

Obtención y caracterización fisicoquímica del almidón de arroz mexicano en el desarrollo de micropartículas inmunoestimulantes

Proyecto de servicio social

Instituto de Investigaciones Biomedicas. UNAM, CDMX.

Asesor IIB: Dra. Romina Rodríguez Sanoja.

Asesor UAM-Xochimilco: Dr. Alejandro A. Asaola Espinosa.

Preseta: Alberto Medina Nieto

Resumen:

Estudios recientes demostraron que las micropartículas de almidón crudo son inmunoestimulantes y pueden ser utilizadas como vehículos adyuvantes para la administración de antígenos. Sin embargo, las propiedades inmunológicas de estas micropartículas se han evaluado principalmente en almidones de arroz comerciales, por lo que el objetivo de este proyecto fue desarrollar una metodología para la producción de SMPs utilizando arroz cultivado en México como materia prima.

Se obtuvo una muestra de arroz del estado de Morelos, se seleccionaron y optimizaron dos métodos de extracción de micropartículas de almidón: con metabisulfito de sodio 0.2% y con hidróxido de sodio a dos concentraciones (0.18% y 0.15%). Tras la extracción, se evaluó la concentración de almidón total y se realizó un análisis de proteínas utilizando el método de Bradford. Además, se realizaron observaciones microscópicas de las muestras de almidón.

Los resultados mostraron que ambos métodos fueron eficaces para obtener micropartículas de almidón, pero el método de extracción con hidróxido de sodio al 0.15% demostró ser el más promisorio. Se plantean futuras investigaciones para

validar el potencial inmunoestimulante de las micropartículas de almidón obtenidas. Este estudio no solo contribuye al desarrollo de una metodología específica y controlada para la producción de SMPs, sino que también ofrece la oportunidad de agregar un valor distintivo al producto final obtenido de una fuente nacional.

Introducción:

La inmovilización de antígenos en micropartículas o nanopartículas de polímeros se estudia ampliamente para el desarrollo de nuevas vacunas. Dicha inmovilización requiere la adsorción o encapsulación de los antígenos, a través de procesos de funcionalización complejos en los que se pueden formar enlaces covalentes entre el polímero y la proteína o bien los antígenos son atrapados dentro de las partículas durante su producción.

En una aproximación diferente, Guillén y colaboradores (2014) inmovilizaron sobre micropartículas de almidón (MPAs), el fragmento C de la toxina tetánica (TetC) fusionando dicho gen al de un dominio de fijación al almidón (DFA). El sistema antígeno-DFA-micropartícula de almidón fue administrado por la vía oral a ratones sanos. Este estudio demostró que la inmovilización sobre el almidón transportó eficazmente las proteínas a los sitios de inducción de respuesta inmune en intestino dado que se obtuvieron anticuerpos específicos en los grupos que recibieron la proteína de fusión unida al almidón. Además, se observó un retraso en el desarrollo de los síntomas de tétanos en ratones desafiados con toxina tetánica cuando se administró el sistema TetC-DFA-MPAs.

Moreno-Mendieta et al. (2014), investigaron el impacto de administrar el sistema no solo por la vía oral sino también la nasal. En este trabajo se utilizó como antígeno modelo a la proteína alfa cristalina (Acr) de *Mycobacterium tuberculosis*. Nuevamente se realizó la fusión del antígeno Acr al DFA y se inmovilizó sobre las MPAS. Se evaluaron los niveles de anticuerpos IgG específicos en el suero de ratones BALB/c inmunizados por vía oral e intranasal. Se observó una mayor respuesta en los niveles de IgG, y los bazo de los ratones inmunizados por ambas vías con proteína inmovilizada en las MPAs liberaron una cantidad mayor de INF- γ en comparación con los de los animales que fueron inmunizados con la proteína no inmovilizada, lo que comprobó el potencial del sistema para el desarrollo de vacunas de subunidades y sistemas de entrega.

En experimentos posteriores, se estudió el potencial del sistema para reforzar la vacunación BCG en un modelo murino de tuberculosis pulmonar. En este trabajo ratones BalbC fueron vacunados contra la tuberculosis con BCG y posteriormente reforzados con el sistema Acr-DFA-MPAs o solo las MPAs por la vía intranasal. Dos meses después, los animales fueron desafiados con tres cepas diferentes de *M. tuberculosis*: la cepa H37Rv, moderadamente virulenta, una cepa altamente virulenta y un aislado hipervirulento. Los resultados mostraron sobrevida y revelaron una reducción significativa en la carga bacteriana pulmonar en los ratones reforzados tanto con el sistema completo como con solo las MPAs en comparación con los que solo recibieron la vacuna BCG. Esto sugiere que las micropartículas por si solas tienen actividad inmunoestimulante, lo que no había sido descrito antes para sistemas particulados de alfa-glucanos (Moreno-Mendieta et al. 2017).

En investigaciones recientes se evaluó la mucoadhesión de las MPAs, revelando su capacidad de retención en la mucosa nasal y del intestino delgado. Se observó una interacción entre las micropartículas y las mucinas, lo que permite que las MPAs se mantengan en la capa de moco y atraviesen la barrera epitelial para llegar a los tejidos linfoides mucosos. Estos hallazgos respaldan la actividad inmunostimulante previamente reportada y sugieren su potencial como sistemas eficientes para la vacunación mucosal (Vasquez-Martínez et al. 2023),

Las MPAs son poliédricas e irregulares, con caras horizontales redondeadas y un tamaño que oscila entre 1.4 a 8.8 μm , con un tamaño medio de 4.8 micras, tienen un potencial z negativo, lo que evita su aglomeración y precipitación en la solución, contribuyendo a la estabilidad coloidal del sistema. En relación a su composición, el análisis químico reveló un contenido de humedad del 6%. El 94% restante corresponde a materia seca. Además, se encontró un contenido de proteína cruda del 0.17%, cenizas del 0.4%, extracto etéreo del 0.17%, y un 92% libre de nitrógeno.

Estructura del almidón

El almidón está compuesto principalmente por dos polímeros: la amilosa y la amilopectina. La amilosa se caracteriza por ser una cadena lineal de α -D-glucosas unidas por enlaces α -1,4, con longitudes de cadena de aproximadamente 250 monómeros de glucosa. Por otro lado, la amilopectina está constituida por α -D-glucosas con enlaces α -1,4 y, aproximadamente, entre un 4% y un 6% de enlaces α -1,6, lo que le confiere una estructura ramificada formando cadenas de diferentes longitudes (a, b, c).

