



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE QUÍMICA

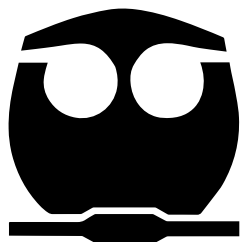


“FUNCIONALIZACIÓN ENZIMÁTICA  
DE AGAVINA CON TERT-BUTIL  
HIDROXIQUINONA”

# TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA  
MIGUEL ÁNGEL HERNÁNDEZ  
VALDEPEÑA



MÉXICO, D.F. 2013



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**JURADO ASIGNADO:**

PRESIDENTE: Profesor Hermilo Leal Lara

VOCAL: Profesora Sobeida Sánchez Nieto

SECRETARIO: Profesor Miquel Gimeno Seco

PRIMER SUPLENTE: Profesora Norma Angélica Camacho de la Rosa

SEGUNDO SUPLENTE: Profesora Perla Deyanira Maldonado Jiménez

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

Laboratorio 314, Conjunto E, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.

ASESOR DEL TEMA:

DR. Miquel Gimeno Seco



.....

SUPERVISOR TÉCNICO:

DRA. Carmina Montiel Pacheco



.....

SUSTENTANTE:

Miguel Ángel Hernández Valdepeña



.....

# INDICE

Índice de figuras . . . . .	8
Índice de tablas . . . . .	9
Lista de abreviaturas y símbolos . . . . .	10
<b>Resumen . . . . .</b>	<b>11</b>
<b>1. Introducción . . . . .</b>	<b>12</b>
<b>2. Antecedentes . . . . .</b>	<b>14</b>
<b>2.1. Fructanos . . . . .</b>	<b>14</b>
<b>2.2. Inulina . . . . .</b>	<b>15</b>
2.2.1. Fuentes y producción de inulina. . . . .	16
2.2.1.1. Agavina . . . . .	17
2.2.2. Aplicaciones . . . . .	18
2.2.2.1. Usos en alimentos. . . . .	18
2.2.2.2. Usos farmacéuticos. . . . .	19
2.2.3. Efectos fisiológicos . . . . .	19
2.2.4. Modificación de la inulina . . . . .	20
<b>2.3. Enzimas. . . . .</b>	<b>21</b>
2.3.1. La oxidoreductasa HRP. . . . .	21
<b>2.4. Antioxidantes . . . . .</b>	<b>23</b>
2.4.1. El antioxidante TBHQ . . . . .	25
<b>2.5. Técnicas Analíticas . . . . .</b>	<b>26</b>
2.5.1. GPC . . . . .	26
2.5.2. RMN . . . . .	26
2.5.3. Espectroscopía infrarroja . . . . .	27
2.5.4. Termogravimetría . . . . .	28
<b>2.6. Concentración Mínima Inhibitoria . . . . .</b>	<b>29</b>
<b>2.7. Escherichia coli . . . . .</b>	<b>30</b>
<b>3. Hipótesis y objetivos . . . . .</b>	<b>31</b>
<b>3.1. Hipótesis . . . . .</b>	<b>31</b>
<b>3.2. Objetivo general. . . . .</b>	<b>31</b>
<b>3.3. Objetivos particulares . . . . .</b>	<b>31</b>
<b>4. Metodología . . . . .</b>	<b>32</b>
<b>4.1. Caracterización de reactivos. . . . .</b>	<b>32</b>
4.1.1. Determinación de peso molecular de agavina por GPC . . . . .	32

4.1.2. Caracterización de la agavina por RMN. . . . .	32
4.1.3. Caracterización de TBHQ por RMN . . . . .	32
4.1.4. Determinación de actividad enzimática de HRP por ABTS . . . . .	33
<b>4.2. Modificación de agavina . . . . .</b>	<b>34</b>
4.2.1. Materiales . . . . .	34
4.2.2. Equipos . . . . .	34
4.2.3. Reacción . . . . .	34
4.2.4. Purificación de polímeros . . . . .	35
<b>4.3. Productos de oxidación de TBHQ . . . . .</b>	<b>35</b>
<b>4.4. Caracterización de los materiales . . . . .</b>	<b>36</b>
4.4.1. RMN. . . . .	36
4.4.2. FTIR-ATR. . . . .	37
<b>4.5. Determinación de poder antioxidante DPPH. . . . .</b>	<b>37</b>
<b>4.6. Determinación de actividad antimicrobiana. . . . .</b>	<b>38</b>
4.6.1. Reactivos y microorganismo. . . . .	38
4.6.2. Preparación del inóculo . . . . .	38
4.6.3. Ensayo de MIC. . . . .	38
<b>5. Resultados y discusión. . . . .</b>	<b>40</b>
<b>5.1. Caracterización de reactivos. . . . .</b>	<b>40</b>
5.1.1. Caracterización de agavina por GPC . . . . .	40
5.1.2. Caracterización de agavina y TBHQ por RMN . . . . .	42
5.1.3. Medición de la actividad enzimática de la HRP . . . . .	48
<b>5.2. Productos de oxidación de la TBHQ. . . . .</b>	<b>48</b>
<b>5.3. Síntesis y purificación de los polímeros . . . . .</b>	<b>51</b>
<b>5.4. Caracterización de los modificados. . . . .</b>	<b>52</b>
5.4.1. RMN. . . . .	52
5.4.2. Espectroscopía infrarroja . . . . .	56
5.4.3. Termogravimetría . . . . .	59
5.4.4. Determinación de poder antioxidante por DPPH . . . . .	60
5.4.5. Determinación de Actividad Microbiana . . . . .	62
<b>6. Conclusiones . . . . .</b>	<b>63</b>
<b>7. Trabajo Futuro . . . . .</b>	<b>64</b>
<b>8. Bibliografía . . . . .</b>	<b>65</b>
Anexo I. Espectros de RMN <sup>1</sup> H de los modificados de agavina. . . . .	68

# ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Equilibrio isomérico de la D-fructosa . . . . .	14
Figura 2. Estructura de la inulina . . . . .	15
Figura 3. Diagrama de obtención de inulina a partir de achicoria . . . . .	16
Figura 4. Estructura de la agavina . . . . .	18
Figura 5. Ciclo catalítico de reacción en el centro activo de la HRP . . . . .	22
Figura 6. Estructura molecular de TBHQ . . . . .	25
Figura 7. Productos de la oxidación de TBHQ . . . . .	26
Figura 8. Estructura molecular aproximada del modificado de agavina. . . . .	37
Figura 9. Cromatograma de los estándares de Pululano . . . . .	40
Figura 10. Cromatograma de fructosa comparado con la curva de calibración . . . . .	41
Figura 11. Cromatograma de la muestra de inulina de agave . . . . .	41
Figura 12. Espectro RMN <sup>-1</sup> H de agavina. . . . .	43
Figura 13. Espectro RMN <sup>-13</sup> C y estructura de la agavina. . . . .	45
Figura 14. Espectro RMN <sup>-1</sup> H de TBHQ . . . . .	46
Figura 15. Espectro RMN <sup>-13</sup> C de TBHQ. . . . .	47
Figura 16. Curva temporal de actividad de HRP . . . . .	48
Figura 17. Espectro RMN <sup>-1</sup> H de producto de oxidación de TBHQ. . . . .	49
Figura 18. Espectro RMN <sup>-13</sup> C de producto de oxidación de TBHQ. . . . .	49
Figura 19. Espectro de RMN <sup>-1</sup> H de C48.A . . . . .	53
Figura 20. Gráfica de Inserción Molar Porcentual de los modificados. . . . .	53
Figura 21. RMN <sup>-13</sup> C de modificado C48.A . . . . .	56
Figura 22. Espectros de transmitancia AFTR-IR. . . . .	57
Figura 23. Acercamiento de bandas de IR . . . . .	58
Figura 24. Estructura de modificado de agavina . . . . .	58
Figura 25. Termogramas porcentuales de polímeros. . . . .	59
Figura 26. Gráfica de Temperatura de descomposición (Td) . . . . .	60
Figura 27. Efecto antioxidante de polímeros. . . . .	61
Figura 28. Gráfica de porcentaje de inhibición de la TBHQ. . . . .	62

# ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Modificaciones realizadas en inulina por vía química. . . . .	20
Tabla 2. Volúmenes de las sol. para la determinación de actividad de HRP . . . . .	33
Tabla 3. Condiciones de modificación de la agavina.. . . . .	35
Tabla 4. Diseño experimental para MIC . . . . .	38
Tabla 5. Rendimiento de masas de las diferentes reacciones.. . . . .	52
Tabla 6. Interpretación de señales típicas de agavina en AFTR-IR . . . . .	56

# LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

°C	Grado Celsius
μL	Microlitros
μmol	Micromol
ABTS	ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)
cm	Centímetro
Dmso-D	Dimetil-sulfóxido deuterado
DPPH*	2,2-difenil-1-picrylhidracilo
EFSA*	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
FTIR-ATR*	Espectroscopía Infrarroja con transformada de Fourier con reflectancia total atenuada
g/L	Gramo/Litro
GP	Grado de Polimerización
GPC*	Cromatografía de Permeación en Gel
HRP*	Peroxidasa de rábano
m/v	Masa/Volumen
mg	Miligramo
MIC*	Concentración Mínima Inhibitoria
min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
M <sub>n</sub>	Peso molecular promedio
nm	Nanómetro
PDI	Polidispersidad
ppm	Partes por millón
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
ROS*	Especies Reactivas de Oxígeno
TBHQ	ter-butil hidroxiquinona
TBQ	ter-butil para-quinona
Td	Temperatura de descomposición
δ	Desplazamiento químico

*\*por sus siglas en inglés.*



## RESUMEN

EL PRESENTE TRABAJO DETALLA EL PROCESO DE MODIFICACIÓN FUNCIONAL de la inulina proveniente del agave (agavina) mediante la inserción de TBHQ por método enzimático usando como biocatalizador a la HRP, enzima generadora de radicales libres con ayuda del peróxido de hidrógeno que actúa como sustrato activador de la enzima.

