz realice al respecto.

De acuerdo con la doctora Frida Díaz-Barriga y el maestro Gerardo Hernández Rojas (2002), dos de los principios educativos asociados con una concepción constructivista del aprendizaje y la enseñanza que tienen relevancia para este trabajo son los siguientes: a). El aprendizaje requiere contextualización: los aprendices deben trabajar con tareas auténticas y significativas culturalmente, y necesitan aprender a resolver problemas con sentido. b). El aprendizaje se facilita con apoyos que conduzcan a la construcción de puentes cognitivos entre lo nuevo y lo familiar, y con materiales de aprendizaje potencialmente significativos.

En las estrategias de enseñanza y en materiales didácticos pueden convivir elementos de las distintas vertientes constructivistas. El constructivismo cognitivo parte esencialmente de la teoría piagetiana. Para Piaget, efectivamente, el proceso de construcción de los conocimientos es un proceso individual que tiene lugar en la mente de las personas, que es donde se encuentran almacenadas sus representaciones del mundo. El aprendizaje es, por tanto, un proceso interno que consiste en relacionar la nueva información con las representaciones preexistentes, lo que da lugar a la revisión, modificación, reorganización y diferenciación de esas representaciones. Ahora bien, como sostienen Serrano y Pons (2011), aunque el aprendizaje es un proceso intramental, puede ser guiado mediante la interacción con otras personas, en el sentido de que “los otros” son potenciales generadores de contradicciones que el sujeto se verá obligado a superar.

Instrumentos de Evaluación

El KPSI (Knowledge and Prior Study Inventory) es un instrumento para la regulación del proceso de aprendizaje y representa un cuestionario de autoevaluación del alumnado (Arellano et al. 2008). El objetivo de este instrumento es obtener información sobre la percepción que el

sujeto tiene de su grado de conocimiento en relación con los contenidos que estudiará; tomando en cuenta a Ausubel, dichas estructuras preexistentes son esenciales en el aprendizaje significativo.

El KPSI diseñado por Tamir y Lunetta (1978) solicita al estudiante que seleccione su respuesta en función de 5 niveles o categorías: No lo sé/ no lo comprendo, lo conozco un poco, lo comprendo parcialmente, lo comprendo bien o lo puedo explicar a un compañero.

Por otro lado, con el fin de evaluar el material didáctico y su potencial para promover el aprendizaje significativo se retoman en el Cuadro 1. Las cinco dimensiones definidas por Jonassen (1995) y Grabe (2007), en este caso, describiendo las características del material didáctico audiovisual que competen en cada dimensión.

Cuadro 1. Características del material didáctico audiovisual en congruencia con las dimensiones del aprendizaje significativo según Jonassen (1995) y Grabe (2007).

Dimensiones	Elementos del material didáctico
Activo	Los alumnos interactúan con el entorno virtual en la página web en la que controlan el proceso de aprendizaje, mediante la selección del material de su interés y la posibilidad de evaluarse y determinar si es necesario trabajar con más material para lograr los objetivos de aprendizaje o si consideran que han comprendido lo suficiente, es decir son capaces de autorregular su aprendizaje. Los alumnos tienen roles dinámicos en las actividades de aprendizaje.
Auténtico	El aprendizaje se contextualiza con elementos del entorno cotidiano de los alumnos y con aplicaciones relacionadas con la salud. Se motiva a los alumnos a identificar aplicaciones de la rapidez de reacción en su vida cotidiana.
Constructivo	Es responsabilidad de los alumnos generar predicciones, responderse preguntas y argumentar los fenómenos observados en los experimentos, además de modelar tanto en la hoja de trabajo como en la sesión de socialización.
Cooperativo	Se realiza una sesión de socialización de los aprendizajes. El trabajo de construcción de conocimientos en comunidad hace que los alumnos aprovechen las habilidades de los demás y proporcionan apoyo social y mejoran los modelos de los otros estudiantes.
Integrado	Una parte significativa de lo que los estudiantes aprenden es resultado de la interacción con otros en el contexto del aprendizaje activo. Se utiliza tecnología para dotar al proceso de enseñanza/aprendizaje de aplicaciones fluidas y vivas a través de la página web, los videos y las simulaciones de las moléculas.

Fuente: elaboración propia.

Por lo que el objetivo de la presente investigación fue diseñar un material didáctico audiovisual que promueva el aprendizaje significativo de rapidez de reacción en los estudiantes de nivel medio superior mediante la conciliación de los tres niveles de pensamiento químico propuestos por Johnstone.

Metodología

Diseño de la Investigación

Para cumplir con los objetivos específicos del presente trabajo se realizaron las siguientes actividades.

- a). Se diseñó el material didáctico audiovisual que se describe en extenso en el Apartado 2.2.
- b). Se diseñaron los instrumentos de evaluación diagnóstica (pre-test), formativa (Hoja de trabajo) y sumativa (post-test) en torno a 2 tipos de investigación:
 - 1. Semi experimental: Donde se compararon conocimientos de química, específicamente sobre rapidez de reacción y factores que la modifican. Se presenta información que compara los resultados obtenidos por la muestra perteneciente ENP (Grupo A) y CCH (Grupo B).
 - 2. No experimental: Donde se comparó la autopercepción del conocimiento mediante un instrumento (KPSI), y se analiza la aplicación del contenido en ejercicios relacionados con el contexto cotidiano, la argumentación y los modelos realizados por los alumnos durante la intervención didáctica.
- c). La intervención didáctica. En donde se pudo aplicar el material didáctico propuesto y comparar los resultados entre los estudiantes de las dos instituciones.

