



EL SABER DE MIS HIJOS
HARÁ MI GRANDEZA

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

**DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA
Y METALURGIA**

**BIOMINERALIZACIÓN DE FOSFATO DE
CALCIO, INDUCIDA EN UNA MATRIZ
ORGÁNICA PROVENIENTE DE EXTRACTOS
ACUOSOS DE SALVADO DE TRIGO:
INFLUENCIA DE LOS LÍPIDOS Y EL pH DEL
MEDIO DE REACCIÓN**

Tesis

Que para obtener el título de:

INGENIERO QUÍMICO

Presenta

PAOLA GUADALUPE HURTADO SOLÓRZANO

Hermosillo, Sonora

Mayo, 2019

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

DEDICATORIA

Para mis padres, Efraín y Rosa María, quienes siempre me brindaron su apoyo incondicional, por ser mi respaldo cada que me resbalaba en el camino, por sus palabras llenas de aliento y amor que me aliviaban después de un duro día; por no perder la fe en mí, aun cuando yo a veces parecía extraviarla. Por eso y mucho más, gracias; los amo.

A mi hermana Ana Karen, quien siempre ha estado a mi lado, en las buenas pero sobretodo en las malas, gracias por llenar mi vida de risas y bromas.

A mis amigas, Blanca, Daniela y Michell, por estar en esos momentos llenos de diversión y de estrés a lo largo de la carrera. Gracias chicas por haber compartido conmigo una taza de café todas las mañanas.

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. (CIAD) por haberme permitido realizar este proyecto con la finalidad de titularme y de brindarme apoyo económico durante mi estadía en sus instalaciones.

A mi director de tesis, Dr. René Balandrán Quintana, por darme la oportunidad en embarcarme en este proyecto desde mis prácticas profesionales; por su excelente disposición a escuchar y resolver dudas, así como atender a mis comentarios que surgían a lo largo del proyecto. Gracias por su guía, su paciencia, y sobre todo, su profesionalismo.

Un reconocimiento especial al Dr. José Antonio Azamar Barrios, del Departamento de Física Aplicada del CINVESTAV Unidad Mérida, Yuc., ya que su colaboración activa en este y otros proyectos hace posible la caracterización físico química de las muestras.

A M.C. Jorge Mercado por su apoyo técnico y académico durante mi estancia en el laboratorio. Al M. C. Luis Enrique González Siquieros y Q.B. Rosa Amparo Nieblas Almada, por el apoyo técnico en los análisis Goldfish, micro Kjeldahl y cromatografía de gases en el Laboratorio de Análisis de Alimentos del CIAD. A la Técnico Académico Karen R. Astorga Cienfuegos, del laboratorio de Biotecnología Molecular de Plantas del CIAD, por su apoyo con el microscopio estereoscópico. Al Dr. Iván Anduro y a Q.B. Bertha I. Pacheco M., por haber brindado su apoyo con los microscopios de epifluorescencia y confocal del Laboratorio de Patología Experimental del CIAD. Al Laboratorio de Química de Materiales CINVESTAV-IPN, Unidad Mérida Yuc., y al Laboratorio Nacional de Nano y Biomateriales (LANNBIO), proyectos FOMIX-YUCATAN 2008-108160 y CONACYT LAB-2009-01-123913, 188345, 204822, 292692, 294643, por el apoyo analítico. Un agradecimiento especial a Dora Huerta Quintanilla, Ana Ruth Cristobal Ramos y Daniel Aguilar Treviño, del CINVESTAV Unidad Mérida, Yuc., por su asistencia técnica en los análisis SEM, EDS y DRX.

A mis profesores de la Universidad de Sonora, de la carrera de Ingeniería Química, por brindarme los conocimientos y las herramientas para concluir mis estudios exitosamente y poder realizarme profesionalmente.

ÍNDICE DE CONTENIDO **Página**

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	1
I.1 Aspectos generales	1
I.2 Objetivo general	3
I.3 Objetivos particulares	3
I.4 Justificación	3
ANTECEDENTES	4
II.1 Definición de biomineralización	4
II.2 Tipos de biomineralización	4
II.3 Cristales formados en la biomineralización	10
II.4 Importancia de la biomineralización	11
II.5 Beneficios de la biomineralización <i>in vitro</i>	12
II.6 Antecedentes de la biomineralización <i>in vitro</i> en solución, utilizando extractos acuosos de salvado de trigo	13
II.7 Definición de brushita	15
II.8 Definición de fosfolípidos	15
METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	17
III.1 Obtención del salvado de trigo	17
III.2 Limpieza en seco y lavado del salvado de trigo	17
III.3 Extracción acuosa del salvado de trigo.....	19
III.4 Experimento para la verificación del pH durante la formación de brushita en solución, utilizando EAST como matriz orgánica	21
III.5 Recuperación de los cristales formados durante la biomineralización, mediante lavado con agua	24
III.6 Visualización de cristales por microscopía estereoscópica	26
III.7 Cuantificación de proteína soluble por el método de Bradford	27
III.8 Determinación de proteínas totales por el método micro Kjeldahl	28
III.9 Caracterización del perfil de ácidos grasos de los lípidos presentes en los extractos acuosos de salvado de trigo.....	32
III.9.1 Extracción y cuantificación de lípidos del EAST por el método Goldfish... 32	
III.9.2 Análisis de la composición de ácidos grasos presentes en EAST, por cromatografía de gases.....	34
III.10 Visualización de los cristales precipitados por microscopía electrónica de barrido (SEM)	36

III.11 Análisis de la composición elemental de los cristales precipitados por espectroscopía de energía dispersiva de rayos X (EDS).....	36
III.12 Análisis de los cristales precipitados por difracción de rayos X (DRX)	36
III.13 Análisis de los cristales precipitados por espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)	37
III.14 Visualización de cristales por microscopía de fluorescencia.....	37
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
IV.1 Verificación del pH durante la formación de brushita en solución, utilizando EAST como matriz orgánica.....	38
IV.2 Análisis de la visualización de cristales de brushita por microscopía estereoscópica	47
IV.3 Análisis de cuantificación de proteína soluble por el método de Bradford y de proteínas totales por el método micro Kjeldahl.....	50
IV.4 Análisis cuantificación de grasa y lípidos extracción por Goldfish y cromatografía de gases.....	54
IV.5 Visualización de las partículas precipitadas, mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).....	59
IV.6 Análisis de la composición elemental de las partículas precipitadas, por espectroscopía de energía dispersiva de rayos X (EDS).....	64
IV.7 Análisis de los cristales precipitados por difracción de rayos X (DRX)	70
IV.8 Análisis de los cristales precipitados por espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR)	74
VI.9 Análisis de la visualización de cristales por microscopía de fluorescencia	78
CONCLUSIONES Y/O RECOMENDACIONES	80
V.1 Perspectivas de investigación	81
BIBLIOGRAFÍA	82

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Esquema de la mineralización inducida biológicamente. Los precipitados minerales se forman como resultado de actividades metabólicas que afectan el pH, condiciones redox, etc. La célula es solo un agente causal, sin control sobre el tipo de mineral o hábito. Fuente: Weiner et al. (2003)	5
2	Esquema de la mineralización extracelular biológicamente controlada que muestra que este proceso se distingue por la nucleación fuera de la célula. a) Los cationes se bombean a través de la membrana celular y se mueven por difusión pasiva a través de fluidos extracelulares al sitio de la mineralización. b) Los cationes se concentran intracelularmente como iones acuosos en una vesícula que se secreta posteriormente. La ruptura de compartimentos en el sitio de mineralización libera cationes para la formación biomineral. Fuente: Weiner et al. (2003).	7
3	En la mineralización intercelular biológicamente controlada, las superficies epiteliales de las células se utilizan como sustrato orgánico para la nucleación y el crecimiento con una orientación preferida. Los cationes se bombean fuera de la célula y las composiciones fluidas se regulan para mantener el control sobre el tipo biomineral y la extensión del crecimiento. Fuente: Weiner et al. (2003).	8
4	Los esquemas de la mineralización intracelular biológicamente controlada muestran que la nucleación ocurre dentro de la célula en una vesícula especializada. a) Biomineral está nucleado (1) dentro de un compartimento en el ambiente intracelular. Estas unidades de crecimiento pueden ensamblarse intracelularmente (2) para la secreción subsiguiente (3a) o secretarse como una unidad individual (3b) para la organización subsiguiente en estructuras de crecimiento de orden superior como un compuesto masivo u orgánico-mineral. b) En un tipo de mineralización de uso menos frecuente, la unidad biomineral permanece dentro de la célula (1) como una unidad de crecimiento única o se organiza intracelularmente (2) en una estructura de orden superior. Fuente: Weiner et al. (2003).	9

ÍNDICE DE FIGURAS (Continuación)

Figura		Página
5	Lavado del salvado de trigo en H ₂ O HPLC. a) 72 g de salvado de trigo en tela de organza; b) salvado de trigo humedecido en H ₂ O HPLC, aplicando presión manual.	18
6	Distribución del salvado lavado, en charolas forradas con aluminio	18
7	Charolas con salvado colocado dentro de una estufa de convección a 40°C.	19
8	Salvado de trigo seco, con agua HPLC, en una relación 1:10 (p/v).	20
9	Tubos Falcon con salvado H ₂ O en la rueda giratoria Stuart.	20
10	Tubos Falcon con extracto acuoso de salvado de trigo, centrifugados y congelado, dentro del liofilizador Labconco.	21
11	Extracto acuoso de salvado de trigo liofilizado (EAST).	21
12	Solución madre de EAST liofilizado sobre una placa de agitación magnética.	22
13	Diagrama de la separación de volúmenes de EAST liofilizado en solución con H ₂ O HPLC a diferentes pH, y su control (C).	22
14	Lectura de pH y temperatura en el potenciómetro.	23
15	Homogenización de las soluciones de EAST con cristales precipitados, en un agitador Vortexer 2 VWR.	25
16	a) Precipitados de cristales dentro de la caja Petri; b) Cristales lavados.	25
17	Cristales lavados, en tubos Eppendorf de 1.5 mL.	26
18	Espectrofotómetro UV-Vis Cary 60 (Agilent Technologies® CA, USA).	28
19	Muestras de EAST en proceso de digestión, en un digestor micro Kjeldahl, para la cuantificación de proteína total.	29
20	Disolución de sales con agua destilada, previo a la destilación.	30
21	Destilador Labconco. a) Inicio de la destilación; b) Fin de la destilación.	31
22	Dedales de celulosa	32
23	Extractor de grasa Goldfish	33
24	Los dedales colocados en el extractor Goldfish, dentro de un vaso Goldfish; el condensador en la parte superior y la placa de calentamiento en la parte inferior.	34
25	Vasos Goldfish colocados en la estufa a 100 °C después de la extracción de lípidos.	34
26	Cromatografo de gases CG Agilent modelo 6850 (Agilent Instruments, Santa Clara, CA, USA).	35

ÍNDICE DE FIGURAS (Continuación)

Figura		Página
27	Apariencia del EAST al inicio y al final de la biomineralización a diferente pH. a) EAST a pH 5 en día cero; b) EAST a pH 5 en día diez; c) EAST a pH 6 en día cero; d) EAST a pH 6 en día diez; e) EAST a pH 8 en día cero; f) EAST a pH 8 en día diez.	40
28	Promedios del pH medido con respecto al tiempo durante la biomineralización de EAST.	42
29	Promedios del pH medido con respecto al pH inicial durante la biomineralización de EAST.	42
30	Promedio del pH medido con respecto al tiempo y al pH inicial	43
31	Variación del pH de nucleación con la concentración inicial de calcio. Fuente: Arifuzzaman et al., 2004.	45
32	Comportamiento de los valores promedios de pH medido con respecto al tiempo y su pH inicial. a) EAST sin modificar; b) EAST desengrasado	46
33	Cristales precipitados durante la biomineralización de EAST a diferentes pH, 6 °C, 10 d de incubación, sin agitación previa a la medición diaria de pH. a) pH 5; b) pH 6; c) pH 8; d) pH 11.	48
34	Cristales precipitados durante la biomineralización de EAST a diferente pH, 6 °C, 10 d de incubación, con agitación previa a la medición diaria de pH. a) pH 6; b) pH 8.	49
35	Cristales precipitados en la biomineralización a 6 °C, incubado por 10 d, desengrasados; sin agitación, con a) EAST a pH 6; b) EAST a pH 11.	49
36	Cromatografía de gases de los lípidos presentes en el EAST. El color negro representa el EAST y el color azul el estándar usado como marcador de referencia.	57
37	Micrografías SEM a 2000x de estructuras de láminas nanométricas que forman la estructura interna de las partículas cristalinas por medio acuoso de EAST liofilizado reconstituido al 10% en agua con 0.75M CaCl ₂ a 10 d. a) pH 5; b) pH 6; c) pH 8; d) pH 11.	59
38	Micrografía SEM de estructuras globulares formadas por. a) medio acuoso de EAST liofilizado al 10% de agua con 0.75M CaCl ₂ a 10 d, a pH 6; b) medio acuoso de EAST liofilizado al 10% de agua con 0.75M CaCl ₂ a 10 d, a pH 8.	60

ÍNDICE DE FIGURAS (Continuación)

Figura		Página
39	Micrografía SEM a 10 000x de estructuras de láminas nanométricas que forman la estructura interna de las partículas cristalinas por medio acuoso de EAST lioflizado al 10% de agua con 0.75M CaCl ₂ a 10 d, a a) pH 5; b) pH 6; c) pH 8; d) pH 11.	61
40	Micrografía SEM de estructuras de láminas nanométricas que forman la estructura interna de las partículas cristalinas por EAST lioflizado al 10% de agua con 0.75M CaCl ₂ a 10 d, a a) pH 5; b) pH 6; c) a pH 11.	63
41	Micrografía SEM de las partículas cristalinas en EAST desengrasado a pH 6 con estructuras a) globulares; b) de láminas nanométricas que forman la estructura interna	64
42	Micrografía SEM de las partículas cristalinas en EAST desengrasado a pH 11 a) a 5000x; b) a 500x	64
43	Espectroscopía de energía dispersiva de rayos X y composición elemental de las partículas precipitadas durante la biomineralización con EAST a pH 5.	66
44	Espectroscopía de energía dispersiva de rayos X y composición elemental de las partículas precipitadas durante la biomineralización con EAST a pH 6.	67
45	Espectroscopía de energía dispersiva de rayos X y composición elemental de las partículas precipitadas durante la biomineralización con EAST a pH 8.	67
46	Espectroscopía de energía dispersiva de rayos X y composición elemental de las partículas precipitadas de la biomineralización con EAST a pH 11.	67
47	Espectroscopía de energía dispersiva de rayos X y composición elemental de las partículas precipitadas durante la biomineralización con EAST a pH 6 desengrasado.	68
48	Espectroscopía de energía dispersiva de rayos X y composición elemental de las partículas precipitadas durante la biomineralización con EAST a pH 11 desengrasado.	68
49	Espectro de difracción de rayos-x de referencia del cristal brushita (Ucar et al., 2016)	70
50	Difractograma representativo de las muestras de EAST biomineralizadas con CaCl ₂ a pH inicial 6.0.	71
51	Difractograma representativo de las muestras de EAST biomineralizadas con CaCl ₂ a pH inicial 8.0.	71

ÍNDICE DE FIGURAS (Continuación)

Figura		Página
52	Difractograma representativo de las muestras de EAST desengrasado y biomineralizadas con CaCl ₂ a pH inicial 6.0.	72
53	Difractograma representativo de las muestras de EAST biomineralizadas con CaCl ₂ a pH 5.	72
54	Espectro de difracción de rayos-x de referencia del cristal weddellita (Conti et al., 2010)	73
55	Difractograma representativo de las muestras de EAST biomineralizadas con CaCl ₂ a pH 11.	73
56	Difractograma representativo de las muestras de EAST desengrasado biomineralizadas con CaCl ₂ a pH 11.	74
57	Espectros infrarrojo de las partículas precipitadas de un EAST liofilizado	76
58	Espectros infrarrojo de las partículas precipitadas de un EAST liofilizado, desengrasado y reconstituido en agua al 10% a diferente pH.	77
59	Espectro infrarrojo de brushita. Fuente: Casciani et al. (1979).	78
60	Visualización en la microscopia de fluorescencia del EAST liofilizado reconstituido al 10% de agua, pH 6 al día 0 de incubación.	79

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1	Principales biominerales y sus atribuciones.	11
2	Análisis de varianza, mostrando los efectos del pH inicial (pH ₀) y el tiempo de incubación sobre el pH medido durante la biomineralización con EAST.	39
3	Valores de pH registrados en extractos acuosos de salvado de trigo con pH inicial ajustado a 5, 6 y 8, adicionados con CaCl ₂ 0.75 M e incubados durante 10 días a 6.0±2.0 °C	41
4	Análisis de varianza, mostrando los efectos del pH inicial (pH ₀) y el tiempo de incubación sobre el pH medido durante la biomineralización con EAST desengrasado.	45
5	Valores de pH registrados al inicio y al final de la biomineralización con extractos acuosos de salvado de trigo (EAST), desengrasados, con pH inicial (pH ₀) ajustado a 6 ó 11, adicionados con CaCl ₂ 0.75 M e incubados durante 10 días a 6.0±2.0 °C.	46
6	Análisis de varianza del pH inicial con respecto a la concentración de proteína en EAST después de la biomineralización	52
7	Análisis de varianza del pH inicial con respecto a la concentración de proteína en EAST desengrasado después de la biomineralización	53
8	Valores de la concentración proteica (mg/mL) registrados en extractos acuosos de salvado de trigo con pH inicial ajustado a 5, 6 y 8, adicionados con CaCl ₂ 0.75 M e incubados durante 10 días a 6.0±2.0 °C	53
9	Valores de la concentración (mg/mL) registrados en extractos acuosos de salvado de trigo desengrasado, con pH inicial ajustado a 6 y 11, adicionados con CaCl ₂ 0.75 M e incubados durante 10 d a 6.0±2.0 °C	54
10	Composición y abundancia de los lípidos identificados en EAST	58
11	Nombre y composición química de minerales biológicamente inducidos y controlados por procesos de mineralización.	69
12	Principales formulaciones de fosfato de calcio, obtenidas mediante reacciones tanto térmicas como de precipitación.	69

RESUMEN

En la Naturaleza el proceso de biomineralización es dirigido por una matriz orgánica extra celular de cuya composición dependen el tipo y la función de los cristales biogénicos. En la biomineralización *in vitro* se utilizan polímeros que emulan la función de la matriz orgánica para producir cristales que tienen un rango de aplicaciones industriales. El extracto acuoso de salvado de trigo (EAST) se ha estudiado como matriz orgánica para la biomineralización *in vitro*, encontrándose la formación de brushita ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) a $\text{pH}=8$, lo cual es interesante pues la brushita sólo se forma a pH ácido. Se hipotetizó que en algún momento del proceso el pH vira a ácido o bien que desde el inicio se forma un microambiente de pH ácido constituido por vesículas lipídicas, dentro del cual crecen los cristales de brushita. Para verificar ambas hipótesis, en el presente trabajo se realizó la biomineralización con EAST, ajustando el pH inicial en un rango 5-8 y monitoreando su valor durante 10 d. Al final del periodo se determinó el efecto del pH del proceso sobre las características de los cristales precipitados, esta últimas analizadas por microscopía estereoscópica, SEM, FTIR y DRX. Posteriormente se extrajeron los lípidos del EAST, se analizó su perfil de ácidos grasos y se repitió el experimento con EAST libre de lípidos para observar su efecto sobre las características de los cristales. La posible formación de vesículas se analizó por microscopía óptica. Desde el inicio de la biomineralización el pH viró a ácido, manteniendo durante los 10 d un valor constante que dependió del pH inicial. El pH inicial 6 fue para el que se obtuvo mayor abundancia y homogeneidad en forma y tamaño de cristales de brushita. A pH inicial 8 los cristales perdieron estructuras definidas y a pH inicial 5.0 no alcanzaron a precipitar. Con EAST libre de lípidos a pH inicial 6 se obtuvieron cristales de menor tamaño y de superficie más rugosa, mientras que a pH inicial 11 no hubo precipitación. Se concluyó que la brushita se forma a pH ácido y que la presencia de lípidos afecta la morfología. Asimismo, no se identificaron vesículas.

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

I.1 Aspectos generales

La biomineralización *in vivo* es un proceso de formación y crecimiento de cristales minerales sobre una matriz orgánica extracelular, para proporcionar protección y soporte a los seres vivos. La formación de huesos, dientes, caparazones de moluscos y artrópodos, son ejemplos de biomineralización *in vivo*. A los minerales formados mediante este proceso se les conoce como biominerales. La matriz orgánica extracelular está constituida por polisacáridos y proteínas ricas en ácido aspártico (Asp) y ácido glutámico (Glu). No obstante, otras biomoléculas también participan en la orientación, morfología y tamaño de los biominerales, como son los carbohidratos y algunos ácidos grasos (Luna-Valdez et al., 2017). Los biominerales son de interés en las industrias de alimentos, farmacéutica y biomédica, entre otras. Por ello, se intenta producirlos *in vitro* sobre matrices orgánicas cuya composición imita a la de la matriz orgánica extracelular.

El salvado de trigo es un subproducto obtenido en la molienda del grano de trigo. Comercialmente posee una cantidad relativamente pequeña de celulosa (16%) y de lignina (6.6%). También presenta una cantidad significativa de glucuronoarabinoxilanos (38%), proteínas (hasta 25%), almidón (9%) y lípidos (> 4%) (Prinsen et al., 2014). Además, es buena fuente de minerales, vitaminas del complejo B, así como de una gran cantidad de compuestos bioactivos. Pese a ello, la inclusión de salvado de trigo en la dieta humana es muy baja debido a factores antinutricionales y sensoriales, por lo que se buscan alternativas de uso de este subproducto (Balandrán-Quintana et al., 2015).

En las proteínas del salvado de trigo se encuentra una gran variedad de aminoácidos. En la fracción de albúminas, es decir la fracción proteica del salvado que es extraíble con agua, destacan por su abundancia Asp y Glu (Balandrán-Quintana et al., 2015). Como ya se mencionó, estos aminoácidos

son particularmente importantes en los procesos de biomineralización *in vivo*, razón por la cual se propuso, en un trabajo previo, que los extractos acuosos de salvado de trigo podrían actuar como matriz orgánica para la biomineralización (Zavala-Corrales, 2017). En ese primer trabajo se demostró la formación de partículas esféricas formadas por cristales de una fase mineral de fosfato-hidrógeno cálcico hidratado, o brushita, utilizando calcio y fósforo como iones precursores. El primero se adicionó al medio de reacción como CaCl_2 y el segundo provino de los iones fosfato encontrados naturalmente en el salvado de trigo y que fueron co-extraídos durante la extracción acuosa.

El pH del medio en las reacciones de biomineralización determina el tipo de la fase mineral formada. En el trabajo referido, la biomineralización se indujo ajustando el pH inicial de los extractos acuosos a un valor de 8.0, con el fin de solubilizar al máximo las proteínas. Luego, se permitió transcurrir la biomineralización durante 15 d. Un hecho que llamó la atención fue que a $\text{pH}=8$ se formase brushita, ya que el crecimiento de cristales de este mineral requiere de condiciones ácidas, surgiendo así una pregunta de investigación. Dos hipótesis para dar respuesta a esta pregunta son: 1) Durante el proceso de biomineralización el pH de la solución vira a ácido, lo que favorece la formación de brushita; 2) se forma un microambiente con pH ácido en cuyo interior crece la brushita, existiendo la posibilidad de que tal microambiente se desarrolle en el interior de vesículas constituidas por los lípidos presentes en los extractos acuosos.