El almidón exhibe anillos de crecimiento, los cuales típicamente tienen un grosor de 100 a 500 nm. Estos anillos están compuestos por capas cristalinas y semicristalinas, organizadas en bloques que consisten en unidades repetidas de láminas cristalinas y amorfas. Las láminas cristalinas están principalmente formadas por amilopectina empaquetada en un retículo cristalino, mientras que los puntos de ramificación de la amilopectina y las moléculas de amilosa en una conformación desordenada son los componentes principales de las láminas amorfas. (Amagliani *et al.*, 2016)

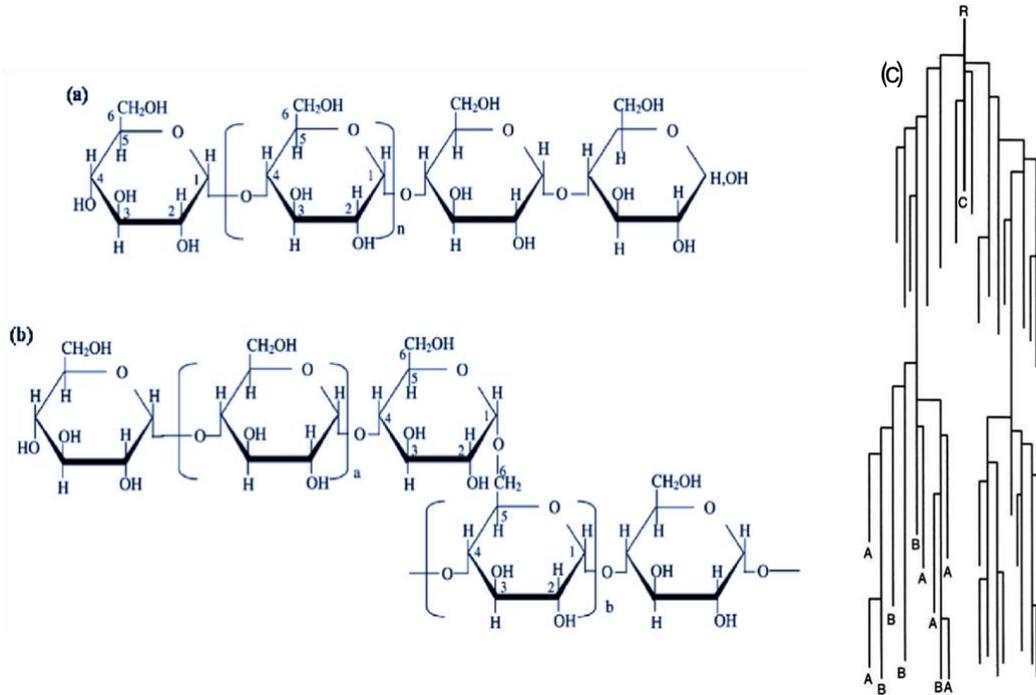


Figura 1.- Estructura de (a) amilosa, (b) amilopectina y (c) estructura esquematizada de amilopectina ramificada.

La amilopectina se puede disponer en dobles hélices y segmentos ramificados, mientras que la amilosa exhibe estructuras lineales dentro de estos arreglos. Las hélices dobles en los cristales polimórficos pueden adoptar formas conocidas como A o B. El polimorfo tipo A presenta una estructura relativamente compacta, con dobles hélices paralelas separadas por agua, mientras que el tipo B tiene una estructura más abierta que contiene un núcleo helicoidal hidratado.

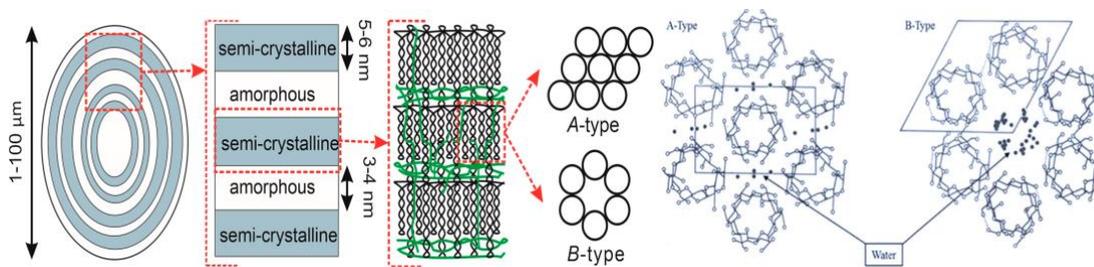


Figura 2.- Primero, los anillos de crecimiento. Luego, las regiones cristalinas y amorfas, siguiendo con las dobles hélices y los segmentos ramificados de amilopectina. Al final, el polimorfo de tipo A y B de estas.

La composición del almidón es principalmente del 98% de amilosa y amilopectina, un 1% de lípidos y un 0.25% de proteínas. (Amagliani *et al.*, 2016)

Justificación.

Dado que las propiedades inmunoestimulantes del almidón de arroz han sido evaluadas utilizando almidones comerciales, se hace evidente la necesidad de establecer una metodología propia para obtener micropartículas de almidón. Esto no solo nos permite eliminar la incertidumbre asociada al cambio de lote o de proveedor de almidón, sino que también nos brinda la oportunidad de agregar un valor distintivo al producto.

Objetivo.

Desarrollar una metodología para la producción de micropartículas de almidón crudo, utilizando arroz cultivado en México como materia prima.

Objetivos Particulares.

- Seleccionar y optimizar métodos de obtención de almidón.
- Realizar pruebas fisicoquímicas.
- Determinar la estructura de las micropartículas de almidón..

Selección del método de obtención

La selección del método de obtención se basó en la búsqueda bibliográfica exhaustiva de artículos científicos utilizando motores de búsqueda como Elsevier, ResearchGate y Google Scholar.

Una vez identificados los candidatos con mejores rendimientos y factibilidad de implementación en el laboratorio, se optó por dos métodos: una extracción básica utilizando hidróxido de sodio reportada por Cardoso *et al.*, 2007, en concentraciones del 0.15% y 0.18%, y un tercer método reportado por Moura *et al.*, 2020, por extracción con metabisulfito de sodio.

Ambos métodos se seleccionaron debido a que ambas sustancias solubilizan las proteínas al modificar sus enlaces, así como tienen un efecto oxidante en los lípidos, que son constituyentes del almidón.

Obtención del arroz:

Se compraron 500 g de arroz entero pulido, del estado de Morelos en un mercado local de la Alcaldía Coyoacán.

Preparación de las soluciones de trabajo:

Hidróxido de sodio 0.15%

0.15 gramos de NaOH por cada 100 ml de solución.

Masa de NaOH requerida

La fórmula para calcular la masa de NaOH requerida:

$$\text{Masa de NaOH}(g) = \frac{\text{Concentración deseada } (\%)}{100} \times \text{Volumen de la solución (mL)}$$

$$\text{Masa de NaOH}(g) = \frac{0.15\%}{100} \times 100 \text{ mL}$$

$$\text{Masa de NaOH} (g) = 0.15 \text{ g}$$

Agregar 50 mL de agua destilada y disolver, una vez disuelto es su totalidad aforar a 100 mL y almacenar.

Hidróxido de sodio 0.18%

0.18 gramos de NaOH por cada 100 ml de solución.

Masa de NaOH requerida

La fórmula para calcular la masa de NaOH requerida:

$$\text{Masa de NaOH}(g) = \frac{\text{Concentración deseada } (\%)}{100} \times \text{Volumen de la solución (mL)}$$

$$\text{Masa de NaOH}(g) = \frac{0.18\%}{100} \times 100 \text{ mL}$$

$$\text{Masa de NaOH}(g) = 0.18 \text{ g}$$

Agregar 50 mL de agua destilada y disolver, una vez disuelto es su totalidad aforar a 100 mL y almacenar.

Meta-Bisulfito de sodio 0.2%

0.2 gramos de Na₂S₂O₅ por cada 100 ml de solución.

