



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

“AISLAMIENTO DE POLIFENOL OXIDASA PARA LA MELANIZACIÓN DE
POLIFENOLES EXTRAÍBLES Y NO EXTRAÍBLES DE *Amaranthus hypochondriacus*
L. Y *Pleurotus ostreatus*.”

TESIS

Para obtener el título de
Maestro en Biotecnología

PRESENTA

I. A. Joaquin Alberto Perez Cruz

Director: Dr. Jorge Soriano Santos

Asesores: Dr. Humberto Vazquez Torres

Dra. Edith Ponce Alquicira

Iztapalapa, Ciudad de México, noviembre 2020

“La maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Padrón Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) de CONACyT, con la referencia 001465”

Este trabajo contó con el apoyo del CONACyT a través de la beca **728456**



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00280

Matrícula: 2183901623

Aislamiento de polifenol oxidasa para la melanización de polifenoles extraíbles y no extraíbles de *Amaranthus hypochondriacus* L. y *Pleurotus ostreatus*.

Con base en la Legislación de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la Ciudad de México se presentaron a las 10:00 horas del día 18 del mes de noviembre del año 2020 POR VÍA REMOTA ELECTRÓNICA, los suscritos miembros del jurado designado por la Comisión del Posgrado:

DR. HUMBERTO VAZQUEZ TORRES
DR. GERARDO DIAZ GODINEZ
DRA. MARIA BELEM ARCE VAZQUEZ
DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA



Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA

DE: JOAQUIN ALBERTO PEREZ CRUZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

JOAQUIN ALBERTO PEREZ CRUZ
ALUMNO

Aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISÓ

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISION DE CBS

DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTE

DR. HUMBERTO VAZQUEZ TORRES

VOCAL

DR. GERARDO DIAZ GODINEZ

VOCAL

DRA. MARIA BELEM ARCE VAZQUEZ

SECRETARIA

DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA

El presente documento cuenta con la firma -autógrafa, escaneada o digital, según corresponda- del funcionario universitario competente, que certifica que las firmas que aparecen en esta acta - Temporal, digital o dictamen- son auténticas y las mismas que usan los c.c. profesores mencionados en ella

Dedicatorias:

A mi familia por siempre estar presentes apoyando y dando la confianza para llevar a cabo este proyecto, en especial a mis padres que sin ellos yo no estaría aquí, que sin su educación, principios, valores y consejos no sería la increíble persona que soy.

Agradecimientos:

Al Dr. Jorge Soriano Santos por la oportunidad dada y la confianza depositada en mi para la realización de este proyecto.

A mi familia por el apoyo incondicional, a mí por el esfuerzo, al comité del posgrado en Biotecnología y por último a Conacyt por el apoyo económico.

Resumen

Las melaninas son polímeros de indoles oxidados presentes en gran parte de los seres vivos del planeta, en mamíferos son las responsables de dar color al pelo, ojos y piel, mientras que en plantas y hongos son el resultado del oscurecimiento enzimático, algo que en los productos agroindustriales no es deseado. Estas moléculas tienen una alta complejidad en su estructura química, por este motivo no han sido estudiadas tan a fondo. Sin embargo, existen estudios en donde se ha probado que éstos poseen propiedades que podrían tener resultados favorecedores en la salud humana como lo son la actividad antioxidante, el efecto quelante de algunos metales, su capacidad para precipitar proteínas, su capacidad como semiconductor eléctrico en equipos biomédicos entre otras, estos compuestos ya son utilizados en la industria cosmética y alimenticia como pigmento oscuro en diferentes productos. En este proyecto se trabajó con dos productos agroindustriales de los cuales se buscaron las condiciones para aislar los polifenoles y que funcionen como el sustrato de los extractos crudos enzimáticos con actividad polifenol oxidasa, en ambos casos se buscaron las condiciones óptimas que nos permitieran tener una mejor síntesis de las melaninas. El primero es una planta, *Amaranthus hypochondriacus L.*, se analizaron distintas partes de dicha planta como las hojas, el tallo de la planta fresca y rastrojo, que es el producto de desecho de la cosecha del amaranto, por otro lado, se utilizó el hongo, *Pleurotus ostreatus*, del que se hicieron las mismas pruebas.

Para el caso de los extractos crudos con actividad polifenol oxidasa se hicieron pruebas con tres distintos sustratos, ejemplos de polifenoles comunes dentro de alimentos como lo son la tirosina, el catecol y la rutina, con los que fueron comparados los extractos crudos con actividad polifenol oxidasa obtenidos de diferentes partes de la planta, primero las hojas, el tallo, el tallo con las hojas y el rastrojo, mientras que del hongo se evaluó deshidratado y fresco. El extracto crudo que mostró los parámetros cinéticos más elevados con todos los sustratos y, en consecuencia, el que se podría considerar como el mejor fue el obtenido del hongo fresco teniendo una velocidad mayor con el catecol como sustrato, siendo esta de $33.333 \pm 0.032 \mu\text{mol}/(\text{mL s})$ con una K_m fue de $96.3 \pm 0.5 \mu\text{mol}$. Posteriormente en todos los casos se realizó una prueba de Tukey para comparar y agrupar las medias de velocidad y en esta los datos dieron prueba suficiente de que el conjunto era independiente y tenía diferencia significativa con un valor $P < 0.05$.

De igual forma se realizó una extracción de compuestos fenólicos en los productos agroalimentarios, se extrajeron tanto los polifenoles extraíbles y se liberaron los no extraíbles utilizando disolventes orgánicos como el metanol y la acetona en diferentes concentraciones para los extraíbles; mientras que para los polifenoles no extraíbles se llevó a cabo una hidrólisis ácida de la pared celular con distintas concentraciones de ácido sulfúrico. Todo esto se realizó para la optimización de las

condiciones para tener una mayor concentración de polifenoles liberados y listos para ser utilizados como sustrato de los extractos crudos ya obtenidos anteriormente. Todo esto fue analizado por el método de superficie de respuesta teniendo como variables explicativas la temperatura de reacción, el tiempo de reacción y la concentración de disolvente o ácido, según la metodología empleada. La variable respuesta en todos los casos fue la concentración de polifenoles por cada gramo de muestra. Para este análisis, a diferencia del experimento anterior, fueron harina de rastrojo de amaranto y de hongo deshidratado con el tamaño de partícula lo más uniforme posible. Para la harina hecha con el rastrojo de amaranto se obtuvieron 19.95 ± 0.922 mg de ácido gálico/g de muestra de polifenoles extraíbles polares con $55\% \pm 1\%$ v/v de metanol, $36^\circ \pm 1.8$ °C de temperatura de reacción y a los 42.9 ± 0.9 min. Para los polifenoles con polaridad intermedia se tuvo un valor máximo de 8.838 ± 0.422 mg de ácido gálico/g de muestra con $37.56\% \pm 2.1\%$ v/v de acetona, $20^\circ \pm 0.96$ °C a 41.5 ± 0.987 min. Para los polifenoles no extraíbles el valor máximo obtenido fue de 102.084 ± 2.453 mg de ácido gálico/g de muestra con una solución de $5\% \pm 0.04\%$ v/v de ácido sulfúrico, $90^\circ \pm 1.37$ °C y a 103.437 ± 2.13 min. Para la harina hecha con *P. ostreatus* deshidratado su contenido de polifenoles extraíbles polares alcanzo un valor de 1.695 ± 0.043 mg de ácido gálico/g de muestra con $90\% \pm 3\%$ v/v de metanol, $50^\circ \pm 1.2$ °C a 20.9 ± 1.01 min. Para los polifenoles con polaridad intermedia se obtuvieron 1.006 ± 0.013 mg de ácido gálico/g de muestra con $8.76\% \pm 0.07\%$ v/v de acetona, $18^\circ \pm 1.67$ °C a 36.16 ± 1.6 min. Finalmente, para los polifenoles no extraíbles se alcanzó la concentración de 6.823 ± 0.467 mg de ácido gálico con $8.03\% \pm 0.01\%$ v/v de ácido sulfúrico, $90^\circ \pm 2.57$ °C y a los 97 ± 2.21 min. Todos los modelos fueron significativos con un valor P menor a 0.05 teniendo significancia todos los factores.

La síntesis de melanina utilizando los polifenoles extraídos y liberados de las matrices alimentarias no se pudo llevar a cabo por que no se tuvo accesibilidad a la planta piloto debido a la pandemia por el Sars cov 2 en el año en curso; sin embargo durante las mediciones de la actividad enzimática de los extractos crudos con actividad polifenol oxidasa se sintetizaron compuestos de color oscuro, dependiendo del polifenol utilizado como sustrato la síntesis de pigmentos oscuros tomó un tiempo mayor o menor. En el caso de la tirosina, en un vaso destapado, ya se presentaba una coloración oscura a los 3 días, mientras que con el catecol tardó entre 4 o 5 días, y con la rutina tomó semana y media, la aparición de dicha coloración. A estos pigmentos oscuros de les realizaron dos pruebas rápidas; la solubilidad en álcali y la precipitación en medio ácido, que cumplieron con los requisitos para determinar que el contenido de los vasos eran melaninas. Esto coincide con los ensayos realizados por Mondal y Murniati en 2018.

Abstract

Melanins are polymers of oxidized indoles present in a large part of living beings on the planet, in mammals they are responsible for giving color to hair, eyes and skin, while in plants and fungi they are the result of enzymatic darkening, something that in agro-industrial products is not wanted. These molecules have a high complexity in their chemical structure, for this reason they have not been studied as thoroughly as other compounds present in living organisms. However, there are studies where it has been proven that these have properties that could have favorable results on human health, such as antioxidant activity, the chelating effect of some metals, their ability to precipitate proteins, and their capacity as an electrical semiconductor in biomedical equipment among others. These compounds are already used in the cosmetic and food industry as dark pigments in different products. In this project we worked with two food matrices from which the polyphenols as the substrate of the enzyme and the crude enzymatic extracts with polyphenol oxidase activity were isolated. For both of which the conditions to get the better synthesis of melanins were sought. The first is a plant, *Amaranthus hypochondriacus L.*, different parts of this plant such as the leaves, the stem of the fresh plant and the so called stubble, the waste product of the harvest of the amaranth, were analyzed. On the other hand, the mushroom, *Pleurotus ostreatus* was used, of which the same tests were made. In the case of crude extracts with polyphenol oxidase activity, tests were carried out with three different substrates, examples of common polyphenols within foods such as tyrosine, catechol and rutin; with these the crude extracts with polyphenol oxidase activity obtained were compared. From different parts of the plant, first the leaves, the stem, the stem with the leaves and the stubble, while the mushroom was evaluated dehydrated and fresh. The crude extract that showed the highest kinetic parameters with all substrates and consequently the one that could be considered the best was obtained from the fresh mushroom, this is because its kinetic parameters such as reaction speed were the highest with the catechol where V_{max} was $33.333 \pm 0.032 \mu\text{mol} / (\text{mL s})$ and K_m was $96.3 \pm 0.5 \mu\text{mol}$. In all cases, when performing the Tukey test, the data gave sufficient proof that the set was independent and had a significant difference with a P value <0.005 .

The extraction of phenolic compounds was carried out from these food products, both the extractable polyphenols and the non-extractable polyphenols were extracted using organic solvents such as methanol and acetone in different concentrations in the case of the liberation of the extractables while for the non-extractable polyphenols, an acid hydrolysis of the cell wall was carried out with different concentrations of sulfuric acid, all this for the optimization of the conditions to have a higher concentration of polyphenols released and ready to be used as a substrate for the crude extracts already previously obtained. All this was analyzed by the response surface method, taking as explanatory variables the reaction temperature, the reaction time and the concentration of solvent or acid according to the methodology used, and the response variable in all cases was the concentration of polyphenols per Each gram of sample, for this analysis, unlike the previous experiment, was amaranth stubble flour and dehydrated mushroom with the most

homogeneous particle size possible, approximately 420 μm . For the flour made with amaranth stubble, 19.95 ± 0.922 mg of gallic acid / g of sample of polar extractable polyphenols were obtained with $55\% \pm 1\%$ v / v of methanol, $36^\circ \pm 1.8^\circ$ C of reaction temperature and at 42.9 ± 0.9 min. For polyphenols with intermediate polarity there was a maximum value of 8.838 ± 0.422 mg of gallic acid / g of sample with $37.56\% \pm 2.1\%$ v / v of acetone, $20^\circ \pm 0.96^\circ$ C and at 41.5 ± 0.987 min. For non-extractable polyphenols the maximum value obtained was 102.084 ± 2.453 mg of gallic acid / g of sample with a solution of $5\% \pm 0.04\%$ v / v of sulfuric acid, $90^\circ \pm 1.37^\circ$ C and at 103.437 ± 2.13 min. For flour made with dehydrated *P. ostreatus*, its content of extractable polar polyphenols reached a value of $1,695 \pm 0.043$ mg of gallic acid / g of sample with $90\% \pm 3\%$ v / v of methanol, $50^\circ \pm 1.2^\circ$ C and at 20.9 ± 1.01 min. For polyphenols with intermediate polarity, 1.006 ± 0.013 mg of gallic acid / g of sample were obtained with $8.76\% \pm 0.07\%$ v / v of acetone, $18^\circ \pm 1.67^\circ$ C and at 36.16 ± 1.6 min. Finally, for non-extractable polyphenols the concentration of 6.823 ± 0.467 mg of gallic acid with $8.03\% \pm 0.01\%$ v / v of sulfuric acid, $90^\circ \pm 2.57^\circ$ C and at 97 ± 2.21 min. All the models were significant with a P value less than 0.05, all the factors having significance.

The synthesis of melanin using the polyphenols extracted and released from the food matrices could not be carried out because there was not accessibility to the pilot plant, due to the Sars cov 2 pandemic in the current year. However, during the measurements of the enzymatic activity of the crude extracts with polyphenol oxidase activity, dark colored compounds were synthesized, depending on the polyphenol used as substrate; the synthesis of dark pigments took a longer or shorter time. In the case of tyrosine, in an uncovered glass, a dark coloration was already present at 3 days; while with catechol it took between 4 or 5 days, and with the routine it took a week and a half, the appearance of said coloration.

Contenido

1. Introducción	1
1.1 Situación actual de la producción y aprovechamiento de <i>Pleurotus ostreatus</i> y <i>Amaranthus hypochondriacus</i>	1
1.1.1 <i>Pleurotus ostreatus</i>	1
1.1.2 <i>Amaranthus hypochondriacus</i> L.	2
1.2 Reacciones de oscurecimiento en alimentos.....	4
1.2.2 Oscurecimiento enzimático	12
1.3 Enzimas con actividad polifenol oxidasa.....	12
1.4 Polifenoles.....	15
1.4.1 Polifenoles extraíbles	15
1.4.2 Polifenoles no extraíbles	17
1.5 Melaninas.....	18
2 Antecedentes	21
3 Justificación	21
4 Hipótesis	22
5 Objetivos	22
5.1 Objetivo general.....	22
5.1.1 Objetivos específicos	22
6 Metodología	23
6.1 Obtención de la harina.....	24
6.1.1 Obtención de harina de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> L.	24
6.1.2 Obtención de harina de <i>Pleurotus ostreatus</i>	24
6.2 Extracción de polifenoles.....	24
6.2.1 Extracción de polifenoles extraíbles polares	24
6.2.2 Extracción de los polifenoles extraíbles con polaridad intermedia.	25
6.2.3 Liberación de polifenoles no extraíbles	25
6.3 Obtención de extractos crudos enzimáticos con actividad polifenol oxidasa.....	27
6.3.1 Obtención del extracto crudo enzimático con actividad polifenol oxidasa de rastrojo de amaranto	27
6.3.2 Obtención del extracto crudo enzimático con actividad polifenol oxidasa de <i>Pleurotus ostreatus</i>	28

6.4 Caracterización parcial de los extractos crudos enzimáticos con actividad polifenol oxidasa	28
7 Resultados	30
7.1 Extracción de polifenoles.....	30
7.1.1 Extracción de polifenoles extraíbles	30
7.1.2 Liberación de polifenoles no extraíbles	38
7.2 Cuantificación de proteína total por el método de Bradford.....	42
7.3 Evaluación de la actividad enzimática en los distintos extractos crudos obtenidos de <i>Pleurotus ostreatus</i> y <i>Amaranthus hypochondriacus</i> L.	43
7.4 Síntesis de melanina	49
8 Conclusiones	51
9 Referencias	53
ANEXOS	55
Anexo I	55
Anexo II	56
Anexo III.....	57

Contenido de figuras

Figura 1. <i>Pleurotus ostreatus</i>	1
Figura 2. <i>Amaranthus hypochondriacus</i> L.....	3
Figura 3. Rastrojo de amaranto.....	3
Figura 4. Mecanismo general de las reacciones de Maillard (Baduil, 2006).....	6
Figura 5. Imagen de tirosinasa con señalización al sitio catalítico (Cremsi y col., 2002).....	13
Figura 6. Sitio catalítico de tirosinasa (Cremsi y col., 2002).....	14
Figura 7. Reacción de oxidación en el sitio catalítico de tirosinasa (Mondal., 2018).	15
Figura 8. Ejemplo de polifenoles extraíbles (Arranz y col., 2006).	17
Figura 9. Ejemplo de polifenoles no extraíbles (Arranz y col., 2006).	18
Figura 10. Reacción de síntesis de melaninas (Mondal y col., 2018).	19
Figura 11. Reacción de melanización con la constante de velocidad de cada etapa (Mondal y col., 2018).	20
Figura 12. Reacción entre el reactivo de Folin y un polifenol.	26
Figura 13. Modelo general tridimensional del diseño experimental Box Benhken.	27
Figura 14. Superficie de respuesta con tiempo fijado en 40 min de la extracción de los polifenoles extraíbles polares de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> L.	31
Figura 15. Contornos de la superficie de respuesta con tiempo fijado en 40 min de la extracción de los polifenoles extraíbles polares de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> L.	31
Figura 16. Diagrama de Pareto del modelo de superficie e respuesta para la extracción de polifenoles extraíbles polares de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> L.	32
Figura 17. Superficie de respuesta con tiempo fijado en 40 min de la extracción de los polifenoles extraíbles polares de <i>Pleurotus ostreatus</i>	33
Figura 18. Contornos de la superficie de respuesta con tiempo fijado en 40 min de la extracción de los polifenoles extraíbles polares de <i>Pleurotus ostreatus</i>	33
Figura 19. Diagrama de Pareto del modelo de superficie de respuesta para la extracción de polifenoles extraíbles polares de <i>Pleurotus ostreatus</i>	34
Figura 20. Superficie de respuesta con tiempo fijado en 40 min de la extracción de los polifenoles extraíbles con polaridad intermedia de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> L.	35
Figura 21. Contornos de la superficie de respuesta con tiempo fijado en 40 min de la extracción de los polifenoles extraíbles con polaridad intermedia de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> L.....	35
Figura 22. Diagrama de Pareto del modelo de regresión para la extracción de polifenoles extraíbles de polaridad intermedia de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> L.	36
Figura 23. Superficie de respuesta con tiempo fijado en 40 min de la extracción de los polifenoles extraíbles con polaridad intermedia de <i>Pleurotus ostreatus</i>	37

