

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE INGENIERÍA



“Fermentación sólida de vainas de cascalote (*Caesalpinia coriaria*) y su efecto sobre la recuperación de compuestos fenólicos.”

Por:

FRANCISCO LÓPEZ CÁRDENAS

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Saltillo, Coahuila, México.

Marzo de 2022

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE INGENIERÍA



“Fermentación sólida de vainas de cascalote (*Caesalpinia coriaria*) y su efecto sobre la recuperación de compuestos fenólicos.”

Por:
FRANCISCO LÓPEZ CÁRDENAS

TESIS
Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

**DR. JULIO CÉSAR TAFOLLA
ARELLANO**
Asesor Principal UAAAN

**DR. JOSE JUAN BUENROSTRO
FIGUEROA**
Asesor Principal Externo

Saltillo, Coahuila, México.

Abril de 2022

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE INGENIERÍA

“Fermentación sólida de vainas de cascalote (*Caesalpinia coriaria*) y su efecto sobre la recuperación de compuestos fenólicos.”

Por:

FRANCISCO LÓPEZ CÁRDENAS
TESIS

Que somete a la consideración del H. Jurado Examinador como requisito para obtener el título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

La cual fue revisada y aprobada por:

EL COMITÉ DE TESIS

**DR. JULIO CÉSAR TAFOLLA
ARELLANO**
Asesor Principal

**DR. JOSE JUAN BUENROSTRO
FIGUEROA**
Asesor Principal Externo

**DR. AGUSTÍN HERNÁNDEZ
JUÁREZ**
Asesor

M.C. EMILIO OCHOA REYES
Asesor

MC. SERGIO SÁNCHEZ MARTÍNEZ
Coordinador de la División de Ingeniería



Saltillo, Coahuila, México.

Abril de 2022

AGRADECIMIENTOS

A **Dios** por ser quien me otorgó la vida, salud y tiempo para poder realizar mis metas en cada etapa de mi vida, también por ser el impulso que necesito para realizar mi día a día.

A mi **Familia y Amigos** que hicieron todo lo posible para que culminará este proyecto.

A mi **ALMA TERRA MATER**, La **UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO** por haberme brindado los conocimientos y las herramientas necesarias para que pudiera culminar mi carrera de Ingeniero en Biotecnología.

Al **DR. JULIO CÉSAR TAFOLLA ARELLANO** por ser mi director de tesis, brindarme su apoyo y confianza para realizar este proyecto adecuadamente.

Al **DR. JOSÉ JUAN BUENROSTRO FIGUEROA** por su apoyo, su asesoría, disponibilidad, confianza, por brindarme las herramientas y conocimientos requeridos a lo largo del proyecto, además de las facilidades brindadas en las instalaciones del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo.

Al **M.C. EMILIO OCHOA REYES** por su apoyo técnico, conocimiento y disponibilidad mostrada en el laboratorio.

Al **DR. AGUSTÍN HERNÁNDEZ JUÁREZ** por aceptar formar parte de mi comité.

Al **CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO** por otorgarme la beca para realizar mi proyecto de tesis.

A mis compañeros del **LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**, por el apoyo brindado.

DEDICATORIA

A mi madre **ANTONIA CÁRDENAS HERNANDEZ** por darme sus consejos, enseñanzas y cariño que me impulsaron a seguir adelante a pesar de las dificultades que pudiera encontrar en mi carrera, por estar incondicionalmente en cada momento brindándome su apoyo, muchas gracias por todo.

A mi hermano **VÍCTOR LÓPEZ CÁRDENAS** quien me apoyó con cada decisión que tomaba, por brindarme sus experiencias que me ayudaban a fortalecer mis conocimientos, por su comprensión y cariño.

A mis hermanos **José Apolonio, Baldomero, Elvia, Mario, Celina y Antonio**, que de alguna manera me ayudaron en mi formación con sus consejos, apoyo y cariño.

ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO	
AGRADECIMIENTOS	IV
DEDICATORIA	V
ÍNDICE GENERAL	VI
ÍNDICE DE CUADROS	IX
ÍNDICE DE FIGURAS	X
RESUMEN	XI
CAPÍTULO I	12
INTRODUCCIÓN	12
<i>1.1. Justificación</i>	13
<i>1.2. Hipótesis</i>	14
<i>1.3. Objetivos</i>	14
<i>1.3.1. General</i>	14
<i>1.3.2. Específicos</i>	14
CAPÍTULO II	15
REVISIÓN DE LITERATURA	15
<i>2.1. Generalidades del cascalote</i>	15
<i>2.2. Taninos</i>	17
<i>2.2.1. Descripción</i>	17
<i>2.2.2. Clasificación de taninos</i>	17
<i>2.3. Fermentación en Medio Sólido</i>	19
<i>2.3.1. Microorganismos empleados</i>	19
<i>2.3.2. Factores que influyen en la FMS</i>	19
<i>2.3.3. Ventajas y desventajas</i>	19
<i>2.3.4. Aplicaciones de la FMS</i>	20
CAPÍTULO III	21
MATERIALES Y MÉTODOS	21
<i>3.1. ETAPA 1. Obtención y caracterización fisicoquímica del material vegetal.</i>	21
<i>3.1.1. Caracterización fisicoquímica del material vegetal</i>	21
<i>3.1.1.1. Índice de absorción de agua</i>	21
<i>3.1.1.2. Punto crítico de humedad</i>	21
<i>3.1.1.3. Materia seca</i>	22
<i>3.1.1.4. Humedad</i>	22

3.1.1.5. <i>Proteína cruda</i>	22
3.1.1.6. <i>Extracto etéreo (Grasa)</i>	23
3.1.1.7. <i>Cenizas</i>	23
3.1.1.8. <i>Fibra cruda</i>	24
3.1.1.9. <i>Carbohidratos</i>	24
3.2. <i>ETAPA 2. Evaluación del efecto de la cepa de microorganismo y el tiempo de fermentación sobre la extracción y recuperación de compuestos fenólicos y su capacidad antioxidante.</i>	24
3.2.1. <i>Microorganismos</i>	24
3.2.2. <i>Fermentación en medio sólido (FMS)</i>	25
3.2.3. <i>Análisis químico</i>	25
3.2.3.1. <i>Fenoles Hidrolizables</i>	25
3.2.3.2. <i>Fenoles Condensados</i>	25
3.2.3.3. <i>Fenoles Totales</i>	26
3.2.3.3. <i>Capacidad antioxidante</i>	26
3.2.3.3.1. <i>DPPH</i>	26
3.2.3.3.2. <i>ABTS</i>	26
3.2.3.4. <i>Análisis de resultados</i>	27
3.3. <i>ETAPA 3. Determinación del efecto de los parámetros fisicoquímicos de fermentación sobre la extracción y recuperación de compuestos fenólicos a partir de vainas de cascalote y su capacidad antioxidante.</i>	28
3.3.1. <i>Microorganismo</i>	28
3.3.2. <i>Fermentación en medio sólido (FMS)</i>	28
3.3.3. <i>Caracterización fisicoquímica de cascalote fermentado</i>	29
3.3.4. <i>Análisis de resultados</i>	30
CAPÍTULO IV	31
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
4.1. <i>ETAPA 1. Obtención y caracterización fisicoquímica de las vainas de cascalote (Caesalpinia coriaria).</i>	31
4.1.1. <i>Índice de absorción de agua</i>	32
4.1.2. <i>Punto crítico de humedad</i>	32
4.2. <i>ETAPA 2. Efecto de la cepa fúngica y el tiempo de fermentación sobre la extracción y recuperación de compuestos fenólicos y su capacidad antioxidante.</i>	32
4.3. <i>ETAPA 3. Efecto de los parámetros fisicoquímicos de fermentación sobre la extracción y recuperación de compuestos fenólicos a partir de vainas de cascalote y su capacidad antioxidante.</i>	35
4.3.1. <i>Efecto de la FMS sobre la composición fisicoquímica de cascalote fermentado</i>	41
CAPÍTULO V	43

PERSPECTIVAS	44
CAPÍTULO VI.....	45
BIBLIOGRAFÍA.....	45
ANEXOS.....	50

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Contenido	Pág
1	Matriz experimental Box-Hunter & Hunter (BHH) 2 ^k con tres puntos centrales.....	29
2	Caracterización físico-química del cascalote (<i>Caesalpinia coriaria</i>).....	31
3	Efecto del tiempo de cultivo sobre el contenido de fenoles hidrolizables (FH), condensados (FC) y totales (FT) y la capacidad antioxidante frente a los radicales ABTS y DPPH de extractos obtenidos de la FMS de vainas de cascalote.....	33
4	Efecto del hongo de cultivo sobre el contenido de fenoles hidrolizables (FH), condensados (FC) y totales (FT) y la capacidad antioxidante frente a los radicales ABTS y DPPH de extractos obtenidos de la FMS de vainas de cascalote.....	34
5	Coefficientes de correlación de Pearson.....	35
6	Efecto del tratamiento sobre el contenido de fenoles hidrolizables (FH), condensados (FC) y totales (FT) y la capacidad antioxidante frente a los radicales ABTS y DPPH de extractos obtenidos de la FMS de vainas de cascalote.....	36
7	Análisis proximal de vainas de cascalote fermentadas por <i>A. niger</i> GH1 (CF) y sin fermentar (CSF).....	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig	Contenido	Pág.
1	Recolección de vainas de cascalote	13
2	Árbol de cascalote (Izquierda) y sus vainas.....	15
3	Vainas de cascalote verde (Izquierda) y maduras (Derecha).....	16
4	Clasificación de taninos.....	18
5	Microplacas que muestran el ensayo a) Fenoles hidrolizables, b) Fenoles Condensados, c) ABTS y d) DPPH.....	37
6	Diagrama de Pareto de los efectos estimados a partir del diseño BHH para FT.	38
7	Diagrama de Pareto de los efectos estimados a partir del diseño BHH para FH.	39
8	Diagrama de Pareto de los efectos estimados a partir del diseño BHH para FT.....	39
9	Diagrama de Pareto de los efectos estimados a partir del diseño BHH para ABTS.....	40
10	Diagrama de Pareto de los efectos estimados a partir del diseño BHH para DPPH.....	40

RESUMEN

El cascalote (*Caesalpinia coriria*) es una planta que crece en Centroamérica, Sudamérica, oeste de la India y las Antillas, su uso principal de las vainas es para el curtido de cueros por su alto contenido de fenoles. El objetivo de este proyecto fue desarrollar un proceso de fermentación en medio sólido para favorecer la extracción, recuperación y evaluación de compuestos fenólicos a partir de vainas de cascalote. Para ello, se realizó una caracterización fisicoquímica de la vaina, encontrando que es un material rico en fibra y carbohidratos (9.99 y 81.95 %, respectivamente). Se evaluaron tres cepas fúngicas (*Aspergillus niger* GH1, *Aspergillus niger* HT4 y *Aspergillus niger* awamori) y se determinó el tiempo de máxima liberación de compuestos fenólicos. Una vez seleccionada la mejor cepa y tiempo de cultivo, se evaluó el efecto de la humedad, temperatura, [inóculo], así como la concentración de sales en el medio (KH_2PO_4 , NaNO_3 , MgSO_4 , KCl) sobre la liberación de compuestos fenólicos. Los mejores resultados se obtuvieron al emplear el hongo *A. niger* GH1 a las 12 h de cultivo, con valores 71.56 mgEAG/gms y 20.50 mgEC/gms para fenoles hidrolizables (FH) y fenoles condensados (FC), respectivamente; así como la mayor actividad antioxidante frente a los radicales DPPH y ABTS (629.61 y 311.85 mgET/gms). A partir de la segunda fermentación, se seleccionó el tratamiento 6 ya que presentó los mejores valores de FH (71.55 mgEAG/gms), FT (80.67 mg/gms), ABTS (444.31 mgET/gms) y DPPH (475.13 mgET/gms), con las siguientes condiciones: [inóculo] 1×10^7 esp/gm, 40 °C, 60% de humedad, [KH_2PO_4] 1.52 g/L, [NaNO_3] 7.65 g/L y [MgSO_4] 1.52 g/L. El bioproceso desarrollado permitió obtener extractos ricos en compuestos fenólicos con capacidad antioxidante a partir de la vaina de cascalote, ofreciendo una alternativa para el aprovechamiento de este material poco utilizado.