La agavina usada, así como la TBHQ y los materiales modificados obtenidos fueron caracterizados molecularmente a través de la espectroscopía de RMN<sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C. Los pesos moleculares se determinaron, en el caso de la muestra de agavina usada en este estudio, por dos metodologías, una basada en la cromatografía de líquidos usando columnas de GPC, obteniéndose un grado de polimerización de 16 unidades contra estándares de pululano y también con base en el análisis de RMN obteniéndose una aproximación a 22 unidades de repetición.

Para el establecimiento de un protocolo de modificación de la agavina, se efectuaron varios experimentos cambiando las concentraciones del antioxidante, el catalizador, el peróxido de hidrógeno y el tiempo, obteniendo un modificado soluble en agua con una inserción máxima de 5.24% molar, esta modificación fue comprobada por espectrometría infrarroja y termogravimetría, adicionalmente, con ayuda de la técnica de DPPH se demostró la presencia de actividad antioxidante. Finalmente la actividad prebiótica del polímero modificado fue atenuada con respecto al biopolímero nativo, lo cual se comprobó mediante ensayos microbiológicos de crecimiento de *E. coli*.

# 1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad existe en las industrias alimentaria y farmacéutica un creciente interés por los polímeros naturales debido a sus cualidades como el ser biodegradables, biocompatibles y no tóxicos para el ser humano, además de tener una amplia producción, lo que aumenta la disponibilidad y reduce costos.<sup>1</sup>

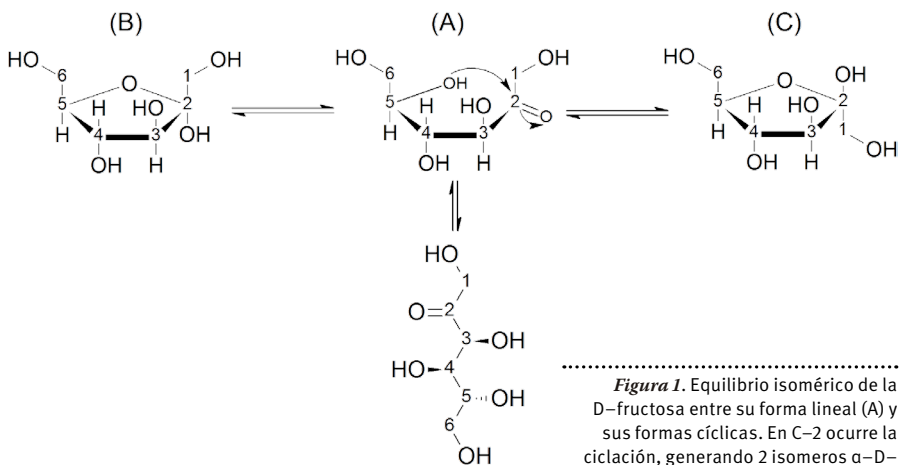
La inulina es un polisacárido con un número significativo de aplicaciones farmacéuticas y alimentarias. En la industria de los alimentos se utiliza como reemplazo de grasa o azúcar y fibra dietética soluble.<sup>2</sup> Junto con la inulina un gran número de polisacáridos han sido objeto de estudio, como lo es el quitosano y la quitina,<sup>3</sup> los anteriores biopolímeros han sido modificados por distintos métodos, por ejemplo, a través de método químico empleando ácido ascórbico como catalizador<sup>4</sup> o por el método enzimático usando tirosinasa o peroxidasa.<sup>5</sup> No obstante, el uso de la inulina adquiere interés debido a que puede ser obtenida de plantas monocotiledóneas, bacterias, alcachofa, achicoria, dalias e inclusive del bagazo del agave mezcalero y tequilero.<sup>6</sup> Debido a lo anterior, la modificación de la inulina con antioxidantes tiene interés potencial para la industria en busca de aditivos funcionales en alimentos aunando las propiedades de ambos e idealmente paliando posibles efectos secundarios de antioxidantes. En México, este polisacárido puede ser extraído de los residuos de la producción de mezcal y tequila siendo un recurso autóctono de muchas regiones del país. Hasta la fecha, la modificación vía enzimática de la inulina con HRP u otra peroxidasa no se encuentra en la literatura, sin embargo, la modificación de la inulina ya ha sido reportada una única vez, usando la inulina de dalia y el ácido ascórbico como agente catalítico iniciador de radicales libres.<sup>7</sup>

Adicionalmente, la modificación enzimática es un atractivo enfoque alternativo a la síntesis química debido a la alta especificidad de la catálisis enzimática, su amabilidad con el medio ambiente y la inocuidad del proceso.<sup>3</sup> En base a todo esto se puede reconocer a la inulina modificada por catálisis enzimática como idónea para la industria alimentaria.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. FRUCTANOS

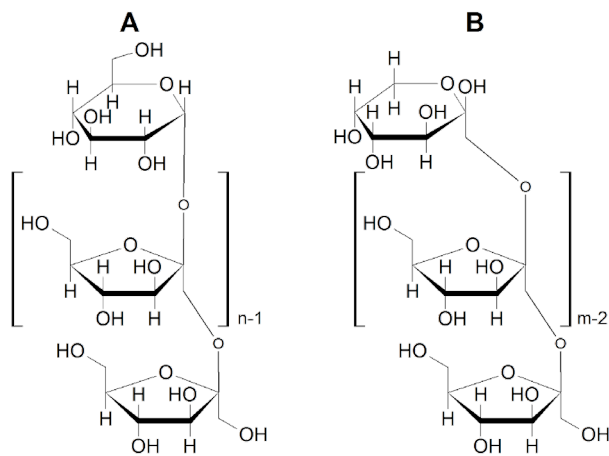
Fructano, en general, es un término usado para cualquier carbohidrato en el que la mayoría de los enlaces glucosídicos los constituyen uniones de fructosil–fructosa. Los fructanos son biopolímeros de fructosa lineales o ramificados, que están enlazados por uniones  $\beta$  (2–1) como en la mayoría de las variaciones de inulina o bien  $\beta$  (2–6) como en los levanos. Alrededor del 15% de las especies de plantas con flores tienden a poseer fructanos como reserva en al menos uno de sus órganos durante su ciclo de vida. Las especies dicotiledóneas almacenan fructanos tipo inulina que consisten en cadenas lineales  $\beta$  (2–1) con unidades de fructosil–furanosa o fructosa cíclica (Figura 1). Los fructanos más complejos y ramificados son comunes en las plantas monocotiledóneas<sup>8</sup> y se ha reportado su presencia en hongos del tipo *Aspergillus spp* y en varias bacterias.<sup>9</sup>



.....  
**Figura 1.** Equilibrio isomérico de la D-fructosa entre su forma lineal (A) y sus formas cíclicas. En C-2 ocurre la ciclación, generando 2 isómeros  $\alpha$ -D-fructo-furanosa (B) y  $\beta$ -D-fructo-furanosa (C)

## 2.2. INULINA

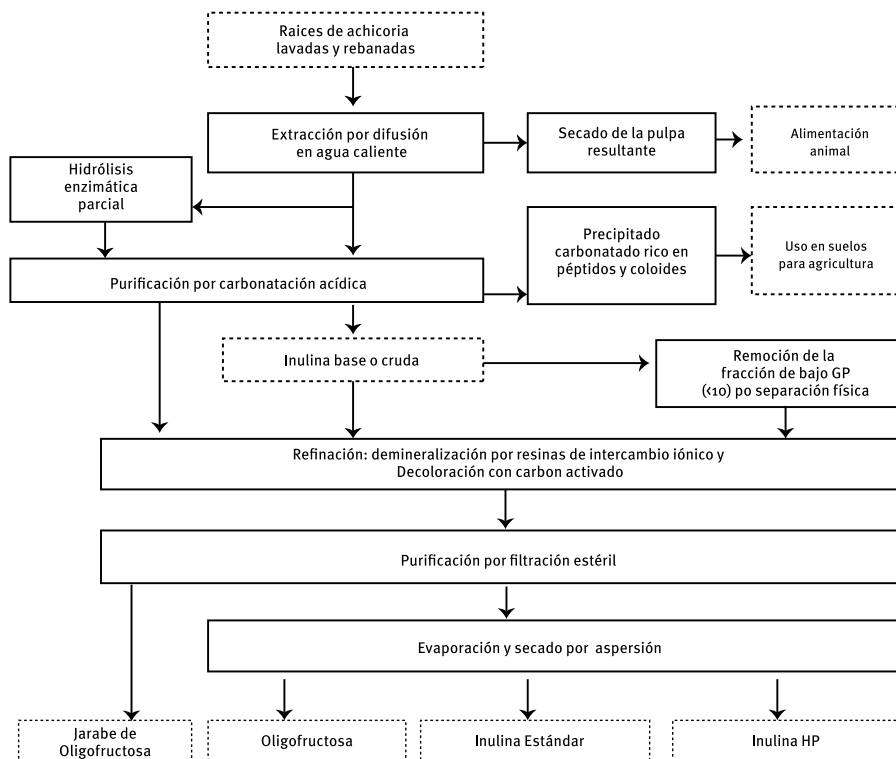
La inulina es un carbohidrato de reserva energética presente en más de 36,000 especies de plantas, aislada por primera vez en 1804, a partir de la especie *Inula helenium* por el científico alemán Rose. En 1818, Thomson, un científico británico, le dio el nombre actual. La inulina a su vez es una mezcla de oligómeros de carbohidratos polidispersa (de 2 a 60 unidades de grado de polimerización),<sup>9</sup> principalmente dispuestos de manera lineal las cadenas contienen unidades de fructosa enlazadas a través mayoritariamente de enlaces  $\beta$  (2–1) fructosil–fructosa, que puede tener como molécula terminal a la glucosa o bien otra fructosa. Como resultado de la configuración  $\beta$  en el Carbono anomérico de los monómeros de fructosa, la inulina resiste a la hidrólisis ácida y enzimática de la digestión humana y por lo tanto pueden ser considerada como fibra dietaria.<sup>10</sup>



.....  
**Figura 2.** Estructura de la inulina: con una molécula terminal de glucosa ( $\beta$ -D-glucopiranosil) (A) y con una molécula terminal de fructosa ( $\beta$ -D-fructopiranosil) (B)