Desarrollo del Material Didáctico

La primera etapa en el desarrollo del material didáctico consistió en revisar diversos manuales y recursos de divulgación con prácticas de laboratorio o propuestas experimentales disponibles para nivel medio superior y superior para identificar aquellas cuyo eje central fuese la cinética química y, específicamente, el análisis de los factores que pueden modificar la rapidez de reacción.

A partir de esta revisión bibliográfica se plantean 11 actividades experimentales que se presentan en la Figura 1.

11° Congreso Internacional de Investigación en Ciencias Básicas y Agronómicas
Universidad Autónoma Chapingo, 22 y 23 de septiembre de 2022
Chapingo, México

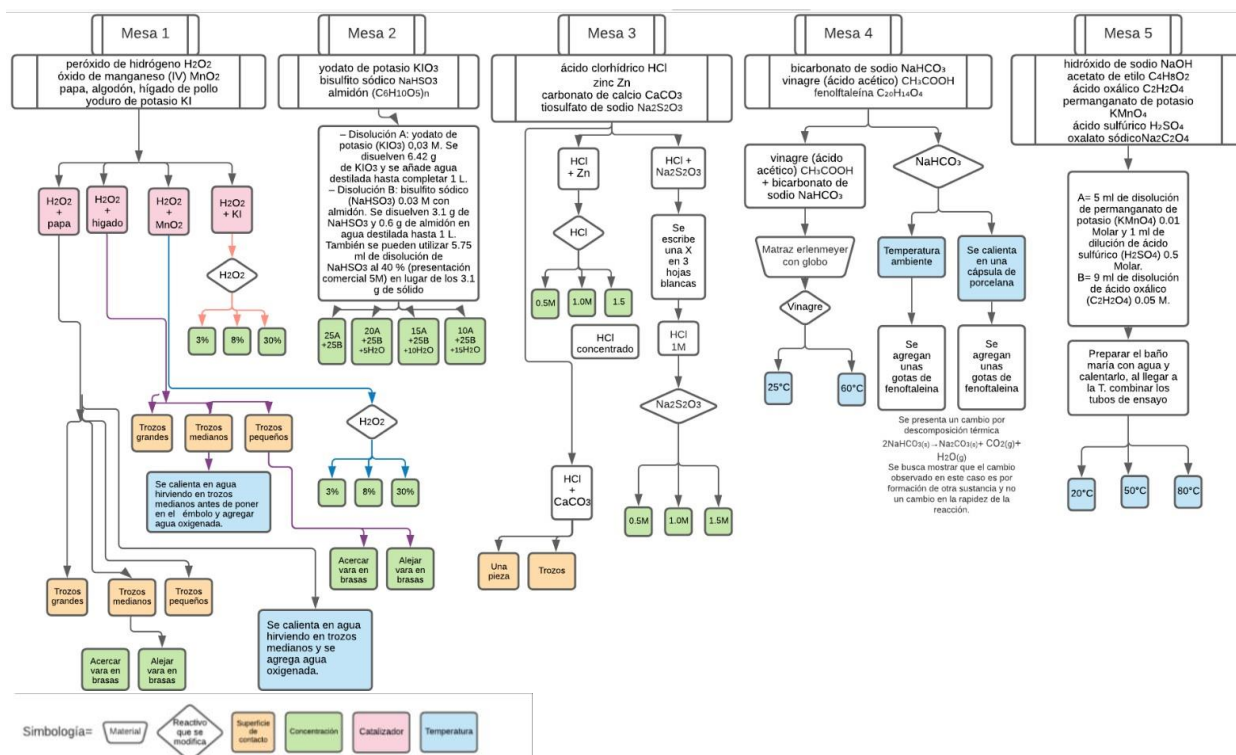


Figura 1. Diagrama de actividades experimentales del recurso didáctico.

Posteriormente se realizaron los experimentos en el laboratorio 204, a cargo del Doctor Carlos Antonio Rius Alonso, en el departamento de Química Orgánica, posgrado del edificio B, en la Facultad de Química de la UNAM los días 19, 20, 26 y 27 de agosto 2021.

Se grabaron los experimentos en dos tomas, una superior y otra lateral, con iluminación LED y utilizando las cámaras de dos equipos celulares.

A continuación, se realizó la edición básica de los 176 archivos de video obtenidos, lo que consistió en eliminar cortes, eliminar el audio, colocar las secuencias de forma cronológica y combinar las dos tomas disponibles. Posteriormente se realizó una edición intermedia; se agregaron letreros, cortinillas de entrada y de salida, ecuaciones químicas de las reacciones y efectos de sonido para los experimentos.

Todo proceso de edición de video se realizó en el editor de video Filmora X, desarrollado por Wondershare Technology Co.