Palabras clave: Cascalote, caracterización fisicoquímica, fermentación en medio sólido, actividad antioxidante, compuestos fenólicos.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

En las planicies costeras del pacifico de América Central es bien conocida una especie llamada comúnmente como “cascalote” (*Caesalpinia coriaria*) que puede formar rodales densos y puros, por lo cual se emplea para la obtención de vigas, postes, leña y carbón. Esta planta posee unas vainas, ricas en taninos, que son empleadas principalmente para procesos de curtido de pieles, elaboración de tintes y como forraje. Sin embargo, gran parte de esta vaina queda tirada en el campo, sin alternativas de uso (Cordero *et al.* 2003; Palma *et al.* 2018).

Se han reportado diversas propiedades biológicas asociadas a las vainas de cascalote, derivadas de su alto contenido de taninos, considerados de alto valor agregado (Anandhi *et al.* 2014; Sanchez-Carranza *et al.* 2017). Estos compuestos pueden ser extraídos empleando solventes orgánicos. Sin embargo, en la actualidad se buscan alternativas que sean amigables con el medio ambiente para la extracción de compuestos de alto valor agregado. Dentro de estas alternativas, surge la fermentación en medio sólido (FMS), debido a que permite el aprovechamiento de materiales vegetales (residuos agroindustriales o especies vegetales poco utilizadas), mismos que son abundantes y de bajo costo, requiere poco consumo de agua, reduce el uso de solventes y generalmente favorece los procesos de extracción de moléculas de interés, como los compuestos fenólicos (Cano y Postigo *et al.* 2021).

En el presente trabajo de investigación se desarrolló un bioproceso para la extracción de compuestos fenólicos con capacidad antioxidante a partir de las vainas de cascalote, evaluando diferentes aspectos del mismo, como es la cepa fúngica y diversas condiciones de proceso y formulación del medio de cultivo, ofreciendo alternativas de uso para esta especie vegetal poco explorada.

1.1. Justificación

La producción que ofrecen los árboles del cascalote es de 30 a 50 kg de vaina/árbol y también existen reportes de hasta 150 kg/árbol (Palma *et al.* 2018), lo que indica una fuerte producción de vainas de cascalote (Fig. 1) que comúnmente se utilizan en la curtiduría de cueros y pintura, siendo un material poco aprovechado. Es necesario aprovechar los compuestos orgánicos que nos ofrece, como lo son sus compuestos fenólicos con capacidad antioxidante, mediante el desarrollo de un bioproceso en el que se obtenga la mayor productividad, explorando las condiciones de operación y el microorganismo empleado. Con la FMS se evitará el uso de solventes ácidos o alcalinos que dañan al medio ambiente, ofreciendo una alternativa biotecnológica, donde los residuos generados incluso pueden ser incorporados en dieta para el ganado. Existe muy poca información reportada acerca de las propiedades fisicoquímicas del cascalote (carbohidratos, lípidos, proteínas, fibra, fenoles, etc.), y no existen reportes de su uso como sustrato en procesos de FMS.

Al aprovechar la vaina del cascalote se generará un impacto económico en la región debido a que se le daría una alternativa de uso a este material poco aprovechado y que es abundante. Con el desarrollo del bioproceso de bajo costo se podría obtener un beneficio económico ya que se producirían compuestos de alto valor agregado en el mercado por sus propiedades biológicas.



Figura 1. Recolección de vainas de cascalote. (Fuente: Vanguardia Totolapense A.C. 2019-2022).

1.2. Hipótesis

El desarrollo de un proceso de FMS permitirá la obtención de extractos ricos en compuestos fenólicos con capacidad antioxidante a partir de vainas de cascalote.

1.3. Objetivos

1.3.1. General

Desarrollar un proceso de fermentación en medio sólido para favorecer la extracción y recuperación de compuestos fenólicos a partir de vainas de cascalote (*Caesalpinia coriaria*).

1.3.2. Específicos

- Caracterizar fisicoquímicamente las vainas de cascalote (*Caesalpinia coriaria*).
- Evaluar el efecto de la cepa de microorganismo y el tiempo de fermentación sobre la extracción, recuperación de compuestos fenólicos y su capacidad antioxidante (DPPH y ABTS⁺).
- Determinar el efecto de los parámetros fisicoquímicos de fermentación sobre la extracción y recuperación de compuestos fenólicos a partir de vainas de cascalote y su capacidad antioxidante.

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Generalidades del cascalote

El cascalote (*Caesalpinia coriaria*) es un árbol nombrado así en honor al botánico italiano Andrea Cesalpino; y “coriaria”, epíteto latino que significa “como de cuero”. El cascalote (Fig. 2) también llamado divi-divi, es un árbol de tamaño pequeño 3 a 10 m de altura (Quezada *et al.* 2010). Produce vainas de 3 a 7 cm de longitud, con un color verde cuando no están maduras y café oscuro cuando lo están, su forma es curvada o enroscada en forma de S (Fig. 3) (Cordero *et al.* 2003; Palma *et al.* 2018).



Figura 2. Árbol de cascalote (Izquierda) y sus vainas (Fuente: Vanguardia Totolapense A.C. 2019-2022).

La clasificación taxonómica es la siguiente:

Reino: Plantae

Phylum o división: Tracheophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Fabales

Familia: Leguminosae

Género: *Caesalpinia*

Especie: *Caesalpinia coriaria*

Algunos estados de México donde lo podemos encontrar son Sinaloa, Nayarit, Jalisco, México, Colima, Michoacán, Guerrero, Oaxaca, Chiapas. Además de Centroamérica, Oeste de India, las Antillas y Sudamérica (Palma *et al.* 2018). Puede crecer en lugares de hasta 1,000 msnm. Se pueden observar con más frecuencia en los márgenes de ríos y en los bordes de áreas inundables de manglar (Cordero *et al.* 2004).



Figura 3. Vainas de cascalote verde (Izquierda) y maduras (Derecha). (Fuente: Vanguardia Totolapense A.C. 2019-2022).

El principal uso de la vaina de cascalote es para la curtidura de cueros de animales, debido a su alto contenido de taninos (Mora-Santacruz *et al.* 2018). Sin embargo, diversas propiedades han sido atribuidas a hojas, raíces, flores y frutos del mismo, asociadas principalmente a la presencia de taninos. Se ha descrito el efecto antineoplásicos y actividad antiproliferativa contra las células cancerosas (Sánchez-Carranza *et al.* 2017). El cascalote contiene flavonoides y glucósidos que influyen en la actividad antibacteriana (Anandhi *et al.* 2014), y debido a la presencia de ácido gálico se ha demostrado que ejerce una actividad ovicida contra nemátodos parásitos gastrointestinales del ganado (Olmedo-Juárez *et al.* 2019) y se puede usar para la elaboración de colorantes (Medina *et al.* 2015).

2.2. Taninos

2.2.1. Descripción

Los taninos son un tipo de compuestos fenólicos, considerados metabolitos secundarios de elevado peso molecular (500-30000 Da) presentes en todas las plantas, solubles en diferentes solventes como agua, alcohol y acetona. Son consumidos en muchos alimentos de origen vegetal, cuya cantidad, estructura química y actividad biológica está determinada por diversos factores, como la fuente (variedad y especie), características fisiológicas (madurez, estado de salud) y ambientales (radiación solar y disponibilidad de agua) (González-Gómez *et al.* 2006).

Si bien se consideran nutrientes no esenciales, son importantes debido a que se les atribuyen beneficios a la salud de quien los consume, debido principalmente a su actividad como antioxidantes (Vázquez-Flores *et al.* 2012).

2.2.2. Clasificación de taninos

De acuerdo a sus características estructurales, los taninos se clasifican en cuatro grupos: galotaninos, elagitaninos, taninos complejos y taninos condensados (Fig. 4) (Khanbabaee y van Ree, 2001).

3. Los galotaninos son todos aquellos taninos en los que las unidades de galoilo o sus derivados metadepsídicos se unen a diversas unidades de polioles, catequinas o triterpenoides.

4. Los elagitaninos son aquellos taninos en los que al menos dos unidades de galoilo están acopladas C – C entre sí, y no contienen una unidad de catequina unida glicosídicamente.
5. Los taninos complejos son taninos en los que una unidad de catequina se une glicosídicamente a un galotanino o una unidad de elagitanino.
6. Los taninos condensados son todos proantocianidinas oligoméricas y poliméricas formadas por la unión de C-4 de uno catequina con C-8 o C-6 de la siguiente catequina monomérica.

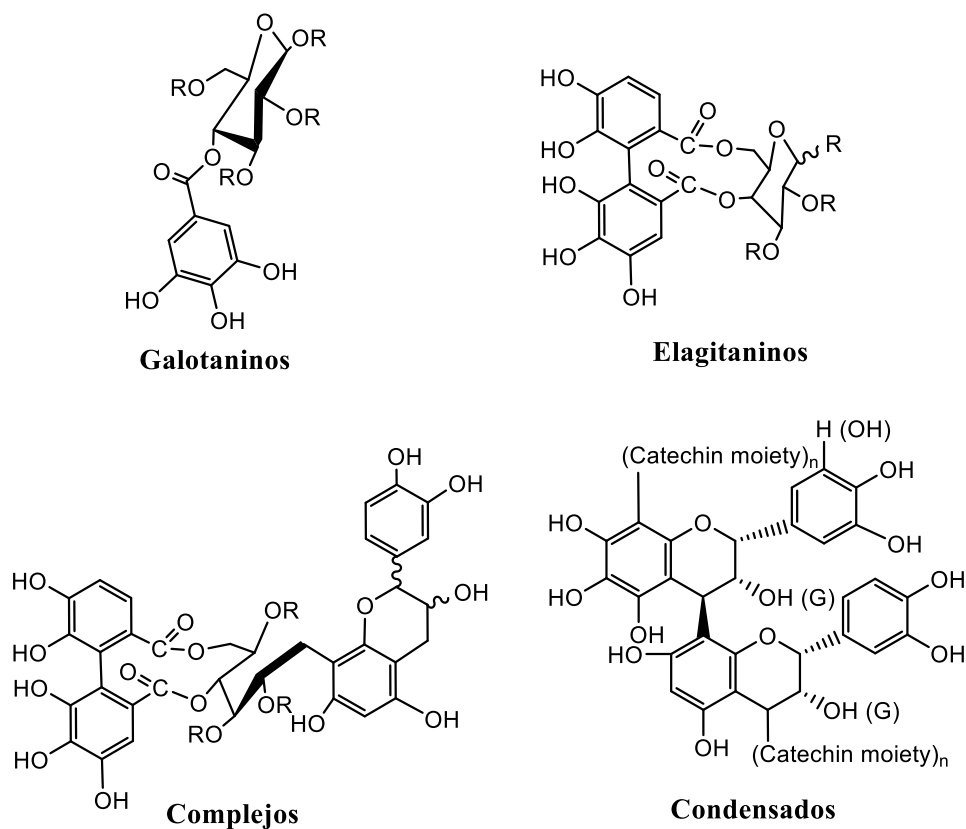


Figura 4. Clasificación de taninos (Khanbabaee y van Ree, 2001).