En el presente trabajo se abordaron ambas hipótesis, para lo cual se estudió el proceso de biomineralización con extractos acuosos de salvado de trigo, en un rango de pH de ácido a básico. La estrategia consistió en monitorear el pH durante todo el proceso y caracterizar las fases minerales precipitadas, para verificar si la brushita se forma efectivamente a pH básico. También se exploró la posible formación de vesículas mediante visualización microscópica y caracterización del perfil de ácidos grasos en los extractos acuosos.

I.2 Objetivo general

Verificar que durante la biomineralización en solución, con extractos acuosos de salvado de trigo, se forma un micro-ambiente de pH ácido, dentro del cual se lleva a cabo el crecimiento de cristales de brushita.

I.3 Objetivos particulares

- a) Verificar el pH de formación de brushita al inducir la biomineralización en solución, utilizando extractos acuosos de salvado de trigo como matriz orgánica.
- b) Caracterizar el perfil de ácidos grasos de los lípidos presentes en los extractos acuosos de salvado de trigo.
- c) Verificar la presencia de vesículas, dentro de las cuales hipotéticamente se forma la brushita.

I.4 Justificación

Se ha demostrado que los extractos acuosos de salvado de trigo actúan como matrices para biomineralización *in vitro*, produciendo partículas esféricas de brushita pura. El mecanismo de formación de esta última no se ha descifrado aún, lo cual es necesario para tener un mayor control sobre el proceso, por lo que los estudios en este sentido están justificados.

ANTECEDENTES

II.1 Definición de biomineralización

La biomineralización es el proceso mediante el cual los organismos vivos forman minerales inorgánicos. Aunque la mayoría de los organismos no forman depósitos minerales, el fenómeno sigue siendo extremadamente extenso. Una de las funciones de los minerales biogénicos es proporcionar resistencia mecánica a las partes duras del esqueleto y los dientes. De los cinco reinos, todos contienen miembros que realizan el proceso de biomineralización. Todos estos organismos son capaces de formar alrededor de 60 minerales diferentes. Algunos minerales biogénicos son formados a gran escala en la biósfera, los cuales tienen un gran impacto en la química oceánica y son componentes importantes en los sedimentos marinos y también en muchas rocas sedimentarias (Lowenstam et al., 1989).

La mayor parte del control de la biomineralización se ejerce a niveles de nanómetros, ya que el crecimiento de los cristales está dado en la nanoescala. Uno de los desafíos para los organismos puede no ser la construcción de nanocristales, sino la construcción de grandes cristales simples con formas complejas, como se observa en los equinodermos, esponjas, algunos moluscos, esmalte de vertebrados y muchos otros tejidos mineralizados (Addadi et. al, 2016)

II.2 Tipos de biomineralización

Los procesos de biomineralización se dividen en dos grupos, fundamentalmente diferentes según su grado de control biológico: inducida biológicamente y controlada biológicamente.

La biomineralización inducida biológicamente es aquella donde los organismos, durante la mineralización, provocan, a través de su actividad metabólica, cambios en las condiciones fisicoquímicas del entorno más próximo como desgasificación, modificaciones en el pH o en las condiciones redox, etc. (Figura 1). Aquello tiene como consecuencia la precipitación mineral. Este tipo de biomineralización es relativamente poco específico respecto a las fases y morfologías cristalinas a las que da lugar, es decir que con frecuencia los biominerales resultantes son materiales amorfos, nanopartículas o microcristales poco organizados estructuralmente. Un ejemplo de esto se puede observar en las algas, las cuales se han encargado durante millones de años, en la producción de carbonatos. Aunque actualmente las construcciones estromatolíticas, biconstrucciones que se encuentran en las llanuras mareales, pueden considerarse como “fósiles vivos”, las algas continúan contribuyendo en la precipitación de carbonatos presentes en el interior de los mares (Ayora et al., 2004).

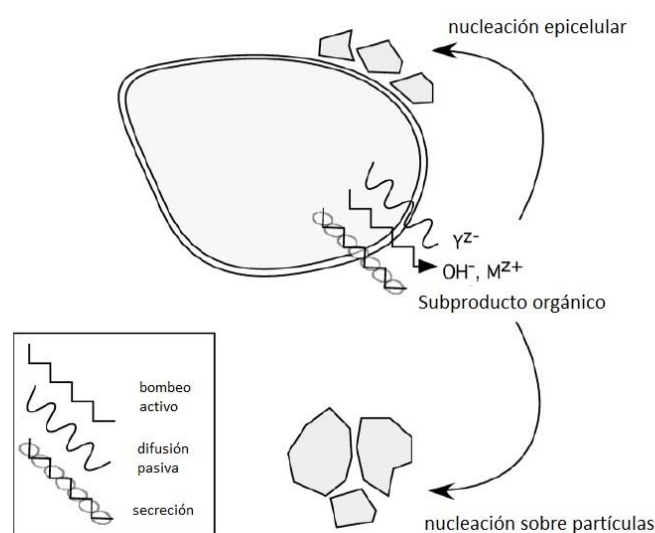


Figura 1. Esquema de la mineralización inducida biológicamente. Los precipitados minerales se forman como resultado de actividades metabólicas que afectan el pH, condiciones redox, etc. La célula es solo un agente causal, sin control sobre el tipo de mineral o hábito. Fuente: Weiner et al. (2003)

La biomineralización controlada biológicamente, en contraste con la biomineralización biológicamente inducida, es mucho más sofisticada e implica la cristalización en lugares específicos de las membranas y corpúsculos celulares. Se trata de un tipo de biomineralización con un elevado control por parte del genoma de los organismos que la originan. La cristalización se encuentra, en este caso, asociada espacialmente a la actividad biológica a una escala muy pequeña, mientras que la composición, morfología y propiedades de los minerales originados están estrictamente controladas por los organismos. Un ejemplo son las conchas marinas, cada especie de concha presenta su propio diseño controlado genéticamente. Sin embargo, desde un punto de vista medioambiental, no son las conchas macroscópicas las responsables de la mineralización, sino microorganismos marinos que construyen exoesqueletos. Entre ellos se encuentran las algas diatomeas, los cocolitofóridos y foraminíferos (Ayora et al., 2004).

Los procesos de mineralización biológicamente controlados pueden describirse como extra-, inter-, o intracelulares.

- a) Mineralización extracelular biológicamente controlada. La célula produce una matriz macromolecular fuera de la célula en un área que se convertirá en el sitio de mineralización. El término matriz se refiere a un grupo de macromoléculas compuestas de proteínas, polisacáridos o glicoproteínas que se ensamblan para formar un marco tridimensional (Figura 2). La composición de la matriz es única porque muchas de sus proteínas contienen una alta proporción de aminoácidos ácidos (especialmente Asp) y grupos fosforilados (Veis et Al., 1967; Weiner, 1979; Weiner et al., 1983; Swift et al., 1992). Las estructuras y composiciones de estos marcos orgánicos están programadas genéticamente para realizar funciones esenciales de regulación y/o organización que resultarán en la formación de compuestos biológicos (Weiner et al., 2003).

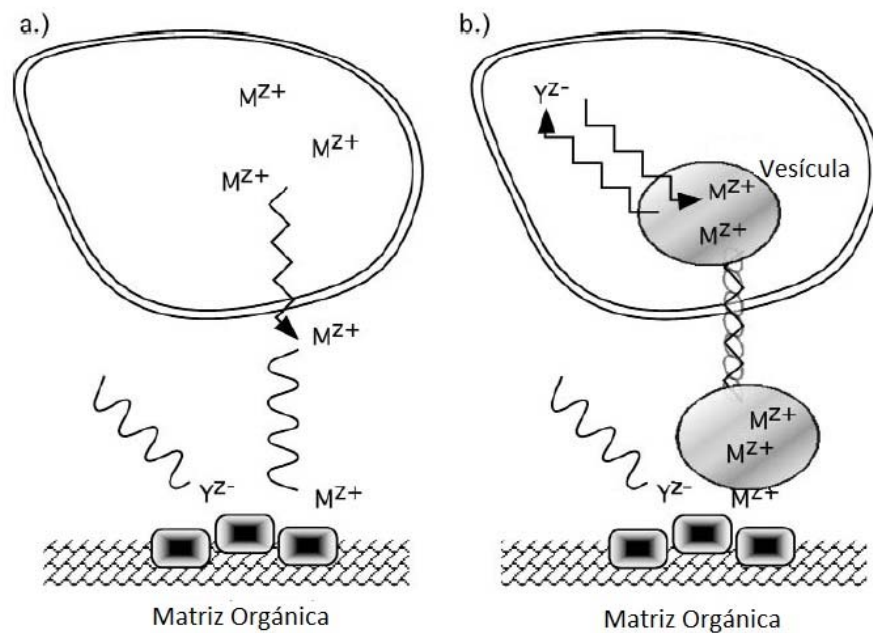


Figura 2. Esquema de la mineralización extracelular biológicamente controlada que muestra que este proceso se distingue por la nucleación fuera de la célula. a) Los cationes se bombean a través de la membrana celular y se mueven por difusión pasiva a través de fluidos extracelulares al sitio de la mineralización. b) Los cationes se concentran intracelularmente como iones acuosos en una vesícula que se secreta posteriormente. La ruptura de compartimentos en el sitio de mineralización libera cationes para la formación biomineral. Fuente: Weiner et al. (2003).

b) Mineralización intercelular biológicamente controlada. La formación de minerales intercelulares parece ser una variante de la mineralización extracelular. Sin embargo, la epidermis de los organismos individuales sirve como medio principal para aislar el sitio de mineralización (Mann, 2001). Como se muestra en la Figura 3, el sustrato epitelial dirige de manera reproducible la nucleación y el crecimiento de fases biominerales específicas sobre grandes áreas de superficies celulares. La mineralización entre células puede llegar a ser tan extensa que llene completamente los espacios intercelulares, formando así un tipo de

exoesqueleto. Los organismos individuales dirigen el polimorfo y la forma del biomineral que se forma (Weiner et al., 2003).

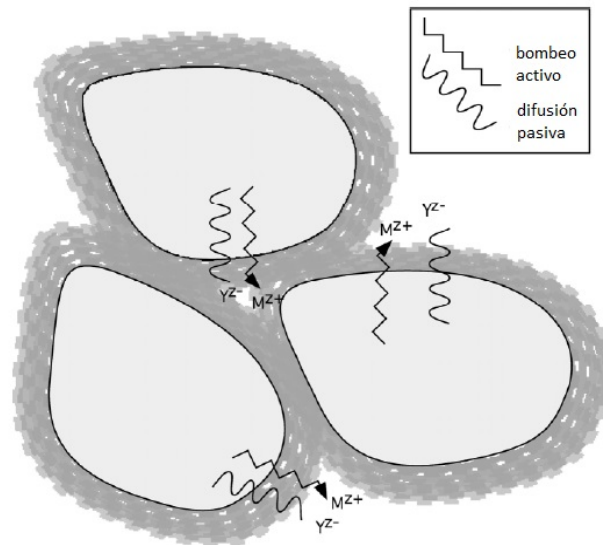


Figura 3. En la mineralización intercelular biológicamente controlada, las superficies epiteliales de las células se utilizan como sustrato orgánico para la nucleación y el crecimiento con una orientación preferida. Los cationes se bombean fuera de la célula y las composiciones fluidas se regulan para mantener el control sobre el tipo biomineral y la extensión del crecimiento. Fuente: Weiner et al. (2003).

- c) Mineralización intracelular biológicamente controlada. La mineralización controlada también puede ocurrir dentro de vesículas especializadas que dirigen la nucleación de los biominerales dentro de la célula. Estos ambientes de cristalización gobiernan la morfología y composición biomineral final. En esta situación, la célula tiene un alto control sobre las concentraciones de los constituyentes biominerales de catión y anión en un entorno donde una matriz orgánica también puede estar activa como una plantilla de nucleación (Figura 4). La membrana del compartimento también regula el pH y, en cierta medida, las composiciones elementales

del cristal. De hecho, las estructuras mineralizadas que se desarrollan a partir de procesos intracelulares a menudo exhiben morfologías específicas de especies altamente intrincadas. Un ejemplo de este último es utilizado por las algas Haptophyte. Estos organismos pre-ensamblan los segmentos de cristal único de calcita intracelularmente en una estructura de cocolito antes de pasar la vaina madura a través de la membrana celular (Weiner et al., 2003).

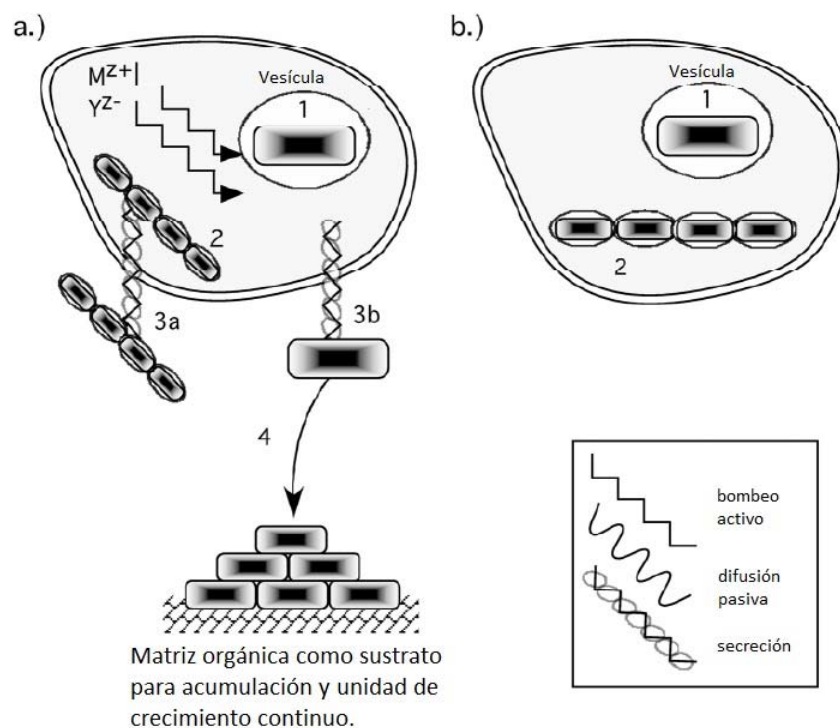


Figura 4. Los esquemas de la mineralización intracelular biológicamente controlada muestran que la nucleación ocurre dentro de la célula en una vesícula especializada. a) Biomíneral está nucleado (1) dentro de un compartimento en el ambiente intracelular. Estas unidades de crecimiento pueden ensamblarse intracelularmente (2) para la secreción subsiguiente (3a) o secretarse como una unidad individual (3b) para la organización subsiguiente en estructuras de crecimiento de orden superior como un compuesto masivo u orgánico-mineral. b) En un tipo de mineralización de uso menos frecuente, la unidad biomíneral permanece dentro de la célula (1) como una unidad de crecimiento única o se organiza intracelularmente (2) en una estructura de orden superior. Fuente: Weiner et al. (2003).

II.3 Cristales formados en la biomineralización

En los cristales en general se pueden identificar siete sistemas cristalinos, los cuales se nombran según su figura geométrica elemental: cúbico, tetragonal, ortorrómbico, monoclinico (prisma oblicuo de base rómbica), triclinico (paralelepípedo en general), romboédrico (paralelepípedo cuyas caras son rombos) y hexagonal (Mann, 2001). A veces es un procedimiento simple, ya que los cristales que pertenecen al sistema cubico, por ejemplo, crecen con forma de cubos tanto en su parte interna como externa. Sin embargo existen cristales que pueden pertenecer a un sistema cristalino determinado y no crecer bajo esa forma externa; es decir, las celdas pueden apilarse para formar otra figura. Se ha demostrado que sólo ocasionalmente los cristales crecen con la misma forma que su celda unitaria (Hernández et al., 2006).

Muchos organismos construyen cristales con un control casi completo sobre todos los aspectos de su formación, desde la nucleación hasta el crecimiento, desde la composición hasta la estructura polimórfica y desde la morfología hasta el tamaño (Addadi et al., 2016). Hay que señalar que es un campo de investigación en el que se está avanzando rápidamente, descubriendo nuevos biominerales. Los fosfatos y carbonatos de calcio son los minerales que se encuentran con mayor abundancia, seguidos del ópalo A y de ciertos óxidos de hierro como la magnetita o la ferrihidrita; en la Tabla 1 se pueden observar muchos más ejemplos de biominerales encontrados en la Naturaleza. Se deduce que el calcio es el catión más abundante. Así, los minerales de calcio constituyen el 50% de todos los biominerales. Entre los aniones, el fosfato forma parte del 25% de los biominerales. Por su parte, dentro de los cristales orgánicos, los más abundantes son los oxalatos de calcio. El predominio de los minerales de calcio se explica por el bajo producto de solubilidad de sus carbonatos, fosfatos y oxalatos, unidos a la existencia de niveles relativamente altos de calcio en los fluidos extracelulares (Carretero-León et al., 2007).

Tabla 1. Principales biominerales y sus atribuciones.

Mineral	Fórmula	Estructura cristalina	Reinos donde se encuentra
Carbonatos:			
Calcita	CaCO ₃	Romboédrico	Monera, Protista, Fungi, Plantae, Animalia
Aragonita	CaCO ₃	Ortorrómico	Monera, Protista, Plantae, Animalia
Vaterita	CaCO ₃	Hexagonal	Plantae, Animalia
Monohidrocalcita	CaCO ₃ ·H ₂ O	Hexagonal	Monera, Animalia
Dolomita	CaMg(CO ₃) ₂	Trigonal	Animalia
Fosfatos:			
Hidroxiapatita	Ca ₅ (PO ₄) ₃ (OH)	Hexagonal	Monera, Animalia
Monetita	CaHPO ₄	Triclínico	Animalia
Brushita	CaHPO ₄ ·2H ₂ O	Monoclínico	Animalia
Fosfato tricálcico	Ca ₃ (PO ₄) ₂	Monoclínico	Animalia
Whitlockita	Ca ₁₈ H ₂ (MgFe) ₂ ⁺² (PO ₄) ₁₄	Trigonal	Monera, Animalia
Fluoruros:			
Fluorita	CaF ₂	Cúbico	Animalia
Hieratita	K ₂ SiF ₆	Cúbico	Animalia
Jarosita	KFe ₃ (SO ₄) ₂ (OH) ₆	Trigonal	Monera
Sulfuros:			
Yeso	CaSO ₄ ·2H ₂ O	Monoclínico	Protista, Plantae, Animalia
Melanterita	FeSO ₄ ·7H ₂ O	Monoclínico	Monera
Celestina	SrSO ₄	Ortorrómico	Protista
Barita	BaSO ₄	Ortorrómico	Protista
Silicatos			
Ópalo	SiO ₂ ·nH ₂ O	Amorfo	Protista, Plantae, Animalia
Oxidos de Fe			
Magnetita	Fe ₃ O ₄	Cúbico	
Ferrihidrita	5Fe ₂ O ₃ ·9H ₂ O	Trigonal	Monera, Fungi, Plantae, Animalia
Sulfuros:			
Pirita	FeS ₂	Cúbico	Monera
Galena	PbS	Cúbico	Monera
Wurtzita	ZnS	Hexagonal	Monera
Esfalerita	ZnS	Cúbico	Monera
Acantita	Ag ₂ S	Monoclínico	Monera

Adaptada de Carretero-León et al. (2007)

II.4 Importancia de la biomineralización

La biomineralización se da ampliamente en la Naturaleza. Los biominerales pueden encontrarse en organismos de todos los reinos (Tabla 1). Este proceso les brinda características estructurales y de resistencia mecánica, desarrollando una serie de funciones biológicas como protección, movimiento, flotabilidad,

detección óptica, detección magnética, detección de gravedad, y almacenamiento (Freixedas et al., 2000; Mann, 2001). Los estudios de biomineralización han progresado desde la cristalización de materiales controlada orgánicamente, hasta mejoras biológicas basadas en materiales. Sin embargo, muchos mecanismos de cristalización y aplicaciones, siguen siendo desconocidos. La combinación de minerales con sistemas biológicos es un tema de investigación interesante, pero permanece en gran parte inexplorada. Estudios anteriores se han centrado en los efectos reguladores de los constituyentes orgánicos en la cristalización inorgánica. Por el contrario, las investigaciones actuales sobre biomineralización tienen como objetivo regular la influencia de las especies inorgánicas en los organismos biológicos (Yao et al., 2017).

II.5 Beneficios de la biomineralización *in vitro*

El término *in vitro* es una técnica en la que un fenómeno se lleva a cabo comúnmente en algún recipiente de vidrio o simplemente en un ambiente controlado, con la finalidad de monitorearlo (Abdelnour-Esquivel, 1994).

En el caso de la biomineralización *in vitro*, esta tiene como objetivo principal el conocer el mecanismo de nucleación y crecimiento de los cristales asistidos por una matriz orgánica (Veis et al., 2013). En la biomineralización, para conseguir una estructura cristalina determinada se necesita, además de los minerales, una superficie orgánica, que tiene la función de orientar la formación de la estructura cristalina y guiar su fase de nucleación. La combinación de estos dos materiales ayuda a la formación de estructuras más fuertes y rígidas de lo que son por sí solas, de manera que es necesaria su imitación a nivel laboratorio para observar y estudiar el proceso de formación y llevarlo a diferentes campos de especialización (Zavala-Corrales, 2017). Por ejemplo en el campo de la mineralogía ambiental, así como en el campo de la geobiología a través del

estudio de biominerales antiguos que almacenan información única en entornos antiguos; o en las ciencias médicas, a través del estudio de calcificaciones que ocurren en el cuerpo humano. En ambos casos, se debe estudiar tanto los minerales como las matrices orgánicas que participan en el proceso. Esto implica la combinación de herramientas y conocimientos producidos por la microbiología, bioquímica, ingeniería de materiales, medicina, etc. (Benzerara et al., 2011).

II.6 Antecedentes de la biomineralización *in vitro* en solución, utilizando extractos acuosos de salvado de trigo

El extracto acuoso de salvado de trigo (EAST) es rico en carbohidratos y proteínas solubles en agua con alto contenido de Asp y Glu. Luna-Valdez et al. (2017) reportaron la síntesis de nanopartículas proteicas de forma esférica a partir de EAST mediante la técnica de desolvatación/gelación en frío. Para esto se aplicó un pre-tratamiento térmico al EAST, seguido por adición de CaCl_2 y liofilización. Se observó la morfología y tamaño de las nanopartículas a diferentes concentraciones de CaCl_2 (0.25 - 1.5 M). De las concentraciones entre 0.25 y 1.0 M el diámetro de las nanopartículas proteicas se mantuvo constante; sin embargo a 1.5 M de CaCl_2 se encontró un aumento de tamaño significativo. Las nanopartículas resultantes a la concentración máxima (1.5 M) fueron analizadas por microscopía electrónica de barrido (MEB), observándose la presencia de cristales tales como sylvita (KCl), brushita ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), weddellita ($\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) y fosfato de magnesio sódico ($\text{Na}_{6.13}\text{Mg}_{1.44}(\text{PO}_4)_3$).