Para las simulaciones que atienden el nivel nanoscópico se consideraron inicialmente dos programas de modelado molecular. En primer lugar, HyperChem, un software de modelado molecular químico desarrollado por Hypercube Inc. En segundo lugar, Spartan una aplicación de modelado molecular y química computacional desarrollado por Wavefunction Inc. Después de aprender lo básico de los dos programas se eligió Spartan en su octava edición, para continuar el trabajo, debido a que su kit de modelado de moléculas orgánicas, inorgánicas, péptidos,

nucleótidos y sustituyentes resultó suficiente para las reacciones que se llevaron a cabo en los experimentos, además de tener distintas opciones de visualización de las moléculas y de presentar una interfaz agradable al usuario, la cual se puede observar en la Figura 2.

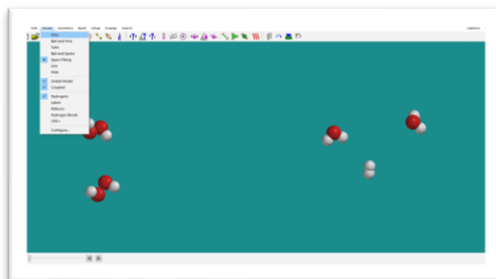


Figura 2. Interfaz del programa de modelado molecular "Spartan"

Nota. Captura de pantalla del programa Spartan de modelado molecular. Se observa el tipo de representación molecular y el menú de los modelos, además de 2 moléculas de peróxido de hidrógeno del lado izquierdo y dos de agua y una molécula de oxígeno diatómico de lado derecho.

Las simulaciones de las reacciones químicas se realizaron utilizando las moléculas generadas con el programa *Spartan* en combinación con la técnica *stopmotion* una técnica de animación que Luengo (2012) señala, consiste en aparentar el movimiento de objetos estáticos por medio de una serie de imágenes fijas sucesivas. Esta técnica se realizó utilizando capturas de pantalla de las moléculas cuadro por cuadro, como se puede observar en la Figura 3, para representar su acercamiento, colisión y posteriormente la formación de los productos. La animación final se realizó con la aplicación para Windows 10 *Zoetrope* desarrollada por Michael S. Scherotter.

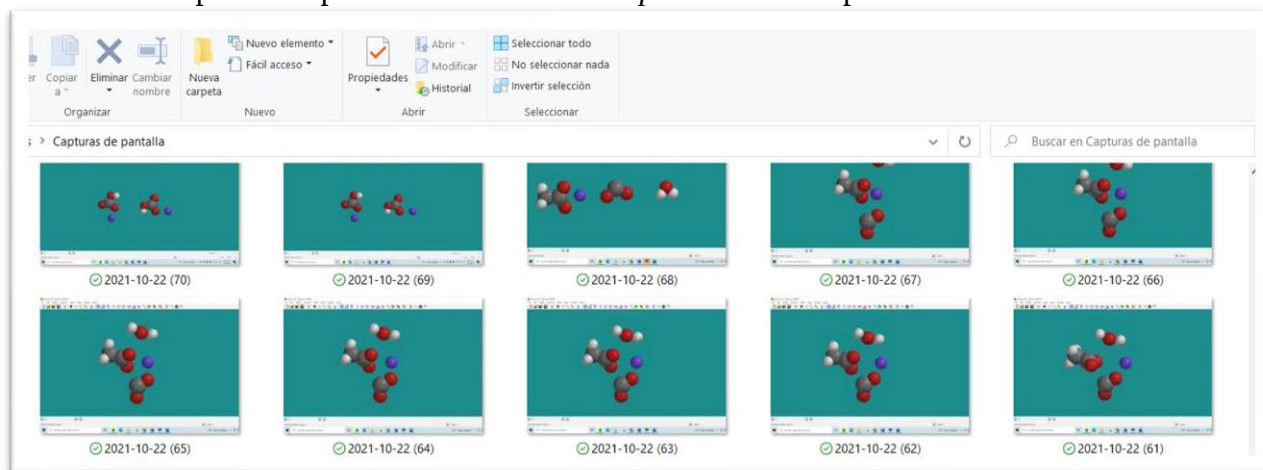


Figura 3. Moléculas cuadro por cuadro para la técnica stopmotion.

Nota. Captura de pantalla de las moléculas siendo movidas ligeramente cuadro por cuadro para simular el movimiento con la técnica de Stopmotion.

La etapa final de edición consistió en agregar las simulaciones, el acompañamiento de voz en cada uno de los videos, la música de fondo e instrucciones para los alumnos en relación con la hoja de trabajo.

De forma paralela, se trabajó en el desarrollo de la página web la cual se creó utilizando la plataforma de creación de páginas web y tiendas en línea de nombre Jimdo la cual cuenta con un propio sistema de gestión de contenido que funciona como un editor. Esta plataforma permite crear y personalizar en línea páginas web utilizando la tecnología WYSIWYG (*What you see is what you get* en español “lo que ves es lo que obtienes”), la cual permite al desarrollador ver el resultado final mientras se crea la interfaz o el propio documento.

La interfaz de Jimdo está basada en un sistema de módulos que se pueden añadir, desplazar y eliminar de forma flexible. De esta manera se pueden insertar textos, imágenes propias o de plataformas externas como *Flickr*, videos de *YouTube*, widgets y otros elementos. Esta característica permitió agregar los videos desde una carpeta de drive en la que están almacenados, personalizar los textos disponibles y agregar ventanas para descargar hojas de trabajo, documentos para docentes, enlaces a las evaluaciones, y sección de dudas y comentarios que se reciben por correo electrónico.