2.3. Fermentación en Medio Sólido

La fermentación en medio sólido (FMS) es un bioproceso que consiste en hacer crecer un microorganismo en un sustrato sólido utilizando una fuente de nitrógeno, sales mineralizadas, temperatura, pH, con ciertas condiciones de humedad (en ausencia o casi ausencia de agua libre) para la formación de productos en la superficie (Echavarría *et al.* 2003, Orzua *et al.* 2009.). Es un proceso rentable y con enorme potencial para favorecer la biodisponibilidad de compuestos presentes en materiales biológicos, como residuos agroindustriales (cáscaras, frutas, semillas) y plantas, debido a que, durante la fermentación, el microorganismo es capaz de sintetizar una amplia gama de enzimas que degradan la pared celular del material vegetal, facilitando la liberación y posterior extracción de los compuestos, evitando así el uso excesivo de solventes de extracción (Torres-León *et al.* 2021).

2.3.1. Microorganismos empleados

Uno de los factores más importantes en FMS es el tipo de microorganismo que se emplea, dentro de los que podemos encontrar están los hongos que son los que se adaptan mejor a este tipo de fermentación, debido a que las condiciones de crecimiento son similares a su hábitat natural. Asimismo, se pueden emplear levaduras y bacterias, pero estas requieren mayor contenido de humedad para crecer de forma adecuada, además que sus rendimientos generales son menores que los obtenidos al emplear hongos (Cano y Postigo *et al.* 2021).

2.3.2. Factores que influyen en la FMS

Debido a que la FMS implica un bajo contenido de agua, debemos de tener en cuenta varios parámetros que tienen influencia en la misma como lo es la humedad, temperatura, tipo de sustrato, aireación, pH entre otros, ya que el proceso es susceptible a pequeños cambios (Cano y Postigo *et al.* 2021).

2.3.3. Ventajas y desventajas

Entre las ventajas de la FMS podemos encontrar, fácil transporte de gases, un bajo consumo de agua, uso de fermentadores pequeños, bajo costo y bajo riesgo de contaminación (Machado de Castro *et al.* 2018; Srivastava *et al.* 2019).

Algunas de las desventajas que se pueden encontrar es que es más difícil de controlar diversos parámetros en comparación con el cultivo sumergido (pH, temperatura, humedad, transferencia de masa y energía), y limitante respecto al diseño del biorreactor y su instrumentación (Srivastava *et al.* 2019).

2.3.4. Aplicaciones de la FMS

El proceso de FMS se emplea para la transformación de moléculas complejas en otras más simples o de menor tamaño molecular, debido a la acción de enzimas microbianas. Estos cambios modifican las propiedades fisicoquímicas del producto, y mejoran la biodisponibilidad y calidad de los nutrientes presentes en el alimento. A partir de procesos de FMS es posible obtener biocombustibles, biosurfactantes, fertilizantes orgánicos, compuestos antioxidantes, enzimas, ácidos orgánicos, azúcares, proteínas unicelulares, pigmentos, entre otros productos (Torres-León *et al.* 2021). Cabe destacar el papel fundamental que juegan los procesos evolutivos y de adaptación de los microorganismos empleados en FMS, ya que esto ha permitido desarrollar un excelente mecanismo metabólico para extraer o transformar compuestos de alto valor agregado. Hasta el momento, no existen reportes acerca del uso de cascalote en procesos de FMS.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. ETAPA 1. Obtención y caracterización fisicoquímica del material vegetal.

El cascalote (*Caesalpinia coriaria*) fue recolectado en el municipio San Miguel Totolapan, Guerrero, México y trasladado al laboratorio de Biotecnología y Biología Molecular de la UAAAN para los análisis físico químicos. Los análisis de FMS se realizaron en laboratorio de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Unidad Delicias, Chihuahua. El cascalote fue sometido a un proceso de molienda y tamizado hasta obtener un tamaño de partícula de 1 mm². Este material fue empleado para determinar el punto crítico de humedad y el índice de absorción de agua. Otra fracción de cascalote de menor tamaño (<1 mm) se utilizó para los análisis fisicoquímicos.

3.1.1. Caracterización fisicoquímica del material vegetal

3.1.1.1. Índice de absorción de agua

El índice de absorción de agua (IAA) se determinó acorde a lo reportado por Buenrostro-Figueroa *et al.* (2014). Se colocaron 1.5 gramos de muestra en 15 mL de agua destilada en un tubo de centrifuga de 50 mL previamente tarado. La mezcla se agitó en vórtex por 1 min y se centrifugó (3000 rpm; 10 min; 25°C). Se descartó el sobrenadante, y el IAA se calculó a partir del peso del gel restante, y se expresó como g de gel/ g de peso seco.

3.1.1.2. Punto crítico de humedad

Para determinar el punto crítico de humedad (PCH) se pesó 1 g de muestra en una termobalanza (OHAUS/MB120) y se deshidrató a 120 °C durante 60 min. El PCH se calculó después de estimar la tasa de secado durante la cinética de deshidratación del material. Posteriormente, dichas velocidades se relacionaron con la cantidad de agua eliminada respecto al tiempo (Buenrostro-Figueroa *et al.* 2014).

3.1.1.3. Materia seca

Los materiales y equipos empleados fueron: una estufa a 50°C, crisol de porcelana, desecador, pinzas para crisol, espátula de acero inoxidable, mechero, balanza analítica. La muestra seca se colocó en una estufa, a 50 °C/24 h hasta peso constante. Se pasó a un desecador por 30 min y se pesó. Se pesó 1 g de muestra y se colocó dentro del crisol. Los análisis se realizaron por triplicado. El porcentaje de materia seca total se calculó con la siguiente ecuación:

$$\% \text{MST} = \frac{\text{Peso del crisol} + \text{Muestra seca} - \text{Peso de crisol vacío}}{\text{Gramos de muestra}} \times 100$$

% MST = % Materia Seca Total.

3.1.1.4. Humedad

El porcentaje de humedad se calculó con ayuda de una termobalanza OHAUS MB-90 de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{Humedad} = 100 - \% \text{Materia seca}$$

3.1.1.5. Proteína cruda

En la determinación de proteína (AOAC. 1990), se molió la muestra y se pesó 0.250 g, después se colocó en el matraz Kjeldahl y se agregó una cucharada de selenio y 6 perlas de vidrio. Posteriormente se adicionaron 25 mL de H₂SO₄ concentrado, se colocó el matraz en el digestor Kjeldahl. La mezcla se mantuvo en reacción hasta que se observó un cambio de color café oscuro a verde claro y se agregaron 30 mL de agua destilada. En un matraz Erlenmeyer de 250 mL se mezclaron 50 mL de H₃BO₃ ácido bórico y 3 gotas de indicador mixto y se colocó debajo del destilador Kjeldahl para recibir el producto de la destilación. Se adicionaron 110 mL de NaOH al 45% y una cucharada de Zn, se mezclaron y se conectó al aparato de destilación, calentando hasta obtener 200 a 250 mL. Se corrió el blanco H₂SO₄ en el lugar de la muestra, para emplearlo en el cálculo de los resultados, se procedió a titular ambas muestras, y el contenido se expresó en porcentaje de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% N = \frac{(mL \text{ de ácido})(N \text{ de ácido}) - (mL \text{ blanco})(N \text{ blanco}) * 0.014}{\text{gramos de muestra}} * 100$$

$$\% \text{ Proteína Cruda} = \%N X 6.25$$

3.1.1.6. Extracto etéreo (Grasa)

En esta técnica, se utiliza el hexano para extraer la grasa presente en la muestra y se reporta el porcentaje del peso después de eliminar el solvente (AOAC. 1990). Para ello, se pesaron 2 g de muestra molida en un papel filtro y se colocaron dentro de un dedal de asbesto. Se agregaron 200 mL de hexano en un matraz bola de fondo plano, previamente tarado. El dedal se colocó dentro de una unidad de extracción (sifón Soxhlet) y se conectó al extractor el matraz bola, y se calentó a ebullición durante 12 h. Pasado el tiempo de extracción, se retiró el dedal para recuperar el sobrenadante. Finalmente, se colocó el matraz en una estufa a 80°C durante 24 h para eliminar completamente el hexano. Después de ello, el matraz se retiró de la estufa para enfriarlo y registrar su peso. La fórmula para determinar el extracto libre de nitrógeno es la siguiente.

$$\% \text{ Extracto Etereo} = \frac{\text{peso del matraz con grasa} - \text{peso del matraz solo}}{\text{gramos de muestra}} * 100$$

3.1.1.7. Cenizas

Es el residuo obtenido de la incineración de la muestra hasta lograr una combustión completa de la materia orgánica, y después de obtener un peso constante. Para ello, se pesaron crisoles y se les colocó 1g de muestra, y se acondicionó calentando suavemente con un mechero hasta carbonizar. Posteriormente se colocaron los crisoles dentro de la mufla a 600°C durante 2 a 3 h. Finalmente, se retiraron de la mufla y se colocaron en un desecador por 30 min para enfriarlos, antes de registrar su peso. El contenido de cenizas se obtuvo mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de Cenizas} = \frac{\text{Peso de crisol con ceniza} - \text{peso del crisol solo}}{\text{gramos de muestra}} * 100$$

3.1.1.8. Fibra cruda

En la determinación de la fibra cruda (AOAC, 1990), se pesaron 2 g de muestra desengrasada, que se colocó en vasos de Berzelius y se agregaron 100 mL de ácido sulfúrico 0.255 N. Se colocó el vaso en el digestor Labconco hasta que comenzó a hervir, se dejó por 30 min, se filtró y se realizaron lavados con agua destilada caliente hasta quitar el ácido. Posteriormente, se transfirió el residuo a un vaso Berzelius, se agregaron 100 mL de NaOH al 0.313 N, se dejó hervir 30 min, se procedió a filtrar y lavar con agua destilada caliente hasta quitar el hidróxido. La muestra se colocó en un crisol para ponerlo en la estufa de secado por 12 h y se pesó. Como último paso se colocó el crisol en la mufla por 2 h y se pesó. El resultado se expresó en porcentaje empleando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Fibra} = \frac{\text{Peso de crisol} + \text{muestra seca} - \text{peso del crisol} + \text{cenizas}}{\text{gramos de muestra desengrasada}} * 100$$

3.1.1.9. Carbohidratos

El extracto libre de nitrógeno o carbohidratos se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Carbohidratos} = \% \text{ cenizas} + \% \text{ extracto etéreo} + \% \text{ proteína cruda} + \% \text{ fibra cruda} - 100$$

3.2. ETAPA 2. Evaluación del efecto de la cepa de microorganismo y el tiempo de fermentación sobre la extracción y recuperación de compuestos fenólicos y su capacidad antioxidante.

3.2.1. Microorganismos

Se emplearon tres cepas fúngicas (*Aspergillus awamori*, *Aspergillus niger* HT4 y *Aspergillus niger* GH1), que pertenecen a la colección de cultivos del DIA-FCQ-UAdeC. Las cepas fúngicas fueron mantenidas en criopreservación a -20 °C en glicerol-leche descremada. Las esporas se reactivaron en agar papa dextrosa (PDA-Bioxon®) e

incubadas a 30°C durante 5 días. Se conservaron a 4°C, y se inocularon en matraces Erlenmeyer (250 mL) con 30 mL de PDA y se incubaron a 30°C durante 5 días. Las esporas fueron colectadas con una solución estéril de Tween-80 al 0.01 % (v/v) y contadas en una cámara de Neubauer.

3.2.2. Fermentación en medio sólido (FMS)

El proceso de FMS se realizó empleando el medio mineral Czapek-Dox, además, el cascalote como soporte y fuente de nutrientes. La composición del medio fue (g/L): 1.52 KCl, 1.52 MgSO₄, 7.65 NaNO₃, 3.04 K₂HPO₄. Se preparó una mezcla 50:50 de cascalote-vermiculita, y se impregnó con el medio previamente inoculado (1x10⁶ esp/g) de cada hongo, hasta alcanzar una humedad inicial de 50%. Se colocaron 6 g de la mezcla húmeda en reactores de columna (31.5mm x 180 mm). La fermentación se llevó a cabo a 30°C durante 72 h, tomando muestra cada 12 h. Los extractos fermentados fueron obtenidos por adición de 12 mL de alcohol al 50 %, seguido de agitación y un prensado manual. Los extractos obtenidos fueron filtrados a través de algodón y papel filtro (Whatman #1), almacenados en viales de 2 mL y congelados (-18°C) hasta su uso para la determinación de fenoles hidrolizables, fenoles condensados y capacidad antioxidante (DPPH y ABTS).