Figura 24. Contornos de la superficie de respuesta con tiempo fijado en 40 min de la extracción de los polifenoles extraíbles con polaridad intermedia de <i>Pleurotus ostreatus</i>	37
Figura 25. Diagrama de Pareto del modelo de regresión para la extracción de polifenoles extraíbles de polaridad intermedia de <i>Pleurotus ostreatus</i>	38
Figura 26. Superficie de respuesta con tiempo fijado en 40 min de la liberación de los polifenoles no extraíbles de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> L.....	39
Figura 27. Contornos de la superficie de respuesta con tiempo fijado en 40 min de la liberación de los polifenoles no extraíbles de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> L.....	39
Figura 28. Diagrama de Pareto del modelo de regresión para la liberación de los polifenoles no extraíbles de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> L.....	40
Figura 29. Superficie de respuesta con tiempo fijado en 40 min de la liberación de los polifenoles no extraíbles de <i>Pleurotus ostreatus</i>	41
Figura 30. Contornos de la superficie de respuesta con tiempo fijado en 40 min de la liberación de los polifenoles no extraíbles de <i>Pleurotus ostreatus</i>	41
Figura 31. Diagrama de Pareto del modelo de regresión para la liberación de polifenoles no extraíbles de <i>Pleurotus ostreatus</i>	42
Figura 32. Gráfico de la linealización de la cinética enzimática de los diferentes extractos crudos enzimáticos con actividad polifenol oxidasa con catecol como sustrato	43
Figura 33. Gráfico de la linealización de la cinética enzimática de los diferentes extractos crudos enzimáticos con actividad polifenol oxidasa con rutina como sustrato	44
Figura 34. Gráfico de la linealización de la cinética enzimática de los diferentes extractos crudos enzimáticos con actividad polifenol oxidasa con tirosina como sustrato.....	46
Figura 35. Extracto crudo enzimático con actividad polifenol oxidasa en el tiempo 0 de reacción con los distintos sustratos.....	49
Figura 36. Extracto crudo enzimático con actividad polifenol oxidasa a las 24 horas de reacción con los distintos sustratos.....	50
Figura 37. Extracto crudo enzimático con actividad polifenol oxidasa a las 36 horas de reacción con los distintos sustratos.....	50
Figura 38. Pigmento oscuro producto de la actividad polifenol oxidasa del extracto crudo enzimático sobre catecol en medio ácido (pH=2).....	51

Contenido de tablas

Tabla 1. Ejemplos de temperaturas de pirolisis en carbohidratos (Badui, 2006)	10
Tabla 2. Niveles óptimos de los factores necesarios para una óptima extracción de polifenoles extraíbles polares de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> L.	32
Tabla 3. Niveles óptimos de los factores necesarios para la extracción de polifenoles extraíbles polares de <i>Pleurotus ostreatus</i>	34
Tabla 4. Niveles óptimos de los factores necesarios para la extracción de polifenoles extraíbles de polaridad intermedia de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> L.....	36
Tabla 5. Niveles óptimos de los factores necesarios para la extracción de polifenoles extraíbles de polaridad intermedia de <i>Pleurotus ostreatus</i>	38
Tabla 6. Niveles óptimos de los factores necesarios para la liberación de polifenoles no extraíbles de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> L.....	40
Tabla.7. niveles óptimos de los factores necesarios para la liberación de polifenoles no extraíbles de <i>Pleurotus ostreatus</i>	42
Tabla 8. Contenido de proteína por cada gramo de muestra	43
Tabla 9. Datos cinéticos enzimáticos de cada extracto crudo con catecol como sustrato	44
Tabla 10. Datos cinéticos enzimáticos de cada extracto crudo con rutina como sustrato.....	45
Tabla 11. Datos cinéticos enzimáticos de cada extracto crudo con tirosina como sustrato	46
Tabla 12. Agrupamiento de las medias de las velocidades de reacción de los diferentes extractos crudos enzimáticos con actividad polifenol oxidasa con catecol como sustrato.	47
Tabla 13. Agrupamiento de las medias de las velocidades de reacción de los diferentes extractos crudos enzimáticos con actividad polifenol oxidasa con rutina como sustrato.....	48
Tabla 14. Agrupamiento de las medias de las velocidades de reacción de los diferentes extractos crudos enzimáticos con actividad polifenol oxidasa con tirosina como sustrato.....	48

1. Introducción.

1.1 Situación actual de la producción y aprovechamiento de *Pleurotus ostreatus* y *Amaranthus hypochondriacus*

1.1.1 *Pleurotus ostreatus*.

El cultivo de hongos comestibles a nivel mundial comenzó a crecer a partir de la década de los 70's por su aporte nutricional, así como la gran variedad de platillos que se pueden preparar con ellos, desde sopas hasta platos principales. En la actualidad el hongo *Pleurotus ostreatus* también conocido como seta es el segundo hongo comestible más producido cuando se encuentra en madurez de consumo como se muestra en la figura 1, solo después del champiñón. Dichos hongos comestibles han sido sujetos de distintos estudios porque han probado tener diferentes propiedades, aparte de las nutricionales, que podrían tener aplicaciones industriales y tener influencia positiva en la salud humana. En México su producción anual ronda alrededor de las 5,500 toneladas concentrándose la mayoría en los estados del centro del país (INECOL, 2018).



Figura 1. *Pleurotus ostreatus*.

Dentro de los usos domésticos que se les dan a estos hongos en México encontramos que es solo como alimento. Mientras que a nivel industrial tenemos que generalmente son utilizados como productores de enzimas. La mayoría de las empresas productoras emplean desecho agroindustrial como soporte para la

producción de estos hongos en una fermentación en medio sólido, para la producción de enzimas, como los complejos enzimáticos con actividad ligninolítica capaces de aclarar efluentes industriales o degradar colorantes químicos. (Rodríguez-Pérez y col., 2019)

Existen normas de calidad que regulan el comercio y la calidad de los hongos comestibles, ya sea a nivel nacional o mundial. Las normas internacionales son fijadas en forma conjunta por la FAO (Organización para la Alimentación y Agricultura) y la OMS (Organización Mundial de la Salud), regulando la calidad y los requisitos que deben cumplir los alimentos en su estado fresco como procesado (Rodríguez Pérez y col., 2019).

La calidad del producto cosechado depende de las condiciones de cultivo y el manejo postcosecha, procurando mantener la integridad del producto y evitando su deshidratación. Acorde con sus características se clasifican en las siguientes tres categorías (FIDA, 2018):

- Primera categoría o calidad superior: presentan aspecto fresco, sin malformaciones, exentos de daños causados por enfermedades, libres de insectos u otros parásitos, cuerpos extraños como pajas y de sabores y olores extraños
- Segunda categoría: deben ser enteros y bien formados, con defectos mínimos como los mencionados en los de la primera calidad.
- Tercera categoría: hongos rotos o que presenten pequeños defectos sin llegar al estado de descomposición.

En este trabajo se utilizará el hongo de tercera categoría ya que al carecer de calidad de mercadeo su precio es bajo y al mismo tiempo se le otorga un valor agregado y un uso a lo que en algunos lugares se considera desecho.

1.1.2 *Amaranthus hypochondriacus* L.

El amaranto es un grano que se cultiva en México desde hace muchos años atrás, ya que formaba parte de la alimentación de las poblaciones prehispánicas, con la conquista su consumo disminuyó, hasta casi desaparecer, posteriormente se fue recuperando. En la actualidad, el amaranto se emplea en la elaboración de diversos platillos, además es un ingrediente indispensable en la elaboración de dulces típicos.



Figura 2. Amaranthus hypochondriacus L.

En México se producen alrededor de 4,950 toneladas anuales de semilla de amaranto, se cultiva principalmente en los estados que forman parte del denominado valle de México, como lo son el Estado de México, la Ciudad de México, Puebla, Hidalgo, Morelos y Tlaxcala. La semilla representa un porcentaje pequeño de la planta, después de la colecta, cuando la planta tiene una apariencia como la de la figura 2, el resto de la planta, denominado rastrojo (figura 3), se desecha y carece de un uso específico, por lo que podría convertirse en una fuente de contaminación para el campo mexicano (SAGARPA, 2015).

El volumen de rastrojo que se obtiene del cultivo del amaranto llega a alcanzar volúmenes de aproximadamente 41,250 toneladas anuales (SAGARPA, 2015).



Figura 3. Rastrojo de amaranto.

La semilla de amaranto es muy valorada dentro de la industria de alimentos. Sin embargo, el rastrojo solo ha sido utilizado como parte de compostas y piensos alimentarios, la mayoría se quema como parte de la preparación de los terrenos para la siembra, por lo que es de gran importancia el darle una utilidad y valor agregado

1.2 Reacciones de oscurecimiento en alimentos

Todos los alimentos son susceptibles a reacciones de oscurecimiento, estas reacciones modifican sus propiedades organolépticas, algunas son producto de un tratamiento térmico mientras que otras se llevan a cabo naturalmente dentro de la misma matriz alimentaria por acción de enzimas (Fennema, 2010; Badui, 2006).

1.2.1 Reacciones de oscurecimiento no enzimático

Estas reacciones no requieren de la acción de enzimas y por lo general son deseables en los alimentos ya que cambian de manera agradable sus propiedades organolépticas.

1.1.2.1. Reacción de Maillard

Azúcar reductor + aminoácido \longrightarrow Melanoidinas (color oscuro).

La reacción de Maillard (técnicamente: *glucosilación no enzimática de proteínas*) se trata de un conjunto complejo de reacciones químicas que se producen entre las proteínas y los azúcares reductores que se aceleran al aplicar un tratamiento térmico esta reacción es responsable del color marrón de la costra del pan horneado y de la carne mientras se cocina al horno. Los productos mayoritarios de estas reacciones son moléculas cíclicas y policíclicas, que aportan sabor y aroma a los alimentos (Fennema, 2010; Badui, 2006).

Esta reacción la investigó en profundidad el químico Louis-Camille Maillard en los comienzos del siglo XX. En 1916 Maillard (1878-1936) demostró que los pigmentos marrones y los polímeros que ocurren durante la pirólisis (degradación química producida únicamente por calor) se liberan después de la reacción previa de un grupo de aminoácidos con un grupo carbonilo de azúcares. No fue sino hasta 1953 cuando se descubrió el mecanismo de las complejas interacciones que se producen (Fennema, 2010, Badui, 2006).

Estas reacciones se llevan a cabo en algunos alimentos y en todos de manera peculiar por su composición y proceso térmico al cual son sometidos para su elaboración (Fennema, 2010, Badui, 2006).

- Galletas: el color tostado del exterior de las galletas genera un sabor característico.
- El caramelo elaborado de mezclas de leche y azúcar, también llamado toffee.
- Es el responsable del color marrón en el pan al ser tostado.
- El color de alimentos tales como la cerveza, el café, y el jarabe de arce.
- Productos para las cremas bronceadoras.
- El sabor de la carne asada y de las cebollas cocinadas en la sartén cuando se empiezan a oscurecer.
- El color del dulce de leche, obtenido al calentar la leche con el azúcar.

En la Reacción de Maillard existen cuatro fases sucesivas que se observan en la figura 4 y enumeramos a continuación:

1. No existe producción de color. En esta fase se produce la unión entre los azúcares y los aminoácidos formando lo que se denomina como base de Schiff. Posteriormente se le dará el nombre de: reestructuración de Amadori (Azúcares + proteínas).
2. Existe la formación inicial de colores amarillos muy ligeros, así como la producción de olores algo desagradables. En esta fase se produce la deshidratación de azúcares formándose las reductonas o dehidrorreductonas y tras esto se sobreviene la fragmentación. En el paso posterior, conocido como degradación de Strecker, se generan compuestos reductores que facilitan la formación de los pigmentos.
3. En esta fase se produce la formación de los conocidos pigmentos oscuros que se denominan melanoidinas; el mecanismo no es completamente conocido, pero es seguro que implica la polimerización de muchos de los compuestos formados en la anterior segunda fase.
4. La cuarta y última fase es la degradación de Strecker. En esta fase se forman los denominados aldehídos de Strecker que son compuestos con bajo peso molecular que se detectan fácilmente por el olfato.

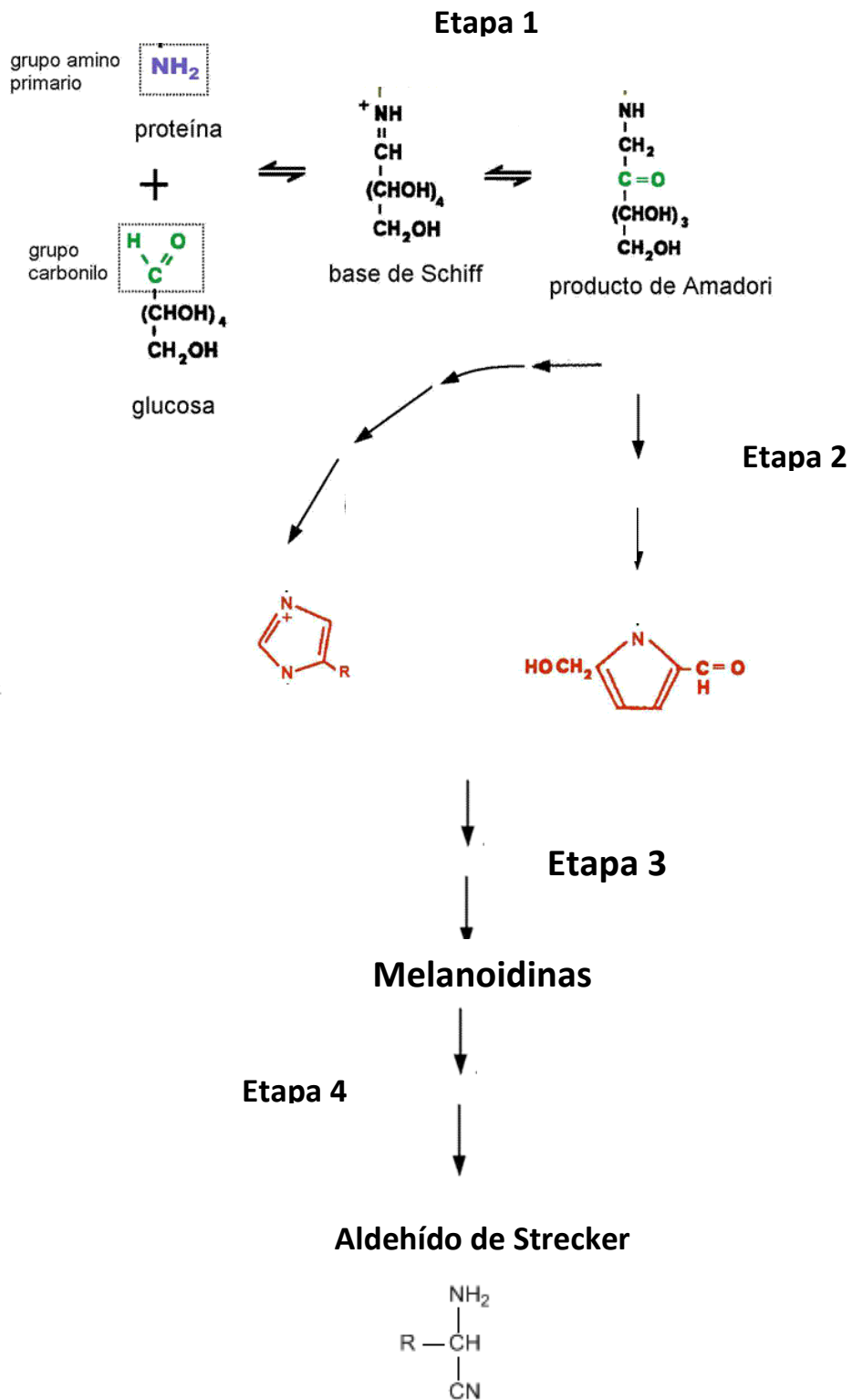


Figura 4. Mecanismo general de las reacciones de Maillard (Baduil, 2006).

Altas temperaturas, y bajos contenidos de actividad de agua (a_w), así como un medio alcalino promueven en conjunto la reacción de Maillard. Los bajos niveles de contenido de humedad, son imprescindibles puesto que a 100 °C se forma vapor de agua, en tanto que la reacción de Maillard comienza a manifestarse de forma visible a partir de 155 °C. En otras palabras, el cambio de coloración es evidente cuando la mayor parte agua se ha vaporizado (Fennema, 2010).

La velocidad de la reacción de Maillard aumenta, proporcionalmente al incremento de la actividad del agua; alcanzando un máximo en el entorno de 0.6/0.7. Sin embargo, puesto que la reacción de Maillard produce agua, el aumento de la actividad del agua por encima de este nivel, puede llegar a inhibir la reacción de Maillard (Fennema, 2010).

- Bajas aportaciones de calor, baja actividad de agua, temperatura insuficiente para comenzar la reacción de Maillard.
- Altas aportaciones de calor, alta actividad de agua (por encima de 0.7), elevada producción de agua, inhibición de reacción de Maillard debido a la disolución de reactivos.

Factores que influyen en la Reacción de Maillard (Badui, 2006):

1. Tipo de hidrato de carbono
2. Tipo de aminoácidos o proteína
3. Concentración de sustratos
4. Tiempo y temperatura de cocción
5. pH arriba o abajo de 7
6. Actividad de agua
7. Presencia de inhibidores

Tipo de hidrato de carbono Los hidratos de carbono se pueden clasificar según su estructura química en Monosacáridos, Disacáridos, Polisacáridos

- Los monosacáridos dan una reacción más intensa que los disacáridos.
- Dentro de los disacáridos, los azúcares reductores dan mayor intensidad que los no reductores
- Dentro de los monosacáridos, las pentosas dan reacción más intensa que las hexosas Pentosas > Hexosas > Disacáridos reductores > Disacáridos no reductores La intensidad de la reacción depende del tipo de hidrato de carbono

Tipo de proteínas y aminoácidos El aroma de los productos de reacción depende de los aminoácidos que componen las proteínas y de la temperatura de cocción. La intensidad de color también depende del tipo de aminoácido. Los básicos son los más reactivos (Saldaña y col., 2005).

Concentración de hidratos de carbono y proteínas

Para que se lleve a cabo la reacción es necesario que estén presentes los 2 sustratos: hidratos de carbono y proteínas. Al aumentar la concentración de estos sustratos en el alimento, mayor será la intensidad de la reacción (Badui, 2006).

Tiempo y temperatura de cocción

Si bien la reacción puede ocurrir a temperatura ambiente, se ve favorecida a altas temperaturas. Al aumentar el tiempo de cocción, aumenta la intensidad de la reacción. Los aromas generados también dependen de la temperatura y tiempo de cocción (Badui, 2006).

El pH: La intensidad de la reacción aumenta a pH alcalinos ($\text{pH} > 7$) y disminuye a pH ácidos ($\text{pH} < 7$)

Actividad de agua (a_w): Valores de a_w de 0.6 a 0.9, son los que más favorecen esta reacción ya que al disminuir la a_w también disminuye la movilidad de los reactivos. Un a_w mayor ejerce una acción inhibitoria ya que el agua diluye a los reactivos (Saldaña y col., 2005).

Los inhibidores más comunes son los sulfitos, metabisulfitos, bisulfitos y anhídrido sulfuroso. Actúan en la etapa de inducción retardando la aparición de productos coloreados, pero no evitan la pérdida del valor biológico de los aminoácidos. Aunque su uso está limitado ya que produce efectos adversos a la salud (Saldaña y col., 2005).