### 2.2.1. Fuentes y producción de inulina

Los fructanos se encuentran en múltiples especies de plantas mono y dicotiledóneas tales como las familias *Liliaceae*, *Amaryllidaceae*, *Gramineae* y *Compositae*. Diversas plantas que se consumen en la dieta diaria contienen este fructano tal es el caso de los espárragos, ajo, puerro, cebolla, alcachofa, achicoria, etc. Sin embargo, sólo un número limitado de especies son aptas para la extracción de la inulina, las dos especies actualmente utilizadas por la industria pertenecen a la familia *Compositae*: alcachofa de Jerusalén (*Helianthus tuberosus*) y las achicorias (*Cichorium intybus*), siendo éstas últimas, por mucho, las más comúnmente utilizadas como fuente. En la achicoria, la inulina constituye alrededor del 70–80% del peso seco de las raíces.<sup>8</sup> A continuación se describe brevemente su método de obtención:<sup>9</sup>

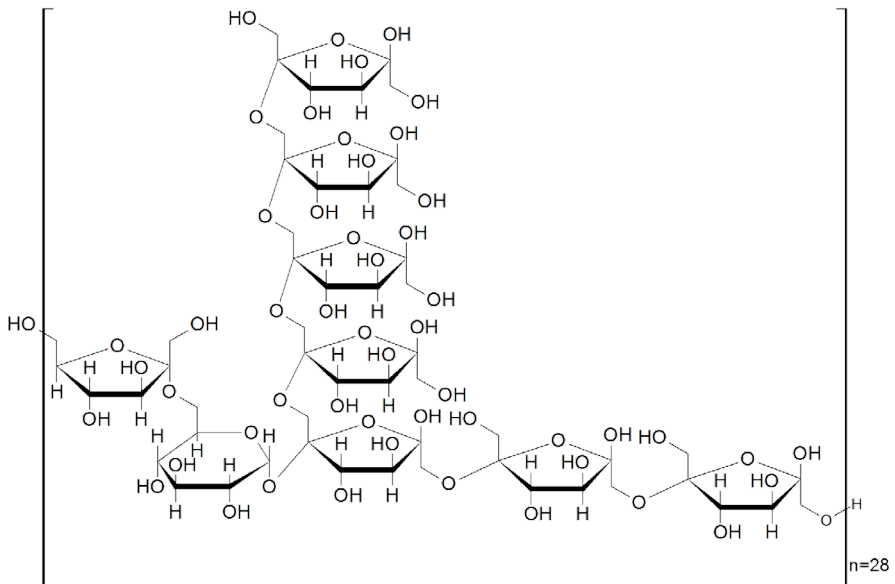


**Figura 3.** Diagrama de obtención de inulina a partir de achicoria. (GP: Grado de Polimerización)<sup>9</sup>

### 2.2.1.1. Agavina

El agave pertenece a la familia *Agavaceae*; es una planta con hojas agrupadas en forma de rosetas. Esta planta es endémica del continente americano, con una distribución que se extiende desde el sur de Estados Unidos hasta Colombia y Venezuela, incluyendo todas las islas del Caribe. El agave ha sido utilizado desde la antigüedad para satisfacer y complementar una serie de necesidades básicas: alimento, forraje, medicamento y construcción, entre otros.<sup>11</sup> Actualmente se han establecido procedimientos con el fin de obtener su inulina (agavina), ya sea para su uso directo o para la generación de jarabes de fructosa.<sup>6,11</sup> Dichos procedimientos son equivalentes a los usados para la obtención de la inulina de achicoria variando en el método de precipitación que puede ser con agua caliente o etanol.<sup>6</sup> La extracción de inulina puede llevarse a cabo de manera adyacente a la producción de tequila o mezcal ya que el desecho orgánico (bagazo) de este proceso contiene altos niveles de fructanos (~27% en *Agave salmiana*)<sup>6</sup> como inulina y fructo-oligosacáridos. El uso del bagazo como fuente de producción del polisacárido es una alternativa ecológica y rentable económicamente al maximizar el rendimiento del agave. Esto motiva la intención de la modificación de agavina descrita en este trabajo.

En el caso del agave azul (*Agave tequilana*) se han descrito características estructurales basadas en la derivatización de inulina, espectrometría de masas y RMN protónica y de Carbono-13 revelando así la presencia de glucosa como molécula interna en la cadena en vez de ser terminal de la misma, con una relación de una molécula de glucosa contra quince de fructosa, también es encontrada la presencia de enlaces  $\beta$  (2-6) lo que demuestra la existencia de ramificación en el polisacárido y con ayuda de la espectrometría de masas se determinó un grado de polimerización de 3 a 29 unidades monoméricas.<sup>12</sup> Debido a estos rasgos diferenciales, algunos autores la describen, no como inulina, sino como otro polisacárido distinto denominado agavina.<sup>12</sup>



.....  
**Figura 4.** Estructura de la agavina  
 propuesta por López y col. (2003)<sup>12</sup>

## 2.2.2. Aplicaciones

### 2.2.2.1. Usos en alimentos.

Debido a la longitud de cadena de la inulina, ésta tiene la capacidad de formar microcristales cuando se cizalla en agua o leche. Estos cristales no son perceptibles en la boca, pero interactúan para formar una textura cremosa y suave proporcionando una sensación en la similar a la grasa, por tanto la inulina se ha utilizado con éxito para reemplazar la grasa de varios alimentos como productos de panadería, rellenos, productos lácteos, postres congelados y aderezos, esto aunado al hecho de que la inulina a diferencia de otras fibras no contiene resabios que pueden hacer a los productos poco apetecibles, lo cual, la hace idónea para su uso en la formulación de alimentos bajos en grasa y altos en fibra. Si es añadida en



pequeñas cantidades puede contribuir a la concentración de fibra de la formulación sin afectar la viscosidad del producto.<sup>13</sup>

#### **2.2.2.2. Usos farmacéuticos.**

La inulina tiene varios usos potenciales en aplicaciones farmacéuticas, ya sea como aglutinante en formulaciones de comprimidos para estabilizar proteínas o para mejorar la disolución de fármacos lipófilos.<sup>14</sup>

#### 2.2.3. Efectos fisiológicos

La inulina tiene importantes propiedades fisiológicas como la actividad prebiótica, es decir, posee un efecto beneficioso sobre las poblaciones de bacterias intestinales.<sup>8</sup> Otro caso claro de esta actividad dietaria es visto a nivel de modelos biológicos en los cuales se inhibe el desarrollo de cáncer de colon, dicho efecto es causado por oligómeros de inulina (o fructo-oligosacáridos) generados por la digestión enzimática de la misma (solo el 11% es capaz de ser digerido).<sup>15</sup>

La inulina ha demostrado tener efectos sobre el metabolismo de lípidos tanto en el humano como en modelos animales, disminuyendo la concentración de triacilglicéridos en plasma sanguíneo, así como la concentración de colesterol.<sup>16</sup>

#### 2.2.4. Modificación de la inulina

La inulina, ha sido modificada químicamente de varias maneras para obtener compuestos biodegradables industrialmente importantes, a continuación se muestran algunos de ellos.<sup>17</sup>

*Tabla 1.* Modificaciones realizadas en inulina por vía química.

<b>Modificación</b>	<b>Capacidad que se añade a la inulina</b>	<b>Aplicación</b>
O-Carboxietilación.	Inhibición de cristalización de sales poco solubles, como CaCO <sub>3</sub> .	Se usa como vehículo de iones metálicos, agente de dispersión y fijador de cabello.
O-3-hidroxiimino-3-aminopropilación.	Quelación para iones de metales de transición, especialmente para Cu (II).	Agente quelante en tratamiento de agua.
Esterificación.	Propiedades surfactantes.	Agente de encolados textiles, pegamento de superficie en la industria del papel, y agente espesante en películas.
Carbamatilación.	Termoestabilidad.	Como termoestabilizador de columnas cromatográficas.

Las modificaciones anteriores se realizan a través de la formación de enlaces entre la inulina y compuestos nitrilados (que contienen un grupo CN) o bromados, adicionalmente algunas de ellas se realizan en medios como el DMSO, por lo cual ninguno de los productos de síntesis pueden ser usados en la industria alimentaria y por tanto la vía enzimática es una propuesta alentadora para la generación de inulina modificada con potencial uso en dicha industria.

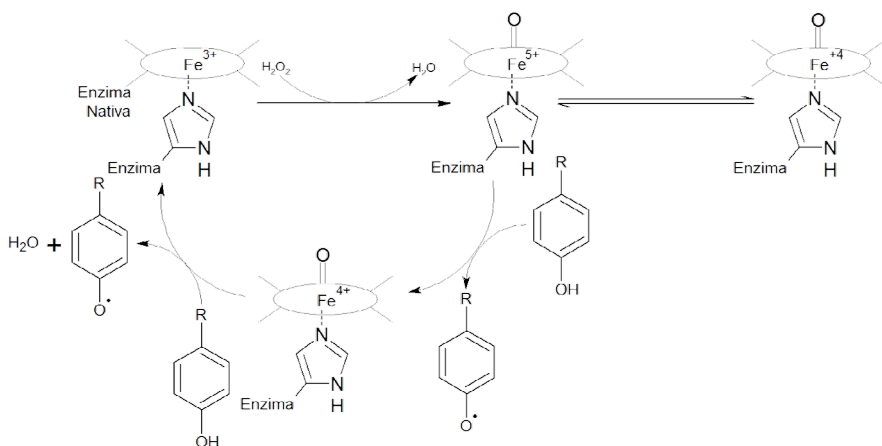
## 2.3. ENZIMAS

Una enzima, es una proteína que actúa como catalizador en una reacción biológica. Al igual que el resto de los catalizadores, la enzima no afecta la constante de equilibrio de la reacción, ésta solo actúa para disminuir la energía de activación, por lo que hace que la reacción ocurra más rápidamente. A diferencia de los catalizadores químicos, las enzimas usualmente son específicas en su acción.<sup>18</sup> Una subdivisión de las enzimas con actividad de oxidoreductasas son las peroxidasas, que juegan un papel importante en procesos de polimerización natural.<sup>19</sup> Muchas enzimas estudiadas hasta el momento son capaces de actuar fuera de su estado natural en reacciones *in vitro*. La mayoría de las enzimas comerciales provenientes de microorganismos son producidas vía clonación de algunas especies conocidas de géneros *Aspergillus* y *Escherichia*.<sup>20</sup> A pesar de las desventajas asociadas a la limitante de escalamiento en la producción de aquellas enzimas de origen vegetal comparadas con las microbianas, las de origen vegetal no están sujetas a regulaciones toxicológicas y son ampliamente aceptadas en industria alimentaria. La expresión efectiva de oxidoreductasas en otros microorganismos recombinantes es al día de hoy un reto científico de interés. Aunque la mayoría de las oxidoreductasas son de origen vegetal, también pueden ser de origen microbiano como la cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago*.<sup>21</sup>