3.2.3. Análisis químico

3.2.3.1. Fenoles Hidrolizables

El extracto se mezcló con 20 µL de carbonato de sodio, 20 µL del reactivo Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich®, México), 125 µL de agua destilada y se registró la absorbancia a 790 nm en un lector de microplacas (Multiskan GO, Thermo Scientific) (Wong-Paz *et al.* 2015). El ensayo se hizo por triplicado y los resultados se expresaron como mg de equivalentes de ácido gálico por mg de cascalote (mgEAG/mg) empleando una curva de calibración con ácido gálico a 0.2 a 1 mg/mL ($y = 2.8717x + 0.0051$; $R^2 = 0.9907$).

3.2.3.2. Fenoles Condensados

Los fenoles condensados (FC) presentes en los extractos se determinaron empleando el reactivo HCl:Butanol (1:9) (Swan y Hillis, 1959). Para ello, se colocaron 250 µL de

muestra en un tubo de ensaye, y se mezclaron con 1500 μL de HCl-Butanol. Se añadieron 50 μL de reactivo férrico (Fe 55.845g/mol; O 63.997g/mol; S;32.065g/mol). Los tubos se taparon y se llevaron a ebullición durante 40 min. Después de este tiempo, las muestras se atemperaron a 25°C. Finalmente, se colocaron 200 μL de cada muestra en los pozos de la microplaca, y se registró su absorbancia a 460 nm en un lector de microplacas (Multiskan GO, Thermo Scientific). El ensayo se hizo por triplicado y los resultados se expresaron como mg de equivalentes de catequina por mg de cascalote (mgEC/mg) empleando una curva de calibración con catequina a 0.2 a 1 mg/mL ($y=0.6491x-0.0097$; $R^2=0.9895$).

3.2.3.3. Fenoles Totales

El contenido de fenoles totales (FT) se obtuvo de la suma del contenido de fenoles condensados e hidrolizables.

3.2.3.3. Capacidad antioxidante

3.2.3.3.1. DPPH

Para determinar la capacidad de eliminación de radicales libres de la muestra empleada, se siguió la metodología reportada por Meléndez *et al.* (2014) empleando una solución de radical DPPH^{*} (2,2-difenil-1-picrilhidracilo, Sigma-Aldrich®, México) a 60 μM (2.365 mg en 100 mL de etanol absoluto). Para el ensayo se mezclaron 7 μL de muestra (extracto de cascalote) con 193 μL de solución DPPH. Se preparó un control (DPPH-Etanol) y un blanco (Etanol). La mezcla se dejó reaccionar en la oscuridad por 30 min y se registró la absorbancia a 517 nm en un lector de microplacas (Multiskan GO, Thermo Scientific). El ensayo se hizo por triplicado y los resultados se expresaron como mg de equivalentes Trólox por mg de cascalote (mgET/mg) empleando una curva de calibración con Trólox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-carboxílico; Sigma-Aldrich®, México) a 0.2 a 1 mg/mL ($1.9762x-0.0154$; $R^2=0.983$).

3.2.3.3.2. ABTS

El ensayo ABTS se basa en cuantificar la decoloración del radical ABTS⁺, ABTS⁺ inducida por la reducción a ABTS en presencia de antioxidantes (Re *et al.* 1999). El radical

cación se genera mediante la oxidación del ABTS (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico) con persulfato de potasio, dando lugar a un cromóforo verde que absorbe a 734 nm. Por lo tanto, el grado de decoloración del radical $ABTS^+$ es proporcional a la concentración de antioxidantes en la muestra. Se generó el radical catión $ABTS^+$ al mezclar una solución de ABTS 7 μ M (0.3602 g en 100 mL agua) con persulfato de potasio (2.45 μ M, 0.0662 g en 100 mL agua). Esta mezcla se dejó reaccionar durante 12-16 h a temperatura ambiente y en oscuridad. La solución catión ABTS se diluyó con etanol hasta ajustar la absorbancia a 0.7 ± 0.02 nm. Para el ensayo, se colocan en 10 mL de muestra y 190 de la solución de $ABTS^{++}$; después de 1 min de reacción en reposo, se registró la absorbancia a 734 nm en un lector de microplacas (Multiskan GO, Thermo Scientific). Se empleó un control ($ABTS^+$) y un blanco (etanol). El ensayo se hizo por triplicado y los resultados se expresaron como mg de equivalentes Trólox por mg de cascalote (mgET/mg) empleando una curva de calibración con Trólox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-carboxílico; Sigma-Aldrich®, México) a 0.2 a 1 mg/mL ($y=2.3531x+0.0147$; $R^2=0.9735$).

3.2.3.4. Análisis de resultados

Se utilizó un Diseño Completamente al Azar con arreglo factorial 3x7 para evaluar el efecto de la cepa empleada sobre el contenido de fenoles totales (condensados e hidrolizables) y la capacidad antioxidante de los extractos fermentados de cascalote. Los factores fueron A: la cepa fúngica tres niveles (1. *Aspergillus niger* GH1, 2. *A. awamori* y 3. *A. niger* HT4) y B: tiempo con siete niveles (0, 12, 24, 36, 48, 60 y 72 h). Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, empleando el software SAS 9.0. Se estableció una $p < 0.05$ como valor crítico para determinar diferencias entre tratamientos. En caso necesario, se realizó una prueba de comparación de medias usando el procedimiento de rangos de Tukey ($P < 0.05$).

3.3. ETAPA 3. Determinación del efecto de los parámetros fisicoquímicos de fermentación sobre la extracción y recuperación de compuestos fenólicos a partir de vainas de cascalote y su capacidad antioxidante.

3.3.1. Microorganismo

Se empleó el hongo *A. niger* GH1, que pertenece a la colección de cultivos del DIA-FCQ-UAdC. La cepa fúngica se mantuvo en crioconservación a -20°C en glicerol-leche descremada. Las esporas se reactivaron en agar papa dextrosa (PDA-Bioxon®) y se incubaron a 30°C durante 5 días. Se conservaron a 4°C, y se inocularon en matraces Erlenmeyer (250 mL) con 30 mL de PDA y se incubaron a 30°C durante 5 días. Las esporas fueron colectadas con una solución estéril de Tween-80 al 0.01 % (v/v) y contadas en una cámara de Neubauer.

3.3.2. Fermentación en medio sólido (FMS)

Una vez seleccionada la mejor cepa fúngica y el tiempo de máxima liberación de compuestos fenólicos y su actividad antioxidante, se realizó otra fermentación para evaluar el efecto de la concentración de inóculo, temperatura, humedad y concentración de sales (KH_2PO_4 , NaNO_3 , MgSO_4 y KCl) en el medio Czapek-Dox, de acuerdo al Cuadro 1. El proceso de FMS se llevó a cabo en reactores de columna (31.5mm x 180 mm) empleando la vaina de cascalote mezclada con vermiculita (50:50 p/p) y el hongo *A. niger* GH1. Las determinaciones analíticas de polifenoles totales (hidrolizables + condensados) y la capacidad antioxidante (DPPH, ABTS) se realizaron a cada extracto recuperado después de 12 h de fermentación, tal como se reportó en la sección 3.2.2 y 3.2.3. Asimismo, muestras de cascalote fermentado se sometieron a un análisis proximal (Sección 3.1.1) para determinar el efecto de la fermentación sobre la composición fisicoquímica del cascalote.

Cuadro 1. Matriz experimental Box-Hunter & Hunter (BHH) 2^k con tres puntos centrales.

TRATAMIENTO	A	B	C	D	E	F	G
1	-1	-1	-1	1	1	1	-1
2	1	-1	-1	-1	-1	1	1
3	-1	1	-1	-1	1	-1	1
4	1	1	-1	1	-1	-1	-1
5	-1	-1	1	1	-1	-1	1
6	1	-1	1	-1	1	-1	-1
7	-1	1	1	-1	-1	1	-1
8	1	1	1	1	1	1	1
9	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0

Código	Factor	Nivel bajo (-1)	Nivel intermedio (0)	Nivel alto (1)
A	Inóculo (esp/gms)	1×10^6	5.5×10^6	1×10^7
B	Temperatura (°C)	30	35	40
C	Humedad (%)	50	55	60
D	KH_2PO_4	1.52	2.28	3.04
E	NaNO_3 (g L^{-1}) KH_2	3.04	4.56	7.65
F	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (g L^{-1})	1.52	2.28	3.04
G	KCl (g L^{-1})	1.52	2.28	3.04

3.3.3. Caracterización fisicoquímica de cascalote fermentado

Para determinar el efecto de la FMS sobre el contenido nutrimental de la vaina de cascalote, se procedió a determinar el contenido de humedad, cenizas, grasa, fibra cruda, proteína y carbohidratos, tal como se describe en la sección 3.1.1.

3.3.4. Análisis de resultados

Se planteó un diseño factorial 2^k Box-Hunter & Hunter con tres puntos centrales (Cuadro 1) empleando el software Statistica 7.0 (Stat Soft, TULSA, OK, USA) para evaluar el efecto de la concentración de inóculo, temperatura, humedad y concentración de sales (KH_2PO_4 , NaNO_3 , MgSO_4 y KCl) sobre el contenido de polifenoles totales (hidrolizables + condensados) y la capacidad antioxidante (DPPH y ABTS) de los extractos fermentados de vaina de cascalote. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y se expresaron como el promedio ($n=3$) \pm su desviación estándar. Los datos obtenidos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) y la diferencia entre tratamientos se evaluó bajo el procedimiento de rangos de Tukey. Los valores de $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. ETAPA 1. Obtención y caracterización fisicoquímica de las vainas de cascalote (*Caesalpinia coriaria*).

Se realizó una caracterización fisicoquímica de las vainas de cascalote los cuales se observan en el cuadro 2. Los resultados que se obtuvieron fueron similares a los reportados por Mora-Santacruz *et al.* (2018) y Palma *et al.* (2018) para materia seca, carbohidratos, humedad y extracto etéreo, para los parámetros de fibra cruda y proteína cruda se encontraron pequeñas diferencias. Lo anterior evidencia que la vaina de cascalote es un material rico en carbohidratos y fibra.

Cuadro 2. Caracterización físico-química del cascalote (*Caesalpinia coriaria*).

Parámetros (%)	Valor	Otros autores
Materia Seca	96.63 ± 0.39	93.5 - 97
Humedad	3.36 ± 0.39	3
Proteína Cruda	2.94 ± 0.24	3.85 - 5.34
Ceniza	5.13 ± 0.76	1.87 - 2.58
Materia Orgánica	91.49 ± 0.52	---
Extracto Etéreo	0.65 ± 0.09	0.19 – 6.38
Fibra Cruda	9.99 ± 1.49	0.92 - 3.35
Carbohidratos	81.95 ± 2.71	71.62 - 88.82
PCH	3.77 ± 0.29	---
IAA g gel/ g muestra	2.97 ± 0.07	---

Los resultados representan la media ± la desviación estándar de 3 repeticiones. IAA: índice de absorción de agua; PCH: punto crítico de humedad.

4.1.1. Índice de absorción de agua

El IAA nos indica la capacidad del soporte para absorber agua (de la rosa *et al.* 2020). Los materiales con un alto índice de IAA son los que mejor se adaptan a las FMS debido a que la humedad se puede modificar para las necesidades del proceso (Buenrostro-Figueroa *et al.* 2017). En el caso del cascalote se obtuvieron 2.97 ± 0.07 g gel/ g muestra lo que indica que es apto para la FMS.