Masa de Na₂S₂O₅ requerida

La fórmula para calcular la masa de Na₂S₂O₅ requerida:

$$\text{Masa de Na}_2\text{S}_2\text{O}_5(g) = \frac{\text{Concentración deseada } (\%)}{100} \times \text{Volumen de la solución (mL)}$$

$$\text{Masa de Na}_2\text{S}_2\text{O}_5(g) = \frac{0.2\%}{100} \times 50 \text{ mL}$$

$$\text{Masa de Na}_2\text{S}_2\text{O}_5(g) = 0.1 \text{ g}$$

Agregar 20mL de agua destilada y disolver, una vez disuelto es su totalidad aforar a 50 mL y almacenar.

Extracción por metabisulfito de sodio(Moura *et al.*, 2020):

Se pesaron 10 gramos de arroz y se eliminaron las impurezas visibles. Posteriormente, los granos se sumergieron en 100 mL de una solución de metabisulfito de sodio al 0.2% para solubilizar proteínas por ruptura de puentes disulfuro, dejandola en reposos por 48 horas a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se lavaron los granos de arroz con agua destilada corriente durante 3 minutos para eliminar el metabisulfito de sodio y posibles residuos.

Para llevar a cabo la trituration y suspensión del almidón, se colocaron los granos de arroz lavados en una licuadora (marca Oster, motor de 700 W) con agua destilada en una proporción de 1:20 (10 gramos/200 ml). Se tritararon los granos durante 5 minutos, en intervalos de un minuto. La suspensión se filtró por una tela de organza tres veces, transfiriendo el filtrado a un recipiente de vidrio con 100 mL de agua

destiladas donde se dejó reposar durante 24 horas en refrigeración. Pasado este tiempo, el precipitado se decantó y se desechó el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en 200 ml de agua destilada y se almacenó en refrigeración durante 24 horas. Este proceso de resuspensión con agua destilada, decantación y desecho del sobrenadante se repitió cinco veces en total.

Una vez obtenido el precipitado, se transfirió a un plato de vidrio y se dejó secar por 24 horas en un horno a 55 °C. Una vez seco el almidón, se transfirió a un envase para su almacenamiento.

Extracción Alcalina (Cardoso *et al.*, 2007):

Se empleó la misma metodología para ambas muestras, variando únicamente la concentración de la solución de hidróxido de sodio (0.15% y 0.18%).

Se pesaron 10 gramos de arroz y se molieron en una licuadora en seco (marca Oster, motor de 700 W) durante 3 minutos. Los 10 gramos de arroz molido se colocaron en un recipiente, al cual se le añadieron 100 mL de la solución de NaOH. Se dejó reposar el arroz en la solución de NaOH durante 24 horas a una temperatura de 20 °C. Tras transcurrir este período, se descartaron 80 mL del líquido sobrenadante, conservando la suspensión restante. Se resuspendió al volumen original de 20 mL y se dejó reposar por 24 horas más.

Se agitó la mezcla durante 5 minutos para homogeneizarla. Posteriormente, se centrifugó la mezcla a 1300 rpm durante 10 minutos para separar los sobrenadantes y la suspensión. Se desechó el sobrenadante, repitiendo el procedimiento de centrifugación y decantación un total de ocho veces.

Después de la última centrifugación, se suspendió el almidón en 100 mL de agua destilada. Se filtró a través de una malla de nylon de 0.125 mm de poro. El filtrado se centrifugó a 2000 rpm durante 5 minutos y se midió el pH mediante tiras reactivas. Este proceso se repitió un total de 10 veces. Cuando la tira reactiva indicó un color neutro, se leyó el pH del sobrenadante en el potenciómetro, dando una medición de pH de 6.3.

El precipitado se transfirió a un plato de vidrio y se dejó secar en un horno a 55 °C durante 24 horas. Una vez concluido el secado, se transfirió a un envase de vidrio para su almacenamiento.

Optimización de los métodos de extracción.

De las extracciones anteriores, se decidió continuar únicamente con uno de los métodos de extracción básica, eligiendo el de concentración al 0.15% como el candidato a seguir, debido a que en pruebas no mostradas la extracción al 0.18% presentó un mayor porcentaje de proteínas.

Preparación del arroz:

Se inició el proceso seleccionando, limpiando y pesando 30 g de arroz entero. Posteriormente, se procedió a moler el arroz en un molino de granos durante 30 segundos, dejando un minuto de espera antes de repetir este proceso tres veces para completar un tiempo total de 1 minuto y 30 segundos de molienda. Luego, se filtró con un tamiz de 0.100 mm de poro y se reservó el filtrado.

Extracción alcalina con NaOH 0.15%:

Se pesaron 10 g de arroz pulverizado y se colocaron en un tubo cónico de 50 mL. Luego, se añadieron 10 mL de solución de NaOH al 0.15% y se mezclaron. El recipiente se dejó reposar durante 24 horas a temperatura ambiente.

Después del tiempo de reposo, se procedió a descartar 8 mL del líquido sobrenadante resultante, conservando únicamente la suspensión restante. Para restablecer el volumen original de 10 mL, se volvió a suspender el arroz en la solución de NaOH y se agitó vigorosamente durante 5 minutos. A continuación, la mezcla se centrifugó a 2500 rpm durante 5 minutos para separar el sólido del líquido. Se descartó el sobrenadante por decantación y se repitió este proceso de separación del líquido sobrenadante y centrifugación un total de ocho veces.

Con el último sedimento obtenido, se suspendió el almidón en agua destilada con 20 mL. Esta suspensión se filtró a través de un tamiz con un tamaño de poro de 0.100 mm.

Posteriormente, se centrifugó el almidón en suspensión a 2500 rpm durante 5 minutos. Al sobrenadante se le determinó el pH con tiras reactivas y se repitió el proceso de lavado hasta obtener un indicador de neutralidad.

Una vez alcanzada la neutralidad, se determinó el pH del sobrenadante final utilizando un potenciómetro. Finalmente, el almidón obtenido se colocó en un horno de circulación de aire a 50°C y se dejó secar.

Extracción por metabisulfito de sodio:

Se tomaron 10 gramos de arroz pulverizado y se colocaron en un tubo cónico de 50 mL, se agregaron 20 mL de una solución de metabisulfito de sodio al 0.2% y se dejó en reposo durante 48 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se centrifugó a 2500 rpm por 5 minutos, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en agua destilada. Se agitó durante 5 minutos y se determinó el pH con tiras reactivas. Luego, se centrifugó nuevamente a 2500 rpm por 5 minutos, se desechó el sobrenadante y se determinó el pH hasta alcanzar un indicador de neutralidad.

El almidón se suspendió en 30 mL de agua destilada y se filtró la suspensión a través de un tamiz de 0.100 mm de poro. La suspensión filtrada se transfirió a un tubo cónico de 50 mL y se dejó reposar durante 24 horas a una temperatura de 7°C para permitir que el almidón se asentara.

Una vez transcurrido el tiempo de reposo, se centrifugó a 2500 rpm, eliminando el sobrenadante y conservando únicamente el precipitado de almidón. Este precipitado se resuspendió en 30 mL de agua destilada y se dejó decantar durante 24 horas.

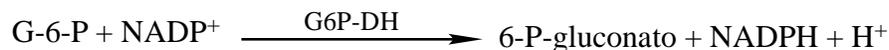
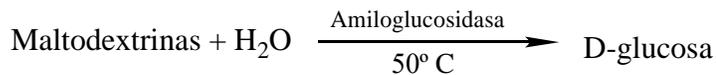
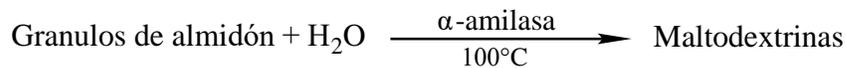
Se repitió el proceso de agregar 300 mL de agua destilada, decantar y desechar el sobrenadante cinco veces.