Los resultados obtenidos por Luna-Valdez et al. (2017) permitieron mostrar el potencial que tiene el EAST como plataforma para la biomineralización inducida de una variedad de minerales.

Posteriormente se diseñó un experimento que demostró la biomineralización con EAST como matriz orgánica y, al mismo tiempo, precursor de iones fosfato, y CaCl_2 como precursor de iones calcio (Zavala-Corrales, 2017). Mediante los métodos de solución y deposición en membrana, se observó el efecto de las condiciones del proceso sobre el tipo y cantidad de cristales formados. El experimento se realizó variando la concentración de CaCl_2 (0.25M, 0.75M y 1.5 M); el tipo de EAST (liofilizado y no liofilizado, ambos reconstituidos en agua al 10% p/v); la temperatura de incubación (refrigeración y ambiente), y el tiempo de incubación (5, 10 y 15 d). Se llegó a la conclusión que 0.75 M de CaCl_2 en un EAST liofilizado y reconstituido al 10% en agua, a temperatura de refrigeración (4-6°C) y 10 d de incubación fueron las condiciones para las que se obtenía la mayor cantidad de partículas, con morfología y tamaño bien definidos. Después de someter las partículas a caracterización se obtuvo el resultado de que el mineral resultante era el biomineral fosfato hidrógeno dicálcico dihidrato llamado brushita, precursor de la hidroxiapatita, siendo este último el principal componente de huesos y dientes.

Posteriormente (Pompa-Redondo, 2017), se determinó el efecto de la aplicación de un pre-tratamiento térmico a extractos acuosos de salvado de trigo (EAST), sobre las características físicas y la naturaleza de los precipitados formados durante la biomineralización con calcio a pH 8.0 y dos temperaturas de incubación. Se demostró que con tratamiento térmico y ajuste del pH a básico la cantidad de partículas precipitadas en EAST es mucho menor que en aquellos extractos en los cuales no se ajustaba el pH y la temperatura.

En los trabajos previos mencionados no se monitoreó el pH durante el transcurso de la biomineralización, razón por la que se considera que la brushita se formó a un pH cercano a la neutralidad o incluso básico, lo cual no es posible ya que la formación de brushita requiere de condiciones ácidas.

II.7 Definición de brushita

El fosfato dicálcico dihidrato (DCPD), comúnmente conocido como brushita, tiene la fórmula química, $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, caracterizado por una relación Ca/P de 1.0. La brushita se encuentra normalmente en los huesos y cálculos renales. En la Naturaleza, la brushita se encuentra en las cavernas habitadas por murciélagos, debido a que tanto las condiciones ambientales como la composición química del suelo y del guano son las adecuadas para su formación (Dumitraş et al., 2004). Una característica importante de la brushita es que es precursor de la hidroxiapatita (Hirsch et. al, 2014), siendo esta última el mayor componente de huesos y dientes. Además, la brushita es una fase de CaP común, estable en ambientes débilmente ácidos de pH 4–6. No obstante, por lo general su estabilidad es cuestionable ya que tiende a perder su molécula de agua para formar monetita incluso después de su almacenamiento en anaquel. Sin embargo, para explotar el uso potencial de la brushita, es importante que la fase no sólo se sintetice en condiciones fisiológicas, sino que también permanezca estable en esos entornos (Kumta et al., 2005).

La brushita posee usos versátiles como en la fabricación de vidrio o en fertilizantes, pero se usa más comúnmente en el área de la odontología como cemento para la reparación de huesos y dientes. La importancia de los cementos basados en brushita radica en su capacidad para descomponerse en ambientes fisiológicos y ser reabsorbidos por el organismo; este se disuelve al menos 3 veces más rápido que la hidroxiapatita (Tamimi, 2006).

II.8 Definición de fosfolípidos

Entre los diferentes tipos de lípidos cabe mencionar a los fosfolípidos. En su estructura, un ácido graso es sustituido por un grupo fosfato que contiene el mineral fósforo y muchas veces un átomo de nitrógeno, que le permite a las

grasas estar en un entorno acuoso. Por ello, cuando los fosfolípidos son colocados en agua su parte hidrofílica fosfato se dirige al exterior, estando en contacto con el agua, y su parte hidrófoba se agrupa hacia el interior, alejándose del agua (Byrd-Bredbenner, 2014). Su principal función es ofrecer garantías estructurales para la integridad de las membranas y ayudar a llevar a cabo sus funciones. Su estructura molecular, con carácter anfipático, permite la constitución de la bicapa lipídica esencial para la membrana celular (Casado-Bañares, 2014). Esta capacidad que tienen los fosfolípidos de formar compartimentos, se extiende también a algunos ácidos grasos. En el contexto de la biomineralización artificial o in vitro, tanto los fosfolípidos como los ácidos grasos podrían formar vesículas lipídicas en cuyo interior ocurra tanto la nucleación como el crecimiento de biominerales.

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

III.1 Obtención del salvado de trigo

El salvado de trigo (*Triticum aestivum* L.), calidad consumo humano, fue adquirido en una molinera comercial ubicada en Hermosillo, Son., México. Hasta antes de su procesamiento, el salvado estuvo empacado en bolsa de nylon y almacenado a 5 °C.

III.2 Limpieza en seco y lavado del salvado de trigo

El salvado fue cernido a través de un tamiz (ATM Advantech Mfg) con tamaño de malla No. 40 (USA), con el fin de eliminar las partículas más pequeñas, así como el exceso de harina o algún otro residuo. Para ello se colocaron pequeñas cantidades sobre la malla y se realizaron ligeros movimientos circulares con el fin de remover los residuos. El proceso de cernido se aceleró dando leves golpes en la parte lateral de la malla.

Posteriormente se colocaron aproximadamente 72 g de salvado de trigo cernido en una tela de organza (Figura 5a), formando un saco. El saco con el salvado se sumergió en agua HPLC agitando constantemente y haciendo presión sobre el salvado humedecido, hasta que el agua se tornó turbia. Este lavado se realizó dos veces, cambiando el agua en cada lavado, con el fin de retirar el almidón y la harina restante que no se pudo eliminar en el cernido (Figura 5b).

Una vez lavado, el salvado se distribuyó sobre charolas perforadas, cubiertas de papel aluminio, formando una capa delgada y evitando aglomeración, lo cual podría ocasionar fermentación (Figura 6). Después de secar a temperatura ambiente por unos minutos, las charolas fueron llevadas a una estufa de convección natural (VWR, PA, USA), donde se dejaron reposar a 40 °C durante

aproximadamente 18 h (Figura 7). Se procuró dejar una pequeña abertura en la puerta de la estufa para facilitar la salida del vapor de agua y evitar así fermentación del salvado. Una vez seco, el salvado se retiró de las charolas y se almacenó en bolsas de polietileno, en refrigeración (6 °C), hasta su uso.

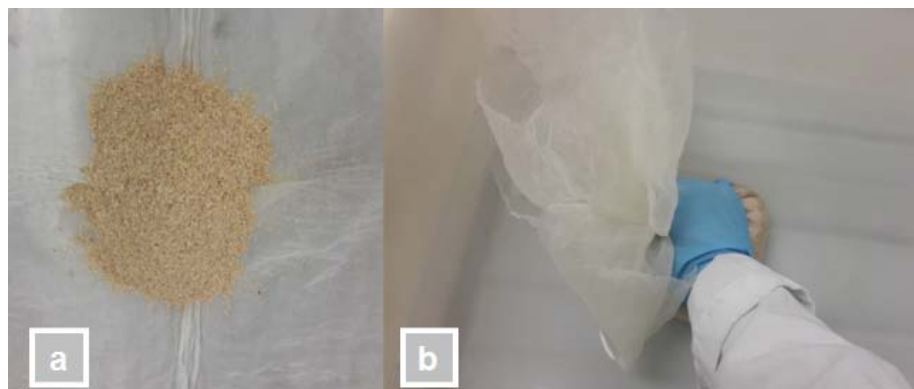


Figura 5. Lavado del salvado de trigo en H₂O HPLC. a) 72 g de salvado de trigo en tela de organza; b) salvado de trigo humedecido en H₂O HPLC, aplicando presión manual.

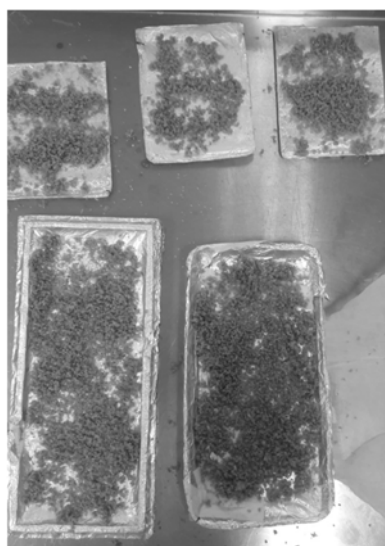


Figura 6. Distribución del salvado lavado, en charolas forradas con aluminio.



Figura 7. Charolas con salvado colocado dentro de una estufa de convección a 40°C.

III.3 Extracción acuosa del salvado de trigo.

En una serie de 12 tubos Falcon de 50 mL se colocaron 3 g de salvado lavado y seco, en cada tubo. Posteriormente, en cada tubo se vertieron 30 mL de H₂O HPLC para obtener una relación 1:10 (p/v) de salvado:H₂O HPLC (Figura 8).

Seguidamente se colocaron los 12 tubos en una rueda giratoria Stuart (Stuart Equipment® SB3, OSA, UK), en un ángulo de 60°. La rueda se mantuvo a una velocidad de 13 rpm durante 3 h a temperatura de refrigeración (6 °C) (Figura 9).

Una vez transcurrido el tiempo, el contenido de los 12 tubos se filtró a través de tela de organza, en un vaso de precipitados. El filtrado recuperado se refrigeró inmediatamente (6 °C) y se centrifugó como se describe a continuación.



Figura 8. Salvado de trigo seco, con agua HPLC, en una relación 1:10 (p/v).

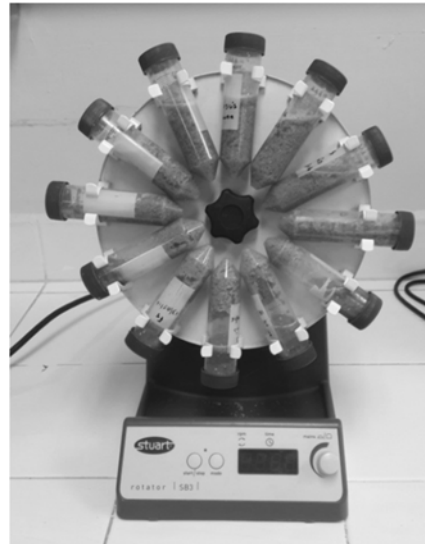


Figura 9. Tubos Falcon con salvado:H₂O en la rueda giratoria Stuart.

En cada corrida de centrifugación se colocaron en el rotor (modelo 630) 6 tubos, conteniendo 20 mL del filtrado del extracto acuoso de salvado de trigo. Antes de centrifugar, los 6 tubos con EAST acuoso se pre-acondicionaron a temperatura de refrigeración por un periodo de 10 a 15 minutos. La centrifugación se realizó en una centrífuga refrigerada Beckman Allegra (Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA, USA) a 4 °C y 6,000xg durante 20 min, con la finalidad de eliminar partículas de gran tamaño y el almidón remanente. Posteriormente, los sobrenadantes se transfirieron a tubos Falcon, colocando 35 mL en cada tubo, y se congelaron a -18 °C.

Una vez que se reunieron alrededor de 35 tubos, cada uno conteniendo 35 mL de extracto centrifugado y congelado, se les colocó en la boquilla papel parafilm agujereado, en lugar de la tapa, y se colocaron dentro de un liofilizador marca Labconco (Labconco®, MO, USA) (Figura 10). Se permitió la liofilización durante 5 días para eliminar el agua del extracto, obteniéndose al final un

producto en fino polvo (Figura 11) el cual fue nombrado extracto acuoso de salvado de trigo (EAST).

Todo el procedimiento anterior se repitió las veces que fueron necesarias hasta obtener la cantidad requerida de EAST para realizar los experimentos de biomineralización.

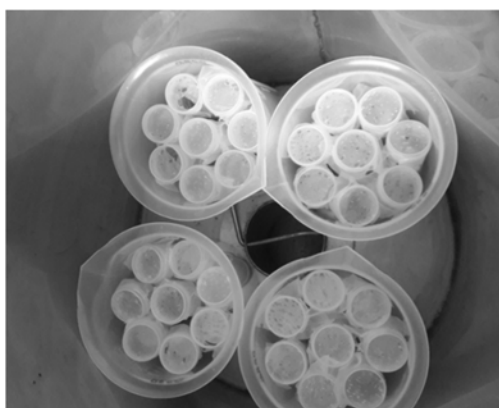


Figura 10. Tubos Falcon con extracto acuoso de salvado de trigo, centrifugado y congelado, dentro del liofilizador Labconco.



Figura 11. Extracto acuoso de salvado de trigo liofilizado (EAST).

III.4 Experimento para la verificación del pH durante la formación de brushita en solución, utilizando EAST como matriz orgánica

Se preparó una solución madre de EAST liofilizado (10% p/v) en agua desionizada MilliQ. La solución se agitó vigorosamente durante 20 min en una placa de agitación magnética, hasta disolución completa (Figura 12).

Después se midió el pH de la solución madre (pH_x) con un potenciómetro Modelo 215 (Denver Instruments, NY, EE.UU). Seguidamente, la solución

madre se dividió en tres volúmenes iguales, en vasos de precipitado. En dos de los vasos de precipitado se ajustó el pH de la solución madre a 8.0 y 5.0, respectivamente, dejando el tercero con su pH original.

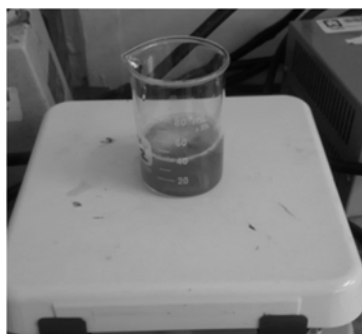


Figura 12. Solución madre de EAST liofilizado sobre una placa de agitación magnética.

Una vez ajustado el pH, se tomaron alícuotas de 500 μ L de cada uno de los vasos para determinar el contenido de proteína soluble por el método de Bradford. Posteriormente, cada uno de los 3 volúmenes se dividió en 4 partes iguales cada uno, con la finalidad de contar con un tubo control y tres réplicas (Figura 13).

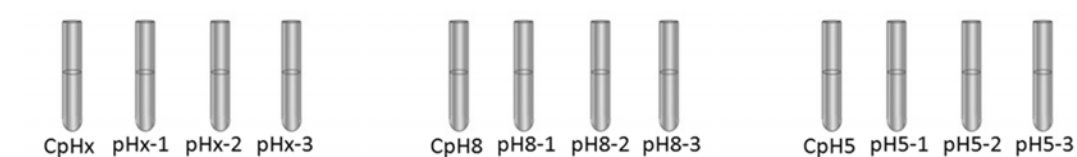


Figura 13. Diagrama de la separación de volúmenes de EAST liofilizado, solubilizado en H₂O HPLC a diferentes pH, y sus controles (C).

Se agregó a cada tubo, excepto a los controles, la cantidad necesaria de CaCl_2 0.75 M para dar una relación 1:10 (v/v). A los tubos control se les agregó un volumen equivalente de agua desionizada. Los tubos se mezclaron en vórtex y se les midió el pH y la temperatura (Figura 14), considerando estos como pH y temperatura al tiempo cero (pH_0 y t_0 , respectivamente).



Figura 14. Lectura de pH y temperatura en el potenciómetro.

Posteriormente se colocaron todos los tubos en el refrigerador (4-6 °C) y se registró diariamente el pH y la temperatura, durante 10 días. También se llevó a cabo una inspección visual diaria, anotando cualquier cambio en la apariencia y llevando un registro fotográfico.

La verificación del pH de formación de brushita se realizó analizando estadísticamente los datos de pH obtenidos durante todo el periodo de biomineralización, comparándolos con el pH inicial. Para este efecto se hizo un análisis de varianza (ANOVA), $p \leq 0.05$, con arreglo factorial.

Al final de los diez días, se recolectaron los precipitados correspondientes a cada tratamiento (sección III.5), asumiendo que son cristales. Se recuperaron las fases líquidas y se tomaron alícuotas de las mismas para medir proteína

soluble (sección III.7); se congeló el resto para su liofilización y análisis en el microscopio (sección III.6).

Posteriormente se preparó una segunda solución madre con EAST liofilizado desengrasado por el método de Goldfish, reconstituyendo con agua al 10% p/v. A diferencia de la solución madre anterior; esta únicamente se dividió en dos volúmenes iguales; uno se mantuvo a su pHx y el otro se ajustó a pH básico de 11. Asimismo, solamente se midió el pH al día cero y hasta el día final (día 10) con el objetivo de observar el efecto de la presencia de lípidos en la biomineralización.

Los datos registrados también fueron sometidos a análisis estadístico (ANOVA) y las partículas precipitadas fueron recuperadas y llevadas a análisis y caracterización.

III.5 Recuperación de los cristales formados durante la biomineralización, mediante lavado con agua

Una vez transcurridos los diez días de incubación, los tubos conteniendo el EAST en solución con precipitación de cristales, se agitaron en un agitador Vortex 2 VWR (Scientific Industries, NY, USA) para homogenizar la mezcla y facilitar la limpieza de los cristales precipitados en los tubos (Figura 15).

Posteriormente se colocó un poco de la mezcla sobre una caja Petri, a la cual se le agregaron 10 mL de H₂O HPLC, con la finalidad de diluir la solución de EAST y dejar los cristales insolubles en el fondo del recipiente (Figura 16a). Con el fin de facilitar el procedimiento, la caja Petri se agitó cuidadosamente sobre la mesa, en movimientos circulares, provocando la concentración de los cristales en el centro.



Figura 15. Homogenización de las soluciones de EAST con cristales precipitados, en un agitador Vortexer 2 VWR.

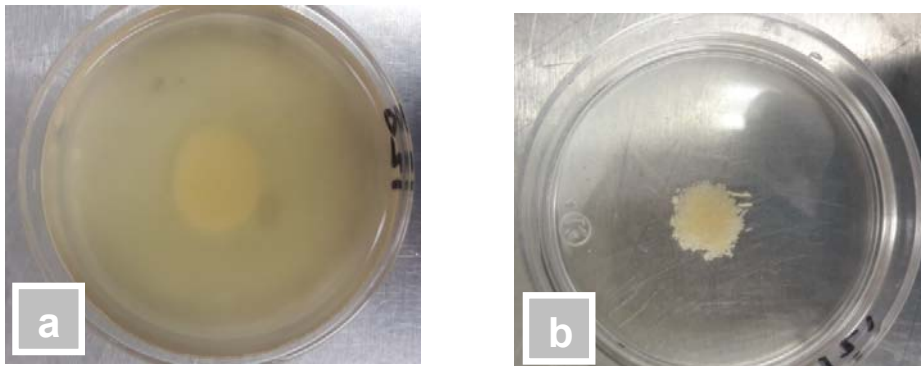


Figura 16. a) Precipitados de cristales dentro de la caja Petri; b) Cristales lavados.

Seguidamente, se extrajo el exceso de agua por las orillas de la caja Petri con una pipeta Pasteur, y se colocó un poco más de solución de EAST en la caja Petri, repitiendo el proceso.

Finalmente, después de lavar y recuperar todos los cristales concentrados en el centro de la caja Petri, correspondientes a cada muestra (Figura 16b), estos se transfirieron con ayuda de una pipeta Pasteur a tubos Eppendorf de 1.5 mL (Figura 17). Finalmente, los tubos Eppendorf, destapados, se colocaron en el interior de una estufa de convección a 40 °C, hasta sequedad de los cristales.

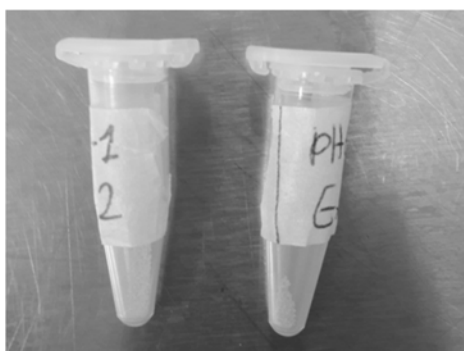


Figura 17. Cristales lavados, en tubos Eppendorf de 1.5 mL.

III.6 Visualización de cristales por microscopía estereoscópica

Con la finalidad de observar la morfología, tamaño y estructura a escala microscópica, de los cristales precipitados en las soluciones de EAST después del periodo de biomineralización, se utilizó un microscopio estereoscópico (Daigger, China). Para tal efecto, una parte de los cristales ya secos se depositaron sobre una plantilla cuadrículada con cuadros de 3 mm, los que sirvieron como escala, en el interior de una caja Petri.

Los cristales observados se observaron a una magnificación de 3x a 4x y las imágenes se digitalizaron para determinar el tamaño de las partículas.

III.7 Cuantificación de proteína soluble por el método de Bradford

El método de Bradford (Bradford, 1976) consiste en cuantificar espectrofotométricamente la unión de un colorante, en este caso el reactivo de Bradford Bio-Rad 500-0006, llamado también Azul de Coomassie G-250, a la proteína, comparando esta unión con la de una proteína estándar preparada a diferentes concentraciones; en este caso se utilizó albúmina de suero de bovinos (ASB). Este método se utilizó para determinar el contenido de proteína soluble en las diferentes soluciones de EAST antes y después de la biomineralización.

Primeramente se preparó una serie de estándares de concentración conocida a partir de una solución madre de ASB, con el objetivo de realizar una curva de calibración como referencia para calcular la concentración de proteína soluble en muestras desconocidas. Se tomaron alícuotas de 50 μ L de cada estándar y posteriormente se adicionaron 1.5 mL de Azul de Coomassie G-250. Después de homogenizar en el agitador Vortexer 2 VWR por 8 segundos, se reposaron los tubos durante 5 min para que el reactivo Azul de Coomassie G-250 reaccionara con las proteínas. También se preparó un blanco de reacción, usando agua HPLC en vez de los estándares. Después de los 5 min de reposo se midió la absorbancia de cada solución en un espectrofotómetro UV-Vis Cary 60 (Agilent Technologies® CA, USA) (Figura 18), a una longitud de onda de 595 nm.



Figura 18. Espectrofotómetro UV-Vis Cary 60 (Agilent Technologies® CA, USA).

La absorbancia del blanco se ajustó a cero antes de medir la de los estándares, lo cual se hizo en el orden de menor a mayor concentración.

Posteriormente, se leyeron las muestras de EAST correspondientes a los experimentos de biomineralización. Puesto que la concentración de proteínas en las muestras fue mayor que en los estándares, las muestras de EAST se diluyeron con agua HPLC de la siguiente manera: 10 μ L de muestra en 100 μ L de agua HPLC. Después, se tomaron 50 μ L de la dilución y se mezclaron con 1.5 mL de Azul de Coomassie G-250. La mezcla se agitó para homogenizar en el agitador Vortex. Después de 5 minutos de reacción, se leyó su absorbancia en el espectrofotómetro a 595 nm.