1.2.1.2 Reacción de caramelización.



Esta reacción de oscurecimiento, también llamada pirólisis, ocurre cuando los azúcares se calientan por encima de su punto de fusión; se efectúa tanto a pH ácidos como alcalinos y se acelera con la adición de ácidos carboxílicos y de algunas sales; se presenta en los alimentos que son tratados térmicamente de manera drástica, tales como los derivados de la panificación, las frituras, y los dulces

a base de leche, como cajeta, natillas, etcétera. Los mecanismos que suceden son muy complejos y no se conocen en su totalidad, se llevan a cabo transformaciones por isomerización y deshidratación de los hidratos de carbono. La deshidratación genera furfural y sus derivados insaturados que se polimerizan consigo mismos o con otras sustancias semejantes para formar las macromoléculas de pigmentos llamadas melanoidinas. Durante esta transformación también se sintetiza una serie de compuestos que incluyen furanos, furanonas, lactonas, pironas, aldehídos, cetonas, ácidos, ésteres y pirazinas, de bajo peso molecular, muy olorosas, así como otras con dobles ligaduras conjugadas que igualmente absorben la energía radiante y que por lo tanto producen colores. Por ejemplo, se conoce que la 2,5-dimetilpirazina y la trimetilpirazina se generan por este mecanismo y contribuyen al aroma típico de las frituras de papas y cacahuates; de manera semejante, el maltol, el isomaltol y el etil-maltol, que se forman en la elaboración del pan, son parte fundamental de su aroma. La caramelización de la sacarosa se ha estudiado con más detalle y se ha comprobado que al calentarse a más de 160°C se provoca simultáneamente la hidrólisis, la deshidratación y la dimerización de los productos resultantes; se sintetiza la isosacarosana de sabor amargo; al incrementar la temperatura se acelera la deshidratación y se produce la caramelana ($C_{24}H_{36}O_{18}$), que corresponde a dos sacarosas eliminadas de 4 H_2O . Posteriormente se sintetiza el carameleno, $C_{36}H_{50}O_{25}$ sustancia oscura y amarga, que representa tres residuos del azúcar menos ocho moléculas de agua. Un calentamiento excesivo da origen a la caramelina o humina de peso molecular muy alto ($C_{125}H_{188}O_{80}$) y sabor desagradable. Comercialmente, la caramelización se lleva a cabo de manera controlada para la fabricación, de caramelos, líquidos o sólidos, que se utilizan como colorantes para refrescos de cola, postres, productos de la confitería, etc.: se elaboran calentando soluciones concentradas de glucosa o de sacarosa en presencia de ácidos y sales de amonio: su composición química es muy compleja y se presentan como partículas coloidales con un tamaño y punto isoeléctrico característicos. La reacción de caramelización es importante en la producción de caramelos comerciales que se emplean en la manufactura de diferentes alimentos y que de acuerdo con sus condiciones de fabricación tendrán características propias de color, sabor, consistencia y textura. Fundamento Químico Al someter los azúcares en estado cristalino o como jarabes a temperaturas superiores a su punto de fusión se generan una serie de reacciones complejas en las cuales se da un rompimiento de las moléculas de azúcares, los residuos de éstos azúcares se reagrupan y forman moléculas diferentes que pueden ser de bajo o alto peso molecular dependiendo que tanto se unen nuevamente éstos compuestos. Los pigmentos son las melanoidinas similares a las desarrolladas por las reacciones de Maillard, pero con diferentes mecanismos de formación. Cuando un azúcar es calentado y fundido, no solamente aparece el color caramelo, sino que paralelamente se forman otros compuestos que colaboran en el sabor y aroma de los productos, como el caso del isomaltol y mantol, que caracterizan el olor del pan horneado. Agentes externos caramelización Para que se presente la reacción de caramelización se utilizan sustancias, cuyo propósito es el de regular el pH del medio, y así garantizar que el caramelo se forme, estas soluciones evitan la formación de sustancias de humo con alto peso molecular, que son no deseables en el caramelo, pues disminuyen las propiedades organolépticas del producto. Hay

muchos agentes que pueden acelerar o retardar dicho proceso, estos se aplican de acuerdo a los requerimientos dentro de una formulación en la industria de alimentos, por ejemplo: ácido rápido: hecho con bisulfito amoniacal, es utilizado para dar color a las bebidas colas. ión amonio: color malteado de la cerveza, se obtiene cuando una solución de sacarosa es calentada en presencia de dicho ión (Fennema, 2010).

Estas reacciones han sido ampliamente estudiadas por muchos autores y ya se tienen registradas las temperaturas de caramelización de algunos monosacáridos como se observa en la tabla 1 (Badui, 2006).

Tabla 1. Ejemplos de temperaturas de pirolisis en carbohidratos (Badui, 2006)

Azúcar	Temperatura
Fructosa	110°C
Galactosa	160°C
Glucosa	160°C
Sacarosa	160°C
Maltosa	180°C

1.2.1.3 Oxidación del ácido ascórbico

Oxidación del ácido ascórbico:



El ácido ascórbico, o Vitamina C, es una vitamina hidrosoluble, emparentada químicamente con la glucosa, que solamente es una vitamina para el hombre, los primates superiores, el cobaya, algunos murciélagos frugívoros y algunas aves. La inmensa mayoría de los animales, incluidos los de granja, pueden sintetizarla, por lo que no la acumulan en su organismo (ni, eventualmente, la segregan en la leche). Esto tiene como consecuencia que los alimentos animales sean generalmente pobres en esta vitamina.

El ácido ascórbico tiene una estructura de lactona. La acidez no se debe a un grupo carboxílico, sino a la posibilidad de que se ionice el hidroxilo situado sobre el carbono 3, formando un anión que queda estabilizado por resonancia. Su pK es de 4,04. Eventualmente, puede incluso disociarse el hidroxilo situado en el carbono 2, formando un dianión, aunque su pK es mucho más alto (11,4), debido a que no está estabilizado por resonancia, como el del carbono 3 (Badui, 2006).

El ácido ascórbico solamente se encuentra en concentraciones significativas en los vegetales (en los que se ignora cuál puede ser su posible papel biológico). En muchas frutas se encuentra en concentraciones elevadas (50 mg/100 g en los cítricos), pero para muchas personas el aporte principal se obtiene de verduras y hortalizas, como repollo o coliflor. Las patatas nuevas contienen unos 30 mg/100 g, aunque lo van perdiendo durante el almacenamiento.

Es una vitamina hidrosoluble, y como tal puede perderse por lixiviación. En esta pérdida influye mucho la superficie de contacto, de modo que se pierde con mayor facilidad de los alimentos que más superficie relativa tienen, como los vegetales foliáceos o los alimentos troceados. Por otra parte, el mantenimiento de estructuras protectoras durante el cocinado (la piel de las patatas, por ejemplo) la protegen de la oxidación y de otras alteraciones (Badui, 2006).

El ácido ascórbico es particularmente sensible a las reacciones de oxidación, destruyéndose con gran facilidad durante el procesado de los alimentos en presencia de oxígeno. La oxidación es dependiente del pH, ya que la forma ionizada es más sensible que la forma no ionizada. El dianión es todavía más sensible, pero para que se forme en proporciones significativas es necesario un pH alcalino que no suele encontrarse en los alimentos (Fennema, 2010).

Inicialmente en la oxidación pasa de ascorbato a dehidroascorbato, en una reacción que es reversible, por lo que el dehidroascorbato mantiene en principio el valor como vitamina C. Sin embargo, la lactona correspondiente al dehidroascorbato es mucho menos estable que la del ascorbato, por lo que se hidroliza con gran facilidad para producir ácido 2, 3 dicetogulónico, que posteriormente puede degradarse por descarboxilación. Ni el ácido 2, 3 dicetogulónico ni sus productos de degradación tienen ya actividad como vitamina C (Fennema, 2010).

La reacción de oxidación puede estar catalizada por el enzima ascorbato oxidasa, abundante en algunos vegetales, y se produce también como reacción lateral en las oxidaciones catalizadas por peroxidases o polifenoloxidasas. Consecuentemente, la ruptura de la compartimentalización acelera mucho la destrucción del ácido ascórbico, ya que también facilita el acceso al oxígeno (Badui, 2006).

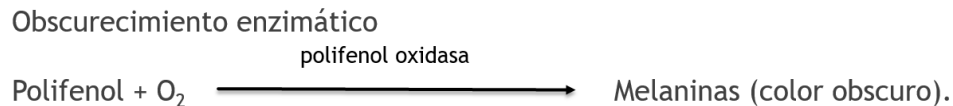
Generalmente esta reacción se produce la oxidación del ácido ascórbico de forma química, sin la intervención de enzimas, especialmente en presencia de metales como el hierro o el cobre, que actúan como catalizadores. El cobre es alrededor de 80 veces más potente que el hierro. En ausencia total de metales, el ácido ascórbico es relativamente estable, incluso en presencia de oxígeno. Los agentes quelantes son relativamente efectivos frente al cobre, pero no frente al hierro (Badui, 2006).

El ácido ascórbico puede romperse también en reacciones no oxidativas, especialmente en medio ácido (entre pH 3 y 4), por apertura del anillo lactónico y posterior descarboxilación. Este efecto puede ser importante en productos

enlatados. En cualquier caso, a igualdad de temperatura esta reacción es mucho más lenta que la de oxidación (Saldaña y col., 2005).

El ácido ascórbico es un potente agente reductor, capaz de reaccionar con el oxígeno, y utilizable por lo tanto como antioxidante. También se utiliza como mejorante panario. En esta aplicación, el ácido dehidroascórbico formado a expensas del ascórbico se reduce a ascorbico, a la vez que oxida los grupos SH del gluten formando puentes disulfuro (Badui, 2006).

1.2.2 Oscurecimiento enzimático



El pardeamiento enzimático es una reacción de oxidación en la que intervienen como sustratos los fenoles y polifenoles presentes en la matriz alimentaria, catalizada por un tipo de enzimas que se puede encontrar en prácticamente todos los seres vivos, desde las bacterias al hombre. En el hombre es la responsable de la formación de pigmentos del pelo y de la piel. En los cefalópodos produce el pigmento de la tinta, y en los artrópodos participa en el endurecimiento de las cutículas del caparazón, al formar quinonas que reaccionan con las proteínas, insolubilizándolas. En los vegetales no se conoce con precisión cuál es su papel fisiológico (Fennema, 2010; Badui, 2006).

El producto final de reacción son los polímeros de DHI o DHICA llamados melaninas, que son pigmentos oscuros (Mondal y col., 2018).

1.3 Enzimas con actividad polifenol oxidasa

Las enzimas con actividad polifenol oxidasa, son enzimas ubicuas ampliamente distribuidas en la escala filogenética, encontrándose tanto en organismos procariotas como en eucariotas. Se trata de enzimas detectadas en la mayoría de los seres vivos, que acorde con el sustrato se denominan tirosinasas, polifenolasa, fenolasa catecol oxidasa, cresolasa o carecolasa.

Estas enzimas se han descrito en diversos tejidos de plantas como raíces, semillas, hojas y frutos. Estudios clásicos de polifenol oxidasa localizan a la enzima en la fracción soluble de las células o fuertemente unida a membranas subcelulares tanto

en hongos como en vegetales. Los hongos son organismos que se caracterizan por su producción de complejos enzimáticos con actividad polifenol oxidasa y ligninolíticas muy potentes (Morniati y col., 2019).

Estas enzimas entran en la categoría de oxidorreductasas por la reacción que llevan a cabo, igual por su estructura son llamadas metaloenzimas azules debido a que en su sitio catalítico tienen uno o más iones de cobre (Kroneck y col., 2012) Estas enzimas trabajan a un pH cercano al neutro y unas temperaturas alrededor de los 30°C y sus actividades han sido ampliamente estudiadas por varios autores en busca de inhibir su actividad ya que el pardeamiento en alimentos es significado de que el producto carece de calidad de consumo (Moosavi y col., 2009).

Todas estas enzimas tiene semejanzas muy grandes en su sitio catalítico, todas son dependientes de cobre, es decir que en su sitio catalítico debe tener iones de este metal y en algunos casos, como la tirosinasa, también tiene uno en un sitio no catalítico que sirve como control positivo de la actividad enzimática, como se observa en la figura 5, es decir que si este sitio contiene un ion de cobre entonces el sitio catalítico es activado para que en presencia de oxígeno se lleve a cabo la reacción, la presencia de oxígeno tiene la misma relevancia que la presencia del ion metálico antes mencionado.

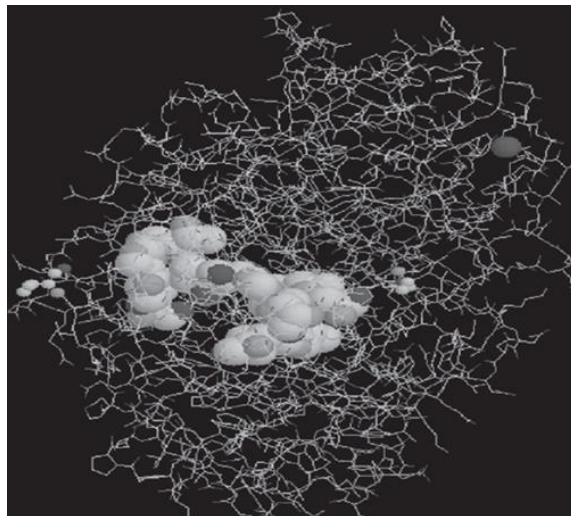


Figura 5. Imagen de tirosinasa con señalización al sitio catalítico (Cremosi y col., 2002).

Como se puede observar en la figura 6 estos dos iones se encuentran rodeados de histidinas y le permiten a la enzima llevar a cabo lo que se denomina como catálisis por ion metálico (Cremosi y col., 2002).

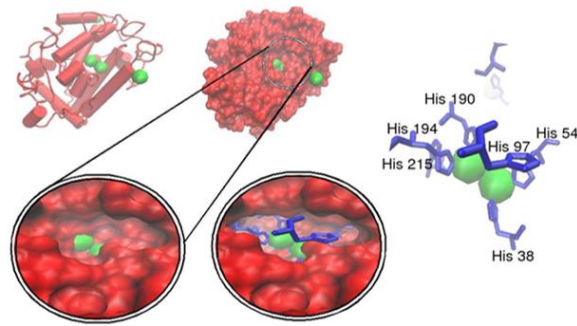


Figura 6. Sitio catalítico de tirosinasa (Cremosi y col., 2002).

La acción catalítica de la tirosinasa implica una oxidación del sustrato que para esta enzima es un compuesto fenólico (Cremosi y col., 2002), un fenol o difenol que no se encuentre ligado a la pared celular, la catálisis por ion metálico (Kroneck y col., 2012) es cuando uno de los iones metálicos, en este caso son de cobre, fijan al sustrato haciendo que la nube de electrones sea atraída dejando propensa a la molécula para un ataque nucleofílico por parte del oxígeno que se encuentra ligado al otro ion, esto hace que se forme un grupo hidroxilo en la molécula convirtiendo al monofenol en difenol, posteriormente por estar en medio acuoso y que el cobre sigue teniendo fijo al sustrato ambos grupos hidroxilos terminan saliendo en forma de agua dando pie a que ambos oxígenos formen doble enlace con su respectivo carbono dando pie a la formación de una DOPAquinona que posteriormente se oxidara para formar algo llamado ciclodopa, en esta segunda parte de la reacción de oxidación el ion metálico vuelve a fijar ahora a los oxígenos de los grupos cetos provocando que la molécula de agua ponga de nuevo los hidrógenos en los oxígenos provocando que la estabilidad del anillo se vea comprometida, esto provoca que el nitrógeno que se encuentra al extremo posterior de la molécula cambie su hidrogeno por un enlace con el carbono más cercano pasando de una amina primaria a una secundaria regresando la resonancia completa al anillo, cuando esto sucede se forma algo llamado ciclodopa (Mondal y col., 2018), esta molécula, que sigue dentro del sitio catalítico, vuelve a interactuar con el ion metálico y el oxígeno, pero a diferencia de la primera interacción solo se forma un grupo ceto y un extremo con oxígeno disponible, la resonancia dentro del anillo permite que entre estos dos oxígenos se intercambie el doble enlace pasando de uno al otro haciendo de esto una molécula estable llamada DOPACROMO como se observa en la figura 7 (Mondal y col., 2018).

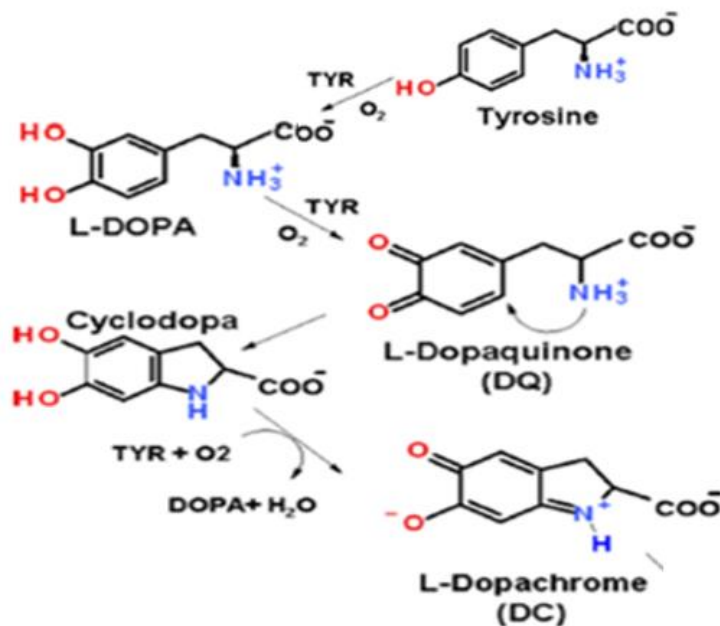


Figura 7. Reacción de oxidación en el sitio catalítico de tirosinasa (Mondal., 2018).

Estas reacciones dependientes de oxígeno catalizadas por la polifenol oxidasa transforman a los fenoles en melaninas.

En hongos y plantas como el amaranto las enzimas con actividad polifenol oxidasa presentes son la O-difenolasa, la fenolasa, la tirosinasa, la lacasa, la catecolasa por mencionar algunas (Moosavi y col., 2009).

1.4 Polifenoles

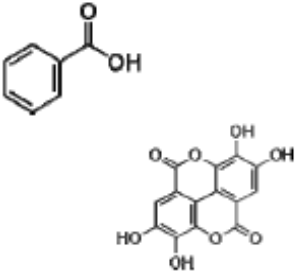
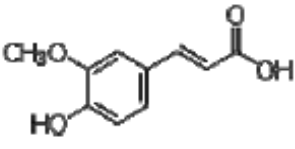
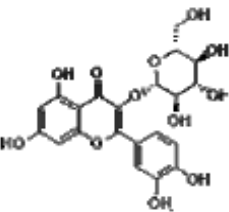
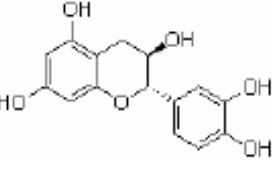
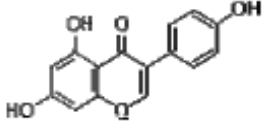
Los polifenoles son moléculas con estructuras cíclicas sin aporte energético, son producto del metabolismo secundario en plantas y se encuentran en todos los alimentos y en gran parte de los seres vivos, estos compuestos fenólicos se clasifican en distintos grupos por su estructura o la facilidad de extracción, por eso la primera clasificación es en extraíbles y no extraíbles (Arranz y col., 2006).

1.4.1 Polifenoles extraíbles

En esta clasificación entran una amplia variedad de moléculas de tamaño relativamente pequeño, en comparación con los no extraíbles, y por lo general son los que no se encuentran inmersos en la pared celular de la matriz alimentaria, por esta razón son los más estudiados hasta el momento y se les atribuyen propiedades

químicas y biológicas como la actividad antioxidante, la actividad quelante para algunos metales, capacidad de precipitar proteínas, entre otras. Estos compuestos al estar libres de la pared celular del alimento son accesibles a solventes orgánicos para su extracción, de ahí su nombre. Los polifenoles son denominados como extraíbles ya que se pueden obtener con solventes polares próticos como alcoholes, agua o incluso solventes polares apróticos como la acetona.

Acorde con su estructura estos igual pueden separarse en hidrolizables y condensados; son derivados del ácido gálico o elágico (Arranz y col., 2006), podemos ver algunos ejemplos en la figura 8.

