

## PROTOCOLO PARA LA GENERACIÓN DE EXTRACTOS ETANOLÓICOS DE *Pterophylla beltrani* BOLÍVAR y BOLÍVAR, 1942 (ENSIFERA: TETTIGONIIDAE)

Luis Daniel García-García<sup>1</sup>, Ludivina Barrientos-Lozano<sup>1</sup> y Jorge Ariel Torres-Castillo<sup>2</sup>✉

<sup>1</sup>Tecnológico Nacional de México-Instituto Tecnológico de Ciudad Victoria. División de Estudios de Posgrado e Investigación. Boulevard Emilio Portes Gil N° 1301, Ciudad Victoria, C. P. 87010, Tamaulipas, México.

<sup>2</sup>Instituto de Ecología Aplicada, Universidad Autónoma Tamaulipas, División del Golfo N° 356, Ciudad Victoria, C. P. 87019, Tamaulipas, México.

✉ Autor de correspondencia: [jorgearieltorres@hotmail.com](mailto:jorgearieltorres@hotmail.com)

**RESUMEN.** Los insectos se han utilizado a lo largo de la historia en beneficio de la humanidad como agentes de control biológico, en la industria alimentaria, en la industria textil y como agentes medicinales. En este sentido, diversas especies de insectos han sido exploradas como materias primas o como preparaciones o extractos. No obstante, estas preparaciones generalmente son de forma empírica o no siguen protocolos adecuados que permitan su análisis de forma amplia; por lo que la generación de protocolos de extracción en cada especie debe desarrollarse para permitir el estudio de éstas y de sus componentes bioquímicos. En el caso de *Pterophylla beltrani* Bolívar y Bolívar, 1942, se ha demostrado que tiene diversos componentes bioactivos, entre ellos compuestos fenólicos y antioxidantes. Sin embargo, es necesario el establecimiento de un protocolo que permita la extracción eficiente para poder aprovechar este recurso. Por ello, en esta investigación se desarrolló un protocolo para generar extractos a partir de un pulverizado de *P. beltrani* a una concentración 100 veces mayor que los reportados previamente, lo que facilitará el estudio de este insecto como fuente de compuestos bioactivos.

**Palabras clave:** Orthoptera, extracciones, compuestos bioactivos.

### Protocol for the generation of ethanolic extracts from *Pterophylla beltrani* Bolívar & Bolívar, 1942 (Ensifera: Tettigoniidae)

**ABSTRACT.** Insects have been used throughout history for the benefit of mankind as biological control agents, in food and textile industry, and as medicinal agents. In this sense, various species of insects have been explored as raw materials, preparations or extracts. However, these preparations are generally empirically or do not follow appropriate protocols to allow their deep analysis; therefore, development of extraction protocols in each species must be encouraged to study insects and their biochemical components. In the case of *Pterophylla beltrani* Bolívar & Bolívar, 1942 it has been shown that contains various bioactive components, including phenolic and antioxidant compounds. Nonetheless, it is necessary to establish a protocol for the efficient extraction to use this resource. Therefore, in this research, an extraction protocol was developed to generate ethanolic extracts of *P. beltrani* at a concentration 100 fold higher than those previously reported, which will facilitate the study of this insect as a source of bioactive compounds.

**Keywords:** Orthoptera, extractions, bioactive compounds.

## INTRODUCCIÓN

Se ha reportado el potencial de los insectos como materia prima p. ej., seda, cera, péptidos, proteína, quitina, compuestos fenólicos de interés en la industria farmacéutica, textil, biotecnológica y alimentaria, donde se usan como fuente de componentes y aditivos de interés comercial, i.e., colorantes, saborizantes, antioxidantes (Andersson *et al.*, 2016; Xiao *et al.*, 2017; Kannan *et al.*, 2019); no obstante, la diversidad de especies de interés industrial es bastante limitada. En los últimos años, en la Universidad Autónoma de Tamaulipas, se ha trabajado con la exploración del insecto *Pterophylla beltrani* Bolívar y Bolívar como fuente de entomoquímicos (García-García *et al.*, 2019). *P. beltrani* es un ortóptero que pertenece a la familia Tettigoniidae, endémico de la Sierra Madre Oriental en el noreste de México. Durante los meses de agosto y septiembre se encuentra