Después de la última decantación, se descartó el sobrenadante y se transfirió el precipitado de almidón a una bandeja de vidrio para su secado en un horno de circulación de aire a 50°C durante 48 horas, transcurrido el tiempo, se almacenó para su posterior análisis.

Pruebas fisicoquímicas

Determinación de almidón total

La determinación de almidón total se realizó con el kit K-TSHK de la marca Megazime®. La cuantificación se basa en una serie de reacciones que se describen a continuación:



Al final se determina la reducción de NADP⁺ a NADPH, en un espectrofotómetro a 340 nm.

Se pesaron 100 mg de la muestra y se añadieron 0.2 mL de etanol (80% v/v). Posteriormente, se añadieron 3 mL de α-amilasa termoestable. El tubo se incubó en un baño de agua hirviendo durante 6 minutos, agitándolo vigorosamente después de 2, 4 y 6 minutos. Luego, se colocó el tubo en un baño a 50°C y se añadieron 0.1 mL de amiloglucosidasa (botella 2). Se agitó el tubo en un mezclador de vórtice e incubó a 50°C durante 30 minutos.

Todo el contenido del tubo de ensayo se transfirió a un matraz volumétrico de 100 mL, utilizando un embudo para facilitar la transferencia, y se aforó. Posteriormente, se centrifugó una porción de 0.5 mL a 3,000 rpm durante 10 minutos, utilizando el sobrenadante. A este sobrenadante se tomó una muestra de 50 µL y 2 mL de agua destilada, posteriormente se agregaron los reactivos buffer (pH 7.6) y NADP⁺ más ATP. (Botellas 3 y 4 del kit), se mezcló. La primera lectura fue 3 minutos después de agregar los reactivos 3 y 4 del kit, utilizando el espectrofotómetro se hizo la lectura a 340 nm. Posteriormente, se agregó el reactivo hexoquinasa más glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (botella 5), se mezcló, se dejó reposar por 5 minutos y se leyó a 340 nm. Esta última lectura se repitió cada dos minutos hasta que la lectura no varió. Todas las muestras fueron evaluadas por triplicado

Contenido de proteínas:

El contenido de proteínas se determinó mediante el método de Bradford, utilizando el reactivo para ensayo de proteínas de Bio-Rad®. El principal componente de este reactivo es el azul de Coomassie, que se une a las proteínas presentes en la muestra, formando un complejo colorimétrico con la interacción de aminoácidos básicos como

la lisina, arginina e histidina. Esto permite cuantificar la cantidad de proteínas presentes en función de la intensidad del cambio de color.

Con el fin de cuantificar las proteínas que pueden encontrarse dentro de las micropartículas, la muestra se obtuvo después de la digestión con la amilasa y la glucósidasa del método anterior. El blanco de proteína se trató con las mismas enzimas del kit K-TSHK de la marca Megazime®, y luego se restó el contenido promedio de las tres muestras a las concentraciones resultantes.

Se utilizó una curva de calibración con Suero de Albúmina Bovina (BSA) que contenía 10 puntos y se realizó por triplicado.

Se tomaron 800 µL de muestra y se les añadieron 200 µL de reactivo de Bradford. Posteriormente, se agitaron y se dejaron en reposo durante 3 minutos para su lectura. Después de este período, se registraron las lecturas a 595 nm en el espectrofotómetro.

Las muestras fueron evaluadas por triplicado

Observación al microscopio:

Se utilizó una dilución de 10 mg de almidón en 1 mL de agua destilada, la cual se montó en un portaobjetos. Se empleó el objetivo de 10X para determinar el área de observación y posteriormente se aumentó a 40X para su observación detallada.

Resultados

Optimización del método de extracción.

En el primer ensayo realizado se recuperaron las siguientes cantidades de micropartículas a partir de 10 g de arroz:

- Con $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 0.2%: 3.15 g
- Con NaOH 0.15%: 2.75 g
- Con NaOH 0.18%: 3.05 g

Una vez optimizado el método, e utilizaron 5 g iniciales de arroz y se obtuvieron los muestra inicial siguientes resultados:

- Con $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 0.2%: 3.0 g
- Con NaOH 0.15%: 3.71 g

Los rendimientos obtenidos se ilustran en la figura 3. Como puede observarse

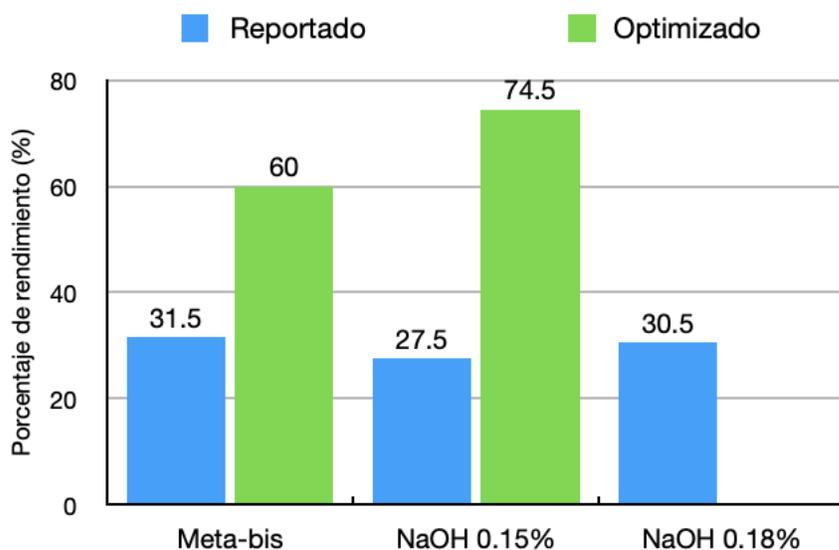


Figura 3: Gráfico comparativo de rendimiento en porcentaje entre el método reportado en la bibliografía (en azul) y el método optimizado (en verde). Siendo los porcentajes de rendimiento considerablemente mayores en el método optimizado.

Determinación de almidón total

Siguiendo la metodología reportada, se realizó la determinación mediante digestión enzimática usando el kit K-TSHK. Los resultados se obtuvieron mediante la ecuación:

$$c = \frac{V * MW}{\epsilon * d * v} * \frac{162}{180} * \Delta A_{D-Glucosa}$$

Donde:

V = Volumen final [mL]

MW = Peso molecular de la D-glucosa [g/mol]

ϵ = Coeficiente de extinción del NADPH a 340 nm = 6300 [l x mol⁻¹ x cm⁻¹]

d = longitud de la celda [cm]

v = Volumen de muestra [mL]