Se diseñaron imágenes con los reactivos disponibles para cada mesa y se realizó la redacción de un texto de presentación que invite a los alumnos a acceder a los experimentos de esa mesa o sección. Por último, se añadieron dos personajes que representan a alumnos del nivel medio superior: “Gaby” y “Mateo”. Su función es invitar a los estudiantes a cada video disponible dentro de la mesa, realizar una pregunta clave o contextualizar la información del video. El diseño e ilustración de los personajes fue realizado por la licenciada en diseño industrial Daniela Fernández Martínez.

Se puede acceder al recurso en el siguiente enlace:
<https://experienciainteractiva.jimdofree.com/>

Es importante recalcar que, retomando su carácter constructivista, el material didáctico tiene como objetivo que el alumno realice su propia construcción de los conceptos con base en: a) la información que se presenta, b) lo que puede observar en los experimentos, c) la organización de sus observaciones en la hoja de trabajo y d) la posterior socialización de la información con sus pares y el docente. Estos conceptos no se definen textualmente, solamente se mencionan en el contexto del video. La información de cada video es complementaria y con distintos niveles de profundidad.

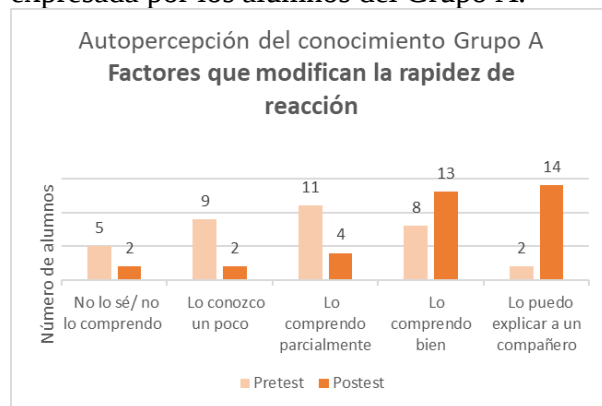
Descripción de la Población

Se trabajó con una muestra total de 53 alumnos: 18 pertenecen al Colegio de Ciencias y Humanidades, plantel Naucalpan; 12 mujeres y 6 hombres que pertenecen al grupo 13 del Programa de Apoyo al Egreso (PAE) y cursan la materia de química III, y 35 alumnos pertenecen a la Escuela Nacional Preparatoria 5 “José Vasconcelos”, 24 mujeres y 11 hombres quienes la materia de química IV que pertenece al Área 2.

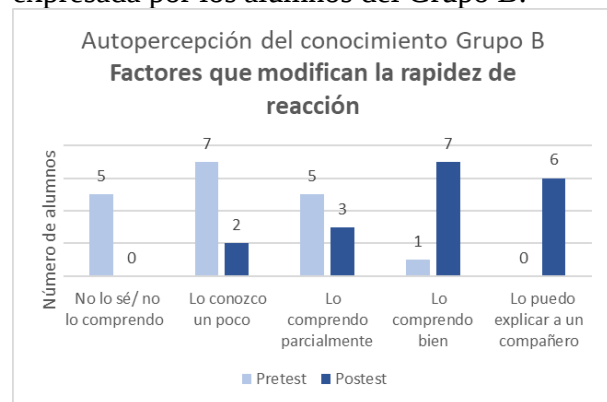
En el caso de la ENP, todos los alumnos están en entre 17 y 18 años, pero en el caso de CCH, hay, además, alumnos de 19, 20, 21, 22 y una alumna de 53 años, esto por pertenecer al Programa de Apoyo al Egreso que permite a alumnos de generaciones anteriores concluir su educación media superior.

En las gráficas 1 a 4 se presentan las gráficas con los resultados de la autoevaluación del conocimiento percibido que reportan los alumnos de forma previa y posterior al uso del material didáctico con respecto a dos temas en específico. Si bien esta autopercepción es subjetiva, es relevante para la regulación del proceso de aprendizaje. Además, considera las estructuras preexistentes percibidas, esenciales en el aprendizaje significativo.

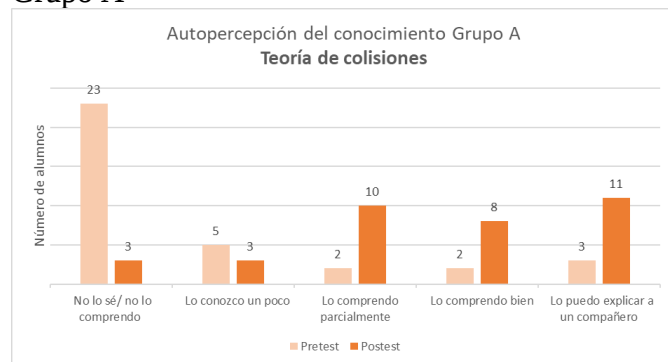
Gráfica 1. Autopercepción del conocimiento de factores que modifican la rapidez de reacción expresada por los alumnos del Grupo A.