### 2.3.1. La oxidoreductasa HRP

El rábano (*Armoracia rusticana*) es una planta perenne cultivada en las regiones templadas del mundo, sobre todo por el valor culinario de sus raíces. Adicionalmente *Armoracia rusticana* también es una rica fuente de peroxidasa, una enzima que utiliza peróxido de hidrógeno para oxidar una amplia variedad de compuestos orgánicos e inorgánicos. La producción de HRP se produce a una escala relativamente grande debido a los usos comerciales de la enzima, por ejemplo como un componente de kits de

diagnóstico y clínicos para inmunoensayos. La HRP es una enzima capaz de degradar el peróxido de hidrógeno en agua, esta enzima comprende un solo polipéptido de 308 residuos de aminoácidos, que contiene un centro de hierro (III) protoporfirina o normalmente conocida como el “grupo hemo”. El cual es esencial para la estructura e integridad funcional de la enzima.<sup>22</sup> Este anillo de porfirina, es el responsable de la catálisis de reacción, como se demuestra en la Figura 5.



.....  
 Figura 5. Ciclo catalítico de reacción en el centro activo de la HRP

El uso de esta enzima en la síntesis de modificados de polisacáridos ha mostrado resultados positivos, como es el caso de la modificación de quitosano con dodecil-galato,<sup>5</sup> síntesis en la cual existe una cierta analogía entre los polisacáridos inulina y quitosano, aunque este último posee grupos amino y los antioxidantes de tipo fenólico (dodecil-galato y TBHQ). Adicionalmente otros estudios demuestran la estabilidad de la enzima después de ser expuesta a mezclas de agua con alcoholes simples (metanol y etanol) hasta un 60% vol de alcohol.<sup>23</sup>

## 2.4. ANTIOXIDANTES

Existen múltiples maneras de definir a los antioxidantes, se pueden definir como “cualquier sustancia que cuando está presente en concentraciones bajas en comparación con la de un sustrato oxidable, retrasa significativamente o inhibe la oxidación de dicho sustrato”, o bien como “cualquier sustancia que retrasa, evita o elimina el daño oxidativo a una molécula específica”, también se pueden definir como “cualquier sustancia que destruye directamente las ROS o indirectamente actuando como un regulador de las defensas antioxidantes o inhibidoras de la producción de ROS”.<sup>24</sup>

Los radicales libres son átomos o moléculas con un electrón desapareado que es extremadamente reactivo (tal es el caso de las ROS), capaz de participar en reacciones rápidas que desestabilizan a otras moléculas y generan muchos más radicales libres. En las plantas y los animales estos radicales libres se desactivan mediante antioxidantes. Estos antioxidantes actúan como un inhibidor del proceso de oxidación, incluso a concentraciones relativamente pequeñas y por lo tanto tienen diversos papeles fisiológicos.<sup>25</sup>

Los antioxidantes, ya sean naturales o sintéticos, poseen una diferente capacidad de detener la oxidación, a esta capacidad se le conoce como poder antioxidante o actividad antioxidante, para determinarla se han usado diversas técnicas.<sup>26</sup>

Las técnicas descritas a continuación pertenecen a las de tipo espectroscópicas, es decir, van acorde con la ley de Lambert-Beer, en la cual existe una asociación directa entre la concentración y la absorbancia de un compuesto en solución.

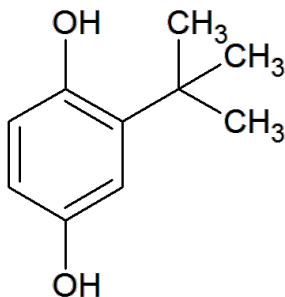
- **El método de DPPH:** El DPPH es un radical libre estable, debido a la deslocalización del electrón libre en toda la molécula. Así, el DPPH• no dimeriza, como sucede con la mayoría de los radicales libres. La deslocalización de la molécula de DPPH• desemboca en la aparición de un color púrpura, con una banda de absorción con un máximo alrededor

de 520 nm. Cuando el DPPH• reacciona con un donante de hidrógeno, la reduce a su forma DPPH, acompañada con la desaparición del color violeta. Por lo tanto, la disminución de la absorbancia depende linealmente de la concentración de antioxidante.

- **El método ABTS:** El catión radical ABTS ( $\text{ABTS}^{\bullet+}$ ), que absorbe a 743 nm (dando un color azul-verde), se forma por la pérdida de un electrón por átomo de nitrógeno del  $\text{ABTS}^{\bullet+}$ . En presencia de Trolox (o de otro antioxidante donador de hidrógeno), el átomo de nitrógeno interactúa con el átomo de hidrógeno, produciendo la decoloración solución. Es un análogo del DPPH en cuanto a fundamento.
- **El método de PFRAP (potencial de reducción de ferricianuro potásico):** Un aumento de la absorbancia puede ser correlacionada con la capacidad reductora de los antioxidantes. Los compuestos con capacidad antioxidante reaccionan con el ferricianuro de potasio ( $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ), para formar ferrocianuro de potasio ( $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ). Este último reacciona con tricloruro de hierro ( $\text{FeCl}_3$ ), produciendo ferrocianuro férrico ( $\text{Fe}_7\text{C}_{18}\text{N}_{18}$ ) o Azul de Prusia, que como su nombre lo indica, es un complejo de color azul, con una absorbancia máxima a 700 nm.
- **CUPRAC (poder antioxidante por reducción de ion cúprico):** los antioxidantes se mezclan con sulfato de cobre (II) ( $\text{CuSO}_4$ ) y neocupróina (2,9-dimetil-1,10-fenantrolina). Después de 30 minutos se mide la absorbancia a 450 nm. En el ensayo, el Cu (II) se reduce a Cu (I) a través de la acción de electro donación por parte de los antioxidantes.

### 2.4.1. El antioxidante TBHQ

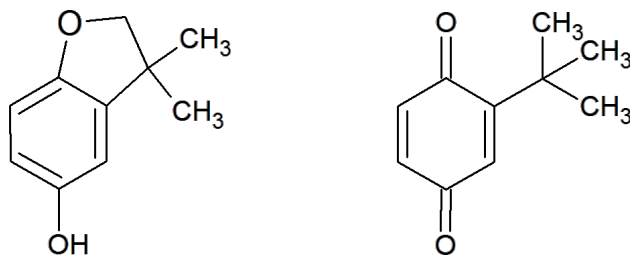
La TBHQ es un antioxidante sintético sólido con cierta solubilidad en grasas y aceites y en un número de disolventes de calidad alimentaria, pero es prácticamente insoluble en agua.<sup>27</sup> Su estructura molecular se describe en la Figura 6.



.....  
Figura 6. Estructura molecular de TBHQ

La TBHQ, estabiliza y conserva la frescura, valor nutritivo, sabor y color de los productos alimenticios de origen animal.<sup>28</sup> En 2004, la EFSA (European Food Safety Authority) publicó un dictamen científico para revisar el impacto de este antioxidante en la salud humana y afirmó que no había ninguna prueba científica de su capacidad carcinogénica a pesar de la existencia de datos contradictorios en la literatura previa. Señalaron que los perros son la especie más sensible y asignó una Ingesta Diaria Admisible (IDA) de 0–0,7 mg/kg de peso corporal/día.<sup>27</sup> Sin embargo, existen todavía muchas versiones contradictorias en cuanto al uso de este compuesto, por lo cual el encontrar una manera de usarlo sin que tenga un riesgo potencial es de vital importancia.

Adicionalmente, este antioxidante ha sido estudiado para comprender su mecanismo de acción, así como los productos secundarios que se pueden generar en condiciones oxidantes, dicho estudio demostró la generación de 2,2–dimetil–2,3–dihidro–benzo (b) furano y 2–tert–butil–p–benzoquinona (Fig. 5), de los cuales se desconoce los posibles efectos adversos en la salud humana.<sup>28</sup>



*Figura 7.* Productos de la oxidación de TBHQ: 2,2-dimetil-2,3-dihidro-benzo furano (izquierda) y 2-tert-butil-p-benzoquinona (derecha)

## 2.5. TÉCNICAS ANALÍTICAS

### 2.5.1. GPC

La GPC es una cromatografía de líquidos que separa a los polímeros polidispersos en fracciones por tamizado mediante un gel (frecuentemente poliestireno con enlaces cruzados). El gel funciona como fase estacionaria, se puede obtener comercialmente en una gran variedad de tamaños de poro (1 a 106 nm). Puesto que las moléculas pequeñas penetran más fácilmente en las partículas de gel, las fracciones de más alto peso molecular se separan antes, de esta manera, la GPC separa las fracciones de acuerdo con su tamaño.<sup>29</sup>