4.1.2. Punto crítico de humedad

El PCH representa la cantidad de agua ligada a el soporte y que por lo tanto no se puede utilizar por el organismo para realizar sus funciones metabólicas. Si el valor de PCH es alto afecta el desarrollo del microorganismo en la FMS. El cascalote mostró un porcentaje de 3.77 ± 0.29 %.

4.2. ETAPA 2. Efecto de la cepa fúngica y el tiempo de fermentación sobre la extracción y recuperación de compuestos fenólicos y su capacidad antioxidante.

En esta etapa se evaluaron tres cepas fúngicas (*A. awamori*, *A. niger* HT4 y *A. niger* GH1) y su efecto en la liberación de compuestos fenólicos por FMS a partir de las vainas de cascalote. En el cuadro 3 se muestra el efecto del tiempo de cultivo sobre la liberación de fenoles y actividad antioxidante. La mayor liberación de fenoles hidrolizables (FH) se observó a las 12 h (71.56 mgEAG/gms) con un aumento de 6.53 veces con respecto al cascalote sin fermentar (tiempo 0 h). En el caso de los fenoles condensados (FC), se presentó un consumo de los mismos a las 12 h y posteriormente ocurre una liberación debido a la actividad metabólica del microorganismo, que genera enzimas que favorecen la extracción de los compuestos presentes en la pared celular. En el caso de los fenoles totales (FT) se observó a las 12 h un aumento de 1.62 veces respecto al control sin fermentar. A este mismo tiempo, se observaron incrementos de hasta 1.2 y 1.73 veces la actividad antioxidante en los extractos fermentados frente al radical ABTS y DPPH, respectivamente. Por lo anterior, se seleccionó el tiempo de 12 h y se utilizó para la fermentación donde se evaluaron los parámetros fisicoquímicos con el fin de maximizar la liberación de actividad antioxidante y fenoles.

Cuadro 3. Efecto del tiempo de cultivo sobre el contenido de fenoles hidrolizables (FH), condensados (FC) y totales (FT) y la capacidad antioxidante frente a los radicales ABTS y DPPH de extractos obtenidos de la FMS de vainas de cascalote.

Tiempo (h)	FC (mgEC/gms)	FH (mgEAG/gms)	FT (mg/gms)	ABTS (mgET/gms)	DPPH (mgET/gms)
0	45.76a	10.97d	56.74bc	258.12b	363.93b
12	20.51 ± 6.20cd	71.76 ± 12.99a	92.26 ± 19.12a	311.85 ± 5.71a	629.61 ± 100.49a
24	11.91 ± 4.50d	34.19 ± 3.22b	46.11 ± 8.40c	227.64 ± 11.13b	246.13 ± 21.76c
36	26.03 ± 10.50bc	31.19 ± 8.22bc	57.23 ± 2.29bc	227.68 ± 50.63b	241.94 ± 22.96c
48	36.56 ± 16.03ab	28.79 ± 1.69bc	67.68 ± 17.19b	151.36 ± 28.53c	227.69 ± 35.99c
60	32.10 ± 15.98b	24.28 ± 1.61bc	60.89 ± 15.67bc	148.63 ± 8.92c	218.14 ± 29.91c
72	30.65 ± 11.32bc	10.97 ± 6.08c	54.93 ± 14.11bc	185.25 ± 44.04c	201.91 ± 35.65c

Los resultados representan la media global de los 3 hongos evaluados (*A. niger* HT4, *A. niger* GH1 y *A. niger* *awamori*), incluyendo 3 repeticiones de cada uno (N=9). Letras diferentes entre columnas indican diferencia significativa (Tukey, p<0.05).

En el cuadro 4 se observa el efecto de los hongos (*A. niger* HT4, *A. niger* GH1 y *A. niger awamori*) sobre el contenido de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante de extractos de vaina de cascalote. Se puede observar que el hongo *A. niger* GH1 tiene una mayor liberación de FC (34.819 mgEC/gms), FT (67.315 mg/gms) y DPPH (323.34 mgET/gms). En el caso de *A. niger* awamori tiene una liberación mayor de FH (36.341 mgEAG/gms) y ABTS (228.826 mgET /gms). Aunque *A. niger* HT4 si presentó una liberación de fenoles y actividad antioxidante no presentó la mejor en ningún parámetro. Dado los resultados anteriores se determinó que *A. niger* GH1 es la mejor cepa para la FMS con cascalote ya que tiene mayor influencia en la liberación de fenoles y en actividad antioxidante a excepción de ABTS.

Cuadro 4. Efecto del hongo de cultivo sobre el contenido de fenoles hidrolizables (FH), condensados (FC) y totales (FT) y la capacidad antioxidante frente a los radicales ABTS y DPPH de extractos obtenidos de la FMS de vainas de cascalote.

Parámetro/Cepa	<i>A. niger</i> GH1	<i>A. niger</i> awamori	<i>A. niger</i> HT4
FC (mgEC/gms)	34.82±14.79a	22.37±10.77b	30.04±14.29a
FH (mgEAG/gms)	32.49±22.67ab	36.34±20.63a	30.72±13.52b
FT (mg/gms)	67.31±22.12a	58.71±19.70b	60.76±10.89ab
ABTS (mgET/gms)	206.99±71.17b	228.83±55.42a	211.55±62.06ab
DPPH (mgET/gms)	323.34±196.98a	301.76±127.24ab	287.49±138.97b

Los resultados representan la media de tres repeticiones. Letras diferentes entre columnas indican diferencia significativa entre las cepas evaluadas (Tukey, $p < 0.05$).

En el cuadro 5 se muestran los coeficientes de correlación de Pearson, que nos indica la relación que existe entre las variables de respuesta. Se observó que FH mostró una correlación negativa con FC, es decir, si el valor de FH aumenta, el contenido de FC disminuye. En el caso contrario como se observa en FH que tiene una correlación positiva con FT, DPPH y ABTS, si FH aumenta su liberación, para FT, DPPH y ABTS, también aumentará. El parámetro de FC tiene una correlación positiva con FT, y con los parámetros de DPPH y ABTS tiene una correlación negativa. FT tiene una correlación positiva con DPPH. Por último, se observa que DPPH tiene una correlación positiva con ABTS.

Cuadro 5. Coeficientes de correlación de Pearson.

	FH	FC	FT	DPPH	ABTS
FH	1	-0.41721 *	0.71377 **	0.72067 **	0.48928 **
FC		1	0.33872*	-0.09729*	-0.26357*
FT			1	0.67113**	0.30343 *
DPPH				1	0.76318 **
ABTS					1

*Significativo (≤ 0.05); **Altamente significativo (≤ 0.0001).

4.3. ETAPA 3. Efecto de los parámetros fisicoquímicos de fermentación sobre la extracción y recuperación de compuestos fenólicos a partir de vainas de cascalote y su capacidad antioxidante.

El efecto de los factores en la liberación de fenoles y actividad antioxidante por *A. niger* GH1 se muestra en el cuadro 6. Para FC la máxima liberación se observa en el tratamiento 7 (9.19 ± 0.56 mgEC/gms) sin diferencia con el tratamiento 6, 3 y 9. Por otra parte, la menor liberación se observó en el tratamiento 8 (5.41 ± 0.58 mgEC/gms). Para FH, la máxima liberación se observó en el tratamiento 6 (71.55 ± 3.82 mgEAG/gms) sin diferencia con el tratamiento 7; con el menor valor en el tratamiento 2 (40.11 ± 2.17 mgEAG/gms). En FT, la máxima liberación se observó en el tratamiento 6 (80.67 ± 3.88 mg/gms) y 7, sin diferencia entre ellos; y la menor en el tratamiento 2 (44.68 ± 1.98 mg/gms). Al evaluar la capacidad antioxidante, los mejores valores frente al radical ABTS se observaron en los tratamientos 6 (444.31 ± 17.80 mgET/gms), 7 y 9, sin diferencia entre ellos, y el menor valor en el tratamiento 2 (247.90 ± 20.91 mgET/gms). La mayor actividad frente al radical DPPH se obtuvo en el tratamiento 6 (475.13 ± 46.81 mgET/gms), sin diferencia con el tratamiento 7 y 9; y la menor en el tratamiento 2 (226.25 mgET/gms).

Cuadro 6. Efecto del tratamiento sobre el contenido de fenoles hidrolizables (FH), condensados (FC) y totales (FT) y la capacidad antioxidante frente a los radicales ABTS y DPPH de extractos obtenidos de la FMS de vainas de cascalote.

Tratamiento	FC (mgEC/gms)	FH (mgEAG/gms)	FT (mg/gms)	ABTS (mgET/gms)	DPPH (mgET/gms)
1	5.42 ± 0.97ed	47.86 ± 1.79ef	53.28 ± 2.59e	271.46 ± 17.43fe	243.99 ± 37.74fg
2	4.57 ± 0.37e	40.11 ± 2.17g	44.68 ± 1.98f	247.90 ± 20.91f	226.25 ± 16.22f
3	8.17 ± 0.38ab	59.01 ± 3.30b	67.19 ± 2.65b	391.38 ± 35.72c	375.92 ± 21.28c
4	6.21 ± 0.15cd	48.44 ± 0.35def	54.65 ± 0.32de	315.55 ± 34.97de	297.58 ± 8.24de
5	7.42 ± 0.46bc	55.45 ± 0.73bc	62.87 ± 0.29bc	384.55 ± 17.62c	335.96 ± 17.19c
6	9.12 ± 0.46a	71.55 ± 3.82a	80.67 ± 3.88a	444.31 ± 17.80a	475.13 ± 46.81a
7	9.19 ± 0.56a	68.30 ± 4.49a	77.48 ± 2.47a	438.81 ± 23.27a	445.98 ± 30.08a
8	5.41 ± 0.58ed	44.79 ± 1.22gf	50.20 ± 0.50fe	337.56 ± 30.13d	329.10 ± 16.68d
9	8.08 ± 0.26ab	53.77 ± 2.21dbc	61.85 ± 0.30bc	429.71 ± 25.86ab	472.41 ± 25.51ab
10	7.33 ± 0.40bc	52.46 ± 1.79dec	59.79 ± 0.87dc	394.61 ± 40.23cb	393.14 ± 28.02cb
11	6.92 ± 0.61bc	53.19 ± 2.06dec	60.12 ± 0.59dc	374.41 ± 14.09c	429.34 ± 15.27c

Los resultados representan la media ± la desviación estándar de 3 repeticiones. Letras diferentes entre columnas indican diferencia significativa (Tukey, p<0.05).