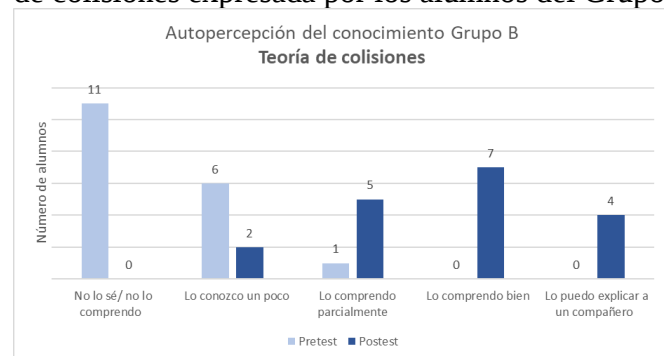
Gráfica 2. Autopercepción del conocimiento de factores que modifican la rapidez de reacción expresada por los alumnos del Grupo B.



Gráfica 3. Autopercepción del conocimiento de teoría de colisiones expresada por los alumnos del Grupo A



Gráfica 4. Autopercepción del conocimiento de teoría de colisiones expresada por los alumnos del Grupo B



Sobre el Contenido

El conocimiento individual no es un objeto concreto y directamente observable, sino un conjunto de representaciones mentales construidas a partir de la dinámica interpretativa que el sujeto del conocimiento establece con los objetos del mundo que percibe mundo (Moreira, 2012a; Lemos, 2011).

En suma, desde una posición constructivista, el sujeto posee una organización interna propia. En función de ella, el sujeto crea e internaliza la realidad, proyectando sobre esta los significados

que va construyendo (Leiva, 2005). Por lo anterior, todo el análisis de los aprendizajes de los alumnos se hace categorizando sus respuestas y no mediante una calificación que refiera respuestas correctas o incorrectas.

Se presentan 5 categorías: respuestas esperadas, respuestas en construcción, desconoce la respuesta, concepciones alternativas o bien respuestas inválidas, en las que se contabilizan respuestas que el alumno consultó alguna de fuente externa al momento de la evaluación ya que el lenguaje no corresponde con lo mostrado anteriormente por el sujeto, además de encontrarse la respuesta textual en buscadores.

Sobre el entendimiento de lo que implica una reacción química se realizaron dos preguntas: la primera que se encuentra se enfoca en las sustancias (nivel macroscópico), mientras que la segunda se enfoca en los átomos (nivel nanoscópico).

Pregunta 1. ¿Qué ocurre con las sustancias cuando sucede una reacción química?

Respuesta esperada: Se considera como respuesta esperada que los alumnos refieran a) que las sustancias se transforman en otras, b) se convierten en productos, c) ocurre una ruptura y formación de nuevos enlaces d) sus moléculas se reacomodan para formar sustancias nuevas.

Respuesta en construcción: los alumnos refieran a) que ocurre un cambio, b) se unen, c) cambia su composición, d) cambian sus propiedades, e) alude a la ley de la conservación de la masa.

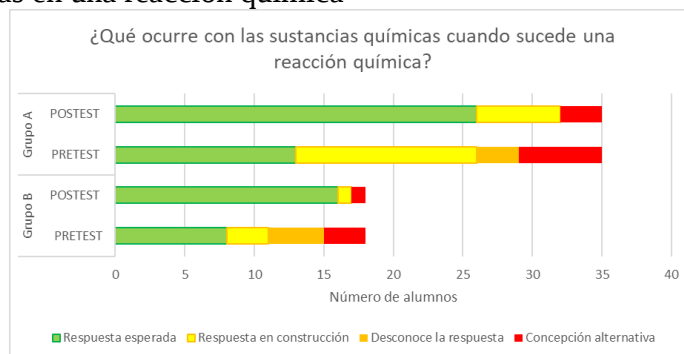
El alumno refiere a) no recordar, b) no saber, c) contesta con un guion, puntos suspensivos o una x. Concepción alternativa. Se considera una concepción alternativa cuando los estudiantes responden que a) ocurre una mezcla, b) desaparecen y aparecen otras, c) cambian de color, d) los átomos se rompen.

Pregunta 2. ¿Qué ocurre con los átomos de los reactivos durante una reacción? Se considera como respuesta esperada que los alumnos refieran que los átomos a) colisionan y b) se reacomodan, c) se reorganizan, d) forman una nueva estructura, e) comparten electrones, f) forman nuevos enlaces.

Se considera como respuesta en construcción que los alumnos refieran que los átomos a) chocan o colisionan entre sí, b) se conservan (o hace referencia a la ley de la conservación de la masa), c) interactúan, d) se unen, e) forman nuevas sustancias.

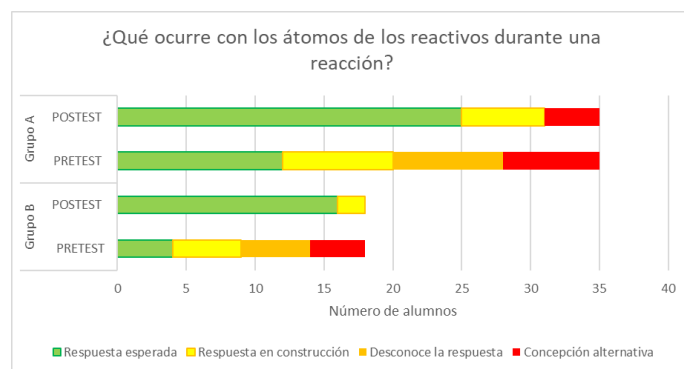
Desconoce la respuesta. Se considera una concepción alternativa cuando los estudiantes refieren que los átomos a) aumentan, b) disminuyen, c) se rompen, d) se descomponen, f) se transforman, g) se modifican. Para facilitar el análisis de las respuestas se presenta de forma gráfica gráficas 5 y 6.