<p>ÁCIDOS BENZOICOS</p>	<p>Ácido <i>p</i>-hidroxibenzoico Ácido gálico Ácido protocatéquico Ácido vanílico Ácido siríngico Ácido elágico Ácido tánico Ácido gentísico</p>	 <p>The image shows two chemical structures. The top one is p-hydroxybenzoic acid, consisting of a benzene ring with a carboxylic acid group (-COOH) and a hydroxyl group (-OH) in the para position. The bottom one is gallic acid, which consists of a central benzene ring with three hydroxyl groups (-OH) at the 2, 4, and 6 positions, and three galloyl groups (-O-CO-C6H2(OH)3) attached at the 1, 3, and 5 positions.</p>
<p>ÁCIDOS HIDROXICINÁMICOS</p>	<p>Ácido clorogénico Ácido cafeico Ácido ferúlico Ácido sinápico Ácido <i>trans</i>-cinámico</p>	 <p>The image shows the chemical structure of chlorogenic acid, which is a hydroxycinnamic acid derivative. It features a central benzene ring with a methoxy group (-OCH3) and a hydroxyl group (-OH) in the meta position, and a propenoic acid side chain (-CH=CH-COOH) in the para position.</p>
<p>FLAVONOLES</p>	<p>Rutina Quercetina Miricetina Kaemferol Glicosidos de quercetina</p>	 <p>The image shows the chemical structure of rutin, a flavonol glycoside. It consists of a quercetin aglycone (a flavone with hydroxyl groups at positions 3, 5, and 7) linked via an ether bond to a glucose molecule at the 3-position.</p>
<p>FLAVANOLES</p>	<p>Catequina Epicatequina Galocatequina Epicatequin galato Epigallocatequin galato Galocatequin galato</p>	 <p>The image shows the chemical structure of epigallocatechin gallate (EGCG), a flavan-3-ol polyphenol. It consists of an epigallocatechin aglycone (a flavan-3-ol with hydroxyl groups at positions 2, 5, and 7) linked via an ester bond to a gallic acid moiety at the 3-position.</p>
<p>ISOFLAVONAS</p>	<p>Daicina Genistina Daiceína Genisteína</p>	 <p>The image shows the chemical structure of daidzein, an isoflavone. It consists of a chromone core with hydroxyl groups at positions 5 and 7, and a 4-hydroxyphenyl group at position 3.</p>

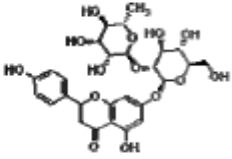
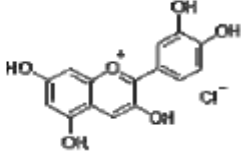
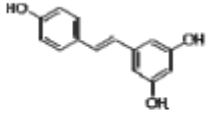
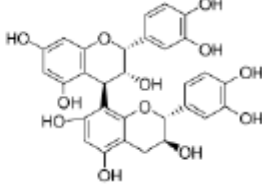
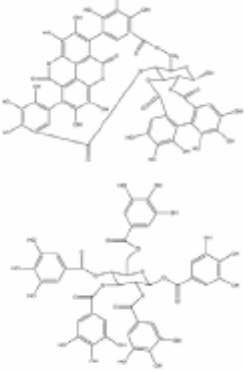
<p>FLAVANONAS</p>	<p>Naringenina Naringina Hesperetina Hesperidina Floricina</p>	
<p>ANTOCIANIDINAS</p>	<p>Malvidina Cianidina Delfinidina Petunidina Glicósidos de antocianidinas</p>	
<p>ESTILVENOS</p>	<p>Resveratrol</p>	
<p>PROANTOCIANIDINAS EXTRAÍBLES</p>	<p>Dímeros A, B Oligómeros (GP 3-10) Polímeros</p>	
<p>TANINOS HIDROLIZADOS</p>	<p>Oligómeros de ácidos benzoicos y ácidos hidroxicinámicos</p>	

Figura 8. Ejemplo de polifenoles extraíbles (Arranz y col., 2006).

1.4.2 Polifenoles no extraíbles

Estas moléculas igual son metabolitos secundarios en las plantas y al igual que los extraíbles aún no se ha definido bien su función dentro de la planta, son moléculas de gran tamaño en comparación con los extraíbles. Estas moléculas han sido subestimadas ya que no se encuentran dentro de los análisis rutinarios de alimentos por su inaccesibilidad a solventes debido a que se encuentran inmersos en la pared celular. Estos polifenoles se encuentran en una mayor concentración en comparación con los extraíbles, los más abundantes en la naturaleza y tienen

propiedades farmacológicas que promueven y fomentan la salud humana (Arranz y col., 2006).

Estos polifenoles, también llamados taninos, tienen características estructurales que al igual que los extraíbles pueden separarlos en hidrolizables y condensados, en este grupo de los polifenoles no extraíbles no se han realizado muchos estudios que no permitan saber si hay una mayor concentración de condensados con respecto a los hidrolizables (Arranz y col., 2006), en la figura 10 tenemos unos ejemplos de estos compuestos.

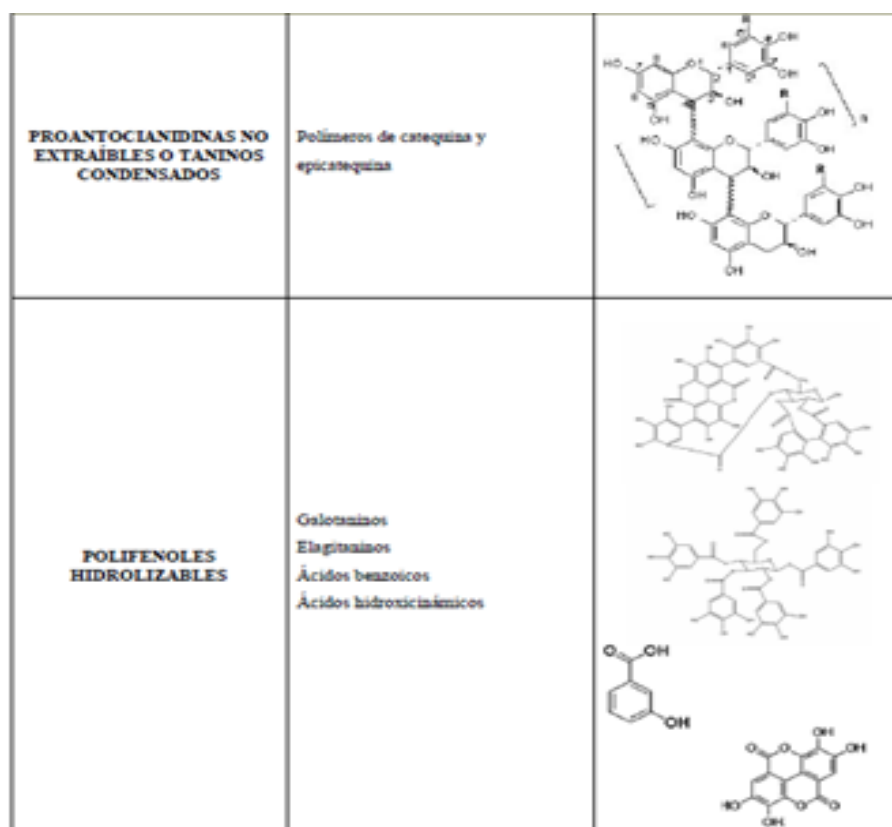


Figura 9. Ejemplo de polifenoles no extraíbles (Arranz y col., 2006).

1.5 Melaninas

Las melaninas son polímeros de estructura muy compleja que le dan color a la piel, ojos y cabello de humanos y animales, se encuentran presentes naturalmente en hongos y es sintetizada en plantas conforme avanza su desarrollo, son producto de

la oxidación de mono y difenoles por acción de la polifenol oxidasa. El mecanismo para su síntesis ha sido estudiado ampliamente por distintos autores ya que generalmente en frutas y hongos se busca su inhibición porque su presencia es señal de pérdida de calidad en estos productos agroalimentarios (Mondal y col., 2018).

El mecanismo de reacción comienza en presencia de oxígeno con la detección de un mono o difenol (DOPA), monofenol como la tirosina, por una enzima con actividad polifenol oxidasa, como la tirosinasa, oxidando al fenol para tener una o-quinona (Dopaquinona), la cual por acción de la misma enzima y en presencia de oxígeno es oxidada nuevamente para convertirla en ciclodopa que posteriormente se convierte en un dopacromo y que por reacciones de autooxidación espontánea sintetizan el dihidroxi indol (DHI) el cual se polimeriza para la formación de las melaninas como se observa en la figura 11 (Mondal y col., 2018).

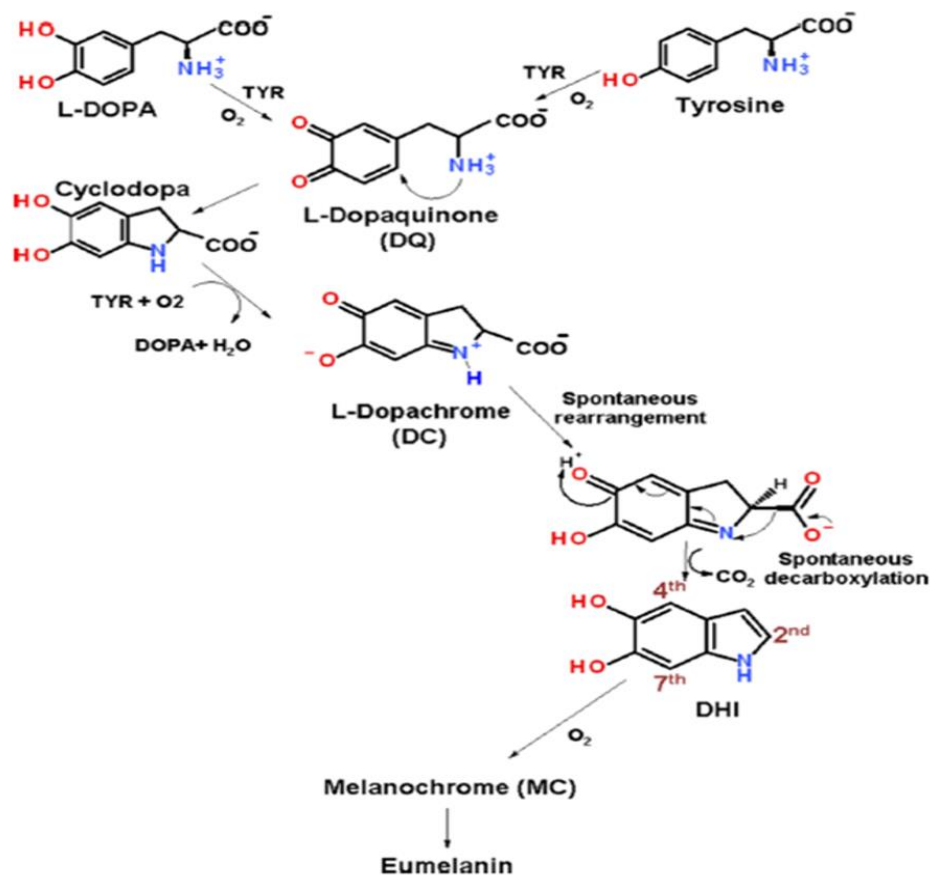


Figura 10. Reacción de síntesis de melaninas (Mondal y col., 2018).

Las melaninas tienen propiedades químicas como la actividad quelante de metales y actividad antioxidante, son insolubles en agua y en solventes orgánicos, excepto

en dimetil sulfóxido (DMSO) y en soluciones alcalinas, su característico color negro se decolora en presencia de agentes oxidantes como el peróxido de hidrógeno, forman precipitado color plateado al reaccionar con el nitrato de plata amoniacal, se precipitan en soluciones ácidas, y forma un precipitado de color café al reaccionar con el FeCl_3 .

Las melaninas tienen como propiedad biológica la actividad antimicrobiana.

Han cobrado relevancia en la industria cosmética y de alimentos, en la industria cosmética tienen la funcionalidad de ser el pigmento con el que asemejan el tono de la piel en maquillajes y el color de cabello oscuro en tintes, mientras que en la industria alimentaria sólo es pigmento oscuro para té, cafés solubles y algunos licores.

También tienen aplicaciones como semiconductores orgánicos en equipos biomédicos además de que tienen otras aplicaciones por su efectividad para combatir gran variedad de microorganismos patógenos.

La síntesis de melaninas es una reacción ampliamente estudiada; varios autores han determinado ya las velocidades de reacción en cada etapa como se muestra en la figura 12 (Mondal y col., 2018).

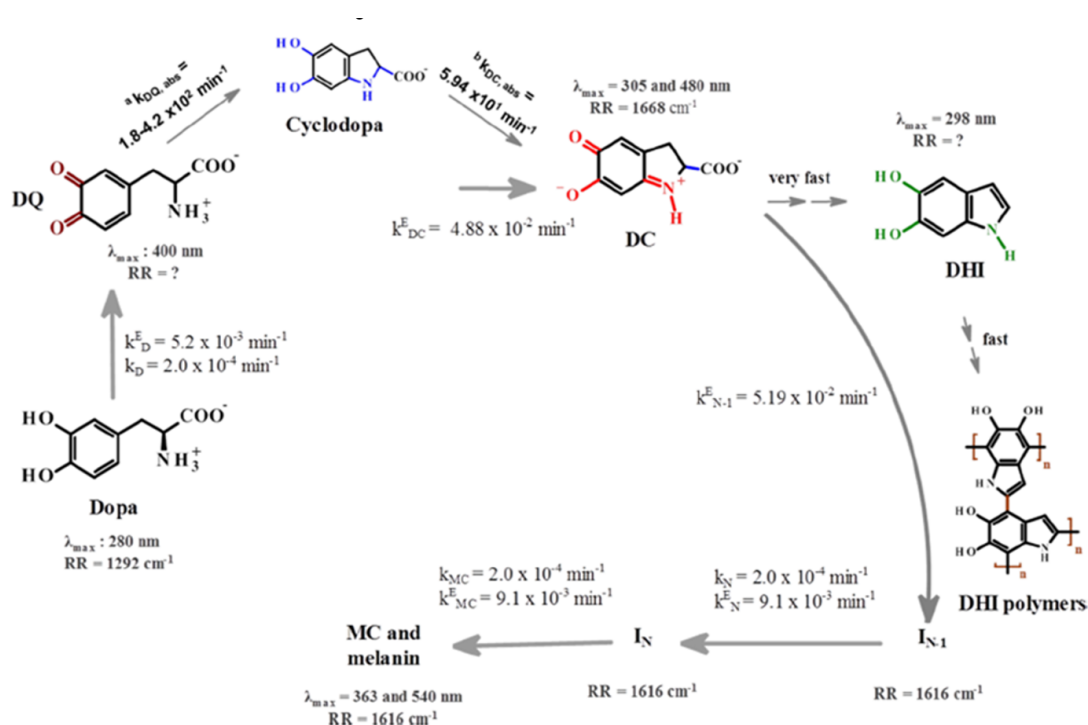


Figura 11. Reacción de melanización con la constante de velocidad de cada etapa (Mondal y col., 2018).

2 Antecedentes

Para esta tesis se tomaron como antecedentes distintos y diversos trabajos dependiendo de la etapa del proyecto que se fuera a realizar, al principio se tenía que llevar a cabo la extracción de compuestos fenólicos y la optimización de las condiciones para esta, por esto mismo se revisaron ejemplos como el realizado por Fulgencio Saura Calixto en 2006 en donde implementaban una metodología de extracción de compuestos fenólicos extraíbles para posteriormente una cuantificación del contenido de estos compuestos en alimentos comunes en la dieta española y analizando algunas de las características de dichos compuestos.

Para lo referente a las enzimas con actividad polifenol oxidasa se buscaron trabajos relacionados directamente con el aislamiento de dichas enzimas, para ser esto algo más específico se buscaron unos en donde las enzimas aisladas fueran provenientes de amaranto y de hongo, en específico *Pleurotus ostreatus*, de estos trabajos se obtuvo la metodología para la elaboración de un buffer de extracción específico para enzimas con actividad polifenol oxidasa, esto se encontró en los trabajos publicados por Murniati en el 2018 para el caso del cuerpo fructífero del hongo y de Moosavi en el 2009 para el amaranto. En ambos trabajos se realizaron caracterizaciones de los extractos crudos enzimáticos con actividad polifenol oxidasa.

Para la parte de la formación de pigmentos oscuros se tomó una tesis de maestría titulada “Identificación de extractos de fuentes naturales con actividad inhibitoria de tirosinasa”, dicho trabajo fue realizado en el 2013 por la en ese momento ingeniera en alimentos Frida M. Paredes Ruiz en donde se obtuvieron fracciones de péptidos que funcionaron como sustrato de la tirosinasa transformándose así en inductores de reacciones de obscurecimiento enzimático, obteniendo de esta forma extractos tipo melaninas a partir de estos hidrolizados proteínicos, los cuales fueron extraídos del grano de amaranto, logrando de esta forma reacciones de melanización de dichos péptidos. Para este trabajo el sustrato de la enzima fueron los hidrolizados proteínicos del amaranto mientras que en este trabajo los sustratos serán los polifenoles extraíbles y no extraíbles del rastrojo de amaranto y el *P. ostreatus*.

3 Justificación

La justificación de este trabajo está sustentada en 6 puntos que son los siguientes:

- 1- Los polifenoles no extraíbles son los más abundantes en la naturaleza y al momento no se han utilizado para un fin particular.
- 2- Los polifenoles no extraíbles tienen propiedades farmacológicas para fomentar la salud humana.

3- El rastrojo de amaranto y *Pleurotus ostreatus* son fuentes naturales de polifenol oxidasas y de polifenoles no extraíbles.

4- Las melaninas se producen de manera natural en la matriz alimentaria por lo tanto podrán sintetizarse en el laboratorio utilizando los polifenoles extraíbles y no extraíbles y la polifenol oxidasa de estos alimentos.

5- Las melaninas sintéticas tienen un uso importante en la industria de los cosméticos y alimentaria.

6- La obtención de productos con valor agregado a partir del rastrojo de amaranto podría incentivar la industrialización de este cultivo que a la fecha es poco utilizado.

4 Hipótesis

Se lograrán establecer las condiciones óptimas de extracción de compuestos polifenólicos y de enzimas con actividad polifenol oxidasa a partir de amaranto y de cuerpo fructífero de *Pleurotus ostreatus*.

5 Objetivos

5.1 Objetivo general

Determinar la cantidad de compuestos polifenólicos y actividad polifenol oxidasa en extractos del rastrojo de amaranto y cuerpo fructífero de *Pleurotus ostreatus*.

5.1.1 Objetivos específicos

- Optimizar las condiciones de extracción de polifenoles extraíbles y no extraíbles del rastrojo de amaranto y *Pleurotus ostreatus*.

- Aislar y caracterizar parcialmente la polifenol oxidasa de rastrojo de amaranto y de *Pleurotus ostreatus*.

6 Metodología

Para la metodología de este proyecto se realizó un plan de trabajo que comprendió de las siguientes etapas:

- Obtención de la harina del hongo y del rastrojo de amaranto
- Extracción de los polifenoles extraíbles
- Liberación de los polifenoles no extraíbles
- Aislamiento y caracterización parcial de los extractos crudos enzimáticos con actividad polifenol oxidasa

Para este trabajo se utilizaron los siguientes materiales, reactivos y equipos:

Materiales:

- El hongo *Pleutorus ostreatus* de tercera categoría adquirido en la central de abasto de la Ciudad de México seleccionado como el de menor o nulo valor comercial y llevado en bolsas a la planta piloto.
- Rastrojo de amaranto fue obtenido en la zona de Tulyehualco en la Ciudad de México llevado a la planta piloto en costales, así fue vendido como desecho los productores de amaranto de la zona.
- Hojas y tallo de huauzontle adquiridas en Wal-Mart seleccionando las más frescas y transportadas en bolsas hasta la planta piloto

Reactivos:

- Metanol absoluto
- Acetona
- Ácido sulfúrico 98% de pureza
- EDTA
- Tritón X-100
- Solución saturada de carbonato de calcio
- Reactivo de Folin
- Reactivo de Bradford
- Polivinil pirroladona (PVP)
- Citrato de sodio
- Ácido cítrico
- Pirogalol

Equipos:

- Deshidratador de alimentos (de aire) de uso doméstico marca Hamilton-Beach modelo 32100^a color gris obtenido en Sam's Club México.
- Licuadora de uso doméstico marca Oster reversible modelo Best-02-E01.
- Modelo de café, semillas y alimentos marca Krups modelo Gx410011.
- Cedazo o tamiz de cocina con 4 mallas intercambiables.

- Centrifuga marca Rotina modelo 420.
- Espectrofotómetro marca Thermo Spectronic modelo Genesys 10.
- Baño maría Vwr.
- Reactor de 0.5 L de tamaño con condiciones de presión constante y temperatura controlada

6.1 Obtención de la harina

6.1.1 Obtención de harina de *Amaranthus hypochondriacus* L.

- El rastrojo del amaranto al ya estar seco se sometió directamente a la pulverización en la licuadora Oster.
- Una vez pulverizado fue tamizado en el Cedazo con la malla con tamaño de orificio más pequeño para buscar un tamaño homogéneo de partícula, aproximadamente 40 μm .
- Una vez tamizado se reservó en un frasco de vidrio lavado completamente seco (secado al sol por 2 horas y posteriormente con un trapo seco y limpio) y etiquetado adecuadamente con fecha en la que se elaboró y se guardó en el refrigerador preferentemente.