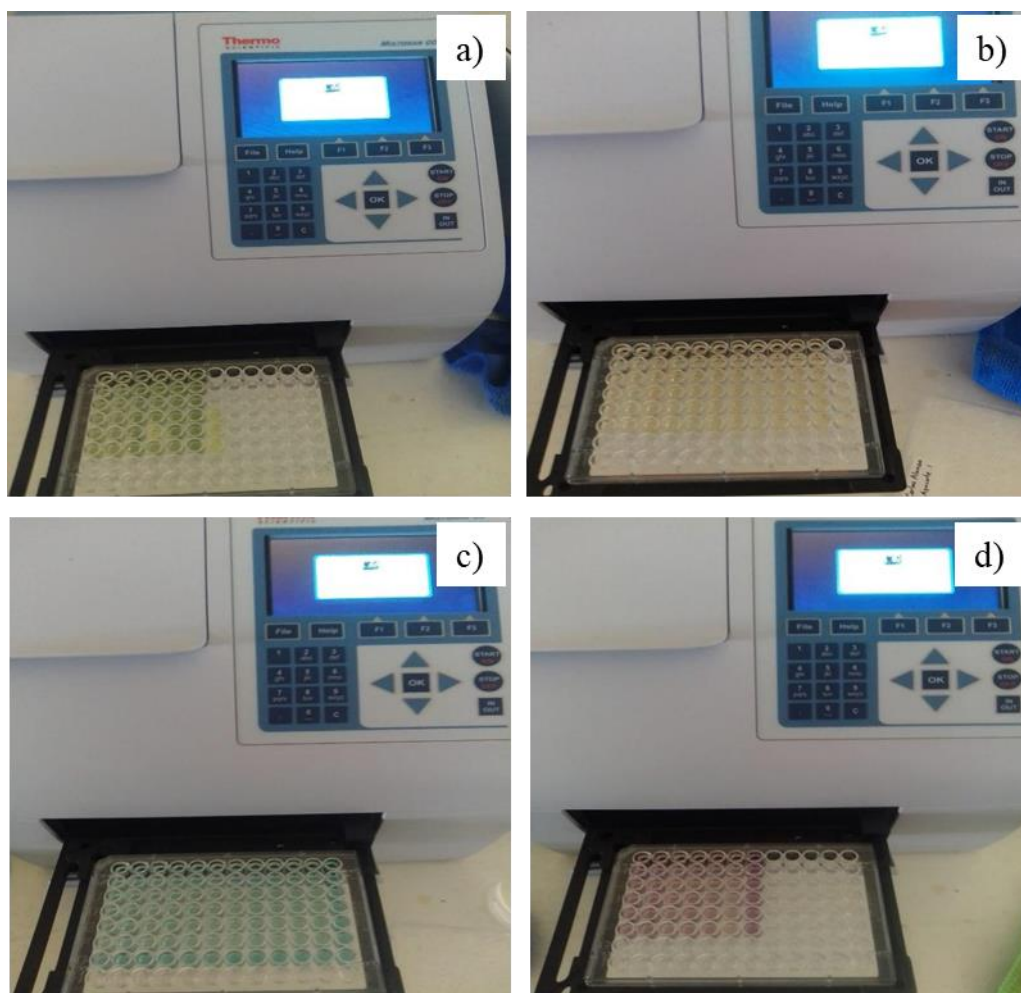


Figura 5. Microplacas que muestran el ensayo a) Fenoles hidrolizables, b) Fenoles Condensados, c) ABTS y d) DPPH.

El diagrama de Pareto (Fig. 6-10) nos ayuda a determinar la influencia de los factores evaluados en el proceso de FMS de vainas de cascalote para la recuperación de compuestos fenólicos con actividad antioxidante, donde se observa que todos aquellos factores graficados por encima de la línea ejercen un efecto sobre la liberación ($p < 0.05$). En las gráficas de FC (Fig. 6), FH (Fig. 7), FT (Fig. 8), ABTS (Fig. 9) y DPPH (Fig. 10) el factor de la humedad es el que muestra una mayor influencia de manera positiva, es decir, entre más aumente el porcentaje de humedad mayor será la liberación, el factor que le sigue en el nivel de importancia es el KH_2PO_4 de manera negativa es decir entre menos concentración se tenga, más producción habrá. Entre los factores que tienen menos influencia es la curvatura (puntos centrales de la fermentación) en FCON, NaNO_3 en FH y DPPH, temperatura en FT y ABTS.

Los factores que no influyen son NaNO_3 en FC y ABTS, temperatura en FH, curvatura en FH y FT e inóculo en DPPH. Dado los resultados obtenidos se observó que tiene un comportamiento similar a la matriz utilizada en el tratamiento 6 a excepción de dos factores (inóculo y temperatura) que son los factores menos importantes o que no influyen, por lo tanto, se seleccionó el tratamiento 6 como el mejor tratamiento.

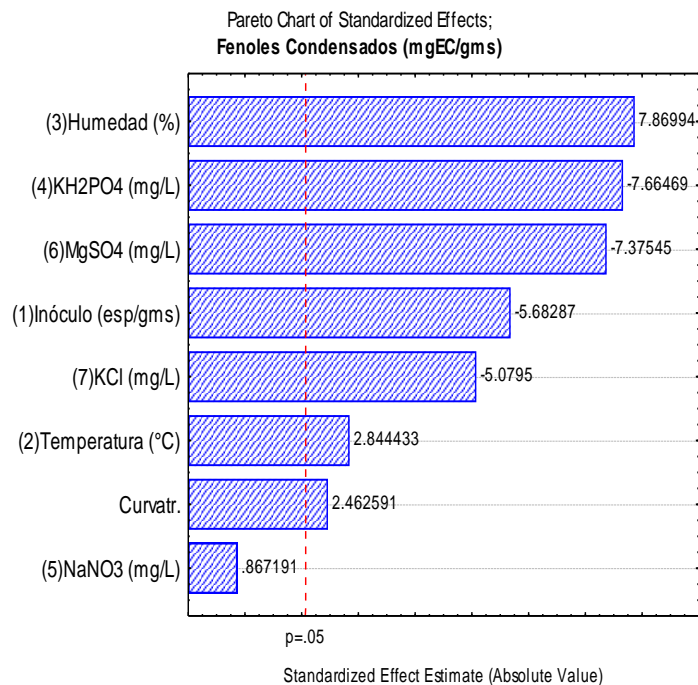


Figura 6. Diagrama de Pareto de los efectos estimados a partir del diseño BHH para FC.

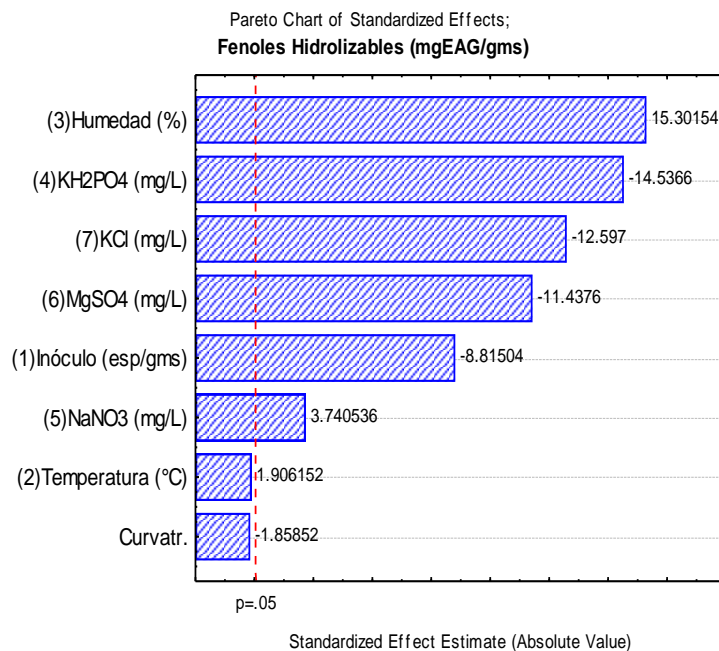


Figura 7. Diagrama de Pareto de los efectos estimados a partir del diseño BHH para FH.

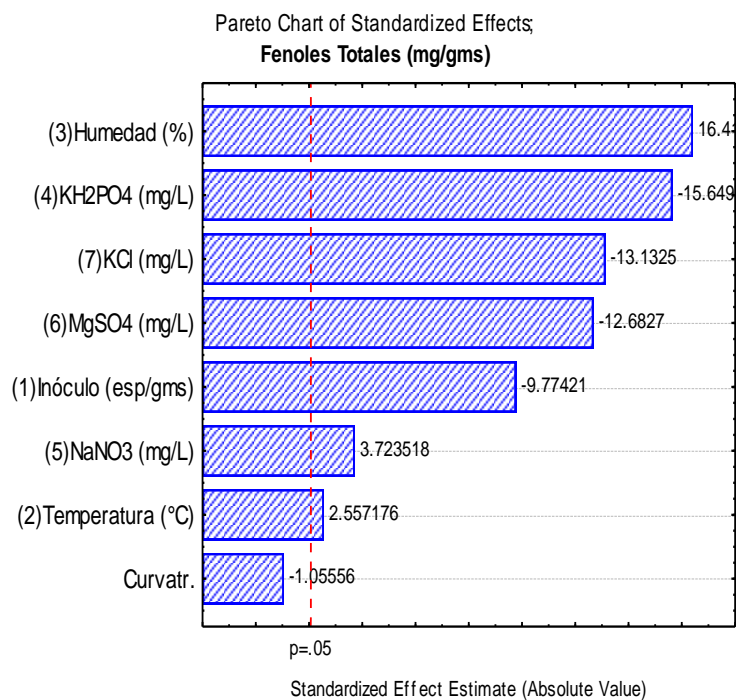


Figura 8. Diagrama de Pareto de los efectos estimados a partir del diseño BHH para FT.

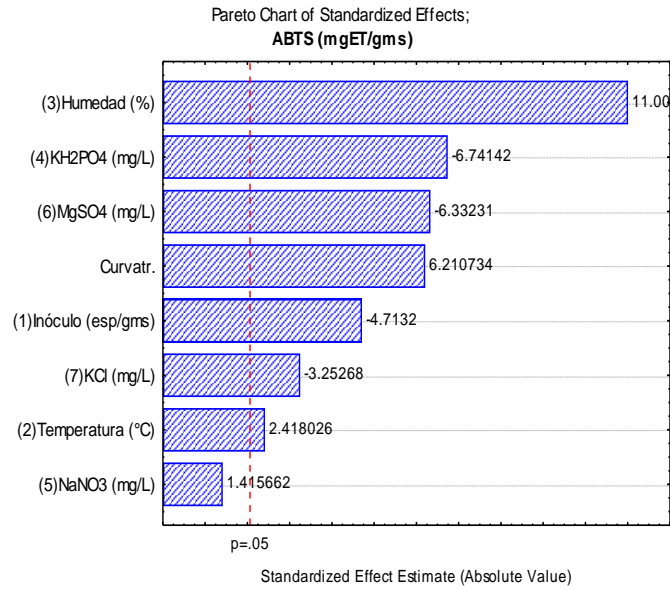


Figura 9. Diagrama de Pareto de los efectos estimados a partir del diseño BHH para ABTS.

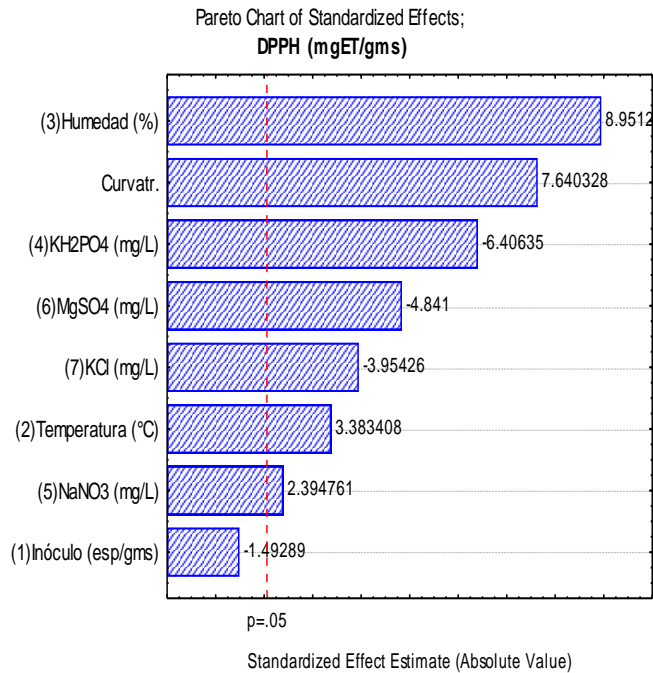


Figura 10. Diagrama de Pareto de los efectos estimados a partir del diseño BHH para DPPH.