Gráfica 5. Sustancias en una reacción química



En la Gráfica 5 se muestra que, en lo que respecta al nivel nanoscópico, en el Grupo A se duplicaron las respuestas esperadas, mientras que en el grupo B se cuadruplicaron. Las respuestas clasificadas como concepciones alternativas se redujeron a cero en el Grupo B y pasaron de 7 a 4.

Gráfica 6. Átomos en una reacción química



En una tercera pregunta ¿Qué factores se deben cumplir para que los reactivos se conviertan en productos? Se presentan las siguientes categorías en el Cuadro 2.

Cuadro 2. ¿Qué factores se deben cumplir para que los reactivos se conviertan en productos?

Teoría de colisiones

Los alumnos mencionan que los átomos, moléculas o reactivos deben colisionar con suficiente energía, en un ángulo correcto.

Reorganización de los átomos

Los alumnos mencionan que debe haber una reorganización de los átomos.

Desconoce la respuesta

Los alumnos refieren a) no recordar, b) no saber, o bien, c) contestan con un guion, puntos suspensivos o una x.

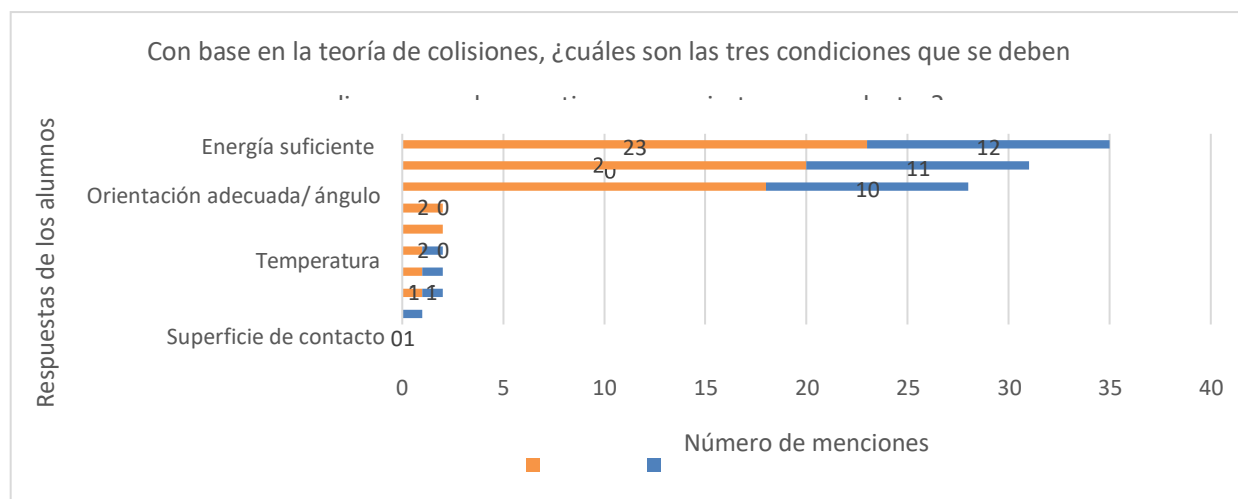
Condiciones de reacción

Los alumnos refieren los factores que modifican la rapidez de una reacción (Presión, temperatura, concentración, presencia de un catalizador).

Reactivos adecuados	Los alumnos refieren la necesidad de tener reactivos, en cantidad suficiente y que puedan reaccionar entre ellos.
Un medio adecuado	Los alumnos hacen referencia al medio en el que ocurre la reacción.
Un cambio	Los alumnos mencionan que se requiere que ocurra un cambio.
Una reacción química	Los alumnos refieren que se requiere que ocurra una reacción química.
Se requiere energía	Los alumnos refieren que se requiere energía o un impulso externo.

Al preguntar a los alumnos cuáles son los factores que se deben cumplir para que los reactivos se conviertan en productos (pero explicitando que con base en la teoría de colisiones), el 65.71% de los alumnos del Grupo A y 66.67% del Grupo B mencionaron energía suficiente, el 57.14% del Grupo A y 61.11% del Grupo B mencionaron que es necesaria la colisión, 51.43% del Grupo A y 55.56% del Grupo B el ángulo o la orientación correcta, información que se encuentra en la Gráfica 7.

Gráfica 7. Factores teoría de colisiones



Conclusiones

El uso de este material didáctico ha conseguido estimular la participación del estudiante y, con ella, una mayor motivación en la búsqueda y establecimiento de relaciones que garantizan actitudes favorables tanto para un aprendizaje significativo como para un incremento en el conocimiento acerca de la rapidez de reacción y los factores que la modifican.

De esta manera, se propició una de las condiciones necesarias para que se produzca un aprendizaje significativo enunciadas por Albaladejo y Echevarría (2001): que el estudiante muestre interés y motivación.

Además, se redujo la presencia de concepciones alternativas como la interpretación de los alumnos de que la rapidez de una reacción puede confundirse con la extensión de la reacción o que no tiene efecto en la rapidez de reacción.