### 2.5.2. RMN

La RMN es un fenómeno físico basado en las propiedades mecánico-cuánticas de los núcleos atómicos. A su vez, RMN refiere al conjunto de métodos científicos que usan esta propiedad para estudiar moléculas (espectroscopía de RMN), macromoléculas (RMN biomolecular), también tejidos y organismos completos (imagen por resonancia magnética). El fenómeno de RMN se presenta en los átomos cuyos núcleos poseen espín nuclear impar y a consecuencia de éste generan un momento magnético; de tal modo que cuando estos se someten a un campo magnético fuerte, los núcleos se orientan dentro del campo, a cada orientación corresponden niveles energéticos particulares.<sup>30</sup> La RMN se utiliza para estudiar una amplia



variedad de núcleos con números de spin impar o bien isótopos estables con número de spin impar, como  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{31}\text{P}$ . Útiles sin duda son la RMN protónica ( $^1\text{H}$ ) y la de Carbono-13 ( $^{13}\text{C}$ ), ya que el Carbono y el Hidrógeno son los componentes mayoritarios de las moléculas orgánicas.<sup>18</sup> En un compuesto dado, cada átomo se encuentra en un ambiente definido que influye sobre el campo electromagnético aplicado a dicho núcleo, lo que genera, que al someterse al campo magnético, cada uno observe un comportamiento particular que se define presentando señales diferentes en un espectro de RMN. Parámetros tales como el desplazamiento químico, la multiplicidad de señales, las constantes de acoplamiento y en dado caso la integración, dan lugar a la interpretación del espectro y permiten analizar la estructura de la molécula.<sup>30</sup>

En la espectroscopía de RMN, el estándar que es a menudo usado es tetrametilsilano,  $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$  o TMS. El desplazamiento químico es un indicador muy preciso del entorno químico alrededor de un núcleo. Por ejemplo, el desplazamiento químico de hidrógeno de un átomo de hidrógeno  $\text{CH}_2$  junto a un Cl será diferente que el de una  $\text{CH}_3$  con un Cl lado de la misma,<sup>31</sup> por tanto hace a esta técnica como una técnica necesaria para la identificación de diversos compuestos tales como los presentes en este trabajo.

### 2.5.3. Espectroscopía infrarroja

La espectroscopía infrarroja es la interacción de la radiación electromagnética de frecuencia de región infrarroja con la materia. La energía total que poseen los compuestos incluyen la llamada energía de traslación, que permite a los compuestos desplazarse en ciertos espacios; la energía rotacional que permite a los compuestos rotar a través de su centro de masa; la energía vibracional, que representa la suma de todas las vibraciones que pueden tener las diferentes uniones químicas, y la energía de unión llamada energía electrónica. La frecuencia de vibración de las diferentes uniones químicas depende de los átomos involucrados en la vibración y de la constante de fuerza de cada unión, por lo que en un compuesto se tendrán tantas vibraciones diferentes como uniones químicas vibrando a

frecuencias diferentes. La energía, frecuencias y longitudes de onda que posee la radiación del infrarrojo medio coincide con la energía que utiliza cada unión química para vibrar, de modo que, cuando ésta incide sobre ellas, es absorbida por las uniones químicas provocando que continúen vibrando a la misma frecuencia y en la mayor amplitud, pero ahora en niveles cuánticos superiores. Una unión química vibrando sólo podrá absorber radiación IR sí la vibración provoca un momento dipolo que varía en la misma frecuencia de la radiación infrarroja absorbida.

Los espectros de infrarrojo son un gráfico donde se representa en las abscisas, la radiación infrarroja absorbida por las uniones químicas en términos de números de onda de la radiación, que es la inversa de la longitud de onda (de 4000 a 200  $\text{cm}^{-1}$ ) y en las ordenadas la absorbancia de las mismas. La espectroscopía infrarroja está considerada como prueba de identidad. Si se comparan los espectros de infrarrojo de un compuesto registrado a una cierta concentración con el de una muestra patrón del mismo compuesto a misma concentración, los dos espectros serán idénticos, sobre todo en la zona del espectro llamada de las huellas digitales (1500 a 200  $\text{cm}^{-1}$ ).<sup>32</sup>

#### 2.5.4. Termogravimetría

La termogravimetría es una técnica para evaluar el cambio en la masa de una muestra en función de la temperatura. En este análisis se usa una balanza altamente sensible para seguir la variación de peso de un polímero sujeto a un barrido de temperaturas.<sup>33</sup>

## 2.6. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA

La MIC se define como la concentración más baja de un agente antimicrobiano que inhibe el crecimiento visible de un organismo después de la incubación (este periodo se extiende por organismos tales como los anaerobios, que requieren incubación prolongada para el crecimiento).

La MIC se considera el “patrón de oro” para determinar la susceptibilidad de los organismos a los antimicrobianos y por lo tanto se utiliza para juzgar el desempeño de todos los otros métodos de pruebas de sensibilidad. La MIC se utiliza en los laboratorios de diagnóstico para confirmar alguna resistencia inusual, para dar una respuesta definitiva cuando existe un resultado en el límite de sensibilidad de otros métodos de pruebas, o cuando los métodos de difusión en disco no son apropiados, por ejemplo, en la determinación de la susceptibilidad de los estafilococos coagulasa–negativos a la teicoplanina.

El intervalo de concentraciones de antibióticos utilizadas para la determinación de la MIC es universalmente aceptado para ser duplicado en etapas de dilución hacia arriba y hacia abajo a partir de 1 mg/L cuando sea necesario.<sup>34</sup>

## 2.7. ESCHERICHIA COLI

La *Escherichia coli* o *E. coli* como es comúnmente conocida, es un microorganismo encontrado de manera natural en el tracto intestinal de animales y humanos, esta bacteria cumple con papeles vitales en la digestión y ayudan a la absorción de vitaminas importantes para el cuerpo. Inclusive previene el crecimiento de especies bacterianas peligrosas. Existen cientos de cepas de *E. coli* siendo la mayoría de estas amigables para nosotros. Otro dato a resaltar, es que este microorganismo es de fácil crecimiento y manipulación en el laboratorio.

La *E. coli* fue descubierta en el siglo XIX por el bacteriólogo alemán Théodor Escherich, encontrándola en el colon humano y vislumbrando su importancia en la digestión, así como su potencial peligro al poder ser causante de enfermedades como la diarrea por su ingestión en alimentos.<sup>35</sup>

Morfológicamente la *E. coli* es una bacteria Gram–negativa, un bacilo que se encuentra comúnmente en el intestino grueso de los animales de sangre caliente (endotérmicos). Las cepas inofensivas son parte de la flora normal del intestino, y pueden beneficiar a sus anfitriones mediante la producción de vitamina K2.<sup>36</sup>

## 3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### 3.1. HIPÓTESIS

Es factible la modificación enzimática de la agavina con TBHQ, como resultado se obtendrá un nuevo compuesto que posea la capacidad antioxidante heredada de TBHQ y el comportamiento hidrofílico y actividad microbiana propios de la agavina.

### 3.2. OBJETIVO GENERAL

Establecer las condiciones para la inserción de TBHQ en la agavina, usando la peroxidasa HRP como catalizador.

### 3.3. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Caracterización de los reactivos usados.
2. Sintetizar vía enzimática un modificado de agavina con TBHQ en varias condiciones de reacción.
3. Caracterización de los materiales funcionales mediante diversas técnicas analíticas (RMN, IR, termogravimetría).
4. Determinar la presencia de actividad antioxidante por el método espectrofotométrico de DPPH.
5. Evaluación de la actividad microbiana de TBHQ, agavina y agavina modificada por ensayos de crecimiento de una cepa de *E. coli*.

## 4. METODOLOGÍA

### 4.1. CARACTERIZACIÓN DE REACTIVOS

#### 4.1.1. Determinación de peso molecular de agavina por GPC

Para determinar el peso molecular de la muestra de agavina comercial (empresa Nektli marca Metlin) por GPC se utilizó un equipo de HPLC conectado a un detector de dispersión de Luz (Light Scattering Evaporative) EL-PLS 1000 utilizando una columna PLgel 10 $\mu$ m MIXED-B LS de Polymer Labs utilizando DMSO como fase móvil y un kit de polisacáridos de pululano para hacer la curva de calibración. El polisacárido pululano utilizado como estándar de calibración. Los estándares van desde 180 g/mol que corresponde a la unidad monomérica (glucosa) hasta 708, 000 g/mol. El cálculo de los pesos moleculares se obtuvo utilizando un GPC Software Currus<sup>TM</sup> de Polymer Labs.

#### 4.1.2. Caracterización de la agavina por RMN

Se pesaron 60 mg de agavina y se disolvieron en 700  $\mu$ L de agua deuterada. El espectro de RMN protónica se realizó en un espectrómetro Broker AC 200 a 200 Mhz para  $^1\text{H}$  a 298 K. Se usó la misma muestra para  $^{13}\text{C}$ , leyéndolo en un Varian 400-NMR.

#### 4.1.3. Caracterización de TBHQ por RMN

Para los espectros protónico y de carbono se usaron condiciones similares a las de la agavina, disolviendo la muestra en cloroformo deuterado.

#### 4.1.4. Determinación de actividad enzimática de HRP por ABTS

Para esta determinación, se prepararon las siguientes soluciones:

- ▶ 20 mL de buffer de fosfato de potasio a pH 5.0 (13.6 mg/mL de fosfato monobásico disuelto en agua destilada).
- ▶ 25 mL de peróxido de hidrógeno al 0.3% (p/p).
- ▶ 10 mL de ABTS 9.1 mM (5.0 mg por mL de buffer de fosfato de potasio). Usada al momento.
- ▶ 5 mL de solución stock de 2 mg/mL de HRP (Sigma–Aldrich 5 KU) en buffer de fosfato de potasio.
- ▶ Dilución 1:10 de la solución anterior. (Hecha al momento del ensayo).

Se pipetearon los siguientes volúmenes en una celda de plástico:

Tabla 2. Volúmenes de las soluciones para la determinación de actividad de HRP

Reactivo	Volumen (mL)	
	Blanco	Muestra
Solución de ABTS	2.90	2.90
Solución H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0.3%	0.10	0.10
Buffer	0.005	—
Dilución de HRP	—	0.005

Se mezclaron las soluciones por inversión de celda y, al instante, se leyó la absorbancia de la mezcla resultante a 405 nm contra blanco por 2 minutos a intervalos de 5 segundos. Los datos se graficaron (tiempo contra absorbancia) tomando solamente aquellos que presentaran la velocidad inicial de reacción (pendiente con correlación lineal al inicio del tiempo de medición), para determinar la actividad se usó la Ecuación 1:

Ecuación 1

$$AE = \frac{m \cdot 3.005 \cdot 10}{36.8 \cdot 0.01 \cdot 1}$$

Donde  $m$ , es la pendiente obtenida de la gráfica temporal (en  $\text{min}^{-1}$ ); 3.005, es el volumen final (en mL) de la reacción; 10 es el factor de dilución usado en la solución de HRP; 36.8 es el coeficiente de extinción milimolar del ABTS oxidado (con unidades de  $\text{mL}/\mu\text{mol}\cdot\text{cm}$ ) a 405 nm; 0.01 es la masa (en mg) de la enzima usada; 1 pertenece a la longitud de celda (expresada en cm).