4.3.1. Efecto de la FMS sobre la composición fisicoquímica de cascalote fermentado

En el cuadro 7 se muestran los resultados de la caracterización fisicoquímica del cascalote fermentado (CF) (tratamiento 6) y el control sin fermentar (CSF). De acuerdo al análisis de resultados, no se observaron diferencias significativas en cuanto al contenido de materia seca, humedad y extracto etéreo. Sin embargo, el contenido de proteína cruda fue mayor CF ($4.83 \pm 0.027 \%$), en cenizas el mayor es CF ($50.38 \pm 1.18 \%$), en materia orgánica es CSF ($91.05 \pm 0.52 \%$), en fibra cruda el mayor es CSF ($9.99 \pm 0.06\%$) y en carbohidratos el mayor es CSF ($81.95 \pm 3.69 \%$) lo cual era de esperarse debido a que los carbohidratos son empleados como fuente de carbono para el crecimiento del microorganismo. Como se puede observar el contenido de carbohidratos y la fibra disminuyen, esto pasa debido a que el hongo produce enzimas que hidrolizan los sustratos poliméricos como son los polisacáridos (Cano y Postigo *et al.* 2021), en proteína se observa un incremento por efecto de la FMS, debido a la biomasa microbiana presente en la muestra fermentada y en el caso de cenizas se sabe que representan los elementos minerales presentes (Lafont *et al.* 2013), se observó que tuvo diferencia significativa en el cascalote fermentado debido a que está mezclado con vermiculita la cual contiene silicatos. Dados los resultados, la fermentación no permitió la mejora en la disposición de materia seca, humedad, materia orgánica, fibra cruda y carbohidratos. Por otro lado, con el CF (tratamiento 6) es posible incrementar los valores de FH (6.5 veces), FT (1.43 veces), ABTS (1.72 veces) y DPPH (1.30 veces) respecto al control sin fermentar. En el caso de los FC, no se observó un incremento por efecto de la FMS.

Cuadro 7. Análisis físico-químico de vainas de cascalote fermentadas por *A. niger* GH1 (CF) y sin fermentar (CSF).

Parámetros (%)	Valor CSF	Valor CF
Materia seca (%)	96.63 ± 0.39a	96.80 ± 0.57a
Humedad (%)	3.36 ± 0.39a	3.19 ± 0.57a
Proteína cruda (%)	2.94 ± 0.24b	4.83 ± 0.02a
Ceniza (%)	5.13 ± 0.03b	50.38 ± 1.18a
Materia orgánica (%)	91.49 ± 0.36a	46.42 ± 1.75b
Extracto etéreo (%)	0.65 ± 0.01a	0.84 ± 0.09a
Fibra cruda (%)	9.99 ± 0.06a	1.77 ± 0.12b
Carbohidratos (%)	81.95 ± 3.69a	45.45 ± 3.41b
FH (mgEAG/gms)	10.97	71.55 ± 3.82
FC (mgEC/gms)	45.76	9.12 ± 0.46
FT (mg/gms)	56.74	80.67 ± 3.88
ABTS (mgET/gms)	258.12	444.31 ± 17.80
DPPH (mgET/gms)	363.93	475.13 ± 46.81

Los resultados representan la media de 3 repeticiones. Letras diferentes indican diferencia significativa entre tratamientos (Tukey, $p < 0.05$).

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

Las vainas de cascalote mostraron valores adecuados de carbohidratos y fibra, que pueden ser empleados como fuente de nutrientes para el crecimiento de microorganismos. Adicionalmente, la vaina de cascalote mostró niveles adecuados de IAA y PCH, lo cual lo convierte en un material apto para su uso como soporte en procesos de FMS.

Las tres cepas fúngicas evaluadas fueron capaces de crecer empleando como fuente de carbono la vaina de cascalote y liberar compuestos fenólicos con actividad antioxidante. Sin embargo, los mejores valores se obtuvieron con la cepa de *A. niger* GH1 a las 12 h de fermentación.

Los factores que más influyen en la liberación de compuestos fenólicos con actividad antioxidante a partir de la FMS de vainas de cascalote con *A. niger* GH1 fueron el contenido de humedad influyendo de manera positiva y la presencia de las sales KH_2PO_4 y KCl , cuya presencia influye de manera negativa sobre el contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante.

Las mejores condiciones para obtener una mayor liberación de compuestos fenólicos con actividad antioxidante fueron: *A. niger* GH1 (1×10^7 esp/gm) a un tiempo de 12 h, 40°C , 60 % de humedad y una concentración de sales minerales en el medio (g/L): KH_2PO_4 : 1.52, NaNO_3 : 7.65, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 1.52 y KCl : 1.52. Bajo estas condiciones, se obtiene un aumento de 6.5 veces los valores de fenoles hidrolizables y 1.72 veces la actividad antioxidante ABTS respecto al material sin fermentar.

El proceso de FMS de vainas de cascalote produjo cambios en la composición fisicoquímica, con un consumo de carbohidratos y fibra cruda, además de un aumento en la proteína.

El presente trabajo nos ofrece una alternativa biotecnológica amigable con el medio ambiente para el aprovechamiento de esta especie que mediante la extracción de compuestos de alto valor biológico pueden ser aplicados en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética generando un impacto económico que beneficie los lugares donde se produce.

PERSPECTIVAS

Al ser un tema poco explorado, surgen muchas vías para continuar con la investigación. A continuación, se mencionan algunas ideas.

- Desarrollar el proceso de fermentación en medio líquido de la vaina de cascalote, para comparar con lo obtenido en el presente estudio.
- Caracterizar los extractos fermentados de vainas de cascalote a través de HPLC-MS, RMN, FT-IR para obtener el perfil de compuestos presentes.
- Evaluar actividades biológicas (antimicrobiano, antiparasitaria) en los extractos fermentados de vainas de cascalote.
- Identificar las actividades enzimáticas presentes en los extractos fermentados y relacionarlas al proceso de liberación de compuestos fenólicos durante el proceso de FMS.
- Realizar estudios de toxicidad de los extractos obtenidos.

BIBLIOGRAFÍA

- Anandhi, D., Srinivasan, P.T., Praveen Kumar, G., Jagatheesh, S. (2014). Influence of flavonoids and glycosides from *Caesalpinia coriaria* (Jacq) wild as bactericidal compound. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences., 3 (4): 1043-1051
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 1990. Official methods of analytical chemist. Arlington, Virginia. Association of Official Analytical Chemists
- Borrás-Sandoval, L. M., & Torres-Vidales, G. (2016). Producción de alimentos para animales a través de fermentación en estado sólido – FES. Orinoquia, 20(2), 47. <https://doi.org/10.22579/20112629.353>
- Buenrostro-Figueroa, J. J., Velázquez, M., Flores-Ortega, O., Ascacio-Valdés, J. A., Huerta-Ochoa, S., Aguilar, C. N., & Prado-Barragán, L. A. (2017). Solid state fermentation of fig (*Ficus carica L.*) by-products using fungi to obtain phenolic compounds with antioxidant activity and qualitative evaluation of phenolics obtained. Process Biochemistry (Barking, London, England), 62, 16–23. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.07.016>
- Buenrostro-Figueroa, J., Ascacio-Valdés, A., Sepúlveda, L., De la Cruz, R., Prado-Barragán, A., Aguilar-González, M. A., Rodríguez, R., & Aguilar, C. N. (2014). Potential use of different agroindustrial by-products as supports for fungal ellagitannase production under solid-state fermentation. Food and Bioproducts Processing, 92(4): 376–382.
- Camacho-Díaz, L. M., Jesús-Ramírez, C. O., Cipriano-Salazar, M., Cruz-Lagunas, B. 2015. Taninos condensados del cascalote (*Caesalpinia coriaria* jacq) y su efecto sobre el contenido de ácido linoleico conjugado (CLA) en leche de vacas doble propósito. MEDIO AMBIENTE Y RECURSOS NATURALES. 1(2): 372-376.
- Cano y Postigo, L. O., Jacobo-Velázquez, D. A., Guajardo-Flores, D., Garcia Amezcuita, L. E., & García-Cayuela, T. (2021). Solid-state fermentation for enhancing the

nutraceutical content of agrifood by-products: Recent advances and its industrial feasibility. *Food Bioscience*, 41(100926), 100926.

Cordero, J. (2003). *Árboles de Centroamérica : un manual para extensionistas*. CATIE.

De la Rosa, O., Múñiz-Marquez, D. B., Contreras-Esquivel, J. C., Wong-Paz, J. E., Rodríguez-Herrera, R., & Aguilar, C. N. (2020). Improving the fructooligosaccharides production by solid-state fermentation. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 27(101704), 101704. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101704>

Echevarría, J., López, P., Mato, S. (2003). Alternativas para la alimentación animal utilizando fermentación en estado sólido. *Avanzada Científica*. 6(1).

Gimeno Creus, E. (2004). Compuestos fenólicos. Un análisis de sus beneficios para la salud. *Offarm*, 23(6), 80–84.

González-Gómez J. C., Ayala-Burgos A y Gutiérrez-Vázquez, E. (2006). Determinación de fenoles totales y taninos condensados en especies arbóreas con potencial forrajero de la Región de Tierra Caliente Michoacán, México. *Livestock Research for Rural Development*. 18 (152).

Khanbabaee, K.; van Ree, T. (2001). Tannins: Classification and Definition. *Natural Product Reports* 18 (6), 641-649.

Lafont, J. J., Calle, E. A., & Durango, L. C. (2013). Composición Química del Aceite de Almendras producidas por el Árbol Olleto (*Lecythis minor* DC). *CIT Informacion Tecnológica*, 24(1), 59–68. <https://doi.org/10.4067/s0718-07642013000100008>

Machado de Castro, A., Fragoso dos Santos, A., Kachrimanidou, V., Koutinas, A. A., & Freire, D. M. G. (2018). Solid-state fermentation for the production of proteases and amylases and their application in nutrient medium production. En A. Pandey, C. Larroche, & C. R. Soccol (Eds.), *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering* (pp. 185–210). Elsevier.

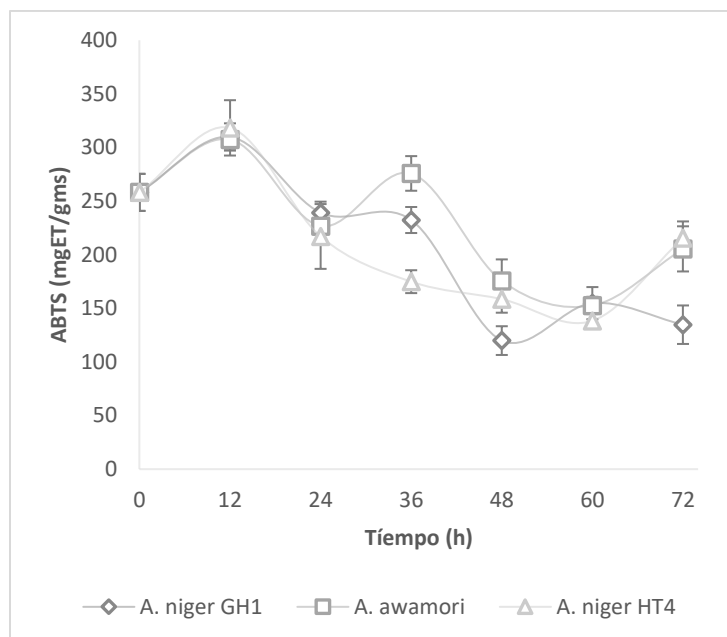
- Medina, J. García, F.; Paricaguán, B y Semeco, R. (2015). Preparación de pirogalato férrico para teñir cueros a partir del ácido gálico obtenido de la planta de dividivi (*Caesalpinia coriaria*). *Ingeniería y Sociedad UC*. 10(2):192-198.
- Meléndez, N. P.; Nevárez-Moorillón, V.; Rodríguez-Herrera, R.; Espinoza, J. C.; Aguilar, C. N. (2014). A microassay for quantification of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging. *African Journal of Biochemical Research* 8 (1), 14-18.
- Mesa-Vanegas, A. M., Zapata-Uribe, S., Arana, L. M., Zapata, I. C., Monsalve, Z., & Rojano, B. (2015). Actividad antioxidante de extractos de diferente polaridad de *Ageratum conyzoides* L. *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 14(1), 1–10.
- MORA-SANTACRUZ, A., ROMÁN-MIRANDA, M., GONZÁLEZ-CUEVA, G., BARRIENTOS-RAMÍREZ, L. (2018). Composición química del cascalote *Caesalpinia coriaria* (Jacq.) Willd., y diversidad de usos en el medio rural, del trópico seco. *Revista de Investigación y Desarrollo*., 4(12): 24-18.
- Olmedo-Juarez, A., Rojo Rubio, R., Mendoza-de Gives, P., Vázquez-Armijo, J. F., Albarran-Portillo, B., & Garcia-Hernandez, C. (2017). Ovicidal effect of the fruit and leaf of *Caesalpinia coriaria* against *Haemonchus contortus* and *Haemonchus placei*. *Journal of Animal Science*, 95(4): 15–15.
- Orzua, M. C., Mussatto, S. I., Contreras-Esquivel, J. C., Rodríguez, R., de la Garza, H., Teixeira, J. A., & Aguilar, C. N. (2009). Exploitation of agro industrial wastes as immobilization carrier for solid-state fermentation. *Industrial Crops and Products*, 30(1): 24–27.
- Palma, J. M., García, J. M. P., Islas, C. G.-R. (2018). *Caesalpinia coriaria* (Jacq.) Willd. *Recursos arbóreos y arbustivos tropicales: para una ganadería bovina sustentable*. Universidad de Colima., 5: 30-34
- Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26 (9), 1231-1237.