162/180.= El ajuste de la glucosa libre a la glucosa anhidra

ΔA = Absorbancia 2- absorbancia 1

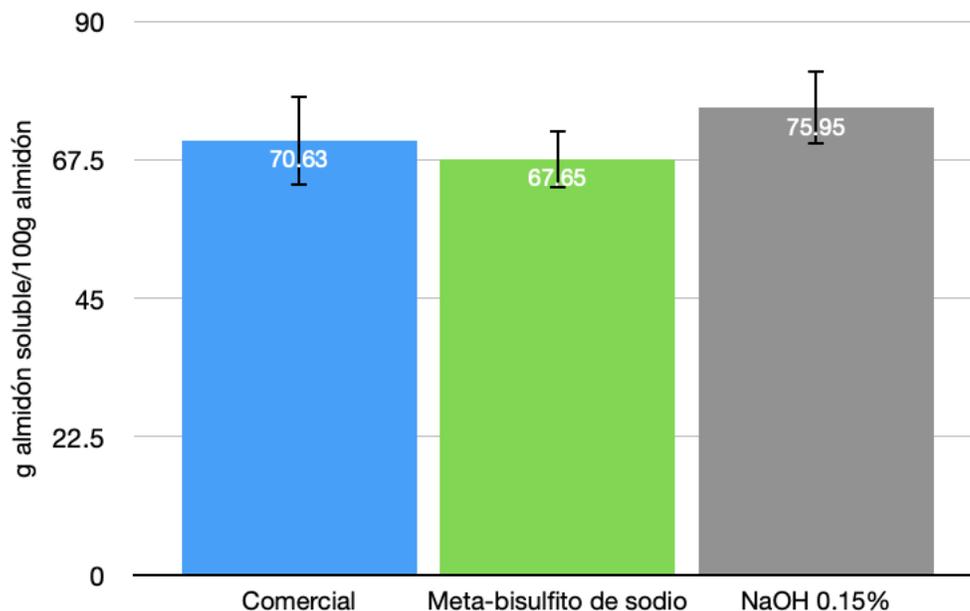


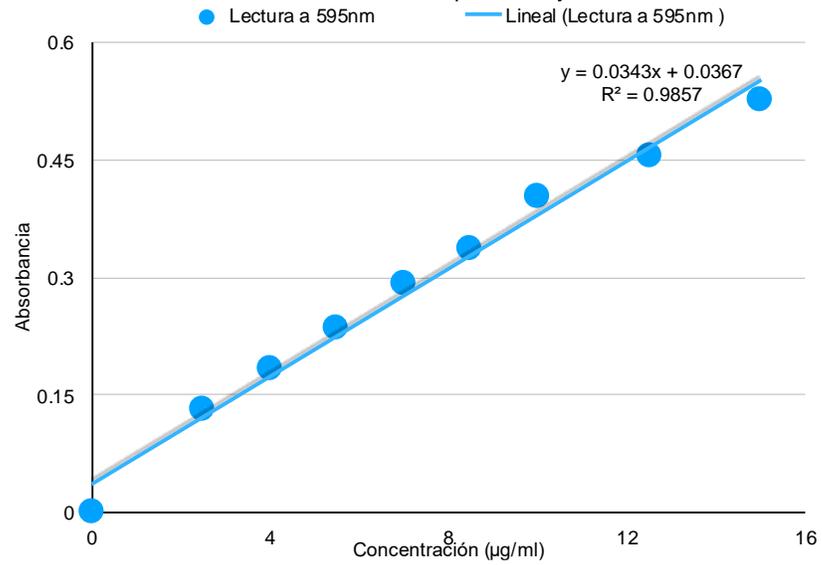
Figura 4: Gráfico comparativo del contenido de almidón en gramos por cada 100 gramos de almidón tratado o comercial.

Se realizó un análisis estadístico t de Student para contrastar el almidón comercial con el obtenido por cada método de extracción. Con un valor de $p > 0.05$ en las comparaciones, se identificaron diferencias significativas entre las extracciones del laboratorio y el contenido de almidón del producto comercial.

Determinación de contenido de proteínas.

Para determinar el contenido de proteínas, se realizó una curva de calibración con concentraciones de 1.2, 2.5, 4, 5.5, 7, 10, 12.5 y 15 $\mu\text{g/mL}$ de BSA. Esta curva se realizó por triplicado.

Gráfica 3. Curva de calibración para ensayo de Bradford.



Con los datos obtenidos de la curva de calibración se obtuvieron las concentraciones de proteínas presentes en el almidón. Estas pruebas fueron realizadas por triplicado.

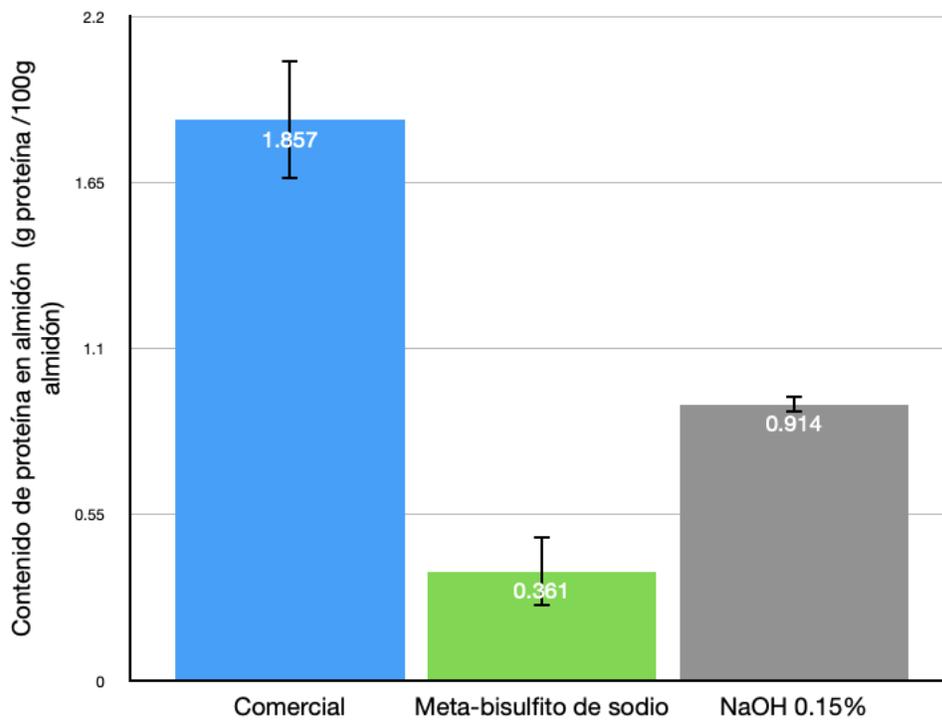


Figura 4: Gráfico comparativo del contenido de almidón en gramos por cada 100 gramos de almidón. No se observan diferencias significativas entre las extracciones obtenidas en el laboratorio y el contenido de almidón en el producto comercial.

Observación al microscopio.

Las imágenes se muestran en anexos.

Microscopía con el objetivo 40x, muestras en dilución de 10 mg/mL.

- Almidón comercial: Se observan caras poliédricas, redondeadas y de tamaño uniforme.
- Almidón/meta-bisulfito: Se denotan aglomerados de micropartículas, con tamaños más pequeños y caras poliédricas.
- Almidón/hidróxido de sodio: Se observan caras poliédricas, redondeadas y de tamaño uniforme.

Discusión de resultados.

Al comparar los resultados de los métodos reportados, se observa que ambos métodos de extracción demostraron eficacia en la obtención de micropartículas de almidón. Sin embargo, el método de extracción por hidróxido de sodio, junto con la optimización del proceso mediante centrifugación y el filtrado por tamices con un tamaño de poro uniforme, mejoraron significativamente tanto el rendimiento como la uniformidad de las partículas. Se identificó que la falta de tratamiento adecuado y el tamaño irregular de las micropartículas podrían haber causado una pérdida considerable durante el proceso. La inclusión de centrifugaciones adicionales permitió un mayor asentamiento de las partículas, mientras que el uso de un tamiz con un tamaño de poro más fino ayudó a obtener partículas con un tamaño más uniforme. Esto sugiere que la modificación de los métodos de extracción puede tener un impacto positivo en la calidad del producto final en la producción de micropartículas de almidón.