En las sesiones de discusión y socialización del recurso se logró un ambiente de interacción que junto con los problemas de aplicación posibilitaron el proceso denominado de confrontación y reestructuración, en el cual los estudiantes estiman las ideas de sus compañeros, complementan y/o corrigen sus construcciones.

La investigación subsecuente a la aplicación de este material didáctico audiovisual ha demostrado que, haciendo hincapié en la triple relación de las representaciones macroscópicas, nanoscópicas y simbólicas en química, es posible que los alumnos logren un aprendizaje significativo de los factores que modifican la rapidez de reacción. Esto se observa en los resultados positivos a las preguntas y ejercicios planteados en los distintos niveles, en los que utilizan sus propias palabras y argumentos y muestran su capacidad de aplicar los conocimientos a tareas reales para generar modelos.

Existen diferencias entre los resultados del Grupo A y el Grupo B que reafirman que la motivación y las estructuras cognitivas previas de los estudiantes tienen una participación importante en la construcción de conocimiento nuevo; no obstante, en ambos grupos hubo un crecimiento importante del pre-test al post-test.

Es importante resaltar que el material didáctico audiovisual no es suficiente por sí solo. El profesor y la socialización de los alumnos con sus pares cumplen un papel importante en el éxito y la eficacia de la enseñanza de la rapidez de reacción.

Además, en el carácter constructivista del material no se trata de que el profesor dé la respuesta “correcta” sino de que el alumno, a través del uso del material, la modelización y valorando otras construcciones y argumentaciones, pueda mejorar lo hecho anteriormente.

Literatura Citada

- Al-Balushi, S.** (2013). The Effect of Different Textual Narrations on Students' Explanations at the Submicroscopic Level in Chemistry. *Eurasia journal of mathematics, science and technology education*. 10.12973/EURASIA.2013.911A
- Andersson, B.** (1986). Pupils' explanations of some aspects of chemical reactions. *Science Education*, (70), 549– 563.
- Anders, C., Berg R.** (2005). Factors related to observed attitude change toward learning chemistry among university students. *Chemistry Education Research and Practice*, 6 (1), 1-18.
- Arellano, M.** (2008). Estudio comparativo de dos instrumentos de evaluación diagnóstica aplicados a profesores de Química en formación: un estudio piloto. *Revista Electrónica de Enseñanza de las Ciencias*, 7(1), 1- 22.
- Ausubel, D. P.** The psychology of meaningful verbal learning. New York: Grune & Stratton; 1963. P. 255.
- Cachapuz, A. F. C., y Maskill, R.** (1987). Detecting changes with learning in the organization of knowledge: Use of word association tests to follow the learning of collision theory. *International Journal of Science Education*, 9(4), 491–504. [doi:10.1080/0950069870090407](https://doi.org/10.1080/0950069870090407)

- Chang R.** (2003). *Química*. (pp. 538, 539, 859). McGrawHill.
- De la Fuente, D., Hernández, M. y Pra, I.** (2018). Video educativo y rendimiento académico en la enseñanza superior a distancia. *Revista Iberoamericana de Educación a Distancia*, 323-341.
- Díaz-Barriga F., y Hernández G.** (2002). Estrategias Docentes para un Aprendizaje Significativo (Una interpretación constructivista), Mc Graw-Hill, México (pp. 31 y 36).
- Galaj, M.** (2014). Students' motivation to learn chemistry – polish scene. *Wyższa Szkoła Informatyki w Łodzi*.
- Gabel, D., Samuel, K. V., & Hunn, D.** (1987). Understanding the particle nature of matter. *Journal of Chemical Education*, 64(8), 695–697.
- Gabel, D.** (1998). The complexity of chemistry and implications for teaching en B. J. Fraser y K. G. Tobin (Eds.). *International handbook of science education*, (1), 233–248. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Gabel, D.** (1999). Improving teaching and learning through chemistry education research: A look to the future. *Journal of Chemistry Education*, 76(4), p. 548–554.
- Grabe, M., & Grabe, C.** (2007). Integrating technology for meaningful learning (5th ed.). New York: Houghton Mifflin Company.
- Jegede, S. A.,** (2007). Students' anxiety towards the learning of Chemistry in some Nigerian secondary schools. *Educational Study and Review*, 2 (7), 193-197.
- Jacobs, G. E.** (2012). Models of power and the deletion of participation in a classroom literacy event. *Journal of Research in Reading*, 35(4), 353–371.
- Johnstone, A. H.** (1993). The development of chemistry teaching: A changing response to changing demand. *Journal of Chemical Education*, 70(9), 701–705.
- Johnstone, A.** (1991). Why is science difficult to learn? Things are seldom what they seem. *Journal of Computer Assisted Learning*. (7), 75-83.
- Jonassen, D. H.** (1995). Supporting communities of learners with technology: A vision for integrating technology with learning in schools. *Educational Technology*, 35(4), 60-63
- Nakamatsu, J.** (2012). Reflexiones sobre la enseñanza de la Química. *En blanco y negro, revista sobre docencia universitaria*, 3(2), 38-46.
- Nakhleh, M. B., & Krajcik, J. S.** (1994). Influence of levels of information as presented by different technologies on students' understanding of acid, base, and pH concepts. *Journal of Research in Science Teaching*, 31(10), 1077–1096.
- Novak, J. D.** (1982). *Teoría de la educación*. Madrid: Alianza Editorial.
- Ramírez, A.** (2010). YouTube y el desarrollo de la competencia matemática. Resultados de una investigación cuasiexperimental. *Contextos Educativos*, 123-138.
- Rodríguez, M., y Fernández, J.** (2017). Uso del recurso de contenido en el aprendizaje en línea: YouTube. *Apertura*, 9(1), 22-31.
- Salta, K., Koulougliotis, D.,** (2012). Students' Motivation to Learn Chemistry: The Greek Case. *1st International Conference "New Perspectives in Science Education"*.
- Sherin, M. y Elizabeth, V. E.** (2009). Effects of Video Club Participation on Teachers' Professional Vision. *Journal of Teacher Education*, 60(1), 20–37.
<https://doi.org/10.1177/0022487108328155>
- Sherin, M. G. y Han, S. Y.** (2004). Teacher learning in the context of a video club. *Teaching and Teacher Education*, 20(2), 163–183. <https://doi.org/10.1016/j.tate.2003.08.001>
- Taber, K.** (2002). *Chemical Misconceptions: Prevention, diagnosis, and cure: Theoretical background*. Royal Society of Chemistry.