- Rioja Antezana, A. P., Vizalque, B. E., Aliaga-Rossel, E., Tejeda, L., Book, O., Mollinedo, P., & Peñarrieta, J. M. (2018). Determinación de la capacidad antioxidante total, fenoles totales, y la actividad enzimática en una bebida no láctea en base a granos de chenopodium quinoa. *Revista boliviana de química* 35(5), 168–176.
- Sánchez-Carranza, J. N., Alvarez, L., Marquina-Bahena, S., Salas-Vidal, E., Cuevas, V., Jiménez, E. W., Veloz G, R. A., Carraz, M., & González-Maya, L. (2017). Phenolic compounds isolated from *Caesalpinia coriaria* induce S and G2/M phase cell cycle arrest differentially and trigger cell death by interfering with microtubule dynamics in cancer cell lines. *Molecules* (Basel, Switzerland), 22(4): 666.
- Srivastava, N., Srivastava, M., Ramteke, P. W., & Mishra, P. K. (2019). Solid-state fermentation strategy for microbial metabolites production: An overview. En V. K. Gupta & A. Pandey (Eds.), *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering* (pp. 345–354). Elsevier.
- Swain, T.; Hillis, W.E. (1959). The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I. The quantitative analysis of phenolic constituents. *Journal of Science Food Agriculture* 10, 63–68.
- Torres-León, C., Chávez-González, M. L., Hernández-Almanza, A., Martínez-Medina, G. A., Ramírez-Guzmán, N., Londoño-Hernández, L., & Aguilar, C. N. (2021). Recent advances on the microbiological and enzymatic processing for conversion of food wastes to valuable bioproducts. *Current Opinion in Food Science*, 38, 40–45.
- Vanguardia Totolapense A.C. 2019-2022. [Árbol y vaina del cascalote]. [https://www.facebook.com/permalink.php?story_fbid=851121251980548&id=200199497072730&_cft__\[0\]=AZVgw0BK55DQASOBO4nrtZYFrH2k5A7ruAnrkeM-1ndkFsZjcAGSJhKZkVvEC3X3TtqbX3N-4dSIIt_z5KOfUx7wdC81Xi7H8Cokz3xcaiyHVXRxJVWKZIF4AksJmB3Z_dvN7I27NyNXWydDTHqc0t_l&_tn_=%2CO%2CP-R](https://www.facebook.com/permalink.php?story_fbid=851121251980548&id=200199497072730&_cft__[0]=AZVgw0BK55DQASOBO4nrtZYFrH2k5A7ruAnrkeM-1ndkFsZjcAGSJhKZkVvEC3X3TtqbX3N-4dSIIt_z5KOfUx7wdC81Xi7H8Cokz3xcaiyHVXRxJVWKZIF4AksJmB3Z_dvN7I27NyNXWydDTHqc0t_l&_tn_=%2CO%2CP-R)

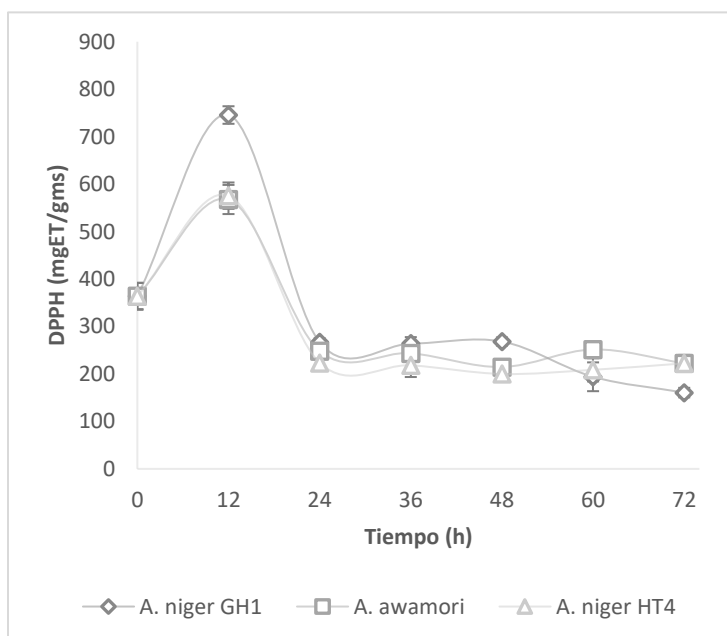
Vázquez-Flores, A. A., Alvarez-Parrilla, E., López-Díaz, J. A., Wall-Medrano, A y De La Rosa, L. A. (2012). Taninos hidrolizables y condensados:naturaleza química, ventajas y desventajas de su consumo. *Tecnociencia Chihuahua*. 6(2).

Wong-Paz, J. E., Contreras-Esquivel, J. C., Rodríguez-Herrera, R., Carrillo-Inungaray, M. L., López, L. I., Nevárez-Moorillón, G. V., & Aguilar, C. N. (2015). Total phenolic content, in vitro antioxidant activity and chemical composition of plant extracts from semiarid Mexican region. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, 8(2), 104–111.

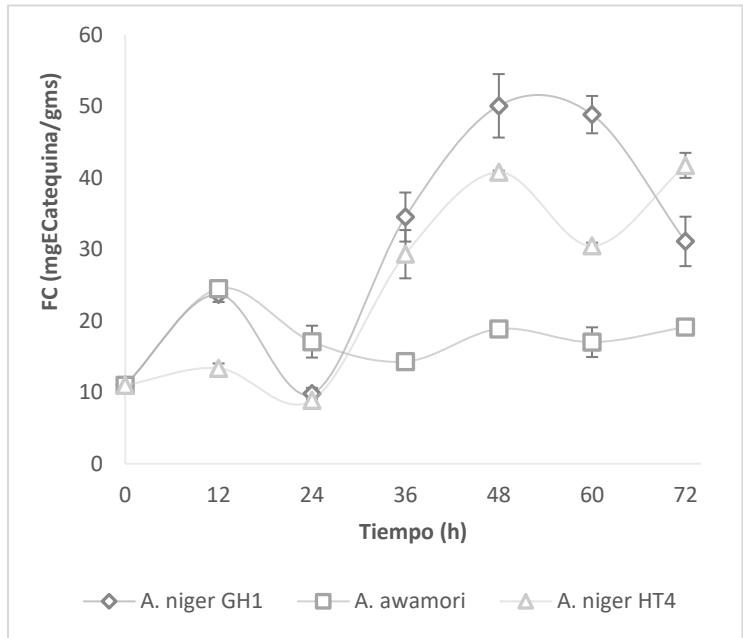
ANEXOS



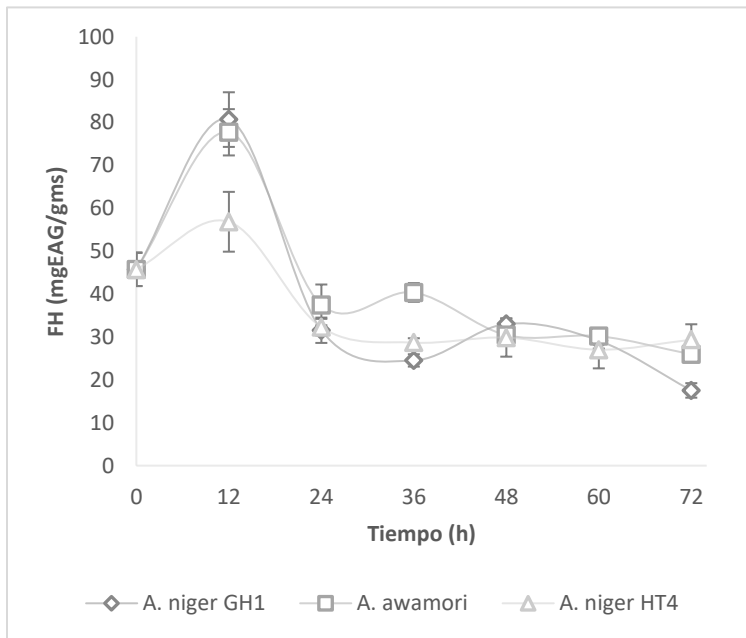
Efecto del tiempo en su capacidad antioxidante (ABTS) usando *A. niger* GH1, *A. niger* *awamori* y *A. niger* HT4.



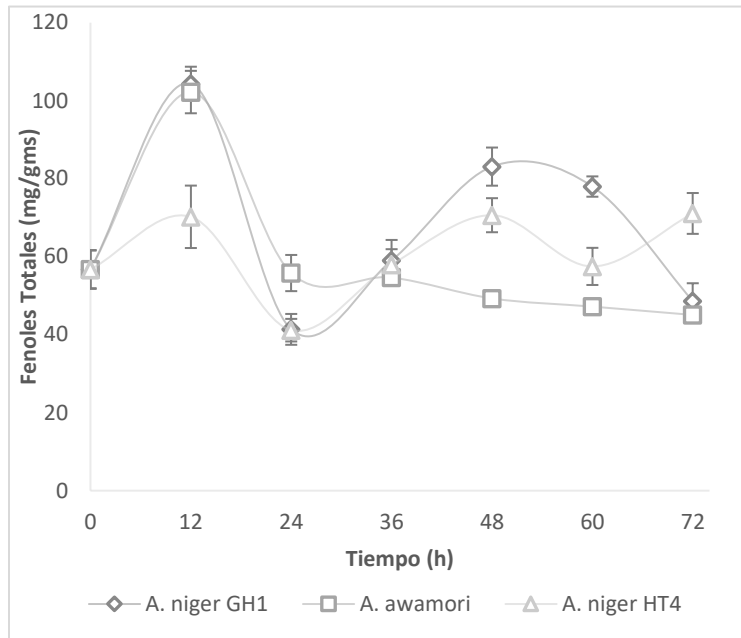
Efecto del tiempo en su capacidad antioxidante (DPPH) usando *A. niger* GH1, *A. niger* *awamori* y *A. niger* HT4.



Efecto del tiempo en fenoles condensados usando *A. niger* GH1, *A. niger awamori* y *A. niger* HT4.



Efecto del tiempo en fenoles hidrolizables usando *A. niger* GH1, *A. niger awamori* y *A. niger* HT4.



Efecto del tiempo en fenoles totales usando *A. niger* GH1, *A. niger* awamori y *A. niger* HT4.