Este hallazgo se alinea con lo evaluado por Halal et al. (2019), quien realizó una comparación de varios métodos de extracción y examinó los rendimientos obtenidos. Su estudio destacó que los pequeños gránulos de almidón presentes en el arroz pueden afectar la purificación debido a la lenta sedimentación en agua, lo que conlleva pérdidas durante las operaciones de separación y purificación.

En las pruebas fisicoquímicas efectuadas, la determinación del contenido total de almidón abarca tanto el almidón digestible como el no digestible, siendo este último imposible de cuantificar mediante este método. No obstante, al contrastar los resultados con el almidón comercial y nuestros extractos, el análisis estadístico t de Student reveló una diferencia significativa en la obtención de almidón entre la muestra comercial y la obtenida con nuestros métodos. Este resultado sugiere que nuestra metodología ha logrado una mayor eficiencia en la extracción de almidón.

En el análisis de proteínas, se observó una notable disparidad entre las tres muestras examinadas. La muestra comercial mostró la mayor concentración de proteínas, seguida por la muestra obtenida mediante extracción básica, mientras que la muestra con el menor contenido proteico correspondió a la obtenida con metabisulfito de sodio. Este patrón de resultados se alinea con el estudio de Lim et al. (1999), donde se compararon tres métodos de extracción de proteínas en harina de arroz para la obtención de almidón. En su investigación, evaluaron extracción con hidróxido de sodio (0.1% y 0.2%), sulfato de laurilo de sodio (SLS, 1.2%) y dodecilsulfonato (DoBS, 1.2%). Los resultados revelaron una mayor extracción de proteínas con DoBS, seguida por la extracción hidróxido de sodio al 0.2%. Es interesante destacar que Nyakabau et al. (2013) también llegaron a la conclusión de que el metabisulfito es un método superior para purificar almidón, ya que tiene un mayor porcentaje de solubilidad de proteínas.

Siendo importante destacar que varios estudios clínicos han documentado casos de alergia inducida por el arroz en pacientes sensibles. Se ha identificado que las proteínas de arroz con pesos moleculares de 14-16, 26, 33 y 56 kDa son responsables de estas reacciones alérgicas. Este hallazgo es relevante porque un menor contenido de proteínas puede resultar en una menor probabilidad de desencadenar una respuesta inmune o alérgica en individuos sensibles (Krishnan & Chen, 2013).

Por lo tanto, la extracción de almidón mediante ambos métodos resulta conveniente, siendo el método de extracción con metabisulfito de sodio el mejor candidato, seguido de la extracción con Hidróxido de sodio 0.15%, para la obtención de micropartículas

de almidón con un menor contenido proteico y como reporta Halal et al. (2019), un menor porcentaje de proteínas conlleva a micropartículas de almidón de mejor calidad.

El análisis microscópico reveló diferencias significativas entre el almidón comercial y las micropartículas obtenidas mediante la extracción con metabisulfito de sodio al 0.2%. En el almidón comercial, se observó una uniformidad en cuanto al tamaño y la estructura, con micropartículas poliédricas que presentaban caras redondeadas. En contraste, en las micropartículas extraídas con metabisulfito de sodio, se observaron variaciones en el tamaño de las partículas, así como la presencia de estructuras de agregados. Estas micropartículas mostraron caras angulares y poliédricas.

Por otro lado, en el almidón obtenido mediante extracción con hidróxido de sodio al 0.15%, se observó un tamaño uniforme de las partículas, con caras redondeadas y estructuras poliédricas, similar a las micropartículas observadas en el almidón comercial. Estas diferencias en la estructura sugieren que los métodos de extracción pueden influir en las características físicas de las micropartículas del almidón.

Estos hallazgos coinciden con el estudio realizado por Nyakabau et al. (2013), quienes llevaron a cabo una comparación de diversos métodos de purificación de almidón en tef, un cereal autóctono africano. Los métodos de extracción evaluados fueron, con metabisulfito de sodio al 0.2%, ácido láctico al 0.5%, la combinación de metabisulfito de sodio y ácido láctico al 0.5%, y con hidróxido de sodio al 0.5%. Mediante microscopía electrónica, se observaron las estructuras presentes en las micropartículas de almidón. Los investigadores no detectaron daños durante el proceso de extracción; sin embargo, informaron la presencia de agregados de micropartículas individuales de almidón, siendo más abundantes en las extracciones realizadas con metabisulfito de sodio y en su combinación con ácido láctico. Por otro lado, señalaron que en la extracción con hidróxido de sodio se observaron una cantidad menor de agregados. Si bien no se tiene una explicación clara de este fenómeno, se podría pensar que los iones sulfato estarían interactuando de alguna manera con la superficie de las micropartículas, posiblemente afectando el potencial z y haciendo que estas micropartículas se agreguen. Sin embargo, para poder tener una explicación clara se necesitan realizar más pruebas.

Conclusión

Los resultados confirman la efectividad de ambos métodos de extracción de micropartículas de almidón. Sin embargo, el método con hidróxido de sodio, junto con la optimización mediante centrifugación y selección de tamaño de poro, mejora notablemente el rendimiento y la uniformidad de las partículas, sugiriendo que la modificación de los métodos de extracción puede mejorar la calidad del producto final.

El estudio respalda la importancia de un menor contenido proteico en las micropartículas de almidón para una mejor calidad del producto, como lo indican investigaciones previas (Halal et al., 2019; Lim et al., 1999). A pesar de la eficacia del método de extracción con metabisulfito de sodio para reducir el contenido proteico, la observación de agregación de micropartículas plantea preocupaciones sobre su idoneidad para el uso biológico que se pretende, descartándolo como opción.

Por último, el método de extracción con hidróxido de sodio al 0.15% emerge como la opción más prometedora debido a su capacidad para obtener micropartículas con menor contenido proteico que el almidón comercial. Por tanto, se selecciona como la metodología preferida para la producción de micropartículas de almidón.

Este avance marca un paso significativo al desarrollar de una metodología exitosa para obtener micropartículas inmunoestimulantes de almidón. Sin embargo, como perspectiva, se requerirán pruebas adicionales, como la evaluación de la fijación del dominio de unión al almidón y estudios in vivo para confirmar su potencial inmunoestimulador, como se ha reportado en la literatura. Estos pasos validarían plenamente el potencial de las micropartículas de almidón obtenidas.