6.1.2 Obtención de harina de *Pleurotus ostreatus*

- El hongo se colocó en el deshidratador Hamilton-Beach a 65°C por aproximadamente 12 h, esto hasta llegar a una humedad del 12%.
- El producto deshidratado fue pulverizado en la licuadora Oster.
- El producto fue tamizado con la malla de tamaño más pequeño del Cedazo domestico para obtener el tamaño de partícula lo más homogéneo posible, aproximadamente 40 μm .
- Ya teniendo la harina esta se guardó en un frasco de vidrio limpio y seco (secado por dos horas al sol y después con un trapo limpio) y se guardó en el refrigerador.

6.2 Extracción de polifenoles

6.2.1 Extracción de polifenoles extraíbles polares

- Se tomó una muestra 0.5 g de harina y se colocó en un matraz al que se le añadió 10 mL de una solución de metanol-agua en distintas concentraciones

(10% v/v metanol, 50% v/v metanol y 90% v/v metanol) para una optimización.

- Este matraz ya con la solución de disolvente y la harina se colocó en el baño maria con temperatura controlada a distintas temperaturas (20° C, 35° C y 50° C) por distintos tiempos (20, 40 o 60 min) en busca de las condiciones óptimas de extracción.
- Una vez que haya transcurrido el tiempo esta mezcla se sometió a centrifugación a 2500 rpm por 10 min.
- Una vez que terminó la centrifugación se separó el sobrenadante, que es donde se encuentran los polifenoles extraíbles polares, del precipitado.
- Al sobrenadante se le realizó la cuantificación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu (Singleton y col., 1998).

6.2.2 Extracción de los polifenoles extraíbles con polaridad intermedia.

- Se tomó el precipitado de la extracción metanólica se colocó en un matraz al que se le añadió 10 mL de una solución de acetona-agua en distintas concentraciones (10% v/v acetona, 50% v/v acetona y 90% v/v acetona) para una optimización.
- Este matraz ya con la solución de disolvente y la harina se colocó en el baño maria con temperatura controlada a distintas temperaturas (20° C, 35° C y 50° C) por distintos tiempos (20, 40 o 60 min) en busca de las condiciones óptimas de extracción.
- Una vez que haya transcurrido el tiempo esta mezcla se sometió a centrifugación a 2500 rpm por 10 min.
- Una vez que terminó la centrifugación se separó el sobrenadante, que es donde se encuentran los polifenoles extraíbles polares, del precipitado.
- Al sobrenadante se le realizó la cuantificación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu (Singleton y col., 1998)

6.2.3 Liberación de polifenoles no extraíbles

- Se tomó el precipitado de la extracción con acetona de hongo o de rastrojo de amaranto y se colocará dentro del reactor.
- Se agregó una solución de H₂SO₄ –agua (5% v/v ácido, 7.5% v/v ácido y 10% v/v ácido) para la hidrólisis de la pared celular en donde se encuentran inmersos los polifenoles no extraíbles, esto a diferentes temperaturas (90° C, 120° C y 150° C) por diferentes tiempos (80 min, 100 min y 120 min), todo esto en busca de la optimización de las condiciones de liberación de polifenoles mediante por hidrólisis de la pared celular.
- Una vez terminado ese tiempo se llevó a centrifugación

- Terminada la centrifugación se separó el sobrenadante del precipitado. Se realizó una cuantificación de polifenoles totales, por el método de Folin-Ciocalteu (Singleton y col., 1998), al sobrenadante.

La cuantificación de polifenoles se lleva a cabo con el método de Folin-Ciocalteu, para esto se necesita el reactivo de Follin Ciocalteu se prepara poniendo en ebullición por 10 h una mezcla de 100g de Tungstato de sodio, 25g de molibdato de sodio ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 100 mL de HCl concentrado, 50 mL de ácido fórfico al 85% y 700 mL de agua. Posteriormente se agrega a la mezcla 150g de sulfato de litio lo que le confiere un intenso color amarillo. La oxidación de los fenoles, presentes en la muestra, causa la aparición de una coloración azulada que presenta un máximo de absorción a 765 nm, y que se cuantifica por espectrofotometría en base a una recta patrón de ácido gálico. Los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo bajo condiciones alcalinas (Chung y col., 1998). Reacción de los compuestos polifenólicos con el reactivo de Follin Ciocalteu

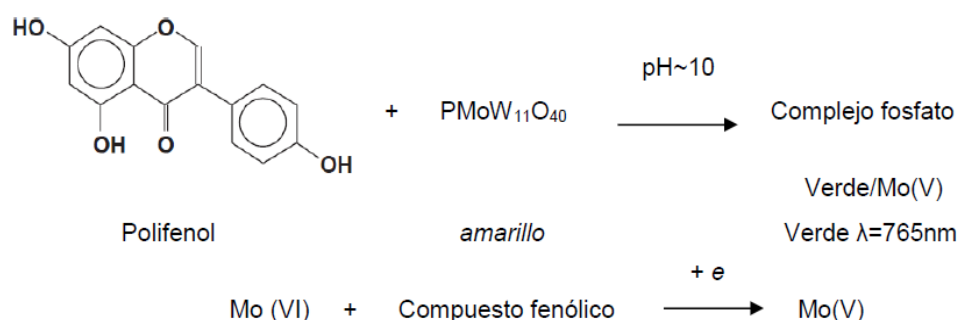


Figura 12. Reacción entre el reactivo de Folin y un polifenol.

Procedimiento experimental

- Se realizó la curva patrón de ácido gálico, ver anexo II.
- Las muestras se prepararon de acuerdo a la siguiente tabla.
- Después de una hora de reacción se leyeron las muestras a 725nm.

El contenido total de polifenoles se calculó en equivalentes de ácido gálico. Se evaluaron todos los extractos obtenidos.

La optimización ha sido realizada evaluando el efecto de cada factor sobre la respuesta experimental, sin embargo, la mayor desventaja de éste proceso es que no estudia las posibles interacciones entre todos los factores involucrados en el sistema, siendo incapaz de describir los efectos de las variables sobre la respuesta de estudio. Con el objetivo de disminuir estos problemas, se han

desarrollado distintas técnicas, una de ellas es el método de superficie de respuesta (Moreno y col., 2015).

El método de superficie de respuesta se realiza siguiendo el siguiente modelo matemático (Gutiérrez-Pulido, 2004).

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j} \beta_{ij} x_i x_j + \sum_{k=1}^k \epsilon_k$$

Este modelo nos permite observar el efecto de cada factor, así como las interacciones al mismo tiempo, en este caso se utilizó el diseño Box Behnken es el adecuado ya que al ser la combinación de un doble factorial en un solo sistema podemos ver la interacción entre dos o más factores con más de un nivel cada uno manteniendo todo dentro de un dominio definido y establecido dependiendo de la naturaleza de los datos evaluados (Gutiérrez-Pulido, 2004).

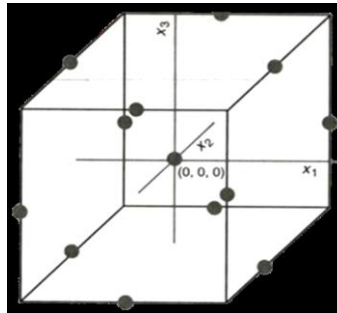


Figura 13. Modelo general tridimensional del diseño experimental Box Behnken.

6.3 Obtención de extractos crudos enzimáticos con actividad polifenol oxidasa

6.3.1 Obtención del extracto crudo enzimático con actividad polifenol oxidasa de rastrojo de amaranto

Para este trabajo utilizaremos el método propuesto por Moosavi en el 2009 que va en el siguiente orden:

- Colocar una muestra de la harina del rastrojo de amaranto en un matraz
- Poner un buffer de extracción (buffer de fosfato pH6.8 0.1M) en una relación de 2mL de este buffer por cada 0.1g de harina

- Dejar en este buffer por aproximadamente 10 minutos a 25°C
- Pasado este tiempo se toman 6mL de la solución y de le agregan 0.3mmol de buffer de fosfato, 0.005mmol de pirogalol y se deja por cinco minutos
- Pasado este tiempo se le agregan 0.05mmol de ácido sulfúrico
- Se lleva a centrifugación a 14000rpm por 15 minutos
- El sobrenadante es el extracto crudo de la enzima polifenol oxidasa

6.3.2 Obtención del extracto crudo enzimático con actividad polifenol oxidasa de *Pleurotus ostreatus*

Para este nos basaremos en la metodología propuesta por Murniati en el 2018 que va en el siguiente orden:

- Colocar una muestra de harina de hongo en un matraz
- Agregar un buffer de extracción (buffer de citrato pH 7 0.1M) y dejar ahí aproximadamente una hora
- Una vez terminado este tiempo colar con gasa y del líquido tomar 10mL
- A este líquido agregar buffer de citrato pH 7 0.1M, EDTA y PVP
- Mantener en agitación a 4°C por una hora
- Pasado este tiempo llevar a centrifugación
- Terminada la centrifugación conservar el sobrenadante ya que este es el extracto crudo

6.4 Caracterización parcial de los extractos crudos enzimáticos con actividad polifenol oxidasa

Primero de determinará el contenido de proteína total dentro de cada extracto crudo para determinar la actividad enzimática por el método de Bradford. (Bradford, 1976)

El método de Bradford se basa en la variación de absorbancia producida por el cambio de color del azul de Coomassie G-250. De acuerdo a la estructura de la molécula de este colorante se observa que posee dos grupos de aminas terciarias con la carga en resonancia, susceptibles de protonarse. La forma catiónica del colorante es roja, corresponde a la forma doble protonada y su máximo en el espectro de absorción se encuentra a una longitud de onda entre 465 y 470 nm, la

forma neutra es verde, corresponde a la forma simple protonada y tiene su pico de absorción a 650 nm. En cambio, la forma aniónica, corresponde a la forma desprotonada, su carga se debe al grupo sulfónico, es azul y la absorción máxima corresponde a una longitud de onda de aproximadamente 595 nm. Las tres formas (catiónica - neutra - aniónica) se encuentran en equilibrio. (Bradford, 1976)

El azul brillante de Coomassie G-250 interacciona principalmente con los residuos de aminoácidos básicos (histidina, arginina y lisina) aunque los aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina y fenilalanina) contribuyen en alguna medida a la unión colorante-proteína. La variación de absorbancia del azul de Coomassie es proporcional a la cantidad de colorante unido a proteínas, por lo que es también proporcional a la concentración de proteínas en una solución. (Bradford, 1976)

El principio del Método de Bradford es por fijación de la proteína al colorante (no se genera un enlace covalente en la reacción). Para alcanzar la máxima sensibilidad en la variación de la longitud de onda, el colorante debe estar preparado de manera de manera que se encuentre mayoritariamente en la forma doblemente protonada (rojo). Al agregar la solución proteica, los grupos sulfónicos ionizados interactúan electrostáticamente con los residuos cargados positivamente de las proteínas. Esto modifica la estructura de las proteínas, revelando grupos hidrofóbicos que contribuyen en alguna medida a la fijación con el colorante. La unión con la proteína consume la forma aniónica de moléculas del colorante desplazando el equilibrio y produciendo el consiguiente viraje hacia el color azul. (Bradford, 1976)

Para la caracterización parcial de la enzima en este trabajo se medirán dos parámetros, uno será la actividad enzimática, para más exactos la actividad tirosinasa del extracto crudo y el otro parámetro será la cantidad de proteína total en el extracto crudo.

Para la medición de la actividad enzimática se realizará una curva estándar utilizando tirosina y tirosinasa comerciales a diferentes concentraciones que se comparará con la actividad de los extractos crudos sobre la tirosina comercial y de la tirosinasa comercial sobre nuestros extractos de polifenoles, tanto extraíbles polares y no polares como los no extraíbles de ambas matrices alimentarias y de los extractos crudos sobre los mismos extractos de polifenoles obtenidos.

Definiremos 1 unidad de monofenolasa de tirosinasa como la cantidad enzima que produce 1 $\mu\text{mol}/\text{min}$ de dopaquinona.

Para la cuantificación de proteína total en el extracto crudo utilizaremos el método de Bradford (Bradford, 1976), este método espectrofotométrico nos permitirá conocer la cantidad total de proteína en el extracto crudo con actividad polifenol oxidasa de nuestras matrices alimentarias.

Para esto se tomaron tres soluciones como sustratos, una de catecol, una con rutina y una con tirosina, con una concentración inicial de 0.001M a la cual se le agrego el

extracto crudo enzimático, 1mL de extracto y 4 de solución de sustrato, y se les midió absorbancia cada 30 segundos durante 15 minutos para la determinación de la desaparición del sustrato con respecto al tiempo.

7 Resultados

7.1 Extracción de polifenoles

7.1.1 Extracción de polifenoles extraíbles

Todas las determinaciones de la concentración de polifenoles en cada una de las muestras fueron hechas con la ecuación ($y = 0.005x + 0.0149$) que corresponde a la curva patrón de ácido gálico que se muestra en el Anexo II

7.1.1.1 Optimización de las condiciones para la extracción de polifenoles extraíbles polares

7.1.1.1.1 polifenoles extraíbles polares de rastrojo de amaranto

En el caso de los polifenoles extraíbles polares del rastrojo de amaranto se obtuvo el modelo polifenoles totales = $-9.4043151 + 0.16879665[M] + 0.80149997T + 0.4783329t - 0.001534375[M]^2 - 0.00018333309[M]T + 0.0001500017[M]t - 0.0115333T^2 + 0.00093348Tt - 0.006062496t^2$ que corresponde a la siguiente superficie de respuesta (figura 14) que tiene una $R^2 = 0.8124$ y un valor $P=0.0023$

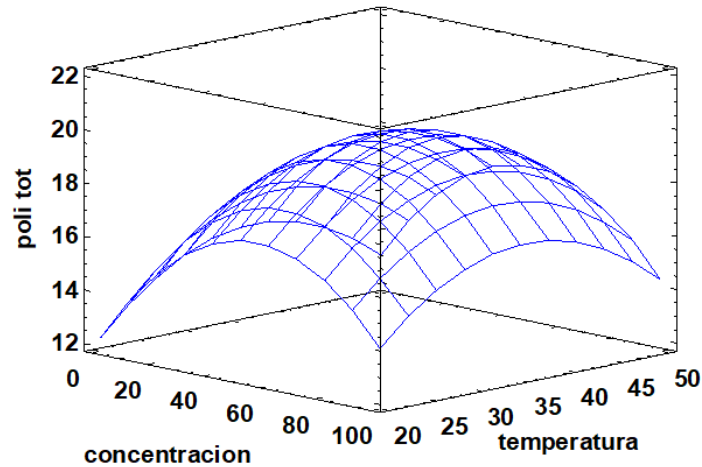


Figura 14. Superficie de respuesta con tiempo fijado en 40 min de la extracción de los polifenoles extraíbles polares de *Amaranthus hypochondriacus* L.

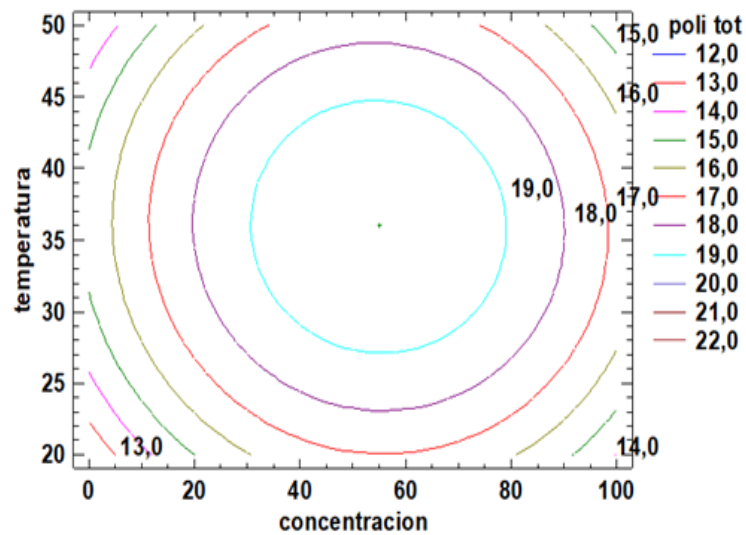


Figura 15. Contornos de la superficie de respuesta con tiempo fijado en 40 min de la extracción de los polifenoles extraíbles polares de *Amaranthus hypochondriacus* L.

Para obtener en promedio 19.95 ± 0.922 mg de ácido gálico/ g, como se observa en la figura 15, de muestra de harina de rastrojo de amaranto se deben tener las condiciones que se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Niveles óptimos de los factores necesarios para una óptima extracción de polifenoles extraíbles polares de *Amaranthus hypochondriacus* L.

Factor	valor optimo
concentración de metanol	55% ± 1% v/v
temperatura	36 ± 1.8°C
tiempo	42.9 ± 0.9 min

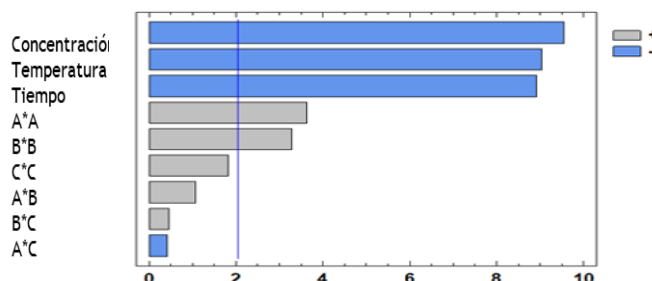


Figura 16. Diagrama de Pareto del modelo de superficie e respuesta para la extracción de polifenoles extraíbles polares de *Amaranthus hypochondriacus* L.

La concentración de metanol, la temperatura y el tiempo fueron significativos, así como el cuadrado de la concentración y la temperatura; como se observa en la figura 16, esto indica que todos los factores tienen influencia significativa sobre la concentración de polifenoles obtenida mediante esta extracción metanólica.

7.1.1.1.2 polifenoles extraíbles polares de *Pleurotus ostreatus*

En el caso de los polifenoles extraíbles polares de *Pleurotus ostreatus* se obtuvo el modelo polifenoles totales = $14,6924 - 0.0627083[M] - 0.0149259T - 0.367125t + 0.00370833[M]^2 + 0.0024[M]T - 0.0018375[M]t + 0.0021037T^2 - 0.00243333Tt + 0.00650833t^2$ corresponde a la siguiente superficie de respuesta (figura 17) que tiene una $R^2 = 0.7289$ y un valor $P=0.000321$

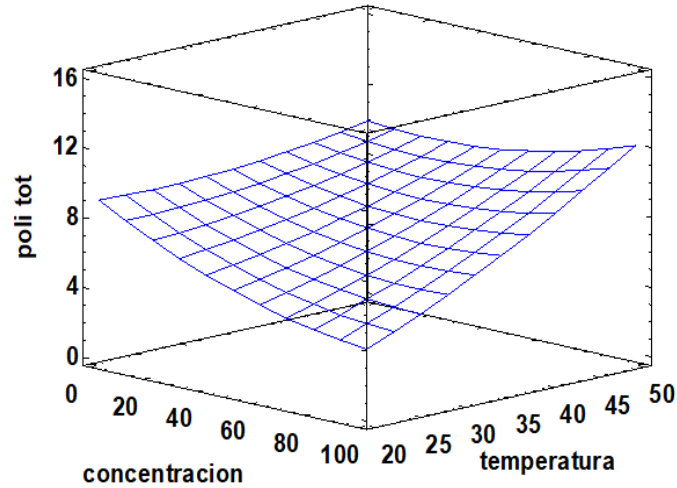


Figura 17. Superficie de respuesta con tiempo fijado en 40 min de la extracción de los polifenoles extraíbles polares de *Pleurotus ostreatus*.