## 4.2. MODIFICACIÓN DE AGAVINA

### 4.2.1. Materiales

Se utilizó agavina obtenida de la empresa Nekutli marca Metlin. TBHQ (Aldrich, E. U. A). Peroxidasa, Tipo II de rábano (Sigma–Aldrich, E.U.).  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Sigma–Aldrich, E. U. A.) al 50%. Etanol absoluto.

### 4.2.2. Equipos

A continuación se enumeran algunos de los equipos usados: Balanza Analítica (Marca Ohaus, modelo AP2105, Suiza), agitador magnético en forma de cápsula, parrilla de agitación magnética (marca Thermo Scientific, modelo Cimarec, E. U. A.), embudo de adición, sistema de filtración Millipore ©, liofilizadora (marca Heto FD 1.0), bomba Vacuubrand GMBH, Type: RZ 2. Ultracongelador REVCO (a  $-80^\circ\text{C}$ ), extractora de disolventes. Material de vidrio diverso.

### 4.2.3. Reacción

Se preparó una solución de agavina al 5% (m/v), se sometió a agitación durante 2 minutos en un matraz de bola hasta solubilizar completamente la muestra de inulina. En todas las síntesis se usaron 10 mL de esta solución. Se probaron cinco condiciones para la modificación de agavina con diferentes concentraciones de TBHQ (en todos los casos el antioxidante fue disuelto en 2.5 mL de etanol) expresados en la siguiente tabla:



.....  
**Tabla 3.** Condiciones de modificación de la agavina.

Condición	A1			A2	B1	B2	C		
	HRP:Sust (mg:mg)	1:250			1:250	1:250		1:500	
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> :HRP (mL:mg)	0.3:1*			0.3:1*	1.7:1	0.6:1	0.6:1		
M. ad. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Embudo de adición a goteo mínimo						30 µL cada 3 min		
Tag (min)	0			45	0		0		
[TBHQ] (mM)	12	24	48	12	24		24	32	48
Notación de muestras	A12.A	A24.A	A48.A	A12.B	B24.A	B24.B	A24.A	A32.A	A48.A

HRP:Sust: Proporción Enzima:Sustrato total (masa de agavina + masa de TBHQ); H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:HRP: Proporción Peróxido de hidrógeno: Enzima; M. ad. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Método de adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; Tag: Tiempo de agitación agregado después de adición de peróxido; [TBHQ]: concentración de antioxidante en la mezcla de reacción. \*La proporción expresada pertenece a una relación Peróxido: Sustrato fenólico (TBHQ).

#### 4.2.4. Purificación de polímeros

Para la purificación de los materiales, las soluciones resultantes fueron congeladas por 3 horas en el Ultracongelador REVCO, posteriormente se dejaron en la extractora de solventes durante 4 horas, con el fin de remover el etanol de las soluciones. Una vez removido, se liofilizaron las muestras por 24 horas.

En el caso de reacciones que tuvieran presencia de precipitado, antes de ser congeladas fueron tratadas por el sistema de filtración Millipore®, una vez separados los precipitados éstos fueron secados a vacío y los sobrenadantes fueron sometidos al mismo proceso que las soluciones que no presentaron precipitación.

### 4.3. PRODUCTOS DE OXIDACIÓN DE TBHQ

Con el fin de comprender el comportamiento de la TBHQ en el medio de reacción, se sometió a una muestra del antioxidante a las mismas condiciones de reacción de la muestra A12.A, con la ausencia de agavina en esta mezcla, el precipitado resultante fue analizado por RMN protónica y

de Carbono en las mismas condiciones que la TBHQ, esta vez usando al DMSO-d (dimetil-sulfoxido deuterado) como disolvente.

#### 4.4. CARACTERIZACIÓN DE LOS MATERIALES

Los ensayos de RMN, AFTR-IR y Termogravimetría fueron realizados con la ayuda de la Unidad de Servicios y Apoyo a la Investigación (USAI).

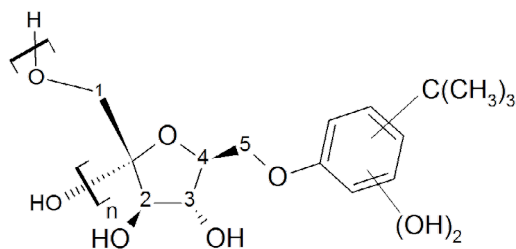
##### 4.4.1. RMN

Al igual que con la agavina nativa se pesaron 60 mg de los polímeros y se disolvieron en 700  $\mu$ L de agua deuterada, la lectura de estas muestras se realizó en los equipos antes mencionados. Los grados de incorporación fueron determinados por la Ecuación 2:

.....  
Ecuación 2

$$\% \text{ Incorporación} = \frac{I_{Ha-Hc}}{\frac{9}{\frac{I_{H1-H5}}{7}}} * 100$$

Donde  $I_{Ha-Hc}$  representa la intensidad de la señal asignada a los hidrógenos del grupo ter-butilo propio de la TBHQ, el número 9 representa el número de hidrógenos asociados a esa señal, mientras que  $I_{H1-H5}$  representa la intensidad de la señal de los hidrógenos medibles y cuantificables por RMN- $^1$ H de las unidades de repetición de la inulina, dichos hidrógenos pueden ser localizados en la estructura de la Figura 8, donde las numeraciones indican los carbonos con hidrógenos enlazados, 1 y 5 presentan dos hidrógenos, mientras que de 2 a 4 presentan uno, dando un total de 7 hidrógenos.



.....  
 Figura 8. Estructura molecular aproximada del modificado de agaveina.

#### 4.4.2. FTIR-ATR

Se utilizó un espectrómetro de IR (marca Perkin Elmer ATR-FTIR, modelo Spectrum 100, EUA), colocando en éste la muestra sólida pulverizada y, con el cual se obtuvieron los espectros en un rango de onda de 500 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ , esta técnica y las sucesivas sólo fueron aplicadas en los polímeros de las condiciones B1, B2 y C excluyendo a los precipitados de este último.

#### 4.5. DETERMINACIÓN DE PODER ANTIOXIDANTE DPPH

Se prepararon soluciones de las diferentes muestras en concentraciones de 40 g/L de las cuales se tomaron 75  $\mu\text{L}$  de solución, cada polímero fue analizado por triplicado, dicho volumen se colocó en celdas de plástico y se añadieron 2.9 mL de solución metanólica de DPPH 0.025 g/L.<sup>37</sup> La absorbancia fue leída contra blanco de metanol a 517 nm en un espectrofotómetro UV-Visible Lambda 2S (Perkin Elmer), a intervalos de 5 segundos por 5 minutos. Los datos fueron tratados con la Ecuación 3 para obtener el porcentaje de inhibición del radical DPPH:<sup>33, 37</sup>

.....  
 Ecuación 3

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} * 100$$

Donde  $A_0$  representa la absorbancia del estándar corregido preparado bajo las mismas condiciones pero sin muestra y  $A_1$  es la absorbancia de las muestras.

## 4.6. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

### 4.6.1. Reactivos y microorganismo

Agar LB Broth Sigma–Aldrich, Caldo LB Broth Sigma–Aldrich, Solución salina al 0.9%, el microorganismo usado es la *Escherichia coli* NRRLB–14218 colección USDA–ARS.

### 4.6.2. Preparación del inóculo

Se inoculó una asada de *E. coli* conservado en glicerol en 5 mL de caldo LB Broth, éste fue incubado a 30°C por 24 horas para obtener una cepa activa.

### 4.6.3. Ensayo de MIC

Para el ensayo se utilizaron soluciones del polímero C48.A, agavina y TBHQ, las concentraciones de dichas soluciones fueron de 0.05, 0.1, 0.3, 0.5, 1 y 3 g/L, a partir de una solución de stock de 20 g/L se realizaron preparaciones como se muestran a continuación:

Tabla 3. Diseño experimental para MIC

Solución 20 g/L (µL)	Caldo LB Broth (µL)	Concentración final de material (g/L)
7.5	1992	0.05
15	1985	0.1
45	1955	0.3
75	1925	0.5
150	1850	1
450	1550	3

A cada tubo (incluido un blanco control) le fueron inoculados 50 µL de *E. coli*, los cuales fueron incubados a 30 °C por 24 horas. Posteriormente se hicieron diluciones de cada tubo ( $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  y  $10^{-7}$ ), de las

cuales se tomaron 10 µL que fueron colocados en la superficie de una placa de agar LB Broth, se dejó en reposo la placa con el fin de que el agar absorbiera la muestra, dicho agar se incubó a 30 °C por 24 horas y fue sometido a conteo de UFC, el resultado fue multiplicado por 100 y por el inverso de la concentración con el fin de determinar las UFC por mililitro de caldo LB Broth. Se calculó el porcentaje de inhibición con la siguiente ecuación:

.....  
*Ecuación 4*

$$\%Inhibición\ bacteriana = \frac{(UFC_c - UFC_a) * 100}{UFC_c}$$

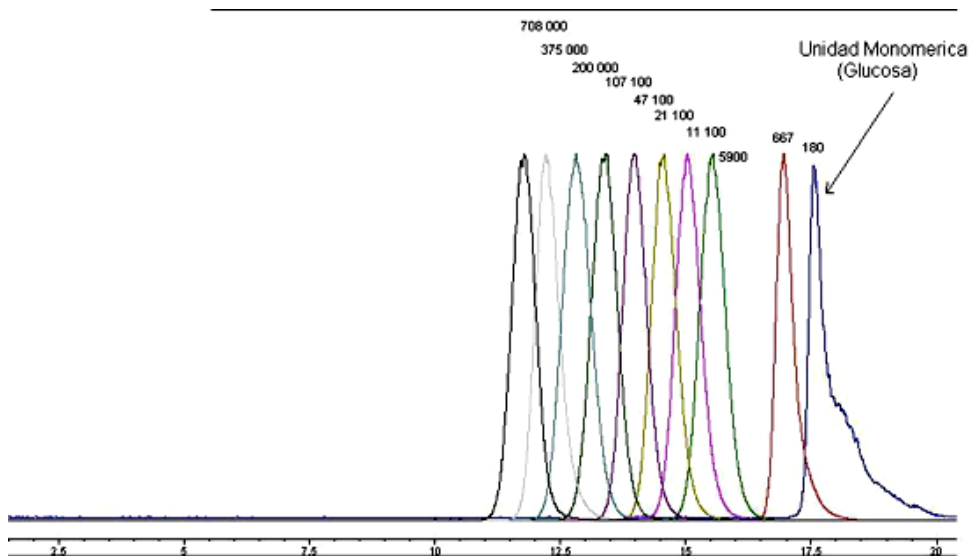
Donde: UFC<sub>c</sub> son las unidades formadoras de colonias encontradas en el control; UFC<sub>a</sub> son las unidades formadoras de colonias contabilizadas en un caldo adicionado con algún polímero o el antioxidante.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

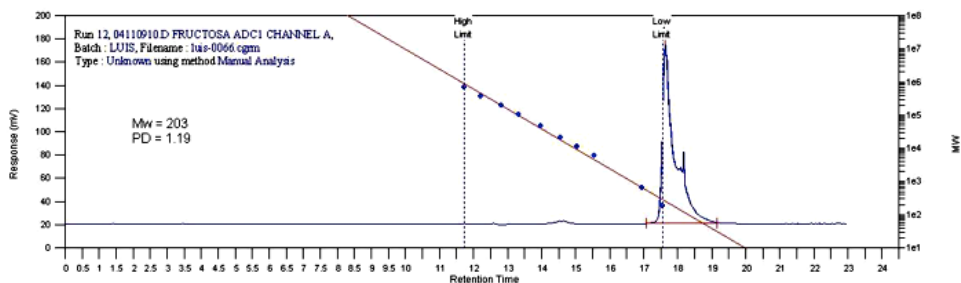
### 5.1. CARACTERIZACIÓN DE REACTIVOS

#### 5.1.1. Caracterización de agavina por GPC

El cromatograma compuesto que dio lugar a la curva de calibración de los estándares de pululano se muestra en la Figura 9, estándares que fueron usados para la caracterización de agavina. Cabe decir que la muestra comercial de agavina usada en este trabajo sufrió procesos de purificación y aislamiento desde la fuente de la agave, por lo que sus características estructurales difieren de aquella en su estado natural. En la Figura 10 se muestra el cromatograma de fructosa indicando los puntos de la calibración, como comparativo de tiempo de retención de una unidad monomérica.

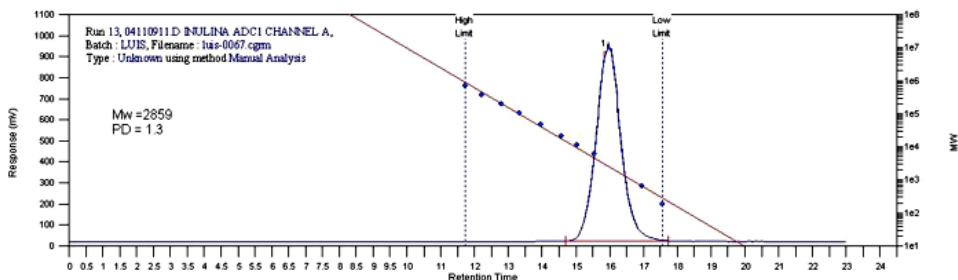


.....  
**Figura 9.** Cromatograma de los estándares de Pululano. Los números indican el peso molecular de los estándares.



.....  
 Figura 10. Cromatograma de fructosa comparado con la curva de calibración

El peso molecular promedio en número ( $M_n$ ) de la agavina usada en este estudio fue de 2,859 g/mol (Figura 10) con PDI de 1.3, el cual es relativamente bajo. Partiendo del hecho de que la fructosa tiene un peso molecular de 180 g/mol se puede inferir que la agavina tiene un promedio de 16 unidades de fructosa incluyendo la posibilidad de tener unidades de glucosa en los extremos, todo esto es concordante con la bibliografía en cuanto a inulina.<sup>9</sup> En todo caso cabe recalcar que la GPC es una técnica aproximativa y referente a estándares de estructura molecular diferente al analito. Además, el hecho de que la inulina proveniente de agave es ramificada<sup>12</sup> genera un error en la medición, puesto que la técnica se basa en la permeación a través de la columna porosa de un volumen hidrodinámico del analito en el solvente.



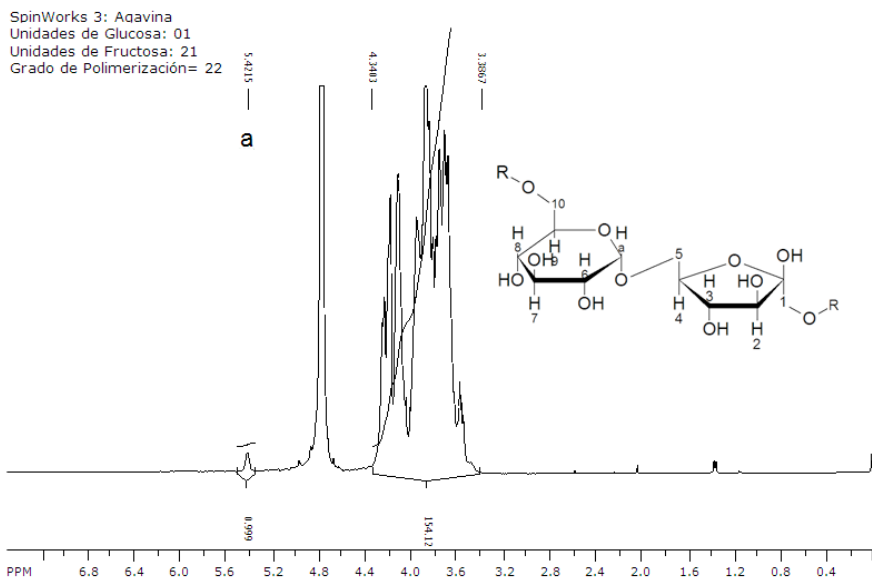
.....  
 Figura 11. Cromatograma de la muestra de inulina de agave comparado con la curva de calibración

### 5.1.2. Caracterización de agavina y TBHQ por RMN

Con el fin de poseer un espectro de referencia, se caracterizó por espectroscopía de RMN protónica y de Carbono a la agavina (Figuras 12 y 13), ésta presenta las señales típicas de la inulina de agave. En el caso del  $^1\text{H}$ -RMN, existe una señal a  $\delta$  5.42 ppm respecto al TMS, la cual corresponde a la variación generada por la presencia de una molécula de glucosa interna en la cadena de inulina, específicamente hablando, del hidrógeno presente en el Carbono anomérico de la glucosa (Ha).<sup>12</sup> Además se presentan señales altamente sobrepuestas en la región de  $\delta$  3.40 a  $\delta$  4.34 ppm las cuales corresponden a los 13 hidrógenos restantes de la glucosa y de la fructosa (H1 a H10), adicionalmente la integración de las señales a  $\delta$  5.42 ppm y las de  $\delta$  3.40 a 4.34 ppm (1.00 y 154.13 respectivamente) determinan un grado de polimerización de 21 unidades de fructosa, con una glucosa interna, es decir 22 unidades.

El contraste de resultados entre la técnica de GPC y RMN- $^1\text{H}$ , puede deberse a que la primera que dictamina 16 unidades de polimerización, lo determina a través de un tamizado molecular, es decir, que moléculas de un mismo tamaño pero diferente peso podrían llegar a pasar con la misma velocidad, esto ocurre en el caso de la agavina, la cual es ramificada, lo que le confiere un tamaño más compacto que una inulina lineal. Otra fuente de error podría deberse al uso de estándares de Pullulano que es similar más no equivalente a la inulina, lo que puede acarrear un error experimental.





.....  
**Figura 12.** Espectro  $\text{RMN}^1\text{H}$  de agavina.

Por su parte, el RMN de Carbono de la agavina presenta cuatro zonas definidas, las cuales han sido caracterizadas con anterioridad en el trabajo de López y colaboradores (2003).<sup>12</sup>

- Señales de C-2 de fructosa de  $\delta$  103.94 ppm a  $\delta$  103.16 ppm, la existencia de 4 señales demuestra la presencia de 4 fructosas diferentes.
  - a)  $\delta$  103.94 ppm demuestra la existencia de un enlace  $\beta$  (2-6) entre unidades de fructosa.
  - b)  $\delta$  103.76 ppm aparece debido a otro enlace  $\beta$  (2-6), esta vez entre una unidad fructosa y una unidad glucosa.
  - c) La señal de  $\delta$  103.63 ppm pertenece a la unión  $\beta$  (2-1) entre dos fructosas.