Referencias

Admin, & Admin. (2020, 3 noviembre). Inmovilizan antígenos en gránulos de almidón. *Gaceta UNAM*. <https://www.gaceta.unam.mx/inmovilizan-antigenos-en-granulos-de-almidon/>

Bashir, K., & Aggarwal, M. (2019). Physicochemical, structural, and functional properties of native and irradiated starch: a review. *Journal of Food Science and Technology*. doi:10.1007/s13197-018-3530-2

Cardoso, M. B., Putaux, J., Samios, D., & Da Silveira, N. P. (2007). Influence of alkali concentration on the deproteinization and/or gelatinization of rice starch. *Carbohydrate Polymers*, 70(2), 160-165. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.03.014>

Da Silva, L. R., De Carvalho, C. W. P., Velasco, J. I., & Fakhouri, F. M. (2020). Extraction and characterization of starches from pigmented rice. *International Journal of Biological Macromolecules*, 156, 485-493. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.034>

Guillén, D., Moreno-Mendieta, S., Pérez, R., Espitia, C., Sánchez, S., & Rodríguez-Sanoja, R. (2014). Starch granules as a vehicle for the oral administration of immobilized antigens. *Carbohydrate Polymers*, 112, 210-215. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.05.089>

Halal, S. L. M. E., Kringel, D. H., Da Rosa Zavareze, E., & Dias, A. R. G. (2019). Methods for extracting cereal starches from different sources: a review. *Starch-starke*, 71(11-12), 1900128. <https://doi.org/10.1002/star.201900128>

Halal, S. L. M. E., Kringel, D. H., Da Rosa Zavareze, E., & Dias, Á. R. G. (2019). Methods for Extracting Cereal Starches from Different Sources: A Review. *Starch-Stärke*, <https://doi.org/10.1002/star.201900128>

Lim, S.-T., Lee, J.-H., Shin, D.-H., & Lim, H. S. (1999). Comparison of Protein Extraction Solutions for Rice Starch Isolation and Effects of Residual Protein Content on Starch Pasting Properties. *Starch - Stärke*, 51(4), 120–125. doi:10.1002/(sici)1521-379x(199904)51:4<120::aid-star120>3.0.co;2-a

Moreno-Mendieta, S., Barrera-Rosales, A., Mata-Espinosa, D., Barrios-Payán, J., Sánchez, S., Hernández-Pando, R., & Rodríguez-Sanoja, R. (2019). Raw starch microparticles as BCG adjuvant: Their efficacy depends on the virulence of the infection strains. *Vaccine*, 37(38),

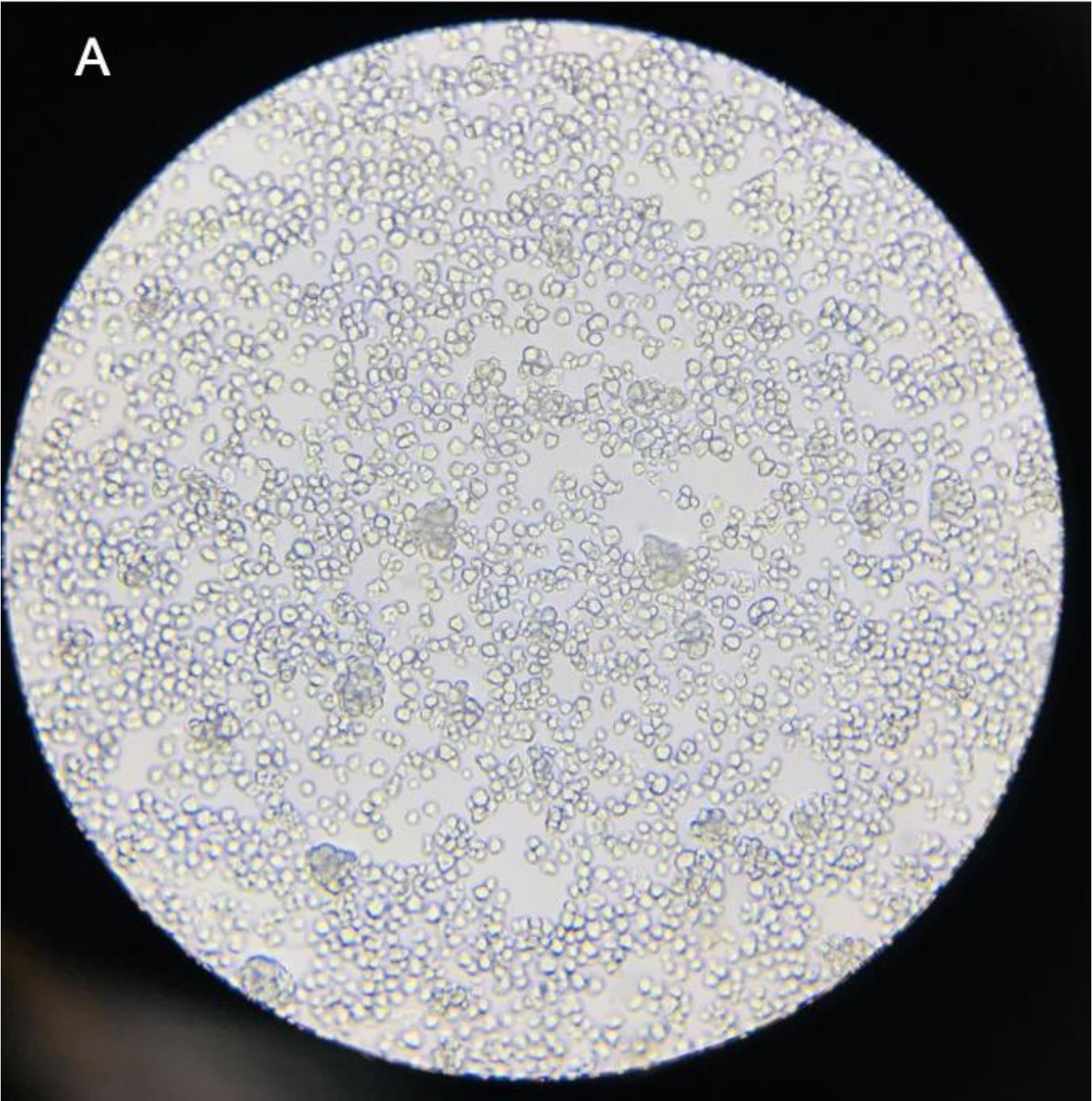
Moreno-Mendieta, S., Guillén, D., Espitia, C., Hernández-Pando, R., Sánchez, S., & Rodríguez-Sanoja, R. (2014). A novel antigen-carrier system: the Mycobacterium tuberculosis ACR protein carried by raw starch microparticles. *International Journal Of Pharmaceutics*, 474(1-2), 241-248.

Moura, H. V., Gusmão, R. P. de, Gusmão, T. A. S., Castro, D. S. de, Almeida, R. L. J., & Figueirêdo, R. M. F. de. (2020). *Extraction and Characterization of Native Starch from Black and Red Rice*. *Journal of Agricultural Studies*, 8(3), 1. doi:10.5296/jas.v8i3.16183