la mayor densidad de población debido a que es la culminación de la etapa de apareamiento (Mariño-Pérez *et al.*, 2011), durante su etapa ninfal es una especie polífaga que se alimenta de diversas plantas silvestres asociadas a los bosques de encino (*Pistacia mexicana* Kunth, *Rhus virens* Lindh. ex A. Gray, *Brahea berlandieri* Bartlett, *Chamaedorea radicalis* Mart, *Sabal mexicana* Mart, *Flourensia laurifolia* DC., *Verbesina persicifolia* DC., *Croton niveus* Jacq., *Caesalpinia mexicana* A. Gray, *Eysenhardtia polystachya* (Ortega) Sarg., *Havardia pallens* (Benth.) Britton & Rose, *Ocotea tampicensis* (Meisn.) Hemsl., *Fraxinus greggii* A. Gray, *Colubrina greggii* S. Watson, *Karwinskia humboldtiana* (Schult.) Zucc., *Ungnadia speciosa* Endl.). Sin embargo, al entrar en su etapa adulta se vuelve oligófaga debido a que se alimenta predominantemente de encinos (*Quercus* spp.). Por ello, es considerada un defoliador específico para estas plantas. Los encinos de los que se alimenta en su etapa adulta son: *Quercus polymorpha* Schltl. & Cham, *Quercus canbyi* Trel y *Quercus fusiformis* Small (Torres Castillo, *et al.* 2016). Durante la exploración de este insecto se ha encontrado que contiene compuestos con potencial nutraceutico, como compuestos fenólicos, antioxidantes, alcaloides, derivados de aminoácidos, ácidos orgánicos y algunos terpenos (Torres-Castillo *et al.*, 2018). No obstante, estos trabajos se han realizado con metodologías generales enfocadas en la detección y no en la preparación de extractos concentrados a partir de los cuales se puedan realizar estudios más profundos. Considerando la alta densidad de población anual que presenta la grilleta (*P. beltrani*) y su uso potencial como fuente de compuestos nutraceuticos, este trabajo tuvo como objetivo generar un protocolo de extracción eficiente de sus componentes bioquímicos a partir de adultos pulverizados, con la finalidad de disponer de un método de extracción eficiente para futuras investigaciones.

## MATERIALES Y MÉTODO

Preparación del insecto. Los adultos de *P. beltrani* se recolectaron en el Área Natural Protegida (ANP) Altas Cumbres (28° 36'52.2" N 99° 11'58.8" O) a 18 km de Ciudad Victoria, Tamaulipas, por la carretera antigua a Tula (carretera 101). En el laboratorio, los adultos se enfriaron a -20 °C por 10 min y posteriormente se evisceraron para retirar todo el tejido intestinal junto con los restos de material vegetal no digerido (Torres-Castillo *et al.*, 2018). Enseguida, se lavaron con agua corriente y se secaron a 45 °C por 24 horas, seguido de molienda en mortero y se tamizaron a través de una malla con poros de 700 µm, este material se manejó como el pulverizado del insecto (Figura 1).

Después de varias aproximaciones, se logró establecer el siguiente protocolo de extracción, donde la proporción recomendada es de 1:8, es decir por 1 g de pulverizado de insecto, se adicionarán 8 ml de solvente, etanol absoluto. Seguido de una agitación por cinco minutos para incorporar la muestra en la solución de manera homogénea y posteriormente un reposo de 30 minutos. Pasado el tiempo de reposo, la muestra se sometió a un proceso de sonicación mediante un baño ultrasónico (BIOBASE, UC - 10A a 40 KHz) por cinco minutos a 35 °C para incrementar la difusión de componentes del tejido del insecto hacia el solvente, enseguida la muestra se agitó por dos minutos y entró de nuevo a otra etapa de sonicación, seguida por un reposo por 30 minutos en oscuridad.