Una vez obtenidos todos los datos se construyó la curva de calibración Absorbancia vs. Concentración con los datos de los estándares y mediante regresión lineal se obtuvo la ecuación de la recta. Con esta, por interpolación de las absorbancias se calculó la concentración de proteína soluble en las muestras de EAST.

III.8 Determinación de proteínas totales por el método micro Kjeldahl

A consecuencia de la estructura de los aminoácidos individuales presentes en las proteínas, el contenido de nitrógeno varía escasamente, por lo que es posible determinar el contenido de proteína total de manera analítica por su contenido general de nitrógeno, tras digestión de la materia orgánica con ácido sulfúrico. Finalmente, el contenido de proteína se calcula multiplicando la concentración de nitrógeno por un factor (F) que depende del alimento (en general, $F = 6.25$). En el presente trabajo se utilizó el método micro Kjeldahl (AOAC, 2000) para cuantificar proteína total en el EAST, valor base utilizado para preparar las soluciones madre y para calcular el rendimiento de extracción. El procedimiento se describe a continuación.

El método micro Kjeldahl se divide en tres partes: 1) digestión, 2) destilación y 3) valoración. Para el proceso de digestión se pesaron 0.2 g de muestra de EAST y 1.5 g de mezcla de catalizadores (una preparación consistente en 5 g de $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y 93 g de K_2SO_4), los cuales se vertieron dentro de un matraz Balón micro Kjeldahl de 100 mL. Luego, a cada tubo se añadieron 3 mL de H_2SO_4 concentrado y posteriormente se colocaron en el digestor micro Kjeldahl dentro de una campana a temperatura de calentamiento (Figura 19). Una vez que la muestra de EAST se digirió totalmente, lo cual se indicó por el desarrollo de un color azul verdoso transparente, se apagó el digestor y se dejó enfriar a temperatura ambiente.



Figura 19. Muestras de EAST en proceso de digestión, en un digestor micro Kjeldahl, para la cuantificación de proteína total.

En el proceso de destilación se agregaron 10 mL de agua destilada al matraz Balón micro Kjeldahl (Figura 20) con el objetivo de disolver sales y poder llevar a cabo la destilación.



Figura 20. Disolución de sales con agua destilada, previo a la destilación.

Una vez lograda la disolución, el contenido de cada matraz, uno a la vez, se vertió en el receptor de la muestra del destilador micro Kjeldahl y se abrió la llave del destilador para que la muestra reposara en el contenedor. En la salida del destilador se colocó un matraz Erlenmeyer de 50 mL con 15 mL de ácido bórico al 4% y dos gotas de indicador rojo de metilo modificado. Se añadió NaOH al 40% en el receptor del destilador micro Kjeldahl y se vertió de poco a poco en el contenedor hasta que la solución se tornó de un color marrón uniforme. Se cerró la llave para encender el equipo y se colocó la pinza en el contenedor con el fin de controlar la presión interna del mismo. En cuanto la solución de ácido bórico al 4% cambió de color (verde), se comenzó a tomar el tiempo por 5 minutos (Figura 21). Pasado el tiempo se retiró el matraz Erlenmeyer y se abrió la llave de desecho. Finalmente se enjuagó el destilador con agua destilada dos veces.

Finalmente se pasó al proceso de valoración, en donde se colocó el matraz Erlenmeyer debajo de una bureta previamente llena con HCl 0.1 N. Gota por gota se agregó el HCl dentro de la solución color verde del matraz Erlenmeyer, agitando continuamente hasta que la solución cambió de color; entonces se

registró el volumen gastado. El porcentaje de proteína se calculó con la Ecuación 1.

$$\%P = \frac{(mL \text{ gastados de HCl})(N \text{ del HCl})(14.007)(\text{factor proteico})(100)}{\text{Peso de la muestra, mg}} \quad (1)$$



Figura 21. Destilador Labconco. a) Inicio de la destilación; b) Fin de la destilación.

III.9 Caracterización del perfil de ácidos grasos de los lípidos presentes en los extractos acuosos de salvado de trigo.

III.9.1 Extracción y cuantificación de lípidos del EAST por el método Goldfish

Para caracterizar el perfil de ácidos grasos presentes en el EAST es necesario primero extraer los lípidos, los cuales son analizados posteriormente por cromatografía de gases. Para ello se utilizó el método de Goldfish (AOAC, 2000).

La extracción de grasa por Goldfish consta del calentamiento de un solvente orgánico, el cual se volatiliza y se condensa sobre la muestra que está siendo extraída. El solvente condensado gotea periódicamente sobre la muestra para extraer la grasa. Finalmente, el contenido de grasa se cuantifica por la diferencia entre el peso inicial de la muestra y el de la grasa removida.

Inicialmente se pesaron 1.5 g de muestra de EAST en un papel filtro, enrollando con cuidado el papel y colocándolo dentro de un dedal de celulosa (Figura 22). El dedal fue colocado en un extractor de grasa Goldfish (Figura 23).



Figura 22. Dedales de celulosa.



Figura 23. Extractor de grasa Goldfish.

El dedal se insertó en una pinza de resorte que sostiene el condensador Goldfish y se alineó para un mejor flujo. A los vasos de extracción se les agregaron 40 mL de éter y se engranó el condensador con un anillo de cierre. Se aplicó calor deslizando la placa de calentamiento hacia la parte inferior del vaso de Goldfish. El tiempo de extracción fue de 4 h a partir de que comenzó el goteo (Figura 24).

Una vez completa la extracción, el recipiente de la muestra se retiró y se reemplazó con un tubo de recuperación de solvente. Los vasos Goldfish se transfirieron a una estufa a 100 °C, donde permanecieron por 1 h (Figura 25), después a un desecador durante 30 minutos, para ser enfriados y finalmente se pesaron. El porcentaje de grasa se calculó con la Ecuación 2.

$$\%G = \frac{((\text{Peso del vaso} + \text{grasa}) - (\text{Peso del vaso})) (100)}{\text{Peso de la muestra}} \quad (2)$$

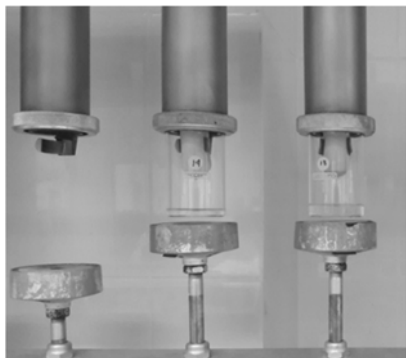


Figura 24. Los dedos colocados en el extractor Goldfish, dentro de un vaso Goldfish; el condensador en la parte superior y la placa de calentamiento en la parte inferior.

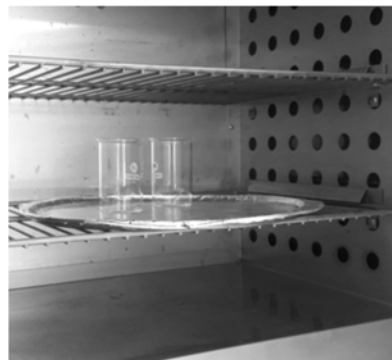


Figura 25. Vasos Goldfish colocados en la estufa a 100 °C después de la extracción de lípidos.

III.9.2 Análisis de la composición de ácidos grasos presentes en EAST, por cromatografía de gases

Para la cuantificación de ácidos grasos se empleó la cromatografía de gases. En general, el método consiste en inyectar una mezcla de estándares de ácidos grasos (con concentraciones y tiempos de retención definidos) y una muestra desconocida, en un cromatógrafo de gases. La comparación de los picos de los estándares obtenidos en el cromatograma con los de la muestra desconocida, permite la identificación de los ácidos grasos presentes en esta última, mientras que el cálculo de las áreas relativas de los picos se utiliza para la cuantificación.

A 2 g de muestra se les agregó metanol-cloroformo en una relación 2:1 y se homogenizó con agitación mecánica. Posteriormente se añadieron 4 mL de KOH al 0.88% y 2.5 mL de agua y se agitó nuevamente hasta formar dos fases; en el sobrenadante se encuentran proteínas, mientras que en la fase

precipitada se encuentran lípidos disueltos en cloroformo, esta última fase es la que se recuperó.

Una vez recuperada, la fase se protegió de la luz y se expuso a un flujo de N₂ durante 1 min. Seguidamente se tomó 1 mL del precipitado recuperado y se pasó a baño maría con flujo de N₂, con el fin de evaporar el solvente. Cuando se obtuvieron aproximadamente 20 mg de grasa se adicionaron 100 µL de diclorometano y 1 mL de NaOH 0.5 M en metanol.

Nuevamente se pasó a baño maría con flujo de N₂ por un lapso de 10 min. Se agregó 1 mL de BF₃ al 14% en metanol y se desplazó el aire con flujo de N₂. Finalmente se añadió 1 mL de agua, 500 µL de hexano y 500 µL de estándar (ácido tridecanoico C13:0), Se mezcló hasta formar dos fases, de ellas se recuperó el sobrenadante y se colocó en un vial cromatográfico a un volumen de inyección de 1 µL. Se realizó una corrida con una rampa de temperatura de 50°C, 1 min, 25°C/min hasta 140°C, 4°C/min hasta 230°C; a una presión de 300 kPa y una velocidad de flujo de 0.8 mL/min. Los ácidos grasos presentes fueron analizados en un cromatógrafo de gases (CG) Agilent modelo 6850 (Agilent Instruments., Santa Clara, CA, USA) (Figura 26). Los datos fueron analizados mediante el programa de CG ChemStation.



Figura 26. Cromatógrafo de gases CG Agilent modelo 6850 (Agilent Instruments, Santa Clara, CA, USA).

III.10 Visualización de los cristales precipitados por microscopía electrónica de barrido (SEM)

Para observar la morfología, tamaño y estructura interna, las partículas precipitadas fueron observadas en un microscopio electrónico de barrido (SEM).

Primeramente, las muestras, colocadas sobre un porta muestras, se recubrieron con una capa de oro-paladio por medio de un revestidor de bombardeo Q150R ES (Quorum Technologies Ltd., USA). Posteriormente, fueron observadas en un microscopio JEOL JSM-7600F (JEOL. Ltd., Tokio, Japón). Se tomaron imágenes con magnificaciones de 700X a 10,000X, aplicando un voltaje de aceleración de 2 kV.

III.11 Análisis de la composición elemental de los cristales precipitados por espectroscopía de energía dispersiva de rayos X (EDS)

La composición elemental de los cristales fue analizada por espectroscopía de energía dispersiva de rayos X (EDS), en un microscopio electrónico JEOL JMS-7600F (JEOL Ltd., Tokio, Japón). Por medio de un revestidor de bombardeo Q150R ES (Quorum Technologies Ltd., USA), las muestras se revistieron con una capa de oro-paladio, sobre un porta-muestras en una cinta de cobre. Se escaneó un área de 30,000 μm^2 sobre la muestra, con el fin de identificar los elementos presentes en la superficie de los cristales.

III.12 Análisis de los cristales precipitados por difracción de rayos X (DRX)

Para comprobar la identidad y naturaleza cristalina de los cristales precipitados, estos se sometieron a análisis cristalográfico mediante difracción de rayos X. El análisis se realizó con un difractómetro de rayos X SIEMENS D5000. Se

hicieron mediciones en las muestras con una longitud de onda de 1.54 Å, 2 θ valuado desde 3 a 70° y con una duración de 12 s.

III.13 Análisis de los cristales precipitados por espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)

Para complementar la identificación de los cristales precipitados, estos se sometieron a espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR). El espectro IR de una sustancia pura constituye la huella digital de la misma, por lo que el análisis FTIR es rutinario en el estudio de cristales. Los grupos funcionales presentes en los precipitados secados a 40 °C fueron analizados en un espectrofotómetro Nicolet Nexus 670-FTIR (Nicolet Instrument Corp., Madison, WI USA) Para ello, se pulverizaron y se homogenizaron con KBr en una relación 1:100; el compuesto KBr fue usado como soporte de los precipitados cristalinos. Se llevaron a cabo 64 escaneos por muestra a una resolución de 4 cm⁻¹ a una velocidad de 0.6329 cm/s, en el rango de 400 a 4,000 cm⁻¹. Los datos de transmitancia vs. número de onda se graficaron en el software OriginPro 8.6.0 (OriginLab Corp., MA, USA) para obtener los espectros IR.

III.14 Visualización de cristales por microscopía de fluorescencia

Para observar la posible formación de vesículas precursoras en la biomineralización con EAST, los precipitados fueron llevados a un microscopio de fluorescencia Axis Vert.A1 (Zeiss, Oberkochen, Alemania). Con ayuda de una pipeta Pasteur se tomó una muestra de los precipitados obtenidos justo después de agregar CaCl₂ al EAST preparado al 10% (p/v). Seguidamente, las muestras fueron colocadas en un portaobjetos y observadas en el microscopio.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1 Verificación del pH durante la formación de brushita en solución, utilizando EAST como matriz orgánica

Como se mencionó en la sección III (Metodología Experimental), se llevaron a cabo tres observaciones de pH en función del tiempo. En dos de ellas, el pH inicial del EAST (previo a la adición de CaCl_2) se ajustó a 5.0 y 8.0, respectivamente, mientras que en la tercera no hubo ajuste sino que se experimentó con el pH resultante al disolver el EAST, cuyo valor promedio fue de 6.27, pero para efectos de simplificación de aquí en adelante se manejará como pH 6.0. Al ajustar el pH a 8.0 con NaOH, el EAST presentó un cambio a color marrón oscuro mientras que no presentó cambios de coloración notorios al ajustar el pH a 5.0, como se puede observar al comparar las muestras control en las Figuras 27a, 27c y 27e.

Después de atemperar las muestras a 6 ± 2 °C y agregar el CaCl_2 0.75 M, el resultado fue una precipitación espontánea de lo que se asume ser una fase incipiente de fosfato de calcio dihidratado o brushita, de acuerdo con lo reportado por Zavala-Corrales (2017), acompañada de una disminución significativa del pH en todas las muestras, excepto en el EAST con pH inicial 5.0 (Figura 27; Tabla 3).

Generalmente, la precipitación de minerales de fosfato de calcio es un fenómeno específico, es decir que las fases precipitadas dependen de la concentración de calcio y fósforo en la solución, del pH y la temperatura (Arifuzzaman et al., 2007). En la presente investigación, el pH fue la única variable independiente. Pese a que los cambios de pH fueron pequeños de un experimento a otro, se observó variación en el tamaño y cantidad de los cristales formados. A pH 5, los cristales fueron muy pequeños, tanto que en algunas repeticiones no fue posible recuperarlos. A pH 6 fue donde se recuperaron los cristales de mayor tamaño y con una morfología mejor definida,

mientras que a pH 8 los cristales fueron mucho más grandes que a pH 5 pero de menor tamaño que a pH 6. Finalmente, a pH 11 el precipitado no presentó formas definidas, únicamente un polvo amorfo. Los detalles en cuanto a tamaños se describen en la sección IV.2.

El análisis estadístico (ANOVA) de las observaciones de pH obtenidas a lo largo de 10 d se muestra en la Tabla 2. Como se observa en la columna de nivel probabilidad, el tiempo no tuvo efectos significativos sobre el pH, lo que quiere decir que en los tres diferentes tratamientos el pH promedio se mantuvo casi constante a lo largo del experimento. Esto último se observa gráficamente en la Figura 28. En cambio, tanto el pH inicial (pH_0) como la interacción entre el tiempo y pH_0 tuvieron efectos significativos sobre el pH medido, respectivamente, como se aprecia en la Figura 29. En el caso de la Figura 30 se observa que los valores medios de los pH medidos sobre cada pH a lo largo del tiempo tienen un comportamiento constante, sobre todo el EAST de pH inicial 8.

Tabla 2. Análisis de varianza, mostrando los efectos del pH inicial (pH_0) y el tiempo de incubación sobre el pH medido durante la biomineralización con EAST.

Término	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-Ratio	Nivel de probabilidad	Poder (Alfa=0.05)
A: Tiempo	10	9.92E-02	9.92E-03	0.99	0.468	0.434
B: pH_0	2	22.69	11.34482	1133.42	0.000*	1
AB	20	0.736	3.68E-02	3.67	2.48E-04*	0.998
S	39	0.390	0.01			
Total (Ajustado)	71	24.734				
Total	72					

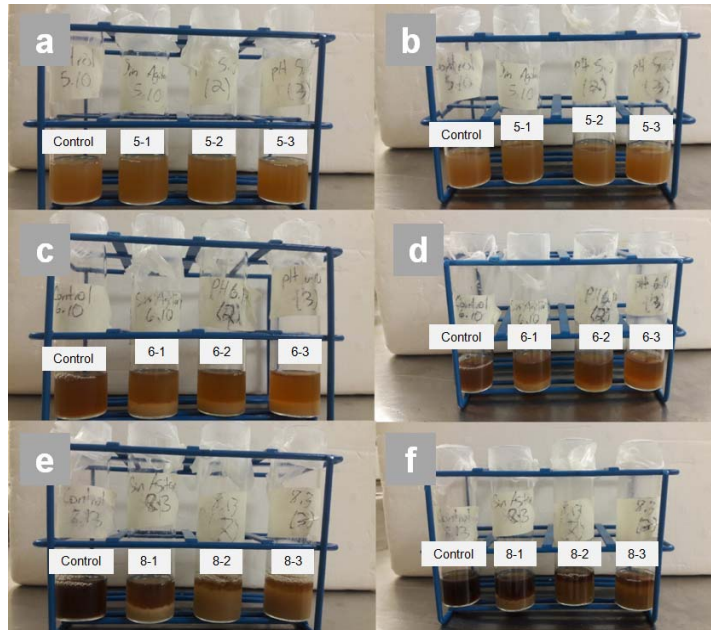


Figura 27. Apariencia del EAST al inicio y al final de la biomineralización a diferente pH. a) EAST a pH 5 en día cero; b) EAST a pH 5 en día diez; c) EAST a pH 6 en día cero; d) EAST a pH 6 en día diez; e) EAST a pH 8 en día cero; f) EAST a pH 8 en día diez.

Tabla 3. Valores de pH registrados en extractos acuosos de salvado de trigo con pH inicial ajustado a 5, 6 y 8, adicionados con CaCl₂ 0.75 M e incubados durante 10 días a 6.0±2.0 °C

Tiempo (d)*	pH inicial (previo a la adición de CaCl ₂)		
	5.0 ^a	6.0 ^a	8.0 ^a
	pH medido en función del tiempo de incubación		
0	4.7±0.06 ^a	5.5±0.06 ^b	6.3±0.06 ^c
1	4.9±0.06 ^a	5.5±0.06 ^b	6.2±0.06 ^c
2	4.8±0.06 ^a	5.4±0.06 ^b	6.2±0.06 ^c
3	4.9±0.06 ^a	5.4±0.06 ^b	6.2±0.06 ^c
4	4.8±0.06 ^a	5.2±0.06 ^b	6.2±0.06 ^c
5	5.0±0.06 ^a	5.3±0.06 ^b	6.3±0.06 ^c
6	4.9±0.06 ^a	5.3±0.06 ^b	6.2±0.06 ^c
7	4.9±0.06 ^a	5.2±0.06 ^b	6.3±0.06 ^c
8	5.0±0.06 ^a	5.1±0.06 ^b	6.2±0.06 ^c
9	5.0±0.06 ^a	5.1±0.06 ^b	6.3±0.06 ^c
10	5.0±0.06 ^a	5.3±0.06 ^b	6.3±0.06 ^c

*El pH al tiempo 0 es el que se registró justo después de agregar el CaCl₂. El pH reportado en función del tiempo es promedio de 3 repeticiones ± error estándar. Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas a p≤0.05.

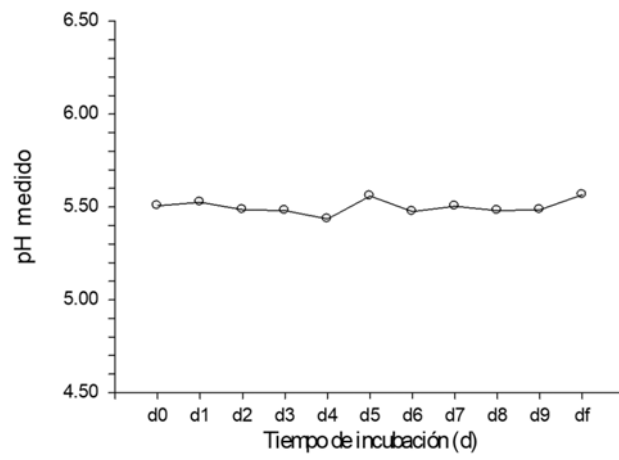


Figura 28. Promedios del pH medido con respecto al tiempo durante la biomineralización de EAST.

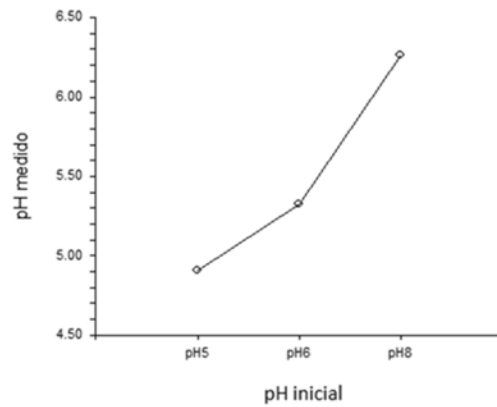


Figura 29. Promedios del pH medido con respecto al pH inicial durante la biomineralización de EAST.

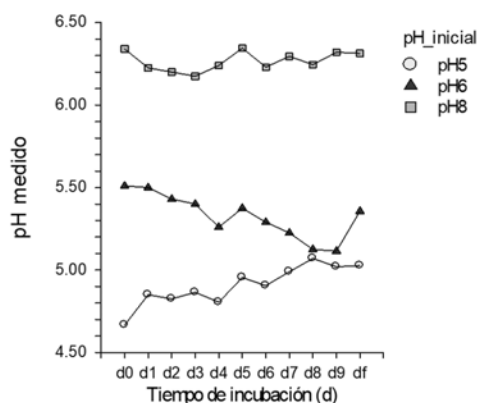


Figura 30. Promedio del pH medido con respecto al tiempo y al pH inicial

Durante el transcurso del experimento, se obtuvo un pH medio global de 5.50. En las muestras con pH inicial 5, el pH descendió muy poco después de adicionar el CaCl_2 , y se mantuvo casi constante durante los 10 d del experimento, con un promedio de 4.9. En este caso casi no precipitaron cristales. Por otro lado, en el EAST de pH inicial 8, posterior a la adición de CaCl_2 el valor disminuyó de forma tal que se mantuvo un promedio de 6.27 durante los 10 d. Aquí se obtuvieron un poco más de cristales que en las muestras con pH inicial 5, pero menos que en aquellas con pH inicial 6.27. En este último, el pH descendió hasta un promedio de 5.33 a lo largo de los 10 d, y fue donde se recuperó el mayor número de cristales, con una eficiencia del 63.93%. Este valor de pH se encuentra dentro del rango reportado por Mekmene et al. (2009), donde los valores de pH descendieron entre 5.13 y 5.96.