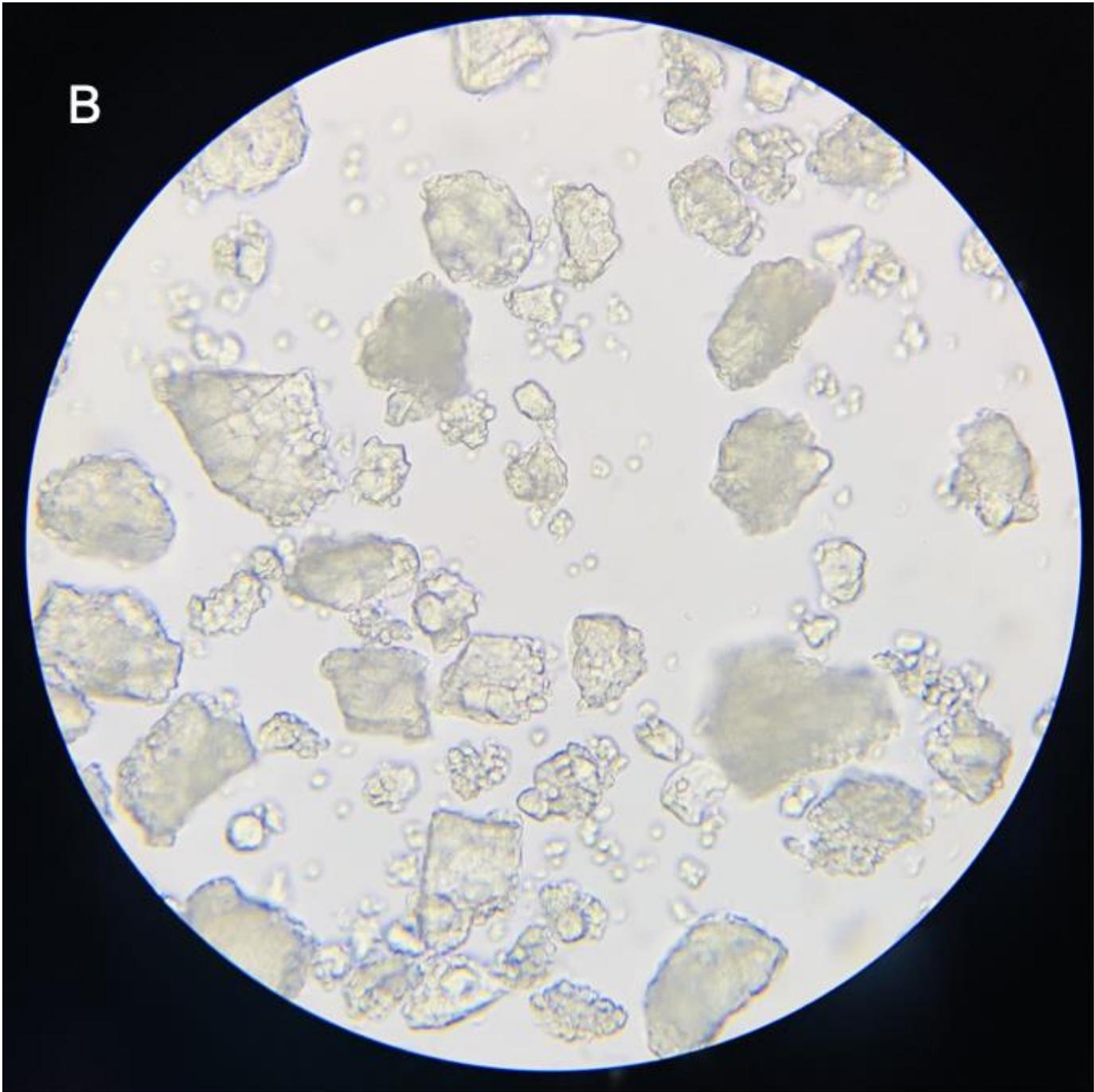
Vasquez-Martínez, N., Guillén, D., Moreno-Mendieta, S., Medina-Granados, P., Pimentel, R. G. C., Martín-Martínez, E. S., Morales, M. A., Sánchez, S., & Rodríguez-Sanoja, R. (2023). In vivo tracing of immunostimulatory raw starch microparticles after mucosal administration. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 187, 96-106. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2023.04.013>

Anexos

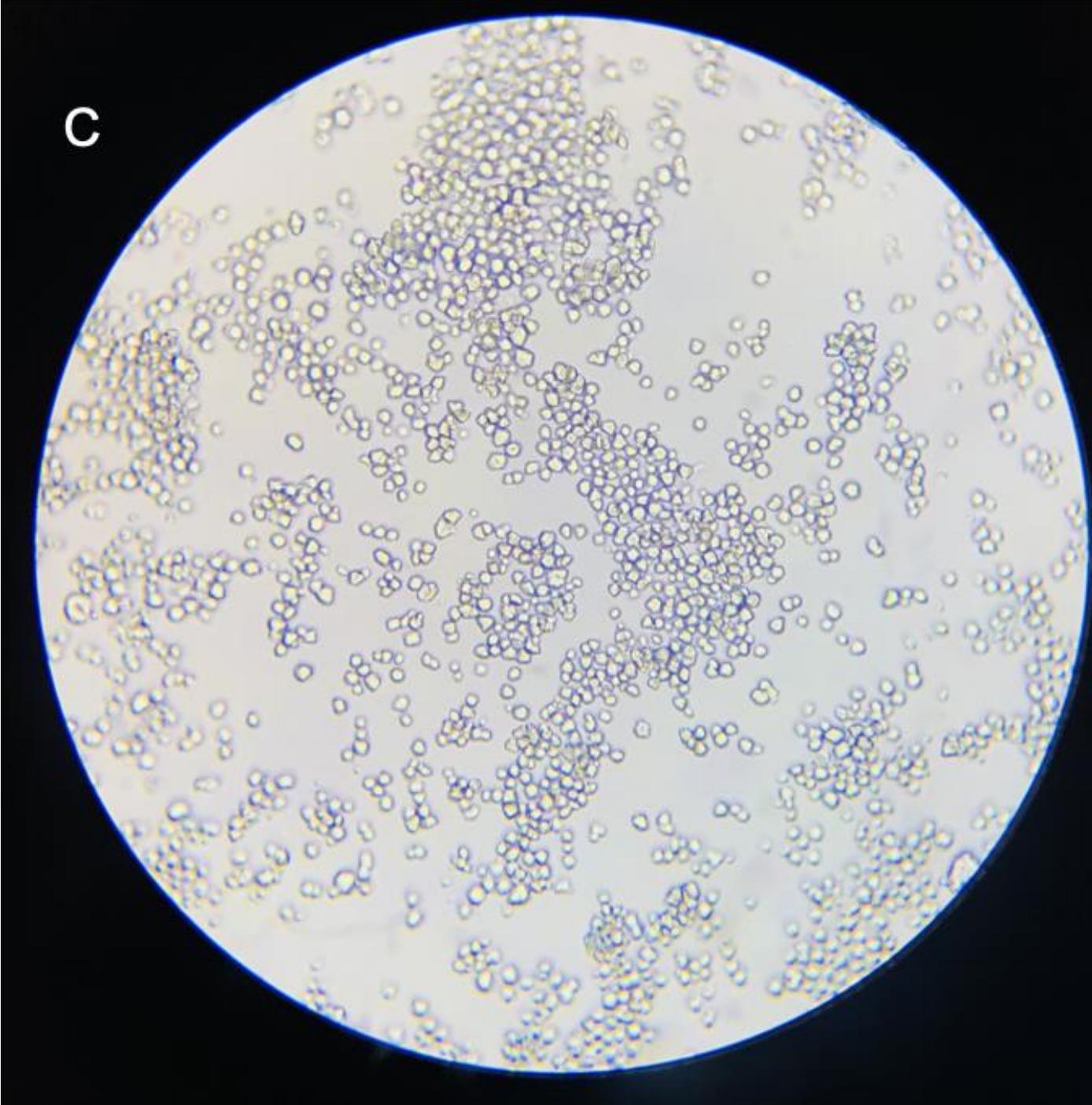
Imágenes obtenidas por microscopía.



(a) Almidón comercial



(b) Almidón obtenido por extracción con meta-bisulfito de sodio al 0.2%



(c) Almidón obtenido por extracción con hidróxido de sodio al 0.15%