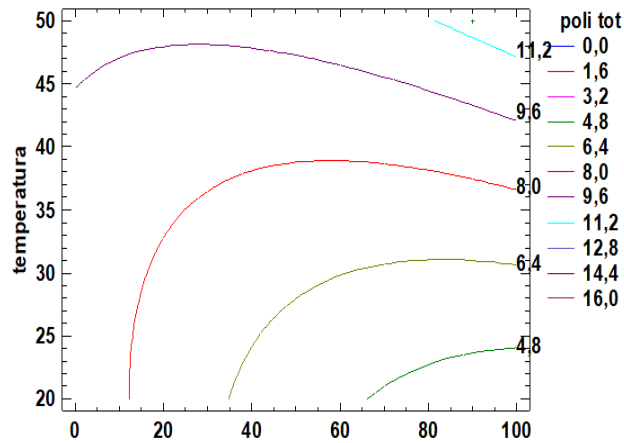


Figura 18. Contornos de la superficie de respuesta con tiempo fijado en 40 min de la extracción de los polifenoles extraíbles polares de *Pleurotus ostreatus*.

Para obtener en promedio 1.695 ± 0.043 mg de ácido gálico/ g de muestra de harina de *Pleurotus ostreatus* se deben tener las siguientes condiciones (tabla 3) esto se observa en la figura 18.

Tabla 3. Niveles óptimos de los factores necesarios para la extracción de polifenoles extraíbles polares de *Pleurotus ostreatus*.

FACTOR	VALOR OPTIMO
CONCENTRACION DE METANOL	90% ± 3% v/v
TEMPERATURA	50 ± 1.2°C
TIEMPO	20.9 ± 1.01 min

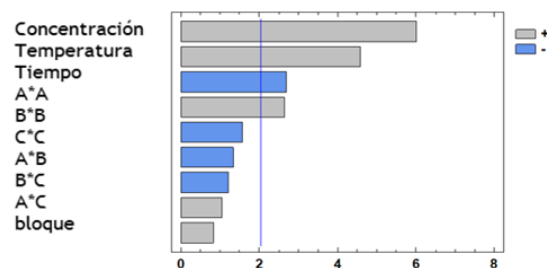


Figura 19. Diagrama de Pareto del modelo de superficie de respuesta para la extracción de polifenoles extraíbles polares de *Pleurotus ostreatus*.

Como se observa en el diagrama de Pareto (figura 19) los tres factores y la el cuadro del factor temperatura y el cuadrado del factor concentración de metanol tienen efecto significativo sobre la concentración de polifenoles obtenida por medio de esta extracción metanólica.

7.1.1.2 Optimización de las condiciones para la extracción de polifenoles extraíbles de polaridad intermedia

7.1.1.1.1 Polifenoles extraíbles de polaridad intermedia de rastrojo de amaranto

En el caso de los polifenoles extraíbles de polaridad intermedia de rastrojo de amaranto se obtuvo el modelo polifenoles totales = $4.82627 + 0.158878[a] - 0.0328319T + 0.0709674t - 0.00215018[a]^2 + 0.00053625[a]T - 0.000194792[a]t + 0.000327778T^2 + 0.000102778Tt - 0.000791359t^2$ correspondiente a la siguiente superficie de respuesta (figura 20) con una $R^2 = 0.8457$ y un valor $P=0.00087$

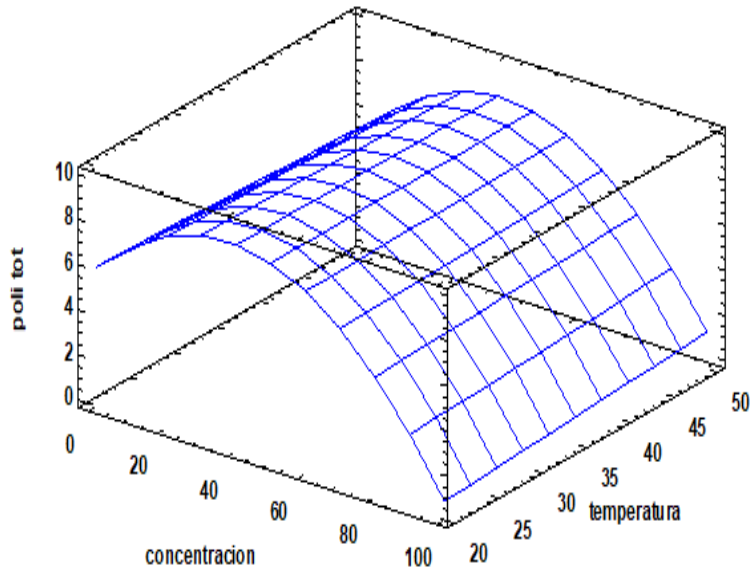


Figura 20. Superficie de respuesta con tiempo fijado en 40 min de la extracción de los polifenoles extraíbles con polaridad intermedia de *Amaranthus hypochondriacus* L.

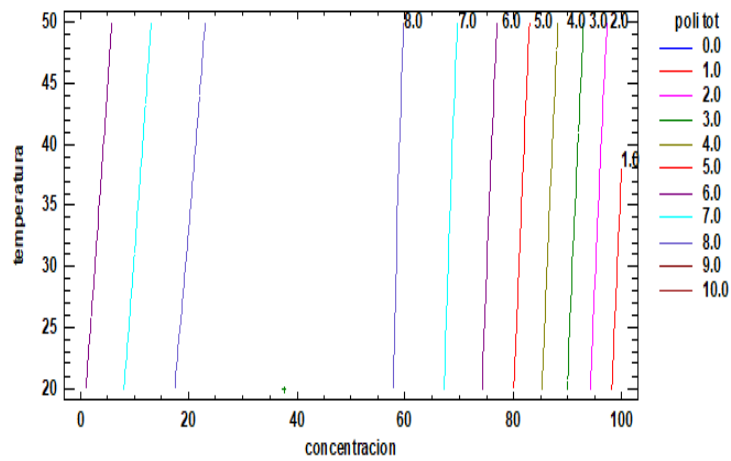


Figura 21. Contornos de la superficie de respuesta con tiempo fijado en 40 min de la extracción de los polifenoles extraíbles con polaridad intermedia de *Amaranthus hypochondriacus* L.

Para obtener en promedio 8.835 ± 0.422 mg de ácido gálico/ g de muestra de harina de rastrojo de amaranto se deben tener las siguientes condiciones (tabla 4) esto se observa en la figura 21.

Tabla 4. Niveles óptimos de los factores necesarios para la extracción de polifenoles extraíbles de polaridad intermedia de *Amaranthus hypochondriacus* L.

Factor	Valor óptimo
concentración de acetona	37.56% ± 2.1% v/v
temperatura	20 ± 0.96°C
tiempo	41.5 ± 0.987 min

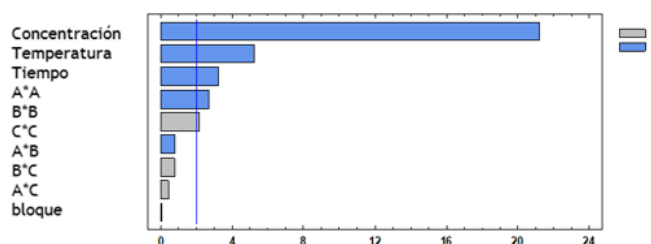


Figura 22. Diagrama de Pareto del modelo de regresión para la extracción de polifenoles extraíbles de polaridad intermedia de *Amaranthus hypochondriacus* L.

Como se observa en el diagrama de Pareto (figura 22) los tres factores y el cuadrado del factor concentración de acetona tienen efecto significativo sobre la concentración de polifenoles obtenida por medio de esta extracción acetónica.

7.1.1.1.2 Polifenoles extraíbles de polaridad intermedia de *Pleurotus ostreatus*

En el caso de los polifenoles extraíbles de polaridad intermedia de *Pleurotus ostreatus* se obtuvo el modelo polifenoles totales = $0.806158 - 0.00455399[a] - 0.000558179T + 0.0134483t - 0.000255642[a]^2 + 0.000225[a]T - 0.000394792[at] - 0.0000542837T^2 + 0.0000225Tt - 0.000197674t^2$ correspondiente a la siguiente superficie de respuesta (figura 23) con una $R^2 = 0.8381$ y un valor $P=0.00021$

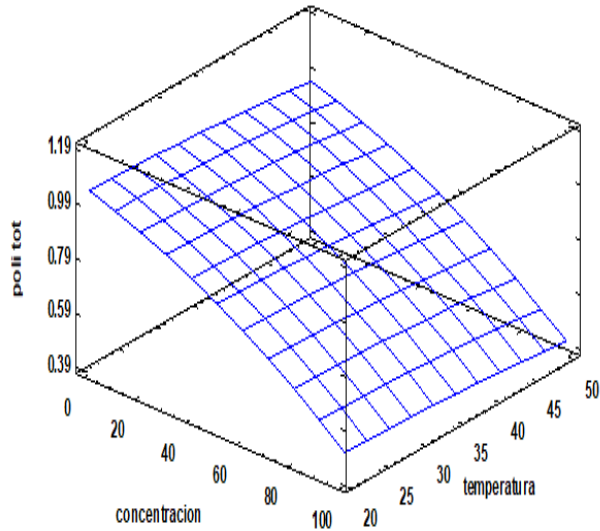


Figura 23. Superficie de respuesta con tiempo fijado en 40 min de la extracción de los polifenoles extraíbles con polaridad intermedia de *Pleurotus ostreatus*.

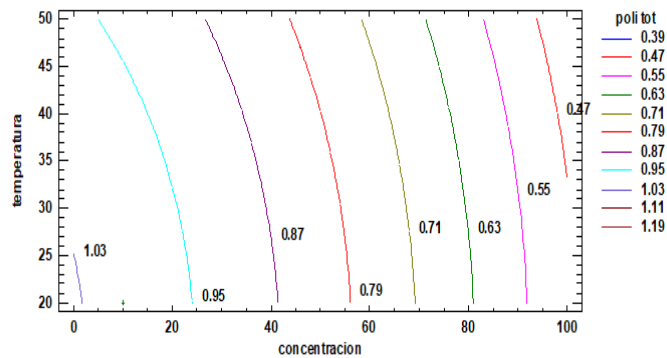


Figura 24. Contornos de la superficie de respuesta con tiempo fijado en 40 min de la extracción de los polifenoles extraíbles con polaridad intermedia de *Pleurotus ostreatus*.

Para obtener en promedio 1.006 ± 0.013 mg de ácido gálico/ g de muestra de harina de rastrojo de amaranto se deben tener las siguientes condiciones (tabla 5) esto se observa en la figura 24.

Tabla 5. Niveles óptimos de los factores necesarios para la extracción de polifenoles extraíbles de polaridad intermedia de *Pleurotus ostreatus*.

Factor	Valor óptimo
concentración de acetona	8.76% ± 0.07% v/v
temperatura	18 ± 1.67°C
tiempo	36.16 ± 1.67 min

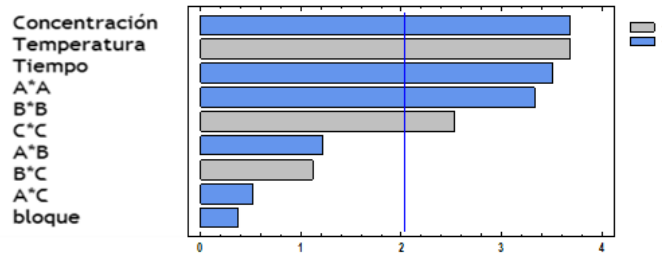


Figura 25. Diagrama de Pareto del modelo de regresión para la extracción de polifenoles extraíbles de polaridad intermedia de *Pleurotus ostreatus*.

Como se observa en el diagrama de Pareto (figura 25) los tres factores y el cuadrado del factor concentración de acetona y el factor temperatura tienen efecto significativo sobre la concentración de polifenoles obtenida por medio de esta extracción acetónica.

7.1.2 Liberación de polifenoles no extraíbles

7.1.2.1 Optimización de las condiciones para la liberación de polifenoles no extraíbles de rastrojo de amaranto

En el caso de los polifenoles no extraíbles del rastrojo de amaranto se obtuvo el modelo polifenoles totales = $178.814 - 19.7388[A] - 1.92219T + 2.26547t + 2.28264[A]^2 + 0.0552889[A]T - 0.24835[A]t - 0.00161219T^2 + 0.0157111Tt - 0.0117837t^2$ correspondiente a la siguiente superficie de respuesta (figura 26) con una $R^2 = 0.6516$ y un valor $P=0.0013$

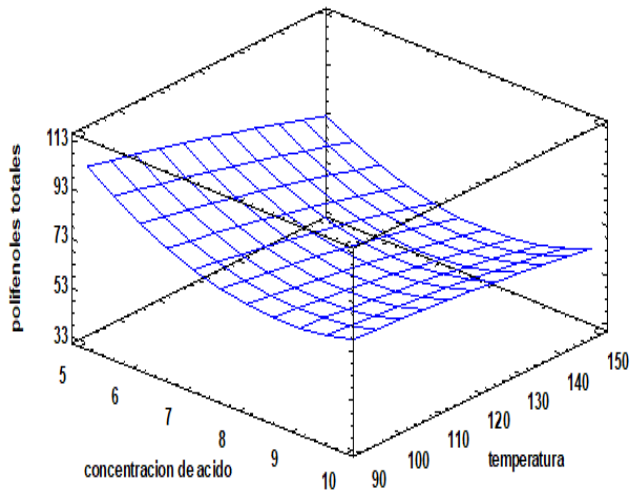


Figura 26. Superficie de respuesta con tiempo fijado en 40 min de la liberacion de los polifenoles no extraíbles de *Amaranthus hypochondriacus* L.

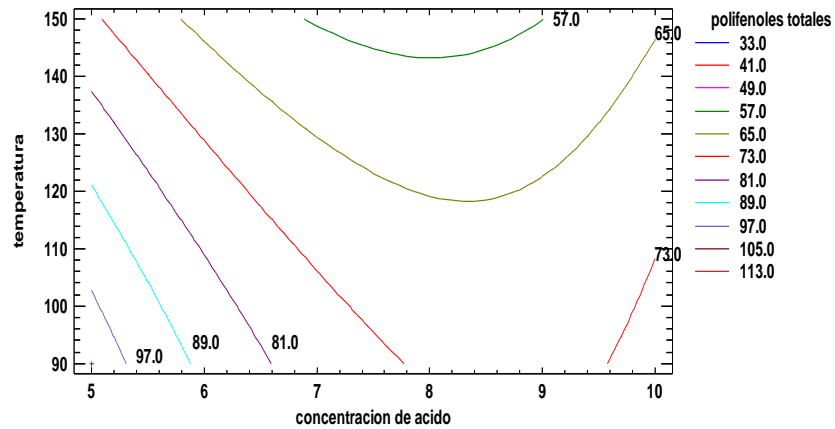


Figura 27. Contornos de la superficie de respuesta con tiempo fijado en 40 min de la liberacion de los polifenoles no extraíbles de *Amaranthus hypochondriacus* L.

Para obtener en promedio $102.084 \pm 2,453$ mg de ácido gálico/ g de muestra de harina de rastrojo de amaranto se deben tener las siguientes condiciones (tabla 6) y esto se puede observar en la figura 27.

Tabla 6. Niveles óptimos de los factores necesarios para la liberación de polifenoles no extraíbles de *Amaranthus hypochondriacus* L.

Factor	valor óptimo
concentración de H ₂ SO ₄	5% ± 0.04% v/v
temperatura	90 ± 1,37°C
tiempo	103,437 ± 2,13 min

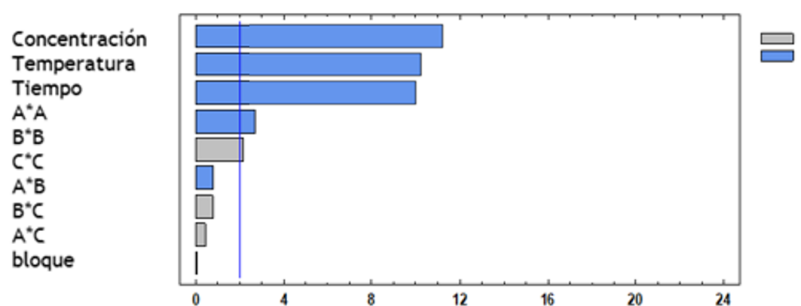


Figura 28. Diagrama de Pareto del modelo de regresión para la liberación de los polifenoles no extraíbles de *Amaranthus hypochondriacus* L.

Como se observa en el diagrama de Pareto (figura 28) los tres factores así como el cuadrado de cada factor tienen efecto significativo sobre la concentración de polifenoles liberada por medio de la hidrólisis ácida de la pared celular.

7.1.2.2 Optimización de las condiciones para la liberación de polifenoles no extraíbles de *Pleurotus ostreatus*

En el caso de los polifenoles no extraíbles de *Pleurotus ostreatus* se obtuvo el modelo: polifenoles totales = $-59.1016 + 8.64482[A] - 0.0263343T + 0.671412t - 0.454558[A]^2 - 0.000864444[A]T - 0.0119517[A]t + 0.0000634414T^2 + 0.000186111Tt - 0,00309747t^2$ correspondiente a la siguiente superficie de respuesta (figura 29) con una $R^2 = 0.8903$ y un valor $P=0.000097$

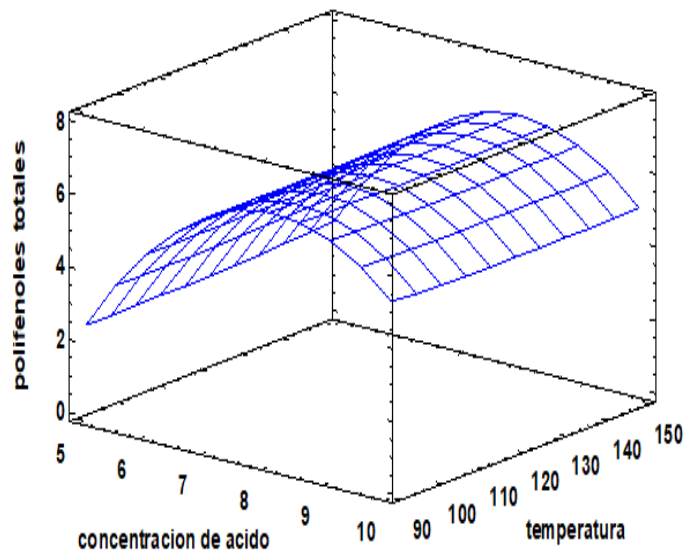


Figura 29. Superficie de respuesta con tiempo fijado en 40 min de la liberación de los polifenoles no extraíbles de *Pleurotus ostreatus*.

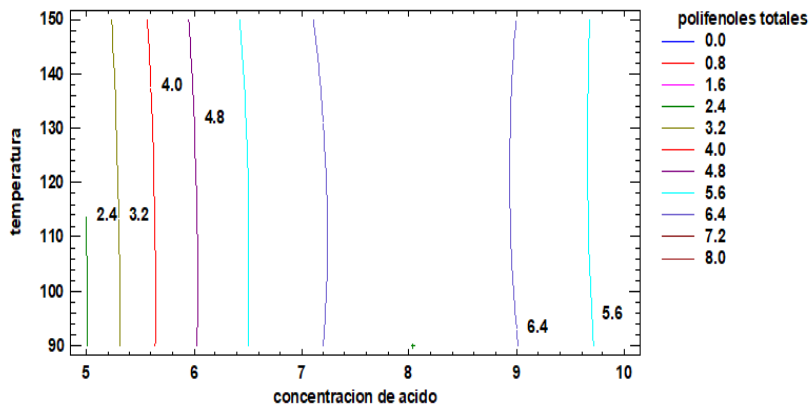


Figura 30. Contornos de la superficie de respuesta con tiempo fijado en 40 min de la liberación de los polifenoles no extraíbles de *Pleurotus ostreatus*.

Para obtener en promedio $6,823 \pm 0.467$ mg de ácido gálico/ g de muestra de harina de rastrojo de amaranto se deben tener las siguientes condiciones (tabla 7) esto se puede observar en la figura 30.