Todo el proceso se realizó bajo condiciones de oscuridad para evitar la pérdida de metabolitos sensibles a la luz. La muestra se centrifugó a 8,500 x g durante 10 minutos para clarificar la mezcla de extracción. El líquido clarificado y libre de restos sólidos se sometió a un ciclo de evaporación en un rotavapor (BÜCHI, R-110 & B - 465) a 70 °C por dos minutos para producir un extracto concentrado. Este líquido concentrado es el extracto y será utilizado posteriormente.

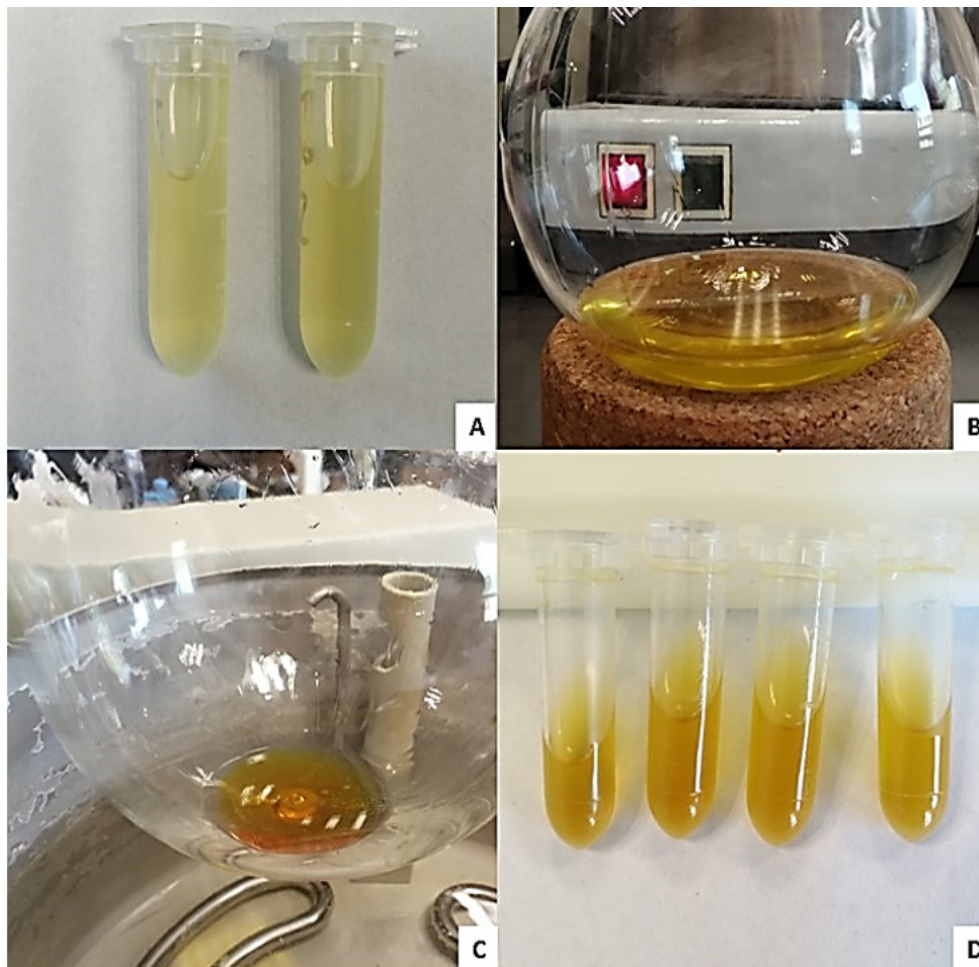


**Figura 1.** Procesamiento de *P. beltrani* en laboratorio. **A.** Evisceración de insectos. **B.** Insectos después del secado. **C.** Tamizado de insecto. **D.** Pulverizado de insecto.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El protocolo de extracción que se aplicó permitió recuperar el extracto de *P. beltrani*, el cual consistió de un líquido de color café ámbar, de un olor acre y de una consistencia densa, similar a un aceite (Figura 2). Este extracto cuando se sometió a bajas temperaturas presentó la formación de cristalizaciones probablemente de componentes grasos. El olor acre puede asociarse a componentes resinosos asimilados de las hojas de encino de las cuales se alimenta el insecto durante la etapa fenológica en la que fue recolectado.