En el trabajo de Mekmene et al. (2009) se realizó una precipitación similar pero sin matriz orgánica, es decir únicamente se mezclaron soluciones de cloruro de calcio y fosfato disódico a diferentes valores de pH, por un lapso de 3 h. Se registró un comportamiento similar al presentado en la Figura 31, el cual indica

que se mantuvo un comportamiento constante después de la nucleación, es decir cuando ocurrió la precipitación espontánea.

En la cristalización se pueden distinguir dos etapas: nucleación y crecimiento. En la nucleación se forman colonias de unos pocos centenares de átomos, llamados núcleos, con la estructura y disposición atómica característica de la nueva fase. Durante el crecimiento, estos núcleos crecen en tamaño (Montes-Martos et al., 2014).

En diversos trabajos se ha reportado que la nucleación de la brushita ocurre a pH inferior a 6.5 (Boistelle et al., 1990; Perassi et al., 2014; Arifuzzaman et al., 2004). Arifuzzaman et al. (2004) llevaron a cabo la precipitación de brushita en un reactor batch, realizando 18 experimentos. Se encontró que la nucleación se lleva a cabo con un descenso del pH en un rango de 6.4 a 4.25 (Figura 31). En el caso de la experimentación de biomineralización con EAST el descenso de pH en las muestras sin ajustar ocurre aproximadamente en un rango de 6.27 a 5.1.

Finalmente, en el experimento de biomineralización realizado con EAST desengrasado, este último obtenido como residuo del proceso de extracción de grasa, se omitieron las observaciones de pH 5 y 8. En cambio, se utilizó el pH del EAST desengrasado sin ajustar, obteniendo un promedio de 6.33, además de un pH básico ajustado a 11. Se tomó lectura de los valores de pH únicamente al día cero (d0) y al día diez (df). La falta de grasa en la muestra de EAST no afectó significativamente los valores de pH. En la Tabla 4 se aprecia que el pH inicial y el tiempo son variables en las que se presenta un efecto significativo y no la interacción de ambas variables; esto probablemente se deba a que el muestreo sólo se llevó a cabo al inicio y al final del experimento, y no periódicamente, por lo que su interacción no fue apreciable. Sin embargo, la condición de muestrear al inicio y al final era necesaria para no perturbar el proceso, además de que solo se requería conocer las características de los

crisales al final de los 10 d. El pH inicial de 6.33 bajó hasta un promedio de 5.63, valor cercano a la muestra sin desengrasar, mientras que el pH inicial de 11 bajó hasta un promedio de 8.62 (Tabla 5). En la Figura 32 se aprecia una comparación con respecto al comportamiento del experimento de EAST desengrasado y el sin modificar.

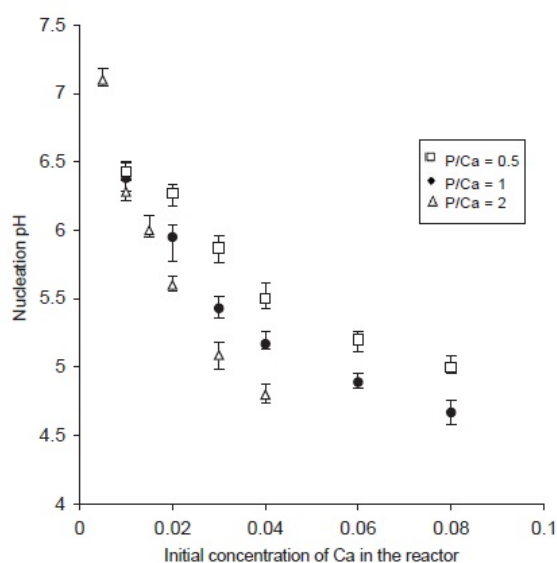


Figura 31. Variación del pH de nucleación de brushita con la concentración inicial de calcio. Fuente: Arifuzzaman et al., 2004.

Tabla 4. Análisis de varianza, mostrando los efectos del pH inicial (pH_0) y el tiempo de incubación sobre el pH medido durante la biomineralización con EAST desengrasado.

Término	GL	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-Ratio	Nivel de Prob	Poder (Alfa=0.05)
A: pH_0	1	19.096	19.097	350.87	4.8E-05*	1
B: Tiempo	1	0.781	0.781	14.35	0.019*	0.806
AB	1	0.273	0.273	5.03	0.088	0.403
S	4	0.217	0.054			
Total (Ajustado)	7	20.369				
Total	8					

Tabla 5. Valores de pH registrados al inicio y al final de la biomineralización con extractos acuosos de salvado de trigo (EAST), desengrasados, con pH inicial (pH_0) ajustado a 6 ó 11, adicionados con $CaCl_2$ 0.75 M e incubados durante 10 días a 6.0 ± 2.0 °C.

Tiempo (d)	pH_0 (previo a la adición de $CaCl_2$)	
	6.0	11.0
	pH medido al inicio y al final de la incubación	
0	5.8 ± 0.06	9.3 ± 0.06
10	5.5 ± 0.06	8.3 ± 0.06



Figura 32. Comportamiento de los valores promedios de pH medido con respecto al tiempo y su pH inicial. a) EAST sin modificar; b) EAST desengrasado

IV.2 Análisis de la visualización de cristales de brushita por microscopía estereoscópica

Se observó la morfología de las partículas precipitadas a diversos pH experimentales por medio de la microscopía estereoscópica. Se determinó que el pH es un factor que tiene efecto tanto sobre la formación como sobre la morfología de cristales.

En la Figura 33 se muestran los cristales extraídos a pH 5, 6, 8 y 11 sin perturbaciones, es decir, sin agitar al realizar la medición potenciométrica. A pH 5, 6 y 8 se presentaron cristales de forma esférica bien definida, con diámetros promedio de 90, 169 y 246 μm , respectivamente. No obstante, a pH 11 el precipitado consistió en un polvo fino de color blanco en el que no se identificaron formas definidas.

En trabajos anteriores se han precipitado cristales de brushita durante la biomineralización con EAST, variando las condiciones tanto de pH como de temperatura a la que fue sometido el EAST antes del proceso (Zavala-Corrales, 2017; Pompa-Redondo, 2017). Pompa-Redondo (2017) reportó precipitación de cristales con EAST pre-tratado térmicamente a 68.5 °C y ajustando a pH básico (8.0) previo a la adición de CaCl_2 , encontrando morfologías mucho más definidas en un EAST sin pre-tratamiento térmico y sin ajuste de pH (pH inicial de 6.5).

Como se mencionó en la sección III (Metodología Experimental), en el caso de los pH 5, 6 y 8 se realizaron dos repeticiones en una de las cuales se aplicó agitación cuando se tomó la lectura de pH, durante los 10 d. Se encontró que la agitación tiene un efecto en el tamaño de los cristales; aquellas repeticiones en las que se aplicó agitación dieron como resultado cristales de menor diámetro. Aplicando agitación, a pH 6 y 8 los diámetros resultantes dieron un promedio de 84 μm , en ambos casos, casi tres y dos veces menor, respectivamente (Figura 34). En el caso de pH 5 con agitación no se encontraron partículas precipitadas

visibles. En la Figura 35 se presentan los cristales precipitados en EAST desengrasado con un tiempo de incubación de 10 d a una temperatura promedio de 6 °C, a pH 6 y 11. Pese a que estas muestras no se agitaron, las partículas a pH 6 muestran un tamaño mucho menor a las observadas en la Figura 33, con un diámetro promedio de 71 μm . A pH 11 no se ve gran diferencia.

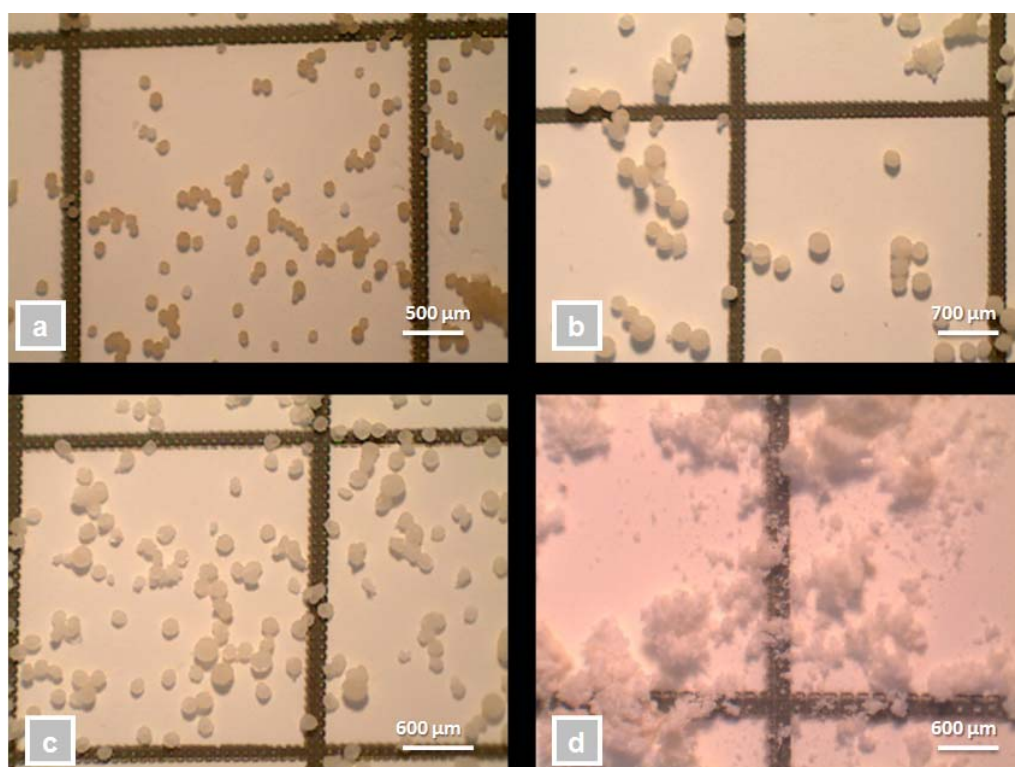


Figura 33. Imágenes estereoscópicas de cristales precipitados durante la biomineralización de EAST a diferentes pH, 6 °C, 10 d de incubación, sin agitación previa a la medición diaria de pH. a) pH 5; b) pH 6; c) pH 8; d) pH 11.

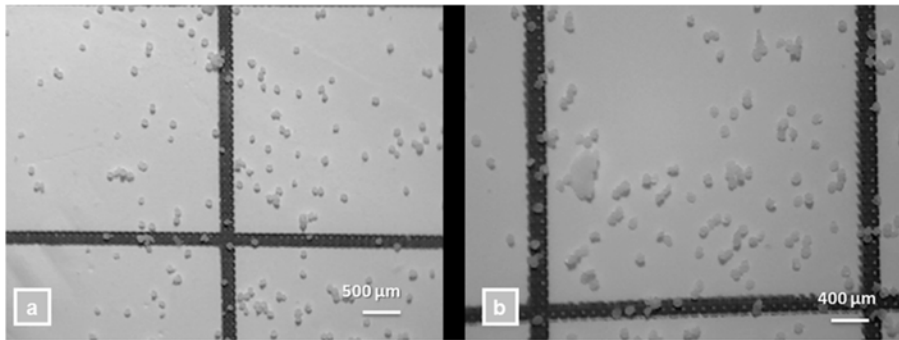


Figura 34. Imágenes estereoscópicas de cristales precipitados durante la biomineralización de EAST a diferente pH, 6 °C, 10 d de incubación, con agitación previa a la medición diaria de pH. a) pH 6; b) pH 8.

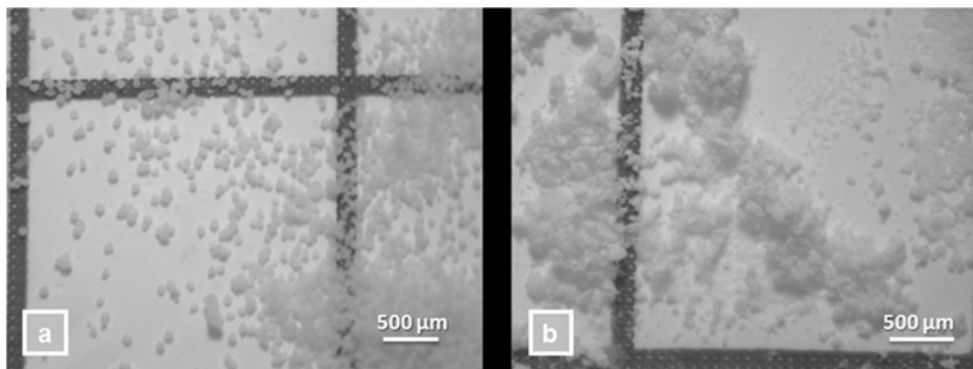


Figura 35. Imágenes estereoscópicas de cristales precipitados en la biomineralización de EAST a 6 °C, incubado por 10 d, desengrasado; sin agitación. a) pH 6; b) pH 11.

IV.3 Análisis de cuantificación de proteína soluble por el método de Bradford y de proteínas totales por el método micro Kjeldahl

Por el método micro Kjeldahl se obtuvo el porcentaje de proteína de EAST liofilizado, el cual tuvo un valor de 19.42%. En el salvado de trigo se ha reportado un valor de 15.5% de contenido proteico (Baladrán-Quintana et. al, 2015). Por otro lado, Luna-Valdez et al. (2016) reportaron para el EAST un contenido proteico de 23% y un perfil de aminoácidos en el que destaca un alto contenido de Glu y Asp. Estos dos aminoácidos representan un contenido significativo en las albúminas en general (Luna-Valdez et. al, 2017). La albúmina es una de las proteínas plasmáticas más pequeñas, y dada su naturaleza altamente polar, se disuelve fácilmente en agua (Baynes et. al, 2011). Puesto que las albúminas representan el 20% del contenido total de proteínas en el salvado de trigo, se puede estimar que la extracción acuosa de proteína de salvado de trigo consta de un rendimiento de hasta 52% (Luna-Valdez et. al, 2017). En el presente trabajo este rendimiento fue ligeramente menor al 42%.

Por el método de Bradford se cuantificó la cantidad de proteína soluble en las soluciones de EAST antes y después de la biomineralización. En la Tabla 6 se reporta el análisis de varianza del efecto del pH inicial sobre la concentración de proteína en las soluciones de EAST después de la biomineralización, indicando que no existe un efecto significativo. Por otro lado, la Tabla 7 describe el análisis de varianza del efecto del pH inicial sobre la concentración de proteína en EAST desengrasado después de la biomineralización, donde sí se observan efectos significativos. Esto podría deberse a que la diferencia de pH entre las muestras no desengrasadas (Tabla 2) no es tan grande como en el caso de las muestras desengrasadas (Tabla 4).

En la Tabla 8, se presentan los valores de concentración proteica registrados en el control y al final del proceso de biomineralización (sobrenadante). Como se

mencionó en la sección III (Metodología Experimental), se tomó una alícuota del EAST antes de agregar el CaCl_2 con el fin de monitorear el cambio de la concentración de proteína al final de los 10 d de incubación; se obtuvieron concentraciones de 7.3, 8.4 y 7 mg/mL a pH inicial 5, 6 y 8 respectivamente. Aunque no se tienen muchos reportes sobre el EAST, en el trabajo de Zavala-Corrales (2017) se reportó una concentración de proteína soluble en el EAST liofilizado de 4.32 mg/mL, casi la mitad de los resultados obtenidos. Los sobrenadantes de EAST de las muestras correspondientes a los diferentes tratamientos después de 10 d de incubación, mostraron cambios en el contenido de proteína soluble, obteniéndose 5.97, 5.92 y 5.62 mg/mL a pH 5, 6 y 8, respectivamente.

La biomineralización ocurre en una matriz orgánica, este término se refiere a un grupo de macromoléculas compuestas de proteínas, polisacáridos o glicoproteínas que se ensamblan para formar un marco tridimensional donde el mineral crece. La composición de la matriz es única porque muchas de sus proteínas contienen una alta proporción de aminoácidos ácidos (especialmente Asp) y grupos fosfatos. Las estructuras y composiciones de estos marcos orgánicos están programadas genéticamente en los procesos *in vivo* (Weiner et al, 2003). En los procesos *in vitro*, como es el caso del presente trabajo, aunque se hace uso de una matriz orgánica esta no está programada genéticamente, sino que ciertas proteínas poseen la estructura tridimensional y la composición adecuadas para llevar a cabo la biomineralización. Puesto que no todas las proteínas contenidas en EAST son partícipes de este proceso, es de esperarse una disminución de la concentración proteica después de 10 d de incubación y no que se consuma en su totalidad. Se estima que las proteínas presentes en EAST y partícipes de la biomineralización en su mayoría son las que contienen altas concentraciones de Asp y Glu, y que estas probablemente se encuentran en el centro del cristal precipitado.

En la Tabla 9 se registraron los valores de la concentración de proteína en las muestras de EAST desengrasado. La concentración es mucho mayor que en las muestras no desengrasadas, en el control se obtuvieron promedios de 8.9 y 9.4 mg/mL y al final del proceso de biomineralización resultaron ser 6.9 y 5.7 mg/mL a pH 6 y 11, respectivamente. A pH 11 su concentración es mucho mayor que en el resto, esto se debe a que la solubilidad de las proteínas es sensible a la composición iónica y al pH.

Las proteínas son electrolitos multivalentes, por lo tanto son susceptibles a la concentración iónica del medio. El pH del medio contribuye a dicha concentración, pues cuando su valor es igual al del punto isoeléctrico de la proteína, la carga eléctrica neta de esta es igual a cero. Esto indica que existe un número igual de cargas positivas y negativas por lo que la atracción entre moléculas es máxima y en consecuencia la solubilidad se minimiza, al grado que ocurre precipitación. Por otro lado, si el pH del medio es menor o mayor a su punto isoeléctrico, la carga proteica neta es positiva o negativa, respectivamente, aumentando la solubilidad. En el caso de las albúminas su punto isoeléctrico es de 4.7, por lo tanto el pH 11 es el más alejado de ese valor, con lo que se espera una solubilidad alta (Peña-Díaz et al., 2004).

Tabla 6. Análisis de varianza del pH inicial con respecto a la concentración de proteína en EAST después de la biomineralización

Término	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-Ratio	Nivel de probabilidad	Poder (Alfa=0.05)
A: pH inicial	2	1.361349	0.6806743	1.24	0.296406	0.261717
S(A)	78	42.98368	0.5510728			
Total (Ajustado)	80	44.34503				
Total	81					

Tabla 7. Análisis de varianza del pH inicial con respecto a la concentración de proteína en EAST desengrasado después de la biomineralización

Término	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-Ratio	Nivel de probabilidad	Poder (Alfa=0.05)
A: pH_inicial	1	6.642266	6.642266	21.62	0.000267*	0.991718
S(A)	16	4.915041	0.3071901			
Total (Adjustado)	17	11.55731				
Total	18					

Tabla 8. Valores de la concentración proteica (mg/mL) registrados en extractos acuosos de salvado de trigo con pH inicial ajustado a 5, 6 y 8, adicionados con CaCl₂ 0.75 M e incubados durante 10 días a 6.0±2.0 °C

Repetición*	pH inicial (previo a la adición de CaCl ₂)		
	5.0	6.0	8.0
Control	7.3±0.06	8.4±0.06	7.0±0.06
1	5.8±0.06	5.9±0.06	4.5±0.06
2	6.1±0.06	5.7±0.06	6.0±0.06
3	6.0±0.06	6.1±0.06	6.6±0.06

*La concentración de proteína registrada consta de tres repeticiones con CaCl₂ agregado al EAST y un Control al cual no se le adicionó CaCl₂. La concentración de proteína (mg/mL) reportada es promedio de 3 valores ± error estándar.

Tabla 9. Valores de la concentración (mg/mL) registrados en extractos acuosos de salvado de trigo desengrasado, con pH inicial ajustado a 6 y 11, adicionados con CaCl₂ 0.75 M e incubados durante 10 d a 6.0±2.0 °C

Repeticiones*	pH inicial (previo a la adición de CaCl ₂)	
	6.0	11.0
Control	8.9±0.06	9.4±0.06
1	6.9±0.06	5.7±0.06

IV.4 Análisis cuantificación de grasa y lípidos extracción por Goldfish y cromatografía de gases

En la presente investigación se utilizaron 1.51 g de EAST liofilizado para la extracción de grasa por Goldfish. Se obtuvieron 0.00315 g de lípidos contenidos en EAST liofilizado, lo cual resultó en un porcentaje de 0.21%. Para salvado de trigo se ha reportado un contenido de lípidos entre 4.3-8.4% (Balandrán-Quintana et al., 2015; Luna-Valdez et al., 2017). En el trabajo de Luna-Valdez et al. (2017) se reportó 6.3% de lípidos totales en EAST, es decir un valor casi 30 veces mayor, pese a que se trabajaron las mismas condiciones (EAST liofilizado); esto probablemente se debe a que en el método de extracción de grasa utilizado por Luna-Valdez pudieron haberse arrastrado otros componentes que ocasionaron una sobre-estimación del contenido de lípidos. Por otro lado, cabe mencionar que se tiene poca información acerca de la composición química del EAST para hacer comparaciones más apropiadas.

En la cromatografía de gases se determinaron los ácidos grasos presentes en el EAST liofilizado (Figura 36). En la Tabla 10 se reporta la concentración de los lípidos obtenidos, siendo el ácido oleico y el ácido palmítico los que se encuentran en mayor concentración. Prinsen et al. (2014) reportaron encontrar

el ácido palmítico en mayor abundancia, seguido del ácido oleico y el ácido linoleico; inclusive en trabajos anteriores se ha reportado al ácido linoleico como el ácido graso con mayor concentración en el salvado de trigo (Liu et. al, 2012), lo cual difiere con los resultados reportados en la Tabla 10. Esto se debe a que en la presente investigación se trabajó con EAST, y el ácido palmítico, oleico y linoleico son poco solubles en agua, por lo cual no se espera que hayan sido mayormente extraídos (Macarulla et al., 1994). Asimismo, se observa la presencia de ácidos grasos no reportados por Prinsen et al. (2014), como el ácido tridecanoico, ácido miristoleico, ácido palmitoleico, ácido heptadecanoico, Cis-11,14,17-ácido eicosatrienoico y ácido nervónico. Esto tal vez se deba, principalmente, al uso de diferentes estándares comerciales utilizados para identificar los ácidos grasos en la cromatografía de gases.

Cabe también mencionar que en el trabajo de Prinsen et al. (2014) se trabajó con salvado de trigo, mientras que en la presente investigación se trabajó con EAST y muchos ácidos grasos no son solubles en agua. En el trabajo de Prinsen et al. (2014) se usó una mezcla de diferentes estándares, como octadecanoico (Sigma-Aldrich, 99%), palmítico (Sigma Aldrich, 99%), sitosterol (Calbiochem, 98%), estearato de colesterilo (Sigma-Aldrich, 99%), sitosteril 3 β -D-glucopiranosido (Matreya LLC, una mezcla de tres glucósidos de esterilo con una pureza del 98%, de los cuales el 56% corresponde a sitosterilglucósido) y triheptadecanoína (Sigma-Aldrich, 99%). Por otro lado, en el presente trabajo se utilizó un estándar comercial 18919-1AMP F.A.M.E. Mix, C4-C24 (Sigma-Aldrich, variado%). Se obtuvo un porcentaje de 39.03%, 53.86% y 7.10% en ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados, respectivamente. Tales cifras difieren significativamente de las obtenidas en otros trabajos, ya que a diferencia de la presente investigación, en la que se trabajó con EAST, ellos trabajaron con salvado de trigo (Balandrán- Quintana et al., 2015).