Tabla.7. niveles óptimos de los factores necesarios para la liberación de polifenoles no extraíbles de *Pleurotus ostreatus*

Factor	Valor optimo
concentración de H ₂ SO ₄	8.03% ± 0.01% v/v
temperatura	90 ± 2.57°C
tiempo	97 ± 2.21 min

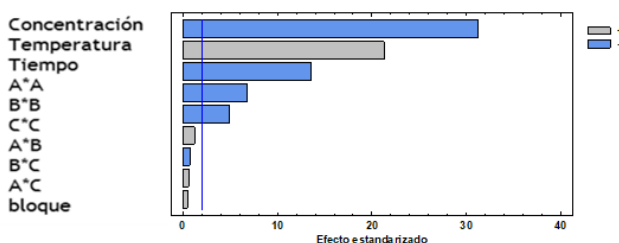


Figura 31. Diagrama de Pareto del modelo de regresión para la liberación de polifenoles no extraíbles de *Pleurotus ostreatus*.

Como se observa en el diagrama de Pareto (figura 31) los tres factores y el cuadrado del factor concentración de ácido y el factor temperatura tienen efecto significativo sobre la concentración de polifenoles liberada por medio de la hidrólisis ácida de la pared celular.

7.2 Cuantificación de proteína total por el método de Bradford

Con ayuda de la ecuación de la recta ($y=2.4367x+0.1366$) de una curva estándar en donde se graficó absorbancia a 595 nm vs concentración de proteína tomando distintas concentraciones de albumina sérica bovina que se muestra en el Anexo I se midió la concentración de proteína total dentro de cada muestra de harina, esto con la finalidad de determinar cuánta enzima hay dentro de cada producto en relación con el contenido proteico total, así determinamos cuántas unidades enzimáticas con actividad polifenol oxidasa hay por g de proteína.

La concentración de proteína en cada extracto se muestra en la tabla 8:

Tabla 8. Contenido de proteína por cada gramo de muestra

Extracto	mg de proteína/g de muestra
<i>P. ostreatus</i> fresco	0.458 ± 0.056
<i>P. ostreatus</i> deshidratado	2.86 ± 0.358
<i>P. ostreatus</i> (Moosavi y col., 2009)	0.480 ± 0.051
Rastrojo de <i>A. hypochondriacus</i> L	2.19 ± 0.327
Hojas de <i>A. hypochondriacus</i> L	0.596 ± 0.018
Hojas con tallo de <i>A. hypochondriacus</i> L.	0.552 ± 0.049
Tallo <i>A. hypochondriacus</i> L.	0.74 ± 0.062
Semillas de <i>A. hypochondriacus</i> L (Murniati y col., 2018)	0.460 ± 0.044

7.3 Evaluación de la actividad enzimática en los distintos extractos crudos obtenidos de *Pleurotus ostreatus* y *Amaranthus hypochondriacus* L.

Se probaron diferentes concentraciones de cada sustrato para determinar los parámetros cinéticos del extracto con cada sustrato utilizado como se observa en las siguientes graficas:

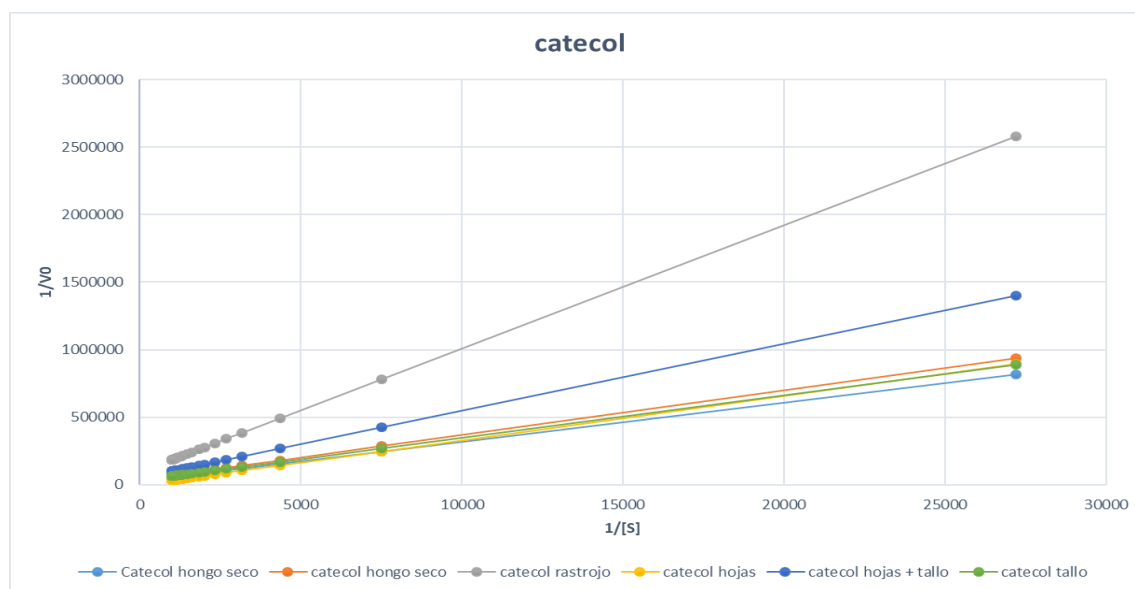


Figura 32. Gráfico de la linealización de la cinética enzimática de los diferentes extractos crudos enzimáticos con actividad polifenol oxidasa con catecol como sustrato.

En la figura 32 se observa como para el caso del catecol quien tiene una mayor velocidad de reacción es el extracto obtenido a partir de *Pleurotus ostreatus* fresco y quien tiene una menor es el rastrojo de *Amaranthus hypochondriacus* L.

Los parámetros cinéticos de este extracto crudo enzimático para este sustrato específico fueron los que se muestran en la tabla 9:

Tabla 9. Datos cinéticos enzimáticos de cada extracto crudo con catecol como sustrato

Extracto	V_{max} ($\mu\text{mol/mL s}$)	K_m (μmol)	UE/mL de mezcla de reacción	UE/g de proteína
<i>P. ostreatus</i> fresco	33.333	96.3	176	384.27
<i>P. ostreatus</i> deshidratado	29.02	96.29	143	151.99
Rastrojo de <i>A. hypochondricus</i> L	10.82	98.4	54.82	114.2
Hojas de <i>A. hypochondriacus</i> L	29.8	97.73	149	168.03
Hojas + tallo <i>A. hypochondriacus</i> L	19.63	97.22	99.01	166.12
Tallo de <i>A. hypochondriacus</i> L	30.05	96.41	153	257.33
<i>P. ostreatus</i> (Moosavi y col., 2009)	30.25	96.59	182	-----
Semilla de <i>A. hypochondriacus</i> L (Murniati y col., 2018)	28.6	98.1	125	-----

Para el caso de la rutina como sustrato los resultados se muestran en la figura 33:

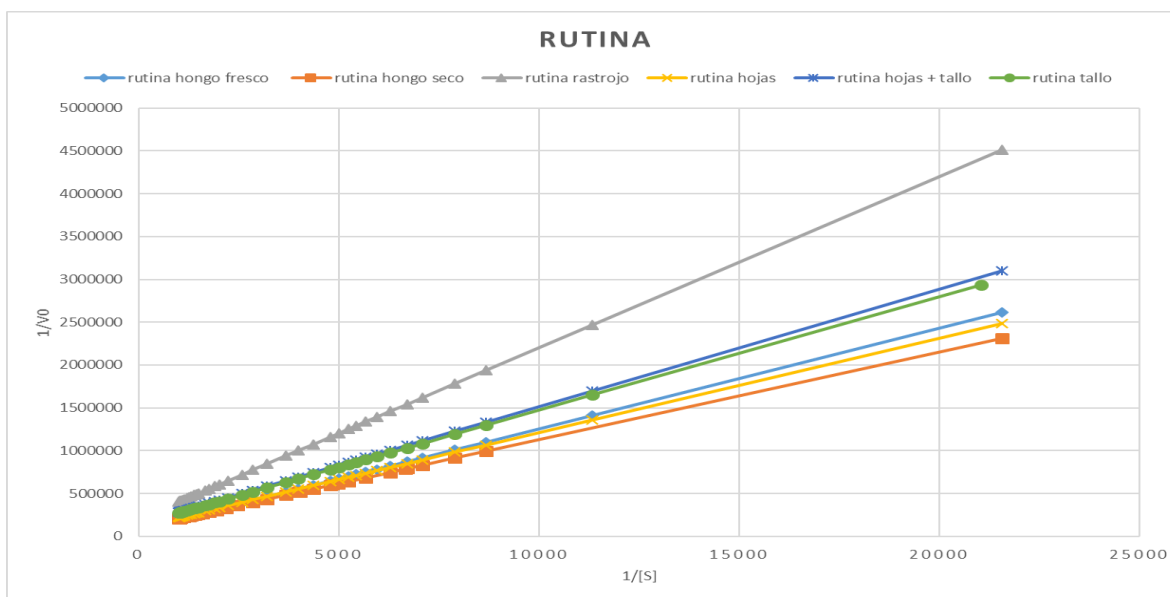


Figura 33. Gráfico de la linealización de la cinética enzimática de los diferentes extractos crudos enzimáticos con actividad polifenol oxidasa con rutina como sustrato.

Y los parámetros cinéticos son los que se muestran en la tabla 10:

Tabla 10. Datos cinéticos enzimáticos de cada extracto crudo con rutina como sustrato

Extracto	V _{max} (μmol/mL s)	K _m (μmol)	UE/mL de mezcla de reacción	UE/g de proteína
<i>P. ostreatus</i> fresco	11.49	135.02	166	362.44
<i>P. ostreatus</i> deshidratado	9.26	94.53	144	150.34
Rastrojo de <i>A. hypochondriacus</i> L	4.83	96.41	53.76	112
Hojas de <i>A. hypochondriacus</i> L	8.55	93.74	148	168.25
Hojas + tallo de <i>A. hypochondriacus</i> L	6.8	93.22	98.1	177.72
Tallo de <i>A. hypochondriacus</i> L	6.94	92.17	152	205.4
<i>P. ostreatus</i> (Moosavi y col., 2009)	9.25	93.9	182	_____
Semilla de <i>A. hypochondriacus</i> L (Murniati y col., 2018)	7.45	101.5	137	-----

Como se muestra una vez más el extracto obtenido con *Pleurotus ostreatus* es quien muestra una mayor velocidad de reacción, aunque su valor de K_m hace que la reacción no sea del todo eficiente ya que su afinidad por el sustrato es alta mientras que el extracto con menor velocidad es nuevamente el de rastrojo de *Amaranthus hypochondriacus* L.

Para el caso de la tirosina se observaron los siguientes comportamientos (figura 34):

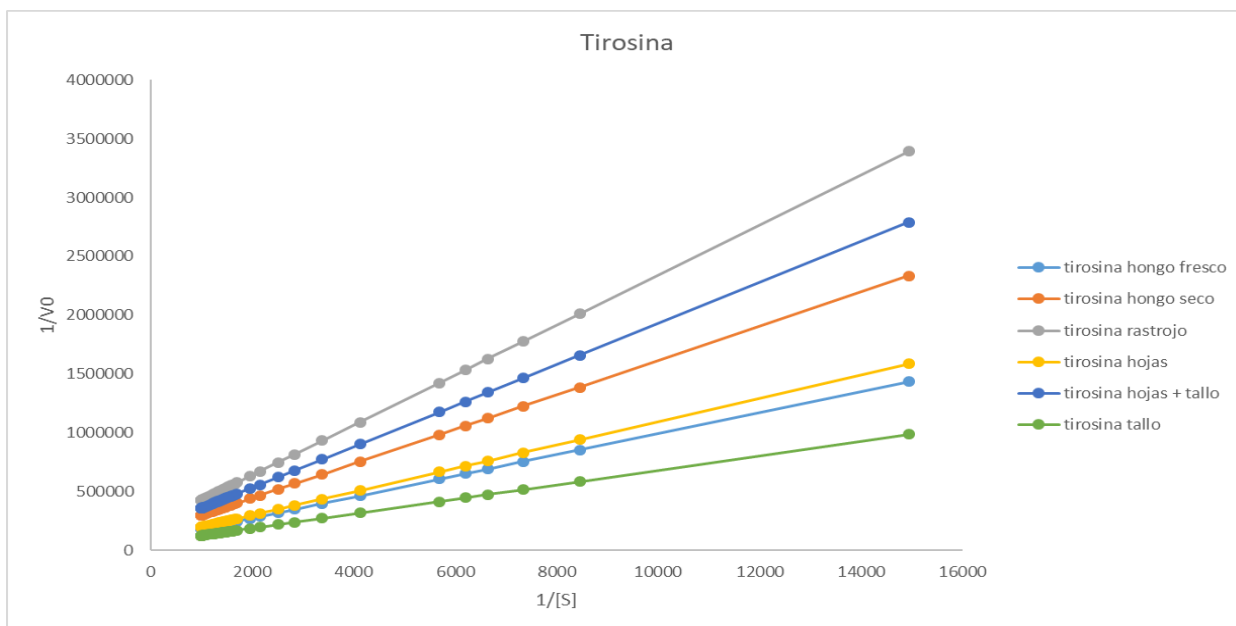


Figura 34. Gráfico de la linealización de la cinética enzimática de los diferentes extractos crudos enzimáticos con actividad polifenol oxidasa con tirosina como sustrato.

Y los parámetros cinéticos se muestran en la tabla 11:

Tabla 11. Datos cinéticos enzimáticos de cada extracto crudo con tirosina como sustrato

Extracto	V_{max} ($\mu\text{mol/mL s}$)	K_m (μmol)	UE/mL de mezcla de reacción	UE/g de muestra
<i>P. ostreatus</i> fresco	12.416	93.4	52.08	113.78
<i>P. ostreatus</i> deshidratado	10.41	93.29	32.05	59.2
Rastrojo de <i>A. hypochondriacus</i> L	4.63	98.33	23.14	36.96
Hojas de <i>A. hypochondriacus</i> L	9.8	94.22	49.01	66.59
Hojas + tallo de <i>A. hypochondriacus</i> L	5.38	93.72	26.88	68.96
Tallo de <i>A. hypochondriacus</i> L	15.2	93.69	79.75	112.53
<i>P. ostreatus</i> (Moosavi y col., 2009)	9.97	92.9	49.2	-----
Semilla de <i>A. hypochondriacus</i> L (Murniati y col., 2018)	9.15	91.52	35.68	-----

Aquí se muestra que a diferencia con los otros sustratos en este caso dos extractos tienen una velocidad de reacción por encima de los demás que son el de *Pleurotus ostreatus* fresco y el de tallo de *Amaranthus hypochondriacus* L.

Para corroborar estos resultados se realizó una comparación de medias para agrupar, una prueba de Tukey en donde se obtuvieron los siguientes resultados:

Para catecol como sustrato el agrupamiento de la variación de medias de la velocidad de reacción por el método de Tuckey se muestra en la tabla 12.

Tabla 12. Agrupamiento de las medias de las velocidades de reacción de los diferentes extractos crudos enzimáticos con actividad polifenol oxidasa con catecol como sustrato.

Media de la velocidad de reacción
16.66 ± 0.923^A
14.51 ± 0.612^B
7.41 ± 0.95^C
9.7 ± 0.9^C
9.82 ± 0.77^C
13.025 ± 923^B

En donde se demuestra ($P^*=0.002$) que entre los extractos obtenidos con rastrojo, hojas y hojas con tallo de *Amaranthus hypochondriacus* L no existen diferencias significativas, así como entre el extracto de *Pleurotus ostreatus* deshidratado y tallo de *Amaranthus hypochondriacus* quedando sólo y con un valor más alto el extracto de *Pleurotus ostreatus* fresco como se había visto en las gráficas.

Para rutina como sustrato los resultados se observan en la tabla 13:

Tabla 13. Agrupamiento de las medias de las velocidades de reacción de los diferentes extractos crudos enzimáticos con actividad polifenol oxidasa con rutina como sustrato.

Media de la velocidad de reacción
5.785 ± 0.425^A
4.63 ± 0.368^B
2.615 ± 0.45^C
4.46 ± 0.152^B
3.4 ± 0.71^C
3.29 ± 0.831^C

En este se demuestra ($P^* < 0.0078$) un comportamiento similar al anterior teniendo como valor más alto al extracto obtenido a partir de *Pleurotu ostreatus* fresco ya que mostro diferencias significativas respecto a los demás.

Para el caso de la tirosina el resultado fue el siguiente:

Tabla 14. Agrupamiento de las medias de las velocidades de reacción de los diferentes extractos crudos enzimáticos con actividad polifenol oxidasa con tirosina como sustrato.

Media de la velocidad de reacción
7.708 ± 0.295^A
5.705 ± 0.923^B
2.315 ± 0.681^C
4.9 ± 0.365^B

2.59 ± 0.431^C
7.6 ± 0.311^A

En este se observa un comportamiento distinto ya que óptimos resultaron dos, el de *Pleurotus ostreatus* fresco y el de tallo *Amaranthus hypochondriacus* L ($P^*=0.012$) este resultado nos hace pensar que se tiene actividad similar en esos dos extractos crudos enzimáticos semejantes en esas dos fuentes.

7.4 Síntesis de melanina

Por problemas causados por la presente pandemia ocasionada por el virus Sars cov 2 ya no se pudo realizar esta prueba en el laboratorio. Sin embargo, debe mencionarse que, durante la medición de la actividad enzimática de los extractos crudos enzimáticos con actividad polifenol oxidasa se observó la formación de pigmentos oscuros en los matraces en donde se llevó a cabo la reacción enzimática con los diferentes extractos, específicamente con el extracto obtenido de *Pleurotus ostreatus* fresco, que fue el que mejores parámetros cinéticos presentó. Se observa que la velocidad de formación de dichos pigmentos dependió del sustrato usado, con el que mayor velocidad de formación se observó fue con el catecol como se mostrará en la siguiente secuencia de imágenes.

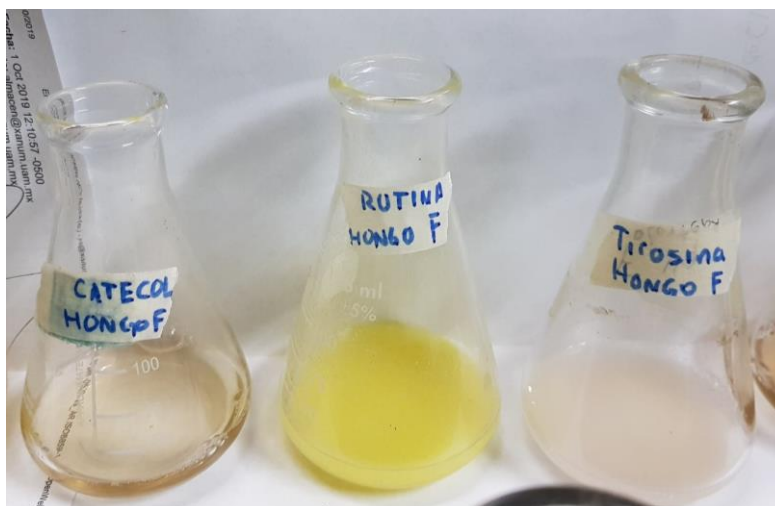


Figura 35. Extracto crudo enzimático con actividad polifenol oxidasa en el tiempo 0 de reacción con los distintos sustratos.