El extracto tuvo una concentración de sólidos de 40.4 mg/ml en dilución 1:8, lo cual indica que se tiene una concentración similar a algunos extractos etanólicos vegetales como es el caso de borraja (*Borago officinalis* Linnaeus, 1753), alcachofa (*Cynara scolymus* Linnaeus, 1753) y moringa (*Moringa oleifera* Lamarck, 1783) en los cuales se obtuvieron resultados positivos en actividad antioxidante en dilución 1:5 (Echavarría *et al.*, 2016); por lo cual es ideal para utilizarlo en diversos ensayos. Por ejemplo, en la evaluación de su efecto antimicrobiano, o la determinación de potencial antioxidantes. La concentración del extracto etanólico que aquí se obtuvo es cerca de 100 veces mayor a la que reportan Torres-Castillo *et al.*, (2016, 2018) para esta misma especie y es mayor a la reportada para extractos obtenidos de otros insectos, como la langosta centroamericana [*Schistocerca piceifrons piceifrons* (Walker, 1870)] con la cual se trabajó con extracciones 1:4 (Pérez-Ramírez *et al.*, 2019). El protocolo de extracción que se generó presenta etapas que pueden escalarse a otros insectos y que además resultan económicas y accesibles (Figura 2); por lo cual puede aplicarse a la exploración de compuestos bioquímicos o bioactivos en especies de insectos de interés alimentario o medicinal, p. ej., *Holotrichia paralella* (Motschulsky, 1854), *Vespa* spp., *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Liu *et al.*, 2012; Xiao *et al.*, 2017).



**Figura 2.** Extractos de *P. beltrani*. **A.** Extracto después del clarificado. **B.** Extracto antes de entrar al rotavapor. **C.** extracto después de la evaporación del solvente. **D.** Extracto recuperado.

La utilización de extractos debe considerar diversos factores, que incluyen el material a extraer, el solvente, la asistencia de técnicas físicas, la temperatura, la presencia de luz, interferencias, contenido de agua, entre otros, lo cual puede garantizar la reproducibilidad y estabilidad de los compuestos de interés (Sarker *et al.*, 2006). El protocolo que se generó y el incremento de 100 veces más en la concentración de extractos etanolólicos que se obtuvieron de la grilleta, nos permitirá estudiar con mayor profundidad este insecto y aportar información adicional sobre los compuestos bioactivos que contiene (Torres Castillo *et al.*, 2016, 2018), así como la posibilidad de proponer estrategias de manejo sustentables. Adicionalmente, la preparación de extractos a partir de insectos bajo condiciones reproducibles y eficientes, sienta las bases para la exploración de éstos como fuente de compuestos bioactivos o de interés industrial.

## CONCLUSIONES

Al establecer un protocolo de extracción, se puede lograr muestras con homogeneidad y reproducibilidad para poder evaluar la actividad biológica de diversos compuestos bioactivos para aplicaciones en futuras investigaciones.

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca nacional N°. 002408 otorgada a Luis Daniel García García para realizar estudios de Maestría en Ciencias. A los investigadores que contribuyeron en la redacción y revisión de este manuscrito.