La identificación de los lípidos presentes en el EAST se hizo con el objetivo de encontrar ácidos grasos que son componentes de fosfolípidos, moléculas que

presentan una cabeza polar y otra no polar formada por ácidos grasos de cadena larga; gracias a esta propiedad, son capaces de formar vesículas lipídicas en medios acuosos, formando mayoritariamente parte de las membranas biológicas (Latorre, 1996). La determinación fue indirecta, ya que no se hizo una separación previa de lípidos polares y no-polares mediante cromatografía de capa delgada, debido a la carencia de equipo.

Se han estudiado diversas estrategias para la formación de biomateriales con el aprovechamiento de los fosfolípidos para compartimentar y/o moldear las reacciones químicas a través de estructuras autoensambladas, como liposomas y túbulos. O bien explotar la biocompatibilidad inherente de los fosfolípidos y los materiales miméticos de fosfolípidos para su uso como nuevos biomateriales de contacto con los tejidos que imitan las membranas biológicas (Collier et al., 2001).

Otro estudio ha revelado la síntesis de cristales por la precipitación de fosfatos de calcio en una suspensión de fosfolípidos. La suspensión, preparada con agua y alcohol, contenía fosfatidilcolina, solectina, lecitina y lipoide. Se obtuvo hidroxiapatita poco cristalizada a pH básico y brushita a pH medio (Mersinlioğlu, 2015).

Los fosfolípidos en el grano de trigo se encuentran en el endospermo, no en el salvado (Geng, 2015). Sin embargo, en la molienda, a la hora de separar el salvado del endospermo para la producción de harina, parte del endospermo queda pegada al extremo interior del salvado. Para evitar esto al máximo se acondiciona el grano de trigo mediante un tratamiento que tiene como objetivo humedecer el salvado, evitando así su fragilidad pero sin llegar a humedecer el endospermo. Así, el salvado queda más correoso y su separación es mucho más fácil (Hernandez et al., 2010).

Por otro lado, aunque los fosfolípidos sean el componente mayoritario en las membranas biológicas, existen otros ácidos grasos de cadena larga que

contribuyen a la formación de vesículas lipídicas y que se encuentran presentes en el EAST, como lo son el ácido palmítico, ácido palmitoleico, ácido esteárico, ácido oleico, ácido linoleico, ácido behénico, ácido lignocérico y ácido nervónico (Latorre, 1996). Aunque no se encuentran estudios en los que estos ácidos grasos participen en procesos de biomineralización, es posible que en este caso, debido a la ausencia de fosfolípidos, jueguen un papel similar a los trabajos mencionados anteriormente (Collier et al., 2001; Mersinlioğlu, 2015).

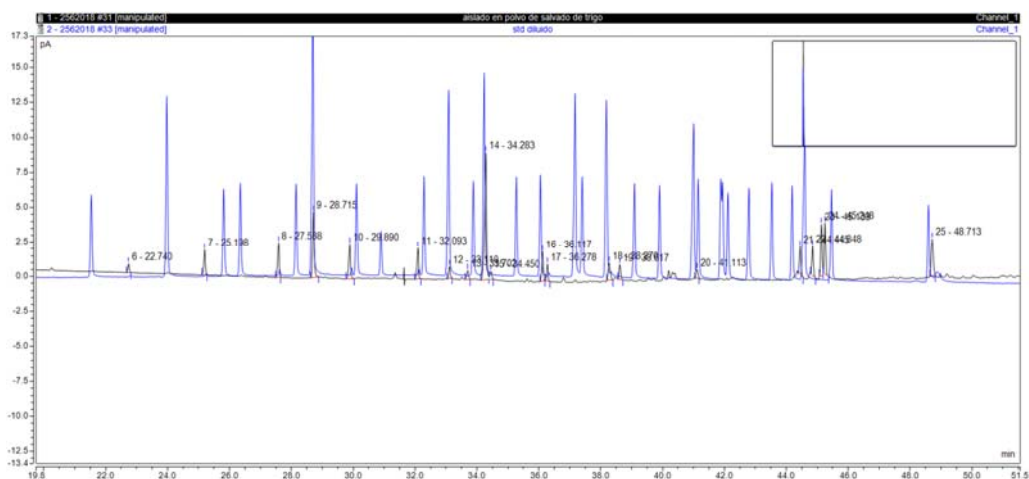


Figura 36. Cromatografía de gases de los lípidos presentes en el EAST. El color negro representa el EAST y el color azul el estándar usado como marcador de referencia.

Tabla 10. Composición y abundancia de los ácidos grasos identificados en EAST

Tiempo (min)	Área	Porcentaje recuperado	mg de ácidos grasos/100 g de muestra	Nombre del componente	Tipo de ácido graso
22.74	0.034	1.42	0.29	Ácido tridecanoico	Saturado
25.198	0.1	4.18	0.86	Ácido miristoleico	Monoinsaturado
27.588	0.151	6.31	1.30	Ácido pentadecanoico Ácido pentadecílico	Saturado
28.715	0.292	12.20	2.52	Ácido palmítico	Saturado
29.89	0.168	7.02	1.45	Ácido palmitoleico	Monoinsaturado
32.093	0.131	5.47	1.13	Ácido heptadecanoico	Monoinsaturado
33.11	0.049	2.04	0.42	Ácido esteárico	Saturado
34.283	0.678	28.33	5.86	Ácido oleico	Monoinsaturado
36.117	0.127	5.30	1.09	Acido linoleico	Poliinsaturado
38.27	0.098	4.09	0.84	Ácido behénico	Saturado
41.113	0.043	1.79	0.37	Cis-11,14,17-ácido eicosatrienoico	Poliinsaturado
44.445	0.108	4.513	0.93	Ácido tricosanoico	Saturado
45.248	0.202	8.44	1.7	Ácido lignocérico	Saturado
48.713	0.212	8.85	1.83	Ácido nervónico	Monoinsaturado

IV.5 Visualización de las partículas precipitadas, mediante microscopía electrónica de barrido (SEM)

Con la visualización por SEM, se pudieron analizar las diferentes morfologías y tamaños de las partículas encontradas en las muestras adicionadas con CaCl_2 a 0.75 M en un medio acuoso de EAST liofilizado al 10% (p/v) a diferente pH, con un tiempo de incubación de 10 d.

En las Figuras 37a y 37b, a pH 6 y 8, respectivamente, se observan estructuras globulares con diámetros de 77 μm y 100 μm . A pH 6 se puede apreciar una estructura interna conformada por delgadas láminas nanométricas en una de sus dimensiones, entre 563 a 875 nm de ancho y 63 a 187 nm de espesor (Figura 37). Se han registrado estructuras similares en estudios de biomineralización con EAST liofilizado y adicionado con CaCl_2 0.75M y con un tiempo de incubación de 10 d (Zavala-Corrales, 2017), las cuales resultaron ser cristales de brushita, por lo que se asume que las muestras son de esa misma naturaleza.

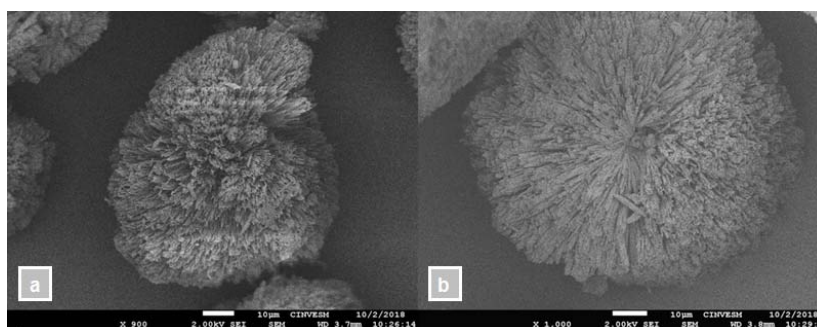


Figura 37. Micrografías SEM de partículas globulares formadas en medio acuoso de EAST liofilizado y reconstituido al 10% con agua, adicionado con CaCl_2 0.75M e incubado durante 10 d. a) pH 6; b) pH 8.

En la Figura 38a se observa que a pH 5 las partículas parecen tener estructura de hojuelas apiladas. A pH 6 (Figura 38b), se observó la formación de una estructura consistente en placas alargadas, apiladas y con crecimiento radial.

En pH 8 (Figura 38c), se aprecian placas alargadas con una estructura similar a las observadas a pH 6. Sin embargo, a pH 11 (Figura 38d), aunque también se formaron láminas, estas son de forma irregular y con textura poco uniforme.

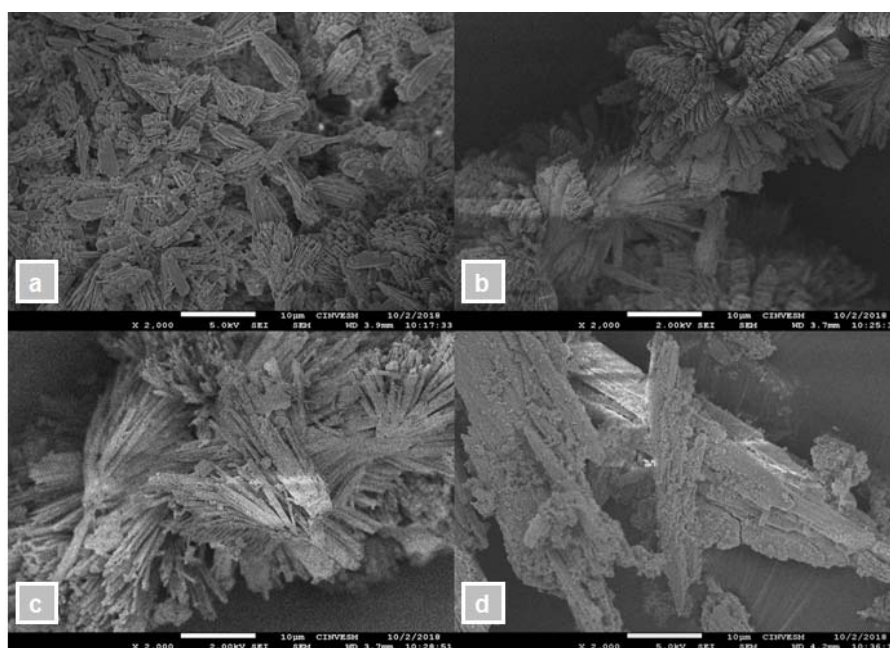


Figura 38. Micrografías SEM de las láminas nanométricas que forman la estructura interna de las partículas formadas en medio acuoso de EAST liofilizado, reconstituido al 10% en agua, adicionado con CaCl_2 0.75M e incubado por 10 d a 6 °C. a) pH 5; b) pH 6; c) pH 8; d) pH 11.

A una mayor magnificación (10,000x) a simple vista se pudieron apreciar diferencias en la estructura interna de las partículas obtenidas a diferente pH experimental (Figura 39). A pH 5, se observaron placas o láminas apiladas entre sí. Entre las láminas se encuentran pequeñas esferas, dando un ordenamiento irregular. En pH 6, las láminas se encuentran uniformemente apiladas unas con otras; a diferencia de las placas observadas en pH 5, no se encuentran las pequeñas esferas entre las láminas. Seguidamente se pudo apreciar que su largo es mucho mayor que su ancho, una característica registrada con anterioridad en una imagen SEM correspondiente al cristal

brushita por Arifuzzaman et al. (2007). En las muestras a pH 8 hubo láminas como las encontradas a pH 5 y 6, pero con algunas aglomeraciones entre las láminas, como en pH 5. Finalmente, en pH 11 se encontró una formación de bloques entre sí, que pudieran tener un ordenamiento similar al observado en los pH anteriores, pero cubiertos de partículas en su superficie.

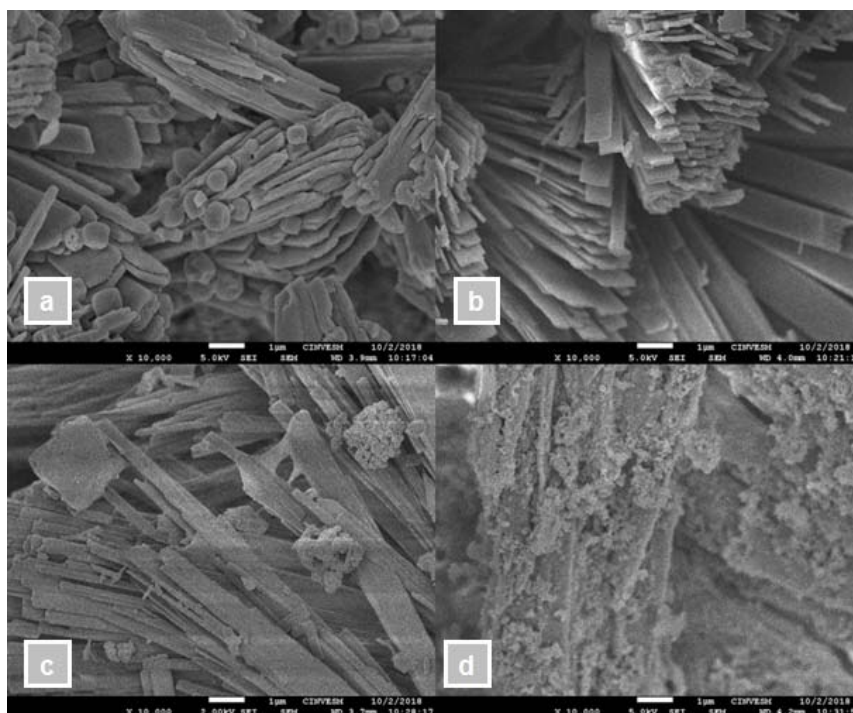


Figura 39. Micrografía SEM a una magnificación 10,000x de las láminas nanométricas que forman la estructura interna de las partículas cristalinas formadas en medio acuoso de EAST liofilizado al 10% de agua con CaCl_2 0.75M e incubado por 10 d a 6 °C. a) pH 5; b) pH 6; c) pH 8; d) pH 11.

Arifuzzman et al. (2004) reportaron imágenes SEM de cristales de brushita obtenidos por precipitación a partir de una solución de CaCl_2 y Na_2HPO_4 en un reactor batch; pese a ser láminas delgadas y de textura uniforme como se aprecia en pH 6, no presentaron un ordenamiento específico entre las láminas;

asimismo, Mekmene et al. (2009) obtuvieron cristales de brushita por agitación continua.

A diferencia de los reportes anteriores, en la formación de cristales por EAST estuvo involucrada la participación de una matriz orgánica, que se encarga de dirigir la nucleación, el crecimiento, y por tanto la morfología del cristal mineral que se deposita (Weiner et al., 2003). La mayor parte del control se ejerce a nivel de nanómetros, una de las características de la biomineralización es la formación de bloques de construcción en la nanoescala, como se puede apreciar en los equinodermos, esponjas, algunos moluscos, esmalte de vertebrados y muchos otros tejidos mineralizados (Addadi et al., 2016)., La organización de láminas en forma radial, como se observa en la Figura 38, así como el apilamiento ordenado de las láminas (Figura 39), sugieren la construcción de bloques y su posterior arreglo ordenado, lo que es indicativo de la presencia de una matriz que dirige la nucleación.

A una mayor magnificación, a pH inicial 5, se observa que las láminas cuentan con una superficie ligeramente rugosa a comparación de las muestras con pH inicial 6. Por otro lado, las muestras con pH inicial 11 presentaron mayor rugosidad, con numerosas aglomeraciones (Figura 40).

En la Figura 41 se muestran las imágenes SEM de las partículas precipitadas con EAST desengrasado y pH inicial 6. Al igual que en la Figura 38, se observa una estructura globular, con un diámetro de 84 μm , conformada por láminas delgadas con dimensiones de 531 a 593 nm de ancho y 125 a 156 nm de espesor. A diferencia de las imágenes obtenidas en las muestras no desengrasadas, pH inicial 6, las láminas que componen el cuerpo globular mostrado en la Figura 41 tienen una terminación puntiaguda en vez de rectangular, y su textura es mucho menos uniforme que como se apreció en la Figura 39.

En las muestras desengrasadas, con pH inicial 11, se aprecian pequeñas estructuras similares a las de la Figura 37, pero en este caso están compuestas de un mayor número de partículas irregulares (Figura 42).

Estas diferencias indican que la eliminación de lípidos afecta la morfología de los cristales de brushita. Como se mencionó en la sección de cromatografía de gases, para identificar los ácidos grasos presentes en el EAST se han realizado experimentos de procesos de biomineralización, los cuales son asistidos por lípidos, principalmente fosfolípidos. Aunque en dicha sección no se presentó la presencia de fosfolípidos, algunos ácidos grasos presentes en el EAST son constituyentes de las membranas biológicas, los cuales pueden realizar la tarea de los fosfolípidos. En el caso de la biomineralización se cree que los ácidos grasos funcionan para compartimentar y/o moldear los cristales precipitados (Collier et al., 2001); eso explicaría por qué los cristales obtenidos con el EAST desengrasado (Figura 41 y 42) son más pequeños que los obtenidos con el EAST sin modificar (Figura 39).

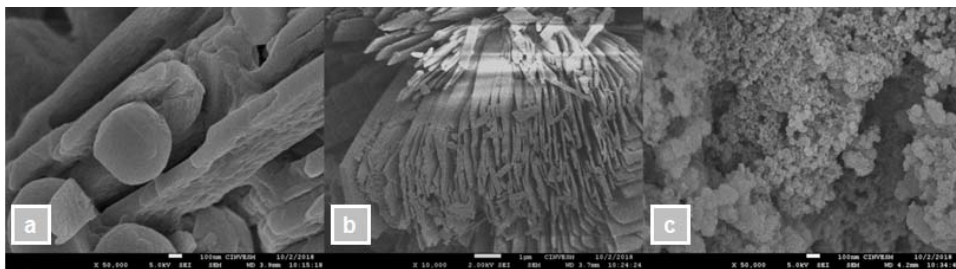


Figura 40. Micrografía SEM de estructuras de láminas nanométricas que forman la estructura interna de las partículas formadas con EAST liofilizado y reconstituido al 10% con agua, adicionado con CaCl_2 0.75M e incubado por 10 d. a) pH 5; b) pH 6; c) pH 11.

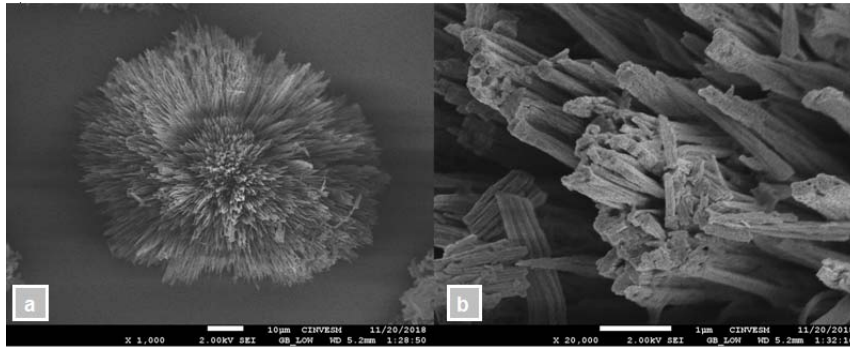


Figura 41. Micrografía SEM de las partículas formadas con EAST desengrasado a pH 6. a) estructuras globulares; b) láminas nanométricas que forman la estructura interna.

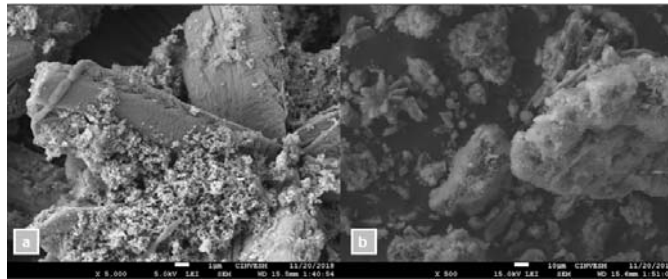


Figura 42. Micrografía SEM de las partículas obtenidas con EAST desengrasado a pH 11. a) 5000x; b) 500x

IV.6 Análisis de la composición elemental de las partículas precipitadas, por espectroscopía de energía dispersiva de rayos X (EDS)

En las Figuras 43, 44, 45 y 46 se muestran los resultados del análisis de la composición elemental realizado a las partículas obtenidas durante la biomineralización con EAST a pH 5, 6, 8 y 11, respectivamente, siendo O, Ca y P los elementos encontrados en mayor abundancia. A su vez, se observó la presencia de C en los cuatro análisis, pudiendo ser procedente de la materia orgánica en las partículas o indicar, junto con la presencia de P, la formación de

minerales inducidos biológicamente, por ejemplo fosfatos o carbonatos (Tabla 11).

No hubo presencia del elemento H en el análisis por EDS. Esto se debe a que los espectros del EDS son menos resolutivos que los espectros por longitud de onda (WDS), sobre todo en elementos ligeros donde sus picos característicos se solapan parcialmente (Castro-Dorado, 2015). En pH 6 y pH 8 se calcularon las relaciones Ca/P, obteniendo 0.91 y 0.95, respectivamente. Según la Tabla 12, donde se presentan las distintas relaciones Ca/P de diferentes cristales fosfatados, a pH 6 y pH 8 su relación está más acorde a los cristales brushita y monetita. Sin embargo, para ambos pH los porcentajes atómicos fueron más parecidos a los del cristal brushita, un polimorfo de fosfato de calcio y precursor de la hidroxiapatita (Zavala-Corrales, 2017).

A pH 5 (Figura 43) se obtuvo una relación Ca/P de 1.25, en peso. El cristal fosfato más cercano a este valor es el fosfato octacálcico, un precursor de la apatita biológica en el tejido óseo (Roldán-Vasco et al., 2016), con una relación Ca/P de 1.33. Por otro lado, la distribución de sus porcentajes atómicos es más similar a los cristales brushita y monetita, donde la diferencia de sus relaciones Ca/P es de 0.25, en ambos casos.

En la Figura 46 se muestra la composición elemental a pH 11. Su relación Ca/P calculada es de 1.07, mientras que los porcentajes atómicos son mucho más cercanos a los del cristal brushita. No obstante, la presencia de Mg en el análisis pudo haber indicado la formación de un mineral carbonatado, protodolomita ($\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$); sin embargo, los valores de su relación Ca/C y su distribución atómica no están lo suficientemente cercanos a los del mineral carbonatado.

En las Figuras 47 y 48 se presentan los análisis de composición elemental de las partículas obtenidas por biomineralización con EAST desengrasado, a pH 6 y 11, respectivamente. A pH 6 (Figura 47) se obtuvo una relación Ca/P de 0.93.

Los cristales más cercanos a este valor fueron brushita y monetita, al igual que se observó en la Figura 44. Sin embargo, su análisis mostró también la presencia de Cl y K.