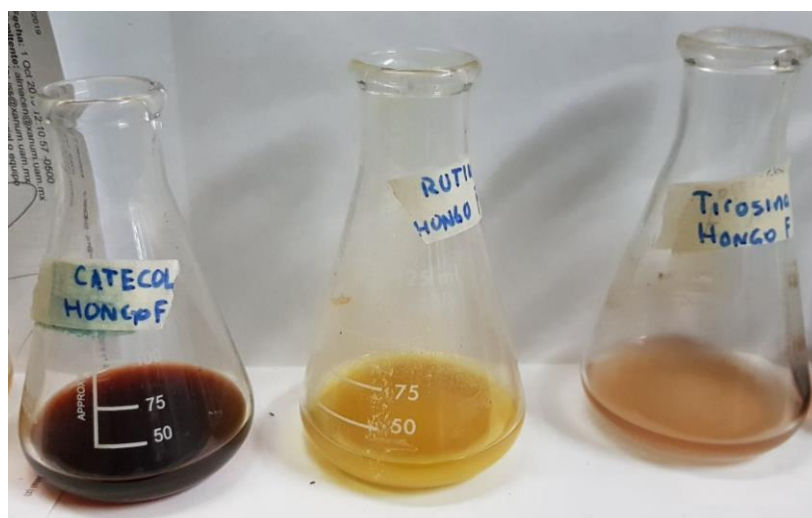


Figura 36. Extracto crudo enzimático con actividad polifenol oxidasa a las 24 horas de reacción con los distintos sustratos



Figura 37. Extracto crudo enzimático con actividad polifenol oxidasa a las 36 horas de reacción con los distintos sustratos.

Como se observa en las imágenes anteriores, sí existe una formación de pigmentos oscuros conforme pasa más tiempo en presencia de oxígeno, lo que indica la posible formación de melaninas. Para corroborar esto, se llevó a cabo una sola prueba de caracterización por cuestiones de tiempo, que es la precipitación en medio ácido: la solución en donde está la melanina, primero se colocó en un recipiente más pequeño y se corroboró que se trataba de una mezcla homogénea, es decir, que el pigmento oscuro estaba totalmente disuelto en el medio, luego se determinó que su pH era alcalino ($\text{pH}=8.3$), lo que coincide con lo publicado por Mondal y colaboradores en el 2018; entonces se agregó ácido para bajar de manera

considerable el pH hasta un valor de 2, y se obtuvo un precipitado del pigmento oscuro como se observa en la figura 43



Figura 38. Pigmento oscuro producto de la actividad polifenol oxidasa del extraco crudo enzimático sobre catecol en medio ácido (pH=2).

Lo que nos indica que, a falta de las demás pruebas, sí se sintetizó melanina con el extracto crudo enzimático con actividad polifenol oxidasa obtenido de *Pleurotus ostreatus* fresco, este resultado abre la posibilidad de poder sintetizar melaninas con el extracto crudo enzimático, usando como sustrato a los polifenoles extraídos de las dos matrices alimentarias con las que se trabajó.

8 Conclusiones

Este trabajo tenía como finalidad encontrar las condiciones óptimas de extracción y liberación de polifenoles que se encontraban dentro del rastrojo de amaranto como en el hongo *P. ostreatus* y corroborar que un extracto crudo enzimático con actividad polifenol oxidasa era capaz de oxidar dichos polifenoles hasta llegar a su polimerización formando melanina.

- Para el caso de los polifenoles extraíbles, tanto polares como con polaridad intermedia, se encontraron satisfactoriamente las condiciones, de tiempo, concentración de disolvente y temperatura de fracción, con las que se obtuvo una mayor concentración de dichos compuestos para ambos productos. Se tuvo una concentración mayor en el rastrojo que en el hongo. En ambos

casos todos los factores resultaron estadísticamente significativos para la extracción, pero de los 3 factores el tiempo mostro menor efecto lo que indica que para esta reacción no es tan relevante como la temperatura y la concentración de disolvente.

- Para la hidrólisis ácida de la pared celular se encontraron las condiciones en las que se obtienen rendimientos más altos de polifenoles liberados habiendo una diferencia muy grande entre la concentración liberada del rastrojo de amaranto que la encontrada en *P. ostreatus*.
- Todos los modelos de regresión correspondientes a las superficies de respuesta obtenidos fueron significativos ($P > 0.05$) en todos los factores y nos permiten predecir el comportamiento de la extracción o liberación de compuestos fenólicos el 95% de las ocasiones con una explicabilidad arriba del 65%. Esto indica que el método de superficie de respuesta es el adecuado cuando se busca una optimización.
- Para los parámetros cinéticos de los extractos crudos con actividad polifenol oxidasa encontramos que quien mostró los mejores con los 3 sustratos distintos fue el que se obtuvo del hongo *P. ostreatus* fresco
- En la prueba de Tukey se muestra que existen diferencias significativas en la velocidad de reacción, con los 3 sustratos distintos, de los 6 extractos crudos separándolos en 3 grupos, dejando en el primero y más alto al obtenido del hongo fresco y en segundo grupo a los obtenidos del hongo deshidratado y hojas con tallo de la planta de amaranto fresca, mientras que con una actividad significativamente menor encontramos a los obtenidos de las hojas, del tallo y del rastrojo.
- Los resultados abren la posibilidad de que la síntesis de melanina se pueda llevar a cabo con el extracto crudo obtenido de *P. ostreatus* fresco utilizando a los polifenoles extraídos y liberados de rastrojo de amaranto y de *P. ostreatus* como sustrato ya que cuando se utilizó catecol, tirosina y rutina como sustrato se consiguió la síntesis de pigmentos oscuros con características semejantes a las de la melanina.

9 Referencias

1. Aldabe, J., Hueto, A., Juni, J., López, P. (1998)., Importancia del oxígeno en reacciones enzimáticas. México. UNAM.
2. Arce-Vazquez, M., Delgado-Fornué, E., Esquivel-Rosales, M: y Soriano-Santos, J., (2004). Amaranth (*Amaranthus Hypochondriacus* L.): Use of Lignocellulosic Biomass to Obtain Antioxidant extracts Through Acid Hydrolysis. *Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences*, vol. 4, 61 – 73 pp.
3. Arranz, S., Saura-Calixto, F., Shaha, S., Kroon, P., (2009) High Contents of Non-extractable Polyphenols in Fruits Suggest That Polyphenol Contents of Plant Foods Have Been Underestimated. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57, 7298-7303 pp.
4. Brand-Williams,W., Cuvelier, M.E., Berset, C. (1994).Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaft and Technologie* 28, 25-30 pp.
5. Cardona, M., Osorio, J., Quintero, J., Degradación de colorantes industriales con hongos ligninolíticos. *Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia* [en línea] 2009, (Junio-Sin mes): [Fecha de consulta: 26 de noviembre de 2019]. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=43016337003> ISSN 0120-6230
6. Chung, K. T., Wong, T. Y., Wei, C. I., Huang, Y. W., Lin, Y. (1998). Tannins and human health: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38(6), 421–464. <https://doi.org/10.1080/10408699891274273>
7. Cremosi, P., Il prato, Padova (2002). L'uso degli enzimi nella pulitura di oper policrome tirosinasa, p. 15
8. E. Primo Yúfera. (1998) *Química de los alimentos*. España: Sintesis
9. González-Palma, I., Escalona-Buendía, H. B., Ponce-Alquicira, E., Téllez-Téllez, M., Gupta, V. K., Díaz-Godínez, G., Soriano-Santos, J. (2016). Evaluation of the antioxidant activity of aqueous and methanol extracts of *Pleurotus ostreatus* in different growth stages. *Frontiers in Microbiology*, 7(JUL), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01099>
10. INECOL instituto de ecologia. (2018). Cultivo de hongos comestibles. agosto, 2018, de CONACyT Sitio web: [Fecha de consulta 17 de septiembre de 2019] <https://www.inecol.mx/inecol/index.php/es/2017-06-26-16-35-48/17-ciencia-hoy/484-cultiva-hongos-comestibles>
11. Kroneck, P., Malmström, G., Freeman, H., (2012). Cuprum, from cyprium – metal of cyprus. *Journal of chemistry*, vol 12, 212 – 232 pp.

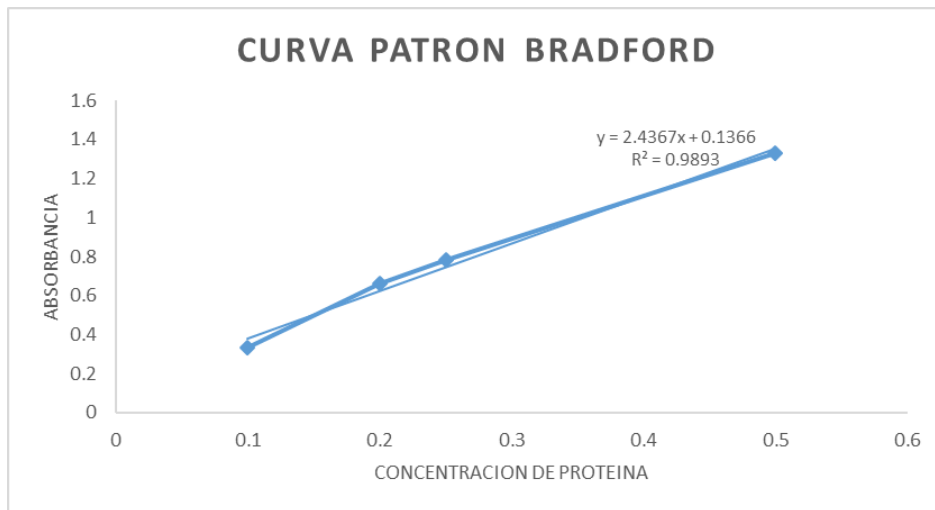
12. Moosavi, A., Tavakkol, A., Sharif-Zadeh, F. y Aneband, A. (2009). Effects of seed priming on germination characteristics, polyphenol oxidase, and peroxidase activities of four amaranth cultivars. *Journal of food, agricultura y environment*, vol. 7, 353 – 358 pp.
13. Moreno Vallespir, J., Jaime. (2015). Extracción de compuestos antioxidantes del gel de Aloe vera. Optimización del proceso mediante la aplicación de la metodología de superficie de respuesta. Retrieved from <http://dspace.uib.es/xmlui/handle/11201/1127>
14. Muñoz-Durango, K., Bravo-Muñoz, K., Zapata-Ocampo, P., Londoño, J., (2007). Caracterización preliminar del enzima polifenol oxidasa en frutas tropicales: implicaciones en su proceso de industrialización. *Scientia et Technica Año XIII*, vol. 33, 161 – 165 pp.
15. Murniati, A., Bubhari, B., Gandasasmita, S., Nurachman, Z. y Nurhanifah, N., (2018). Characterization of polyphenol oxidase application as phenol removal in extracts of rejected White oyster mushrooms (*Pleurotus ostreatus*). *Oriental journal of chemistry*, vol 34, 1457 – 1468 pp.
16. Owen R. Fennema. (1992). *Química de los alimentos segunda edición*. España: Acriba.
17. Prior L. R., Wu X., Schaich K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric.Food Chem.* 53: 4290-4302.
18. Rodríguez-Pérez, Suyén, Bermúdez-Savón, Rosa C., Serrat-Díaz, Manuel, Kourouma, Ansoumane, Selección de cepas de *Pleurotus ostreatus* para la decoloración de efluentes industriales. *Revista Mexicana de Micología [en línea]* 2006, (Sin mes) : [Fecha de consulta: 26 de noviembre de 2019] Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=88302303> ISSN 0187-3180
19. Salvador Badui Dergal. (2006). *Química de los alimentos*. México: Pearson.
20. Singleton, V., Orthofer, R. y Lamuela-Raventos, R. (1998). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* 299, 152–178 pp.

ANEXOS

Anexo I

Curva patron de BSA
mg de proteína/mL VS absorbancia

mg/mL	ABS
0.1	0.330
0.2	0.661
0.25	0.781
0.5	1.332



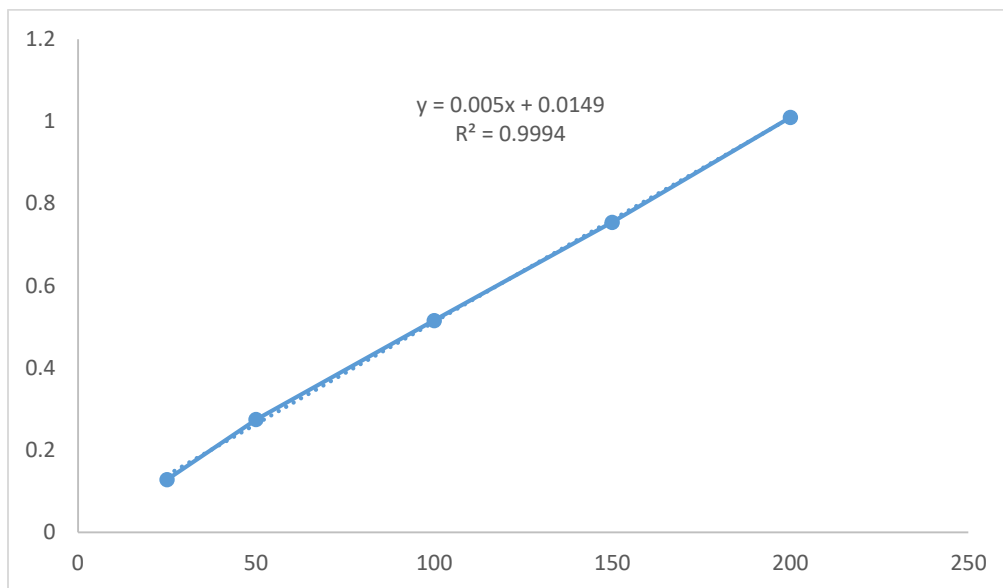
Anexo II

Curva patrón para cuantificación de polifenoles

	Muestra	Blanco
Muestra	250 μ L	-
Agua destilada	4.4 mL	4.650 mL
Reactivo Follin	100 μ L	100 μ L
Na ₂ CO ₃ concentrado	250 μ L	250 μ L

Mg equivalentes de ácido gálico/L vs absorbancia

a. galico (mg/L)	absorbancia
25	0.128666667
50	0.275
100	0.516
150	0.755
200	1.01



Anexo III

ANOVA del modelo de regresión para la extracción de polifenoles extraíbles polares de *Amaranthus hypochondriacus* L.

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Razón F	Valor P
Concentración (A)	15268.36	2	15268.36	35.78	0.0095
Temperatura (B)	12387.1	2	12387.1	33.15	0.012
Tiempo (C)	11955.23	2	11955.23	32.97	0.019
A*A	922.54	3	922.54	2.16	0.038
B*B	892.48	3	892.48	1.85	0.041
C*C	665.93	3	665.93	0.82	0.068
A*B	329.87	3	329.87	0.61	0.16
B*C	135.5	3	135.5	0.29	0.24
A*C	20.19	3	20.19	0.16	0.31
bloque	14.25	2	7.38	0.15	0.33
Error	8759.14	18	437.957		
Total	51350.55	44			

Valor P del modelo = 0.0023

$R^2 = 0.8124$

$R = 0.90133$

Error estándar del est. = 23.024

Error absoluto medio = 16.867

Estadístico Durbin-Watson 2.69 (P=0.8958)

Autocorrelación residual de Lag 1 = -0.20195

ANOVA del modelo de regresión para la extracción de polifenoles extraíbles polares de *Pleurotus ostreatus*.

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Razón F	Valor P
Concentración (A)	568.78	2	568.78	9.23	0.00075
Temperatura (B)	394.45	2	394.45	7.64	0.0069
Tiempo (C)	95.78	2	95.78	3.29	0.036
A*A	92.69	3	92.69	3.17	0.037
B*B	18.65	3	18.65	0.75	0.091
C*C	16.42	3	16.42	0.73	0.16
A*B	15.29	3	15.29	0.69	0.59
B*C	13.55	3	13.55	0.61	0.68
A*C	12.9	3	12.9	0.58	0.73
bloque	12.75	2	6.38	0.52	0.75
Error	321.59	18	19.295		
Total	1562.85	44			

Valor P del modelo = 0.000321

$R^2 = 0.7289$

$R = 0.8537$

Error estándar del est. = 16.28

Error absoluto medio = 11.569

Estadístico Durbin-Watson 1.41 (P=0.8144)

Autocorrelación residual de Lag 1 = -0.12647

ANOVA del modelo de regresión para la extracción de polifenoles extraíbles con polaridad intermedia de *Amaranthus hypochondriacus L.*

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Razón F	Valor P
Concentración (A)	2598.44	2	2598.44	258.66	0.0000
Temperatura (B)	811.29	2	811.29	49.25	0.005
Tiempo (C)	557.69	2	557.69	28.47	0.0102
A*A	499.82	3	499.82	11.25	0.0251
B*B	374.36	3	374.36	2.13	0.0487
C*C	299.55	3	299.55	0.45	0.091
A*B	59.47	3	59.47	0.59	0.088
B*C	61.98	3	61.98	0.21	0.198
A*C	22.7	3	22.7	0.11	0.31
bloque	9.21	2	4.11	0.039	0.789
Error	1095.66	18	54.78		
Total	6390.15	44			

Valor P del modelo = 0.00087

$R^2 = 0.8457$

$R = 0.9196$

Error estándar del est. = 9.278

Error absoluto medio = 4.268

Estadístico Durbin-Watson 2.31 (P=0.7198)

Autocorrelación residual de Lag 1 = -0.19255

ANOVA del modelo de regresión para la extracción de polifenoles extraíbles polares con polaridad intermedia de *Pleurotus ostreatus*.

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Razón F	Valor P
Concentración (A)	12598.71	2	12598.71	101.97	0.0000
Temperatura (B)	12716.13	2	12716.13	102.68	0.0000
Tiempo (C)	9185.33	2	9185.33	92.43	0.0002
A*A	7269.41	3	7269.41	87.35	0.0091
B*B	4987.26	3	4987.26	66.29	0.012
C*C	1921.56	3	1921.56	36.81	0.035
A*B	677.37	3	677.37	0.751	0.21
B*C	536.98	3	536.98	0.628	0.35
A*C	81.59	3	81.59	0.452	0.59
bloque	55.26	2	26.58	0.326	0.66
Error	6357.14	18	318.598		
Total	55776.74	44			

Valor P del modelo = 0.00021

$R^2 = 0.8381$

R = 0.9154

Error estándar del est. = 21.985

Error absoluto medio = 15.4163

Estadístico Durbin-Watson 2.31 (P=0.8744)

Autocorrelación residual de Lag 1 = -0.21525

ANOVA del modelo de regresión para la liberación de polifenoles no extraíbles de *Amaranthus hypochondriacus L.*

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Razón F	Valor P
Concentración (A)	987.26	2	987.26	41.25	0.0012
Temperatura (B)	869.25	2	869.25	37.68	0.0026
Tiempo (C)	858.145	2	858.145	35.489	0.0044
A*A	89.254	3	89.254	5.168	0.035
B*B	75.684	3	75.684	4.986	0.039
C*C	35.67	3	35.67	2.558	0.048
A*B	41.528	3	41.528	2.998	0.057
B*C	39.678	3	39.678	2.358	0.259
A*C	19.255	3	19.255	0.778	0.412
bloque	1.268	2	0.785	0.69	0.482
Error	479.22	18	33.5454		
Total	3496.207	44			

Valor P del modelo = 0.0013

$R^2 = 0.6516$

R = 0.8072

Error estándar del est. = 41.215

Error absoluto medio = 35.6958

Estadístico Durbin-Watson 1.91 (P=0.6474)

Autocorrelación residual de Lag 1 = -0.4125

ANOVA del modelo de regresión para la liberación de polifenoles no extraíbles de
Pleurotus ostreatus.

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Razón F	Valor P
Concentración (A)	1268.358	2	1268.358	516.357	0.0000
Temperatura (B)	894.267	2	894.267	309.57	0.0016
Tiempo (C)	477.214	2	477.214	106.66	0.0122
A*A	105.981	3	105.981	22.367	0.0269
B*B	75.198	3	75.198	20.198	0.0385
C*C	71.68	3	71.68	19.98	0.0497
A*B	21.894	3	21.894	0.91	0.221
B*C	16.297	3	16.297	0.587	0.315
A*C	11.59	3	11.59	0.421	0.451
bloque	10.994	2	10.994	0.29	0.555
Error	721.59	18	50.51		
Total	3665.009	44			

Valor P del modelo = 0.000097

$R^2 = 0.8903$

R = 0.8072

Error estándar del est. = 11.897

Error absoluto medio = 6.315

Estadístico Durbin-Watson 2.13 (P=0.8416)

Autocorrelación residual de Lag 1 = -0.1958