## LITERATURA CITADA

- Andersson, M., Johansson, J. and Rising, A. 2016. Silk spinning in silkworms and spiders. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(8), 1290. <https://doi.org/10.3390/ijms17081290>
- Echavarría, A., Regnault, H.D., Lisbeth, N., Matute, L., Jaramillo, C., Rojas de Astudillo, L. y Benitez, R. 2016. Evaluación de la capacidad antioxidante y metabolitos secundarios de extractos de dieciséis plantas medicinales/evaluation of antioxidant capacity and secondary metabolites of sixteen medicinal plants extracts. *Ciencia UNEMI*, 9 (20), 29-35. <http://dx.doi.org/10.29076/issn.2528-7737vol9iss20.2016>
- García-García, L.D., Torres-Acosta, R.I., Torres-de los Santos, R., Niño-García, N. and Torres-Castillo, J.A., 2019. From the forest to the bottle: entomochemicals from *Pterophylla beltrani* Bolívar and Bolívar for the beverage industry. *Southwestern Entomologist*, 44 (2), 449-455. DOI: 10.3958/059.044.0210
- Kannan, M., Mubarakali, D., Thiyonila, B., Krishnan, M., Padmanaban, B. and Shantkriti, S. 2019. Insect gut as a bioresource for potential enzymes-an unexploited area for industrial biotechnology. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 18, (March 2019), <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.01.048>
- Liu, S., Sun, J., Yu, L., Zhang, C., Bi, J., Zhu, F., Qu, M. and Yang, Q. 2012. Antioxidant activity and phenolic compounds of *Holotrichia parallela* Motschulsky extracts. *Food chemistry*, 134(4):,1885-1891. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.03.091
- Mariño-Perez, R., Fontana, P. y Buzzetti, F.M. 2011. Identificación de plagas de chapulín en el norte-centro de México. En: *Control Biológico de Plagas de Chapulín en el Norte ~ Centro de México*, p. 33-55. En: García Gutiérrez, C; Lozano Gutiérrez, J. (Eds.). Universidad Autónoma de Zacatecas. Zacatecas, México. ISBN: 978-607-7678-51-9 recuperado de: <http://hdl.handle.net/10449/20636>. Fecha de acceso 11/XI/2019.
- Pérez-Ramírez, R., Torres-Castillo, J. A., Barrientos-Lozano, L., Almaguer-Sierra, P., Torres-Acosta, R.I., 2019. *Schistocerca piceifrons piceifrons* (Orthoptera: Acrididae) as a source of compounds of biotechnological and nutritional interest. *Journal of Insect Science*, 19(5), 1–9. DOI: 10.1093/jisesa/iez088
- Sarker, S. D., Latif, Z. and Gray, A. I. 2006. Natural product isolation: an overview. *Methods in Biotechnology*, 20, (1). DOI: <https://doi.org/10.1021/np078142v>
- Torres-Castillo, J. A., Sinagawa-García, S. R., Lara-Villalón, M., Martínez-Ávila, G.C.G., Mora-Olivo, A. and Reyes-Soria, F. 2015. Evaluation of biochemical components from *Pterophylla beltrani* Bolívar & Bolívar (Orthoptera: Tettigoniidae): a forest pest from northeastern Mexico. *Southwestern Entomologist*. Vol.40. (4). DOI: 10.3958/059.040.0402
- Torres-Castillo, J. A., Sinagawa-García, S. R., Ruiz de la Cruz, G., Gámez-Huerta, A. K., Juárez-Aragón, M. C., Lara-Villalón, M. and Mora-Olivo, A. 2016. Digestive proteinases and antioxidant capacity from *Pterophylla beltrani* Bolívar & Bolívar fed two natural diets, *Southwestern Entomologist*, 41(3), 613-624. DOI: <https://doi.org/10.3958/059.041.0304>
- Torres-Castillo, J. A., Sinagawa-García, S. R., Torres-Acosta, R. I., García-García, L. D., Ramos-Rodríguez, A. G., Villanueva-Bocanegra, B., and Moreno-Ramírez, Y. R. 2018. Entomochem-

micals from *Pterophylla beltrani* Bolívar & Bolívar: Antioxidants and other metabolites. *Southwestern Entomologist*. Vol 43 (2), 369-381. DOI: 10.3958/059.043.0208

Xiao, H., Yin, T.-P., Dong, J.-W., Wu, X.-M., Luo, Q., Luo, J.-R., Cai, L. and Ding, Z.-T. 2017. Five new phenolic compounds with antioxidant activities from the medicinal insect *Blaps rynchopetera*. *Molecules*, 22, (1301). DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules22081301>