En la muestra desengrasada, pH 11, (Figura 48) se obtuvo una relación Ca/P de 0.80; al igual que las partículas analizadas a pH 11 mostradas en la Figura 46, se obtuvo una composición elemental similar al cristal brushita, así como en su relación Ca/P. Asimismo, presentó la presencia de Mg, pero su distribución atómica no era cercana al cristal protodolomita.

La presencia de K y Mg en las Figuras 46, 47 y 48 podrían deberse a las reservas de minerales que se encuentran en el salvado de trigo ubicadas en la porción globoide de los cuerpos proteicos de la capa más interna de la aleurona, principalmente en forma de fitina, la sal catiónica del ácido hexametáfosfórico. Los globoides contienen P, K y Mg (Luna-Valdez et al., 2017). Por otro lado, el Na presente en la Figura 48 es probable que se deba al NaOH usado para ajustar la solución de EAST a pH básico 11. Mientras que el Cl encontrado en la Figura 47 y 48, es probable que su presencia se debiera a residuos de la biomineralización con EAST, donde se agrega CaCl_2 como precursor del ión calcio.

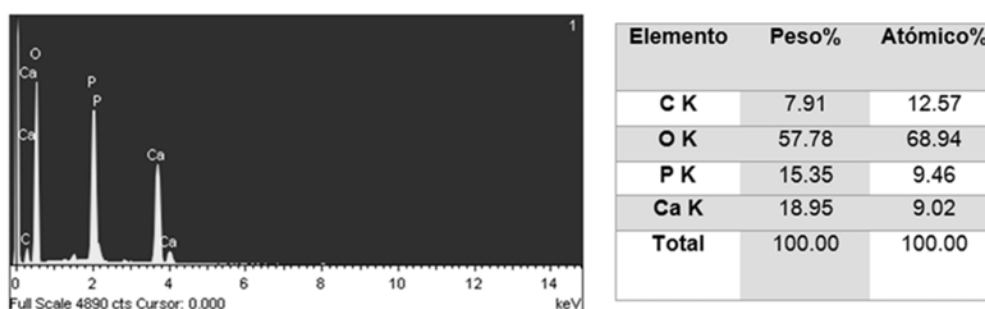


Figura 43. Espectroscopía de energía dispersiva de rayos X y composición elemental de las partículas precipitadas durante la biomineralización con EAST a pH 5.

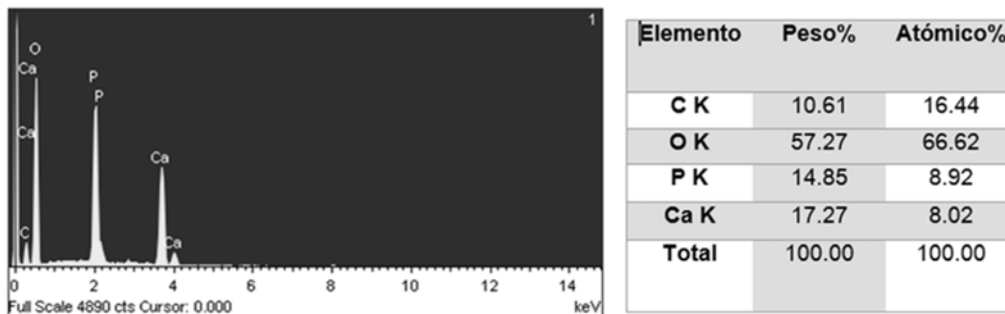


Figura 44. Espectroscopía de energía dispersiva de rayos X y composición elemental de las partículas precipitadas durante la biomineralización con EAST a pH 6.

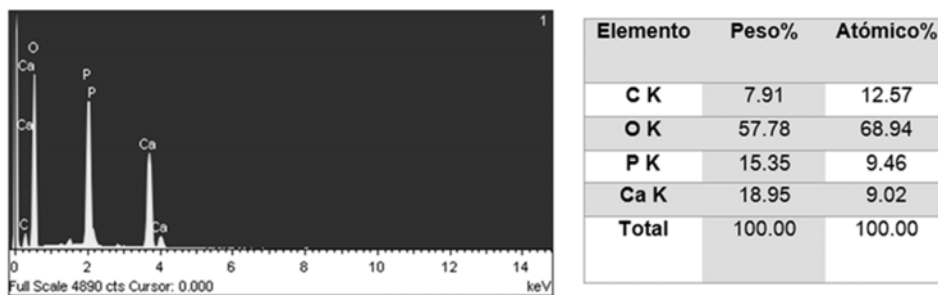


Figura 45. Espectroscopía de energía dispersiva de rayos X y composición elemental de las partículas precipitadas durante la biomineralización con EAST a pH 8.

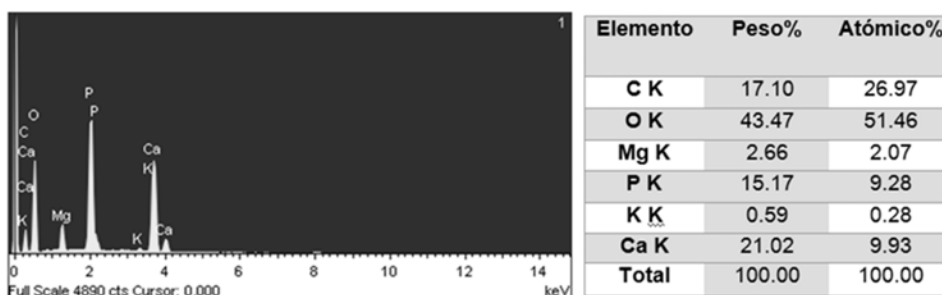


Figura 46. Espectroscopía de energía dispersiva de rayos X y composición elemental de las partículas precipitadas de la biomineralización con EAST a pH 11.

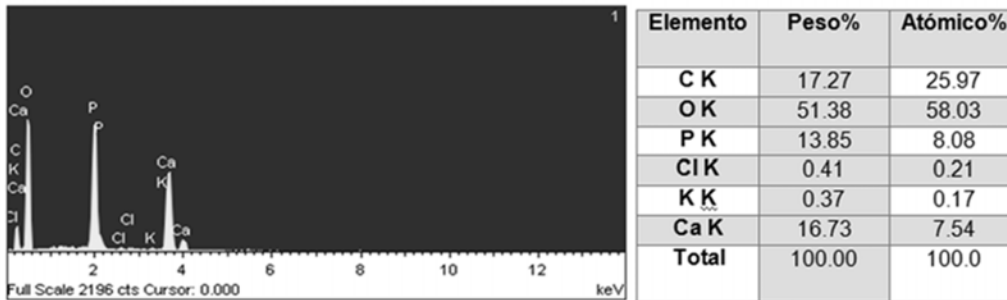


Figura 47. Espectroscopía de energía dispersiva de rayos X y composición elemental de las partículas precipitadas durante la biomineralización con EAST a pH 6 desengrasado.

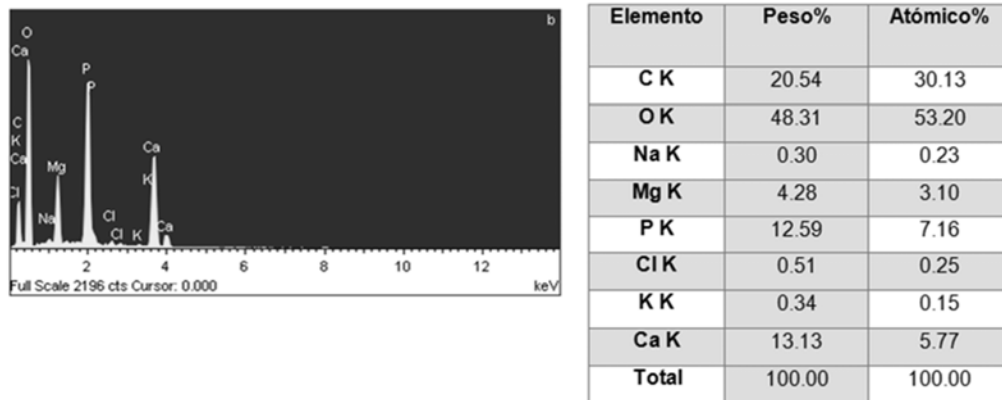


Figura 48. Espectroscopía de energía dispersiva de rayos X y composición elemental de las partículas precipitadas durante la biomineralización con EAST a pH 11 desengrasado.

Tabla 11. Nombre y composición química de minerales biológicamente inducidos y controlados por procesos de mineralización.

Nombre	Fórmula
Carbonatos	
Calcita	CaCO ₃
Mg-calcita	(Mg _x Ca _{1-x})CO ₃
Aragonita	CaCO ₃
Vaterita	CaCO ₃
Monohidrocalcita	CaCO ₃ H ₂ O
Protodolomita	CaMg(CO ₃) ₂
Hidroserusita	Pb ₃ (CO ₃) ₂ (OH) ₂
Carbonato de calcio amorfo	CaCO ₃ H ₂ O ó CaCO ₃
Fosfato	
Fosfato octacálcico	CaH ₂ (PO ₄) ₆
Brushita	CaHPO ₄ 2H ₂ O
Francolita	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ F ₂
Hidroxiapatita carbonatada	Ca ₅ (PO ₄ CO ₃) ₃ (OH)
Whitlockita	Ca ₁₈ H ₂ (MgFe) ₂ ⁺² (PO ₄) ₁₄
Estruvita	Mg(NH ₄)(PO ₄) ₆ H ₂ O
Vivianita	Fe ₃ ⁺² (PO ₄) ₂ 8H ₂ O
Fosfato de calcio amorfo	Variable
Pirofosfato de calcio amorfo	Ca ₂ P ₂ O ₇ 2H ₂ O

Adaptada de: Weiner et al., (2003)

Tabla 12. Principales formulaciones de fosfato de calcio, obtenidas mediante reacciones tanto térmicas como de precipitación.

Nombre	Fórmula	Ca/P
Fosfato tetracálcico	Ca ₄ (PO ₄) ₂	2.0
Hidroxiapatita	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂	1.67
Hidroxiapatita deficiente de calcio	Ca ₉ (PO ₄) ₅ (OH) ₂	1.5
Fosfato de calcio amorfo	Ca _{10-x} H _{2x} (PO ₄) ₆ (OH) ₂	1.5
Fosfato tricálcico (α, β)	Ca ₃ (PO ₄) ₂	1.5
Fosfato octacálcico	Ca ₈ (HPO ₄) ₂ (PO ₄) ₄ 5H ₂ O	1.33
Fosfato dicálcico (Monetita)	CaHPO ₄	1.0
Fosfato dicálcico dihidratado (Brushita)	CaHPO ₄ 2H ₂ O	1.0
Fosfato monocálcico monohidratado	Ca(H ₂ PO ₄) ₂ H ₂ O	0.5

Adaptada de: Öhman (2005)

IV.7 Análisis de los cristales precipitados por difracción de rayos X (DRX)

De acuerdo con los difractogramas de las partículas precipitadas en las muestras de EAST no desengrasadas y sometidas a biomineralización a pH inicial 6 y pH 8, así como en la desengrasada y sometida a biomineralización a pH inicial 6, se encontró brushita pura (Figuras 50, 51 y 52). Los difractogramas obtenidos son muy similares al reportado por Ucar et al. (2016) (Figura 49), donde se caracterizó el fosfato de calcio dihidratado o brushita. En otro trabajo, (Mekmene et al., 2009), se obtuvieron picos característicos a 11.66, 20.96, 29.33, 30.56 y 34.19° que corresponden al patrón característico de brushita; estos valores son muy cercanos a los que aparecen en los difractogramas del experimento de la presente tesis.

A pH 5 el espectro de difracción de rayos-x (Figura 53) también mostró la presencia de brushita, así como de un cristal de oxalato de calcio llamado weddellita u oxalato cálcico dihidratado ($\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$); un mineral con forma bipiramidal simétrica que se encuentra normalmente en los cálculos renales (Semangoen et al., 2008). A manera de referencia, en la Figura 54 se muestran los resultados obtenidos en el trabajo de Conti et al. (2010), quienes obtuvieron un espectro de difracción de rayos-x de weddellita con picos característicos alrededor de 14 y 20°, valores cercanos a los que se identifican en la Figura 53.

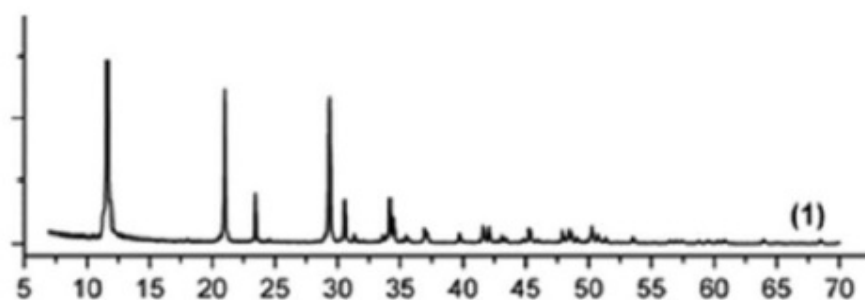


Figura 49. Espectro de difracción de rayos-x de referencia del cristal brushita (Ucar et al., 2016)

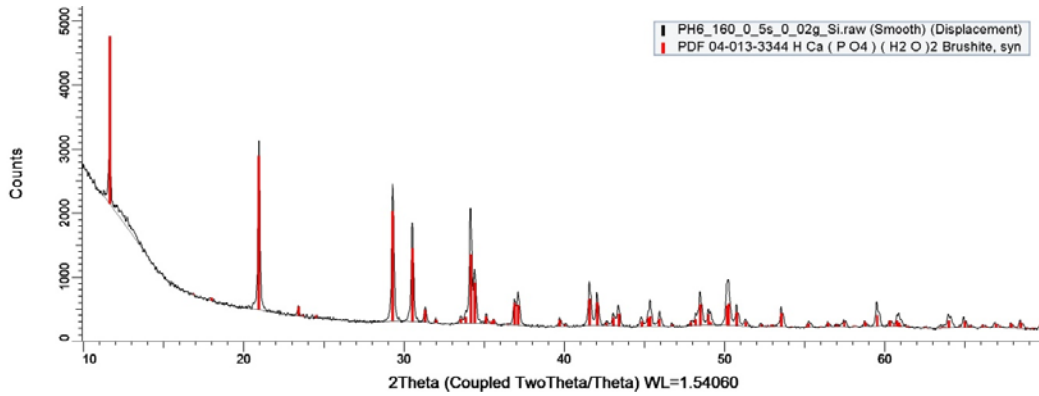


Figura 50. Difractograma representativo de las muestras de EAST biomineralizadas con CaCl_2 a pH inicial 6.0.

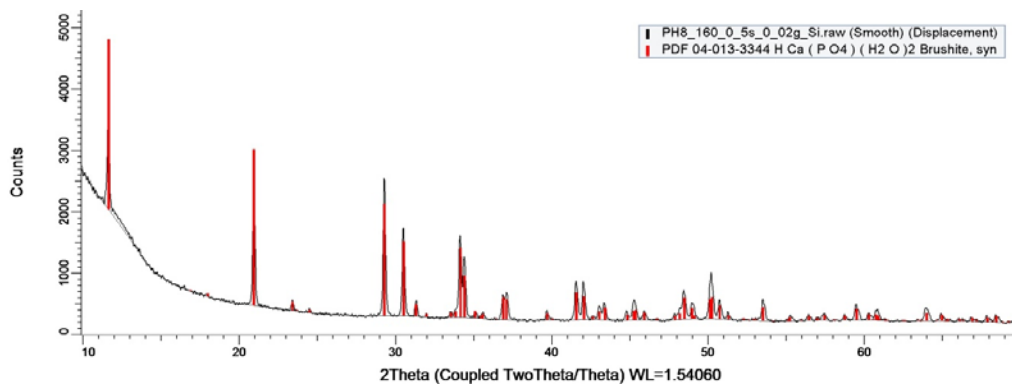


Figura 51. Difractograma representativo de las muestras de EAST biomineralizadas con CaCl_2 a pH inicial 8.0.

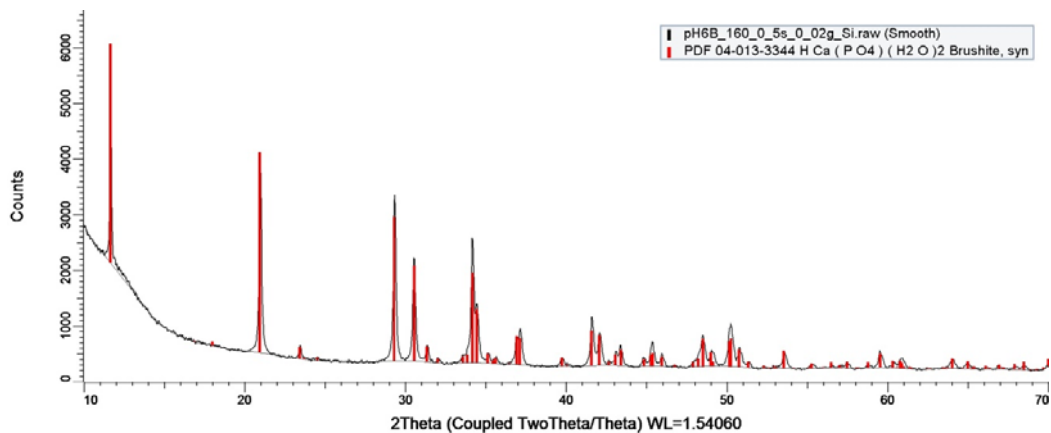


Figura 52. Difractograma representativo de las muestras de EAST desengrasado y biomineralizadas con CaCl_2 a pH inicial 6.0.

No obstante, en las partículas obtenidas en las muestras de EAST con pH inicial 11 y EAST desengrasado con pH inicial 11, no se identificó ningún pico característico (Figuras 55 y 56). Esto pudo deberse, por un lado, a las limitaciones de la técnica de difracción de rayos-x (DRX) que vienen señalados por la concentración del mineral; independientemente del tamaño de la partícula, si su concentración es muy baja, será difícil detectar el mineral (Virginia, 2014). Sin embargo, la razón más probable es que no hubo formación de cristales debido al pH, aún en presencia de una matriz orgánica.

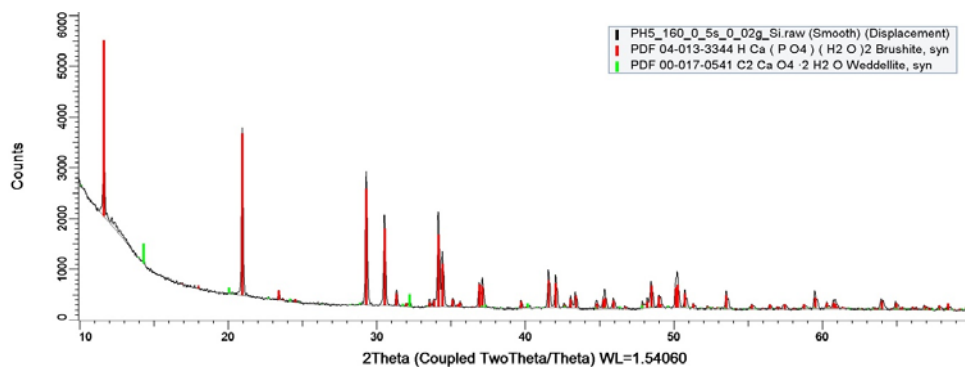


Figura 53. Difractograma representativo de las muestras de EAST biomineralizadas con CaCl_2 a pH 5.

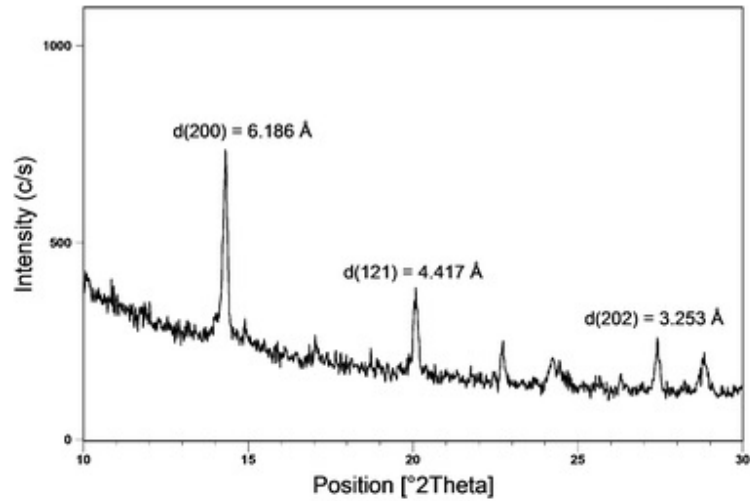


Figura 54. Espectro de difracción de rayos-x de referencia del cristal weddellita (Conti et al., 2010)

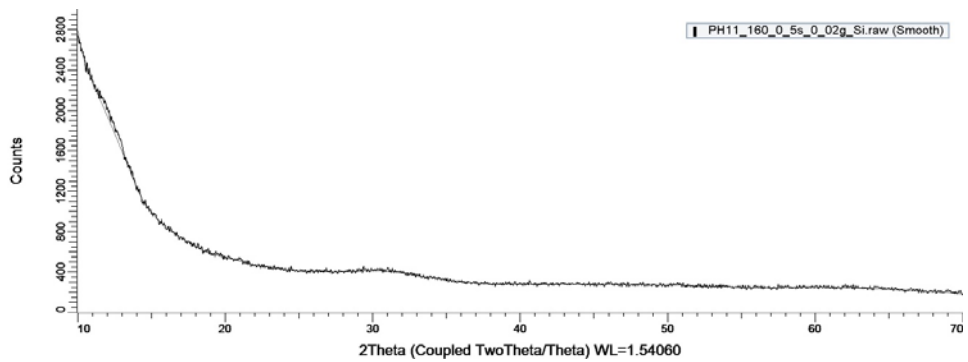


Figura 55. Difractograma representativo de las muestras de EAST biomaterializadas con CaCl_2 a pH 11.

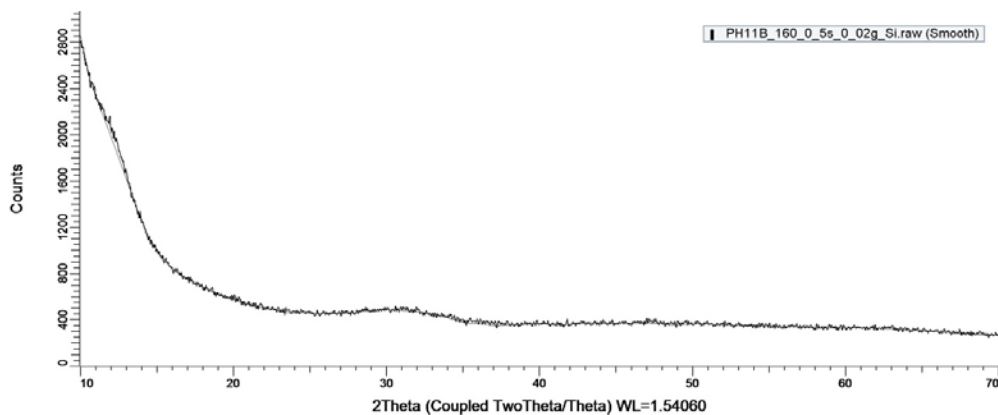


Figura 56. Difractograma representativo de las muestras de EAST desengrasado biom mineralizadas con CaCl_2 a pH 11.