- Tamir, P. y V.M. Lunetta** (1978). An Analyst of laboratory activities in the BSCS. *Yellow version, American Biology Teacher*, 40, 426-428.
- Treagust, D., Gilbert, J.** (2009). *Models and modeling in science education. Multiple representations in chemical education*. Springer.
- Tsaparlis, G., Kolioulis, D., y Pappa, E.** (2010). Lower-secondary introductory chemistry course: a novel approach based on science-education theories, with emphasis on the macroscopic approach, and the delayed meaningful teaching of the concepts of molecule and atom. *Chemistry Education Research and Practice*, 11(2), 107-117.
- Tünnermann Bernheim, C.** (2011). El constructivismo y el aprendizaje de los estudiantes Universidades. núm. 48, 21-32 Unión de Universidades de América Latina y el Caribe Distrito Federal, Organismo Internacional.
- Van Berkel, B., Pilot, A., y Bulte, A. M.** (2009). Micro–macro thinking in chemical education: Why and how to escape. *Multiple representations in chemical education*. (pp. 31-54). Springer.
- Zhang, D., Zhou, L., Briggs, R. O. y Nunamaker, J. F.** (2006). Instructional video in e-learning: Assessing the impact of interactive video on learning effectiveness. *Information and Management*, 43, 15–27. <https://doi.org/10.1016/j.im.2005.01.004>

Efecto del tratamiento térmico aplicado a frijol ayocote (*Phaseolus coccineus* L.) sobre las propiedades tecno-funcionales de sus proteínas.

Lilia Lucía Estrada Fabián^a, Ofelia Sandoval Castilla^a, Blanca Elizabeth Hernández Rodríguez^b.

Mesa: Química

Resumen

Para mejorar el aprovechamiento de los recursos vegetales, es necesario estudiar las propiedades tecno-funcionales que exhiben sus componentes tras cambios en sus procesos de elaboración y al desarrollo de alimentos que aportan alternativas a la problemática actual. A partir de harina de frijol ayocote crudo y cocido, se obtuvieron mediante extracción alcalina aislados de proteína de frijol ayocote crudo y cocido; mostrando una mayor solubilidad ($p \leq 0.05$) a pH 12. Respecto a sus propiedades tecno-funcionales; el proceso de cocción mejoró la capacidad espumante la cual fue mayor ($p \leq 0.05$) en aislados de harina de frijol cocido a pH de 6 y su estabilidad de la espuma a pH 3, respecto a valores obtenidos para los aislados de proteína de frijol crudo. La capacidad emulsionante de las proteínas de frijol ayocote fue más afectada por su solubilidad, siendo mayor ($p \leq 0.05$) a pH 6. La gelificación se alcanzó a 12% a un pH 7 obteniendo geles estructurados. Este estudio aporta alternativas de aprovechamiento de las proteínas de frijol ayocote (*Phaseolus coccineus*), tras evaluar el efecto de variables del proceso que pueden mejorar la estructuración y propiedades tecno-funcionales de sistemas alimenticios innovadores a los que se incorporen.

Palabras clave: frijol ayocote, proteínas aisladas, propiedades tecno-funcionales, tratamiento térmico

Abstract

To improve the use of plant resources, it is necessary to study the techno-functional properties exhibited by their components after changes in their manufacturing processes and to develop foods that provide alternatives to the current problems. From raw and cooked ayocote bean flour, protein isolates of raw and cooked ayocote bean were obtained by alkaline extraction, showing a higher solubility ($p \leq 0.05$) at pH 12. Regarding their techno-functional properties; the cooking process improved the foaming capacity which was higher ($p \leq 0.05$) in cooked bean flour isolates at pH 6 and their foam stability at pH 3, with respect to values obtained for raw bean protein isolates. The emulsifying capacity of the ayocote bean proteins was more affected by their solubility, being higher ($p \leq 0.05$) at pH 6. Gelation was reached at 12% at pH 7 obtaining weak. This study provides alternatives for the utilization of ayocote bean (*Phaseolus coccineus*) proteins, after evaluating the effect of process variables that can improve the structuring and techno-functional properties of innovative food systems in which they are incorporated.

Keywords: ayocote bean, protein isolates, techno-functional properties, heat treatment.