IV.8 Análisis de los cristales precipitados por espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR)

En las Figuras 57 y 58 se presentan los espectros FT-IR de las partículas precipitadas en la biom mineralización con EAST liofilizado disuelto al 10% en agua y con un tiempo de incubación de 10 d, a diferente pH ajustado, no desengrasado y desengrasado, respectivamente.

A pH 5, 6 y 8 se observaron bandas en la región $3159 - 3567 \text{ cm}^{-1}$ los cuales son atribuidos a los grupos OH del agua (Figura 57). Según Weiner et al. (2003), aproximadamente el 60% de los biom minerales conocidos contienen fases hidratadas, estas fases son favorecidas por la reducción de barreras energéticas en la nucleación y crecimiento en una solución acuosa. El pico

presente en la región $1643\text{-}1652\text{ cm}^{-1}$ característico del grupo amida I, pudiera sugerir la presencia de proteínas (Liu et al., 2017), aunque llama la atención la falta de la banda amida II a 1500 cm^{-1} . Zavala-Corrales (2017) detectó mediante electroforesis SDS-PAGE, en cristales de brushita producidos con EAST, 3 bandas de proteínas con peso molecular de 5, 40 y 55 kDa, respectivamente, en muy baja concentración, por lo que es posible que la banda amida I sea muy pequeña y esté opacada por los hombros a 1500 cm^{-1} . Cabe hacer notar que en la región de la banda amida I también aparece la vibración de flexión de las moléculas de agua presentes en la brushita. La zona $523\text{-}1222\text{ cm}^{-1}$ es característica de los grupos fosfato (PO_4^{3-}); dentro de esta misma zona se distinguen dos picos característicos del cristal brushita, $1139\text{-}1155$ y $1067\text{-}1068\text{ cm}^{-1}$ (Zavala-Corrales, 2017). A modo de referencia, en la Figura 59 se puede observar un espectro FT-IR de brushita, donde las bandas características de la zona de los grupos fosfato se encuentran en 1140 y 1057 cm^{-1} (Casciani et al., 1979). Por otro lado, según el trabajo de Singh et al. (2009), se observaron cuatro bandas a 873 cm^{-1} y 1225 cm^{-1} asignadas al grupo HPO_4^{2-} de brushita en todas sus muestras, bandas que también se pueden apreciar en la Figura 57, a excepción a pH 11.

Sin embargo el espectro a pH 11 no presenta picos característicos en la región atribuida a los grupos OH, en cambio, se observa una ligera curvatura. En la zona de los fosfatos tan sólo presenta dos picos característicos a 571 y 1068 cm^{-1} , este último atribuido al cristal brushita. Pero al igual que los demás pH presenta un pico característico de la presencia de amida.

En la Figura 58 se presentan los espectros de las partículas precipitadas con EAST desengrasado a pH 6 y 11; se observa que tienen un comportamiento similar a sus contrapartes (Figura 57).

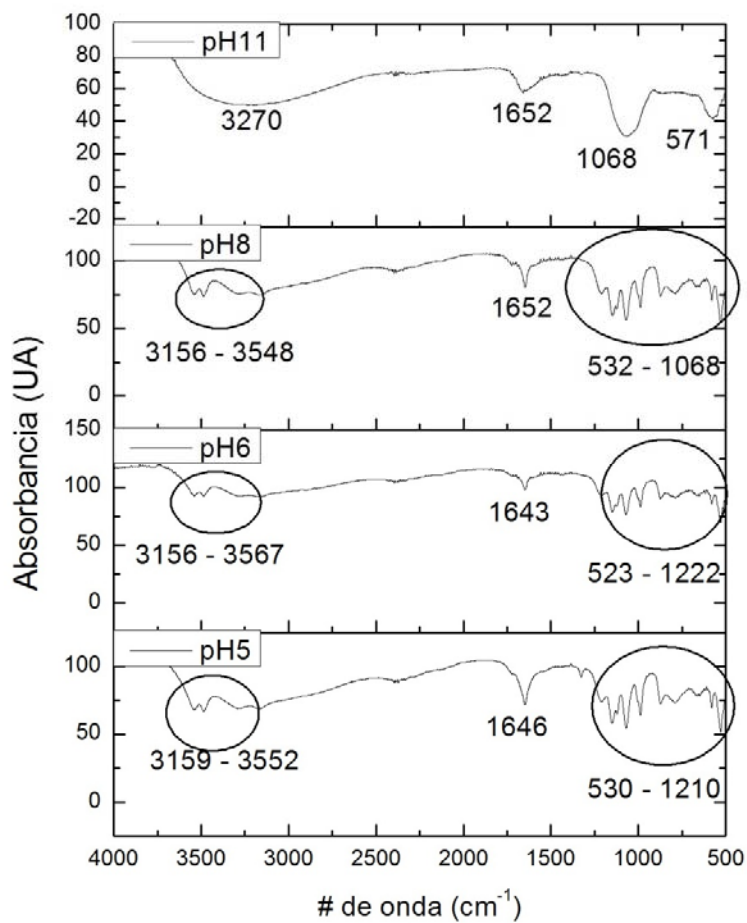


Figura 57. Espectros infrarrojo de las partículas precipitadas de un EAST liofilizado y reconstituido en agua al 10% a diferente pH.

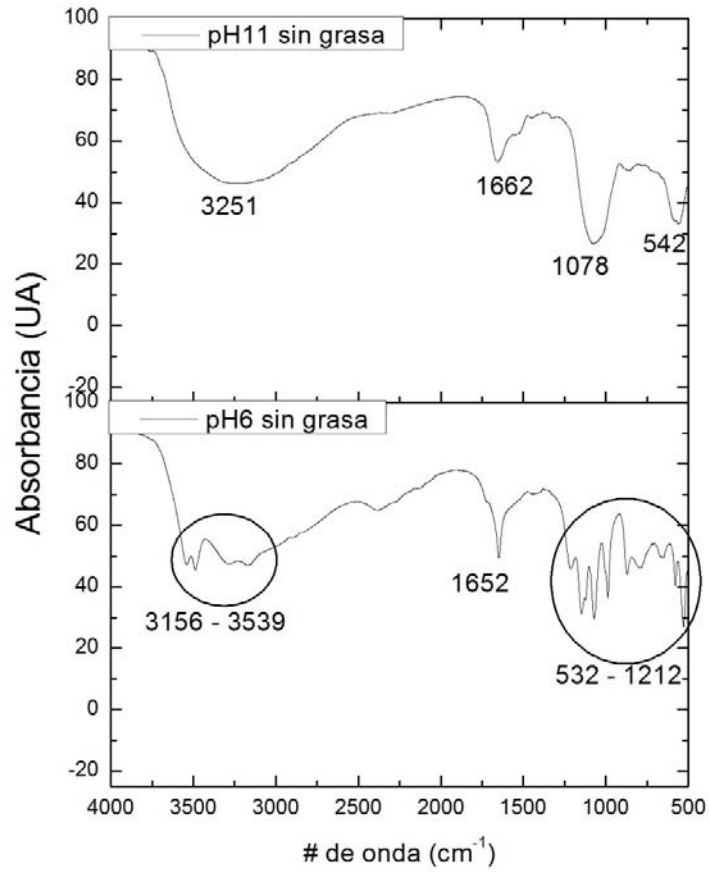


Figura 58. Espectros infrarrojo de las partículas precipitadas de un EAST liofilizado, desengrasado y reconstituido en agua al 10% a diferente pH.

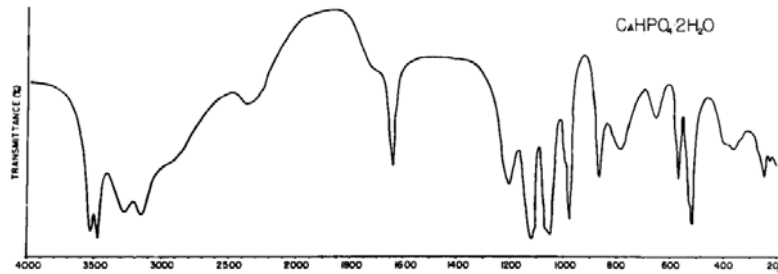


Figura 59. Espectro infrarrojo de brushita. Fuente: Casciani et al. (1979).

VI.9 Análisis de la visualización de cristales por microscopía de fluorescencia

Se utilizó esta técnica con la finalidad de encontrar la presencia de vesículas, ya sean formadas por lípidos o proteínas. Sin embargo no se encontró evidencia alguna de ello. En la Figura 60 se puede observar una pequeña formación circular que podría parecer la presencia de alguna vesícula; no obstante no se pudo identificar la naturaleza de la vesícula, es decir si estaba formada por lípidos o proteínas.

Se han realizado experimentos para localizar lípidos y proteínas en membranas celulares, para ello es necesario tinción de las muestras para localizar los componentes en las membranas (Lodish, 2005; Sampedro et al., 1995). Por ejemplo, se trató de localizar glucoesfingolipido y fosfatasa alcalina placentaria (PLAP), una proteína anclada por lípidos; para localizarla fue necesario tratar a la célula con fluorescencia verde para los lípidos (glucoesfingolipido) y otra muestra con fluorescencia roja para las proteínas (PLAP) (Lodish, 2005).

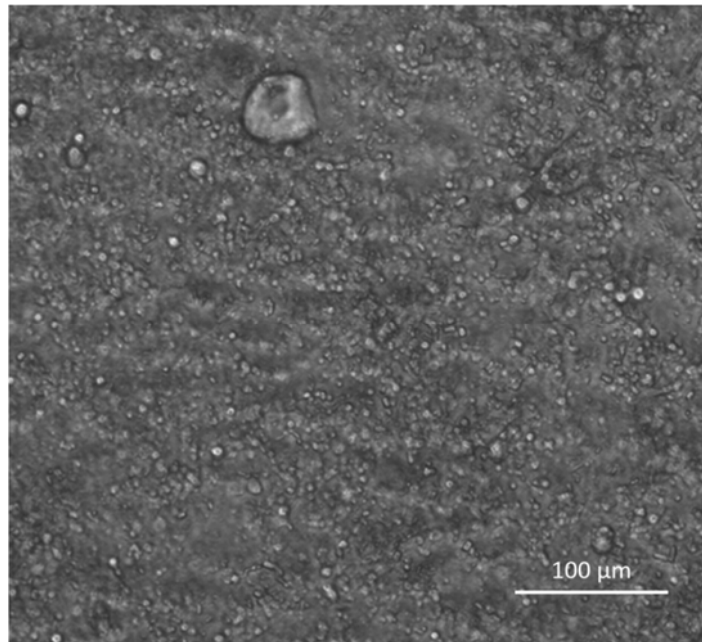


Figura 60. Visualización en la microscopia de fluorescencia del EAST liofilizado reconstituido al 10% de agua, pH 6 al día 0 de incubación.

CONCLUSIONES Y/O RECOMENDACIONES

1. Se confirmó que el EAST liofilizado y reconstituido en agua al 10% actúa como matriz orgánica para la biomineralización en solución con CaCl_2 .
2. La adición de CaCl_2 al EAST en solución ocasiona un descenso significativo del pH, manteniéndose sin cambios significativos durante 10 días, por lo que la brushita se forma a pH ácido en todos los casos (excepto a pH inicial 11, donde el valor desciende a aprox. 8 y no ocurre cristalización) descartándose así la generación de un microambiente ácido dentro de un entorno básico.
3. En el rango de pH inicial 5-8 se forman partículas micrométricas esferoides, con una estructura interna constituida por cristales de brushita de morfología tabular, con lados bien definidos de dimensiones nanométricas.
4. La biomineralización a pH ácido con EAST libre de lípidos resulta en partículas de brushita formadas por tabletas con extremos puntiagudos.
5. El EAST en solución a pH inicial 6, sin remoción de lípidos, resultó ser el medio óptimo para el crecimiento de cristales de brushita en términos de una morfología regular y partículas de mayor tamaño.
6. Se realizó un perfil de ácidos grasos presentes en el EAST resultando el ácido oleico y el ácido palmítico los que se encuentran en mayor concentración. Asimismo se encontraron presentes ácidos grasos de cadena larga que contribuyen a la formación de vesículas lipídicas y que se encuentran presentes en el EAST, como lo son el ácido palmítico, ácido palmitoleico, ácido esteárico, ácido oleico, ácido linoleico, ácido behénico, ácido lignocérico y ácido nervónico.
7. No se visualizaron vesículas dentro de las cuales se esperaba ocurriera la biomineralización.

V.1 Perspectivas de investigación

Puesto que la ausencia de lípidos en el EAST demostró tener un papel significativo en la morfología de los cristales de brushita, se considera que la presente investigación podría ampliarse hacia demostrar la presencia de vesículas formadas por ácidos grasos en etapas más avanzadas del proceso.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abdelnour-Esquivel, A., Vincent, J., 1994. Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales, Editorial Bib. Orton IICA/CATIE, Costa Rica.
2. Addadi L., Gal A., Faivre D., Scheffel A., Weiner S., 2016. Control of biogenic nanocrystal formation in biomineralization. *Isr. J. Chem.* **56 (4)**, 227-241. doi: 10.1002/ijch.201500038
3. Arifuzzaman, S. M., Rohani, S. (2004). Experimental study of brushite precipitation. *J. Cryst. Growth*, **267(3-4)**, 624-634. doi: 10.1016/j.jcrysro.2004.04.024
4. Ayora, C., García, A. M., García, A., García, J. M., Martín, A., Pascual, J. A., & Valero, B. L., 2004. Los sistemas terrestres y sus implicaciones medioambientales. Ministerio de Educación y Ciencia. España.
5. Balandrán-Quintana, R. R., Mercado-Ruiz, J. N., Mendoza-Wilson, A. M., 2015. Wheat bran proteins: A review of their uses and potential. *Food Rev. Int.*, **31(3)**, 279-293. doi: 10.1080/87559129.2015.1015137
6. Baynes, J.W., Dominiczak, M.H., 2011. Bioquímica Médica, Elsevier Mosby, España.
7. Benzerara, K., Miot, J., Morin, G., Ona-Nguema, G., Skouri-Panet, F., Ferard, C., 2011. Significance, mechanisms and environmental implications of microbial biomineralization. *C. R. Geosci.*, **343(2-3)**, 160-167. doi: 10.1016/j.crte.2010.09.002
8. Boistelle R., López-Valero I., 1990. Growth units and nucleation. The case of calcium phosphates. *J. Cryst Growth*. **102 (3)**, 609-617.
9. Bonucci, E., 2007. Biological calcification: Normal and pathological processes in the early stages, Springer Science & Business Media, EE. UU.

10. Carretero-León, M. I., Pozo-Rodríguez, M., 2007. Mineralogía aplicada: Salud y medio ambiente, Editorial Paraninfo, España.
11. Casciani, F., Condrate Sr, R. A., 1979. The vibrational spectra of Brushite, $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. *Spectrosc. Lett.*, **12(10)**, 699-713. doi: 10.1080/00387017908069196
12. Collier, J. H., Messersmith, P. B., 2001. Phospholipid strategies in biomineralization and biomaterials research. *Annu. Rev. Mater. Res.* **31(1)**, 237-263.
13. Conti, C., Brambilla, L., Colombo, C., Dellasega, D., Gatta, G. D., Realini, M., Zerbi, G., 2010. Stability and transformation mechanism of weddellite nanocrystals studied by X-ray diffraction and infrared spectroscopy. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **12(43)**, 14560-14566. doi: 10.1039/C0CP00624F.
14. Dumitraş, D. G., Marincea, Ş., Fransolet, A. M., 2004. Brushite in the bat guano deposit from the dry" Cioclovina Cave. *Neu Jb Mineral, Abh*, **180(1)**, 45-64. doi: 10.1127/0077-7757.
15. Freixedas, F. G., Bauzá, A. C., Söhnel, O., 2000. Cristalización en disolución: Conceptos básicos, Reverté, España.
16. Geng, P., Harnly, J. M., Chen, P., 2015. Differentiation of whole grain from refined wheat (*T. aestivum*) flour using lipid profile of wheat bran, germ, and endosperm with UHPLC-HRAM mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, **63(27)**, 6189-6211. doi: 10.1021/acs.jafc.5b01599
17. Hernández, Á. G., Majem, S., 2015. Libro blanco del pan, Ed. Médica Panamericana, España.
18. Hernandez, H.F.C, Yepes, P.N.M, Sanchez, H.A.V., 2006. Fundamentos de cristalografía, ELIZCOM SAS, Colombia.
19. Hirsch, A., Azuri, I., Addadi, L., Weiner, S., Yang, K., Curtarolo, S., Kronik, L., 2014. Infrared absorption spectrum of brushite from first principles. *Chem. Mater.*, **26(9)**, 2934-2942. doi: 10.1021/cm500650t

20. Kumta, P. N., Sfeir, C., Lee, D. H., Olton, D., Choi, D., 2005. Nanostructured calcium phosphates for biomedical applications: Novel synthesis and characterization. *Acta Biomater*, **1(1)**, 65-83. doi: 10.1016/j.actbio.2004.09.008.
21. Latorre, R., 1996. Biofísica y fisiología celular (No. 49), Universidad de Sevilla, España.
22. Liu, L., Winter, K.M., Stevenson, L., Morris, C., Leach, D.N., 2012. Wheat bran lipophilic compounds with in vitro anticancer effects. *Food Chem.* **130(1)**, 156-164. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.07.023
23. Lodish, H., 2005. Biología celular y molecular, Ed. Médica Panamericana, España.
24. Lowenstam, H. A., Weiner, S., 1989. On biomineralization, Oxford University Press on Demand, EE. UU.
25. Luna-Valdez, J. G., Balandrán-Quintana, R. R., Azamar-Barrios, J. A., Clamont-Montfort, G. R., Mendoza-Wilson, A. M., Mercado-Ruiz, J. N., ... & Chaquilla-Quilca, G. (2017). Structural and physicochemical characterization of nanoparticles synthesized from an aqueous extract of wheat bran by a cold-set gelation/desolvation approach. *Food Hydrocoll*, **62(1)**, 165-173. doi: 10.1016/j.foodhyd.2016.07.034
26. Macarulla, J. M., Goñi, F. M., 1994. Bioquímica humana: Curso básico (Vol. 5), Reverté, España.
27. Mann, S., 2001. Biomineralization: Principles and concepts in bioinorganic materials chemistry, Vol. 5, Oxford University Press on Demand, EE. UU.
28. Mekmene O., Quillard S., Rouillon T., Bouler J., Piot M., Gaucheron F. 2009. Effects of pH and Ca/P molar ratio on the quantity and crystalline structure of calcium phosphates obtained from aqueous solutions. *Dairy Sci. Technol.*, **89**, 301-316. doi: 10.1051/dst/2009019

29. Mersinlioğlu O., 2015. Tesis de doctorado: Síntesis de fosfatos de calcio en presencia surfactantes iónicos, fosfolípidos y nanopartículas de sílice mesoporosa para controlar la mesoestructura de la biocerámica. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España.
30. Montes-Martos, J. M., Gómez-Cuevas, F. P., Cintas-Físico, J., 2014. Ciencia e ingeniería de los materiales, Paraninfo, España.
31. Orme, C., Giocondi, J., 2007. Handbook of Biomineralization: Biomimetic and Bio-inspired Materials Chemistry, Wiley-VCH, Alemania.
32. Perassi, I., Borgnino, L., 2014. Adsorption and surface precipitation of phosphate onto CaCO₃–montmorillonite: Effect of pH, ionic strength and competition with humic acid. *Geoderma*, **232(1)**, 600-608. doi: 10.1016/j.geoderma.2014.06.017
33. Pompa-Redondo, J.S., 2017. Tesis de licenciatura: Efecto de un preacondicionamiento térmico y la temperatura de incubación sobre las características de biominerales producidos sobre matrices orgánicas de salvado de trigo. Universidad Tecnológica de Ciudad Juárez. Ciudad Juárez, Chih., México.
34. Prinsen, P., Gutiérrez, A., Faulds, C. B., Del Río, J. C., 2014. Comprehensive study of valuable lipophilic phytochemicals in wheat bran. *J. Agric. Food Chem*, **62(7)**, 1664-1673. doi: 10.1021/jf404772b
35. Sampedro, A., De Los Toyos, J. R., Martínez-Nistal, A., 1995. Técnicas de fluorescencia en microscopía y citometría (No. 3), Universidad de Oviedo, España.
36. Semangoen, T., Sinchaikul, S., Chen, S. T., Thongboonkerd, V., 2008. Altered proteins in MDCK renal tubular cells in response to calcium oxalate dihydrate crystal adhesion: A proteomics approach. *Proteome Res*, **7(7)**, 2889-2896. doi: 10.1021/pr800113k

37. Swift, D. M., Wheeler, A. P., 1991. Some structural and functional properties of a possible organic matrix from the frustules of the freshwater diatom *Cyclotella meneghiniana*. *J. Am. Chem. Soc.*, **444** (1), 340-353.
38. Tamimi-Mariño, F., 2006. Tesis doctoral: Síntesis, caracterización y aplicación en regeneración ósea de cementos de brushita fraguados con ácidos orgánicos, geles y coloides. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España.
39. Ucar, S., Bjørnøy, S. H., Bassett, D. C., Strand, B. L., Sikorski, P., Andreassen, J. P., 2017. Transformation of brushite to hydroxyapatite and effects of alginate additives. *J. Cryst. Growth*, **468**, 774-780. doi:10.1016/j.jcrysgro.2016.11.019
40. Veis, A., Dorvee, J. R., 2013. Biomineralization mechanisms: A new paradigm for crystal nucleation in organic matrices. *Calcif. Tissue Int.*, **93**(4), 307-315. doi: 10.1007/s00223-012-9678-2
41. Veis, A., Perry, A., 1967. The phosphoprotein of the dentin matrix. *Biochemistry*, **6**(8), 2409-2416. doi: 10.1021/bi00860a017.
42. Virginia, G. E., 2014. El mármol en Hispania: Explotación, uso y difusión en época romana, Editorial UNED, España.
43. Weiner, S., 1979. Aspartic acid-rich proteins: Major components of the soluble organic matrix of mollusk shells. *Calcif. Tissue Int.*, **29**(1), 163-167. doi: 10.1007/BF02408072
44. Weiner, S., Dove, P. M., 2003. An overview of biomineralization processes and the problem of the vital effect. *Rev. Mineral Geochem.*, **54**(1), 1-29. doi: 10.2113/0540001
45. Weiner, S., Talmon, Y., Traub, W., 1983. Electron diffraction of mollusc shell organic matrices and their relationship to the mineral phase. *Int. J. Biol. Macromol.*, **5**(6), 325-328. doi: 10.1016/0141-8130(83)90055-7

46. Yao, S., Jin, B., Liu, Z., Shao, C., Zhao, R., Wang, X., Tang, R., 2017. Biomineralization: From material tactics to biological strategy. *Adv. Mater.*, **29(14)**, 1605903. doi: 10.1002/adma.201605903
47. Zavala-Corrales, J. L., 2017. Tesis de maestría: Biomineralización asistida por matrices orgánicas provenientes del extracto acuoso de salvado de trigo. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo. Hermosillo, Son., México.