- d)  $\delta$  103.16 ppm pertenece al Carbono-2 de la unidad de fructosa terminal de la cadena.
- e) Como caso excepcional, en  $\delta$  91.95 ppm, dicha señal no pertenece a fructosa, esta señal existe debido al Carbono-1 proveniente de una glucosa interna de cadena.
- Las dos señales existentes en  $\delta$  81.07 ppm y 80.21 ppm (f y g) pertenecen al Carbono-5 de la Fructosa en sus dos formas existentes, la primera, pertenece a la forma de fructosa en enlace  $\beta$  (2-1) y la segunda a la fructosa en enlace  $\beta$  (2-6).
- Existen diversas señales entre  $\delta$  76.2 y  $\delta$  67.7 ppm, pertenecientes a las señales de los Carbonos-3 y 4, sin embargo, estas no contribuyen a la identificación de los enlaces en el polímero.
- La última región ( $\delta$  63.87 a  $\delta$  60.45 ppm) pertenecen a los Carbonos 1 y 6 de los residuos de Fructosa y Glucosa.
  - h) A  $\delta$  63.87 ppm se obtiene la señal de C-6 de Glucosa en un enlace  $\beta$  (2-6).
  - i) Por su parte en  $\delta$  63.32 ppm se obtiene la señal del mismo átomo, pero esta vez es el perteneciente a una Fructosa terminal.
  - j) En el caso de los enlaces  $\beta$  (2-6) de fructosil-fructosa, su señal aparece a  $\delta$  62.23 ppm.
  - k) La presencia de la señal  $\delta$  60.45 ppm, pertenece al Carbono-1 del enlace  $\beta$  (2-1).
  - l) Mientras que a 59.99 ppm, se obtiene la señal del mismo Carbono, pero esta vez en el enlace  $\beta$  (2-6), que en este caso se encuentra hidroxilado y no O-sustituido.

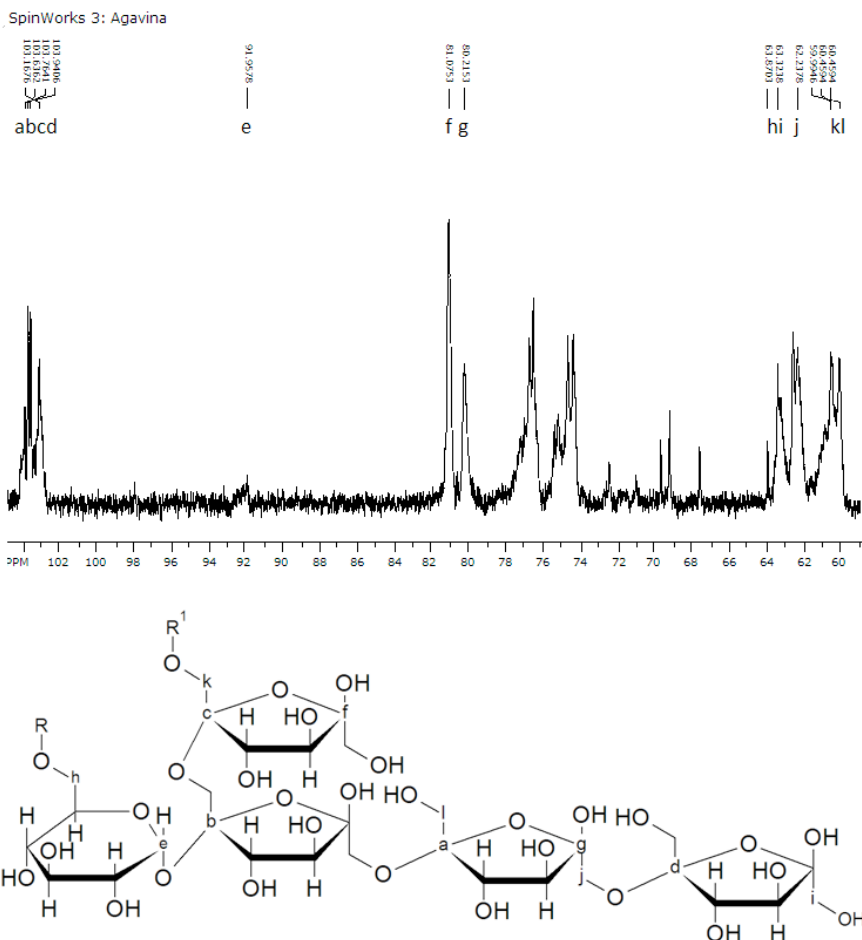
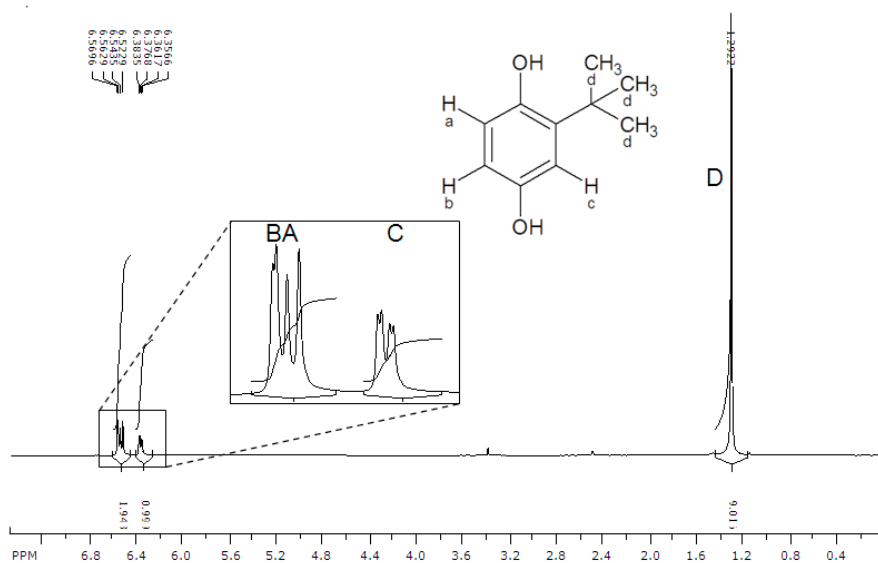


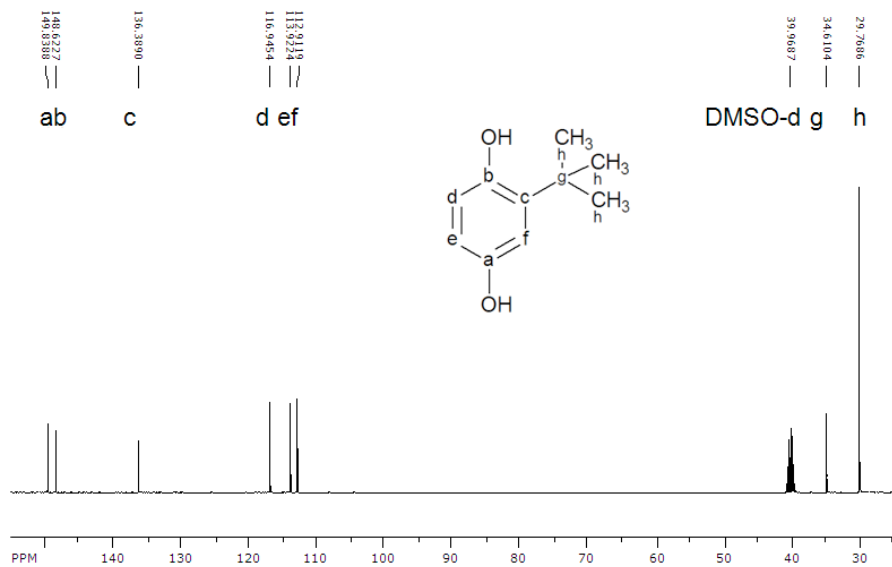
Figura 13. Espectro RMN-<sup>13</sup>C (arriba) y estructura (abajo) de la agavina

En cuanto a la TBHQ, en el RMN-<sup>1</sup>H (Figura 14) se obtuvieron 3 señales de Hidrógenos, 2 en forma de dobletes ( $\delta$  6.57 ppm, 6.56 ppm y  $\delta$  6.54 ppm, 6.52 ppm) pertenecientes a los Hidrógenos aromáticos vecinos de la estructura (Hb y Ha respectivamente) y un doblete de dobletes en la región de  $\delta$  6.38 ppm a  $\delta$  6.35 ppm la cual pertenece al Hidrógeno aromático (Hc) ubicado entre el grupo ter-butilo y el hidroxilo, por último, se posee una señal intensa a  $\delta$  1.29 ppm, perteneciente a los 9 hidrógenos del grupo

ter-butilo, esto es comprobable ya que la integración entre esta señal y el doblete de dobletes, genera la relación 1:9. La estructura queda confirmada con el RMN<sup>-13</sup>C (Figura 15), donde los 6 desplazamientos químicos ubicados entre  $\delta$  149.83 ppm y  $\delta$  112.91 ppm pertenecen a los 6 carbonos del anillo aromático de la TBHQ, mientras que las señales halladas en  $\delta$  34.61 y  $\delta$  29.76 ppm pertenecen al carbono cuaternario y los carbonos metílicos del grupo ter-butil.



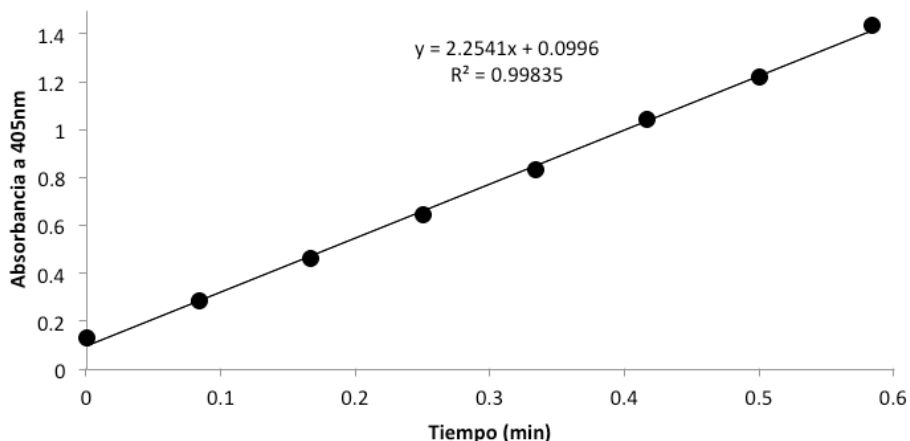
.....  
**Figura 14.** Espectro RMN<sup>-1</sup>H de TBHQ (Valores de integración: BA=1.94 y C=0.99)



.....  
*Figura 15.* Espectro  $\text{RMN}^{-13}\text{C}$  de TBHQ.

### 5.1.3. Medición de la actividad enzimática de la HRP

En el caso de la determinación de la actividad enzimática de la HRP, se obtuvo la siguiente curva temporal:



.....  
Figura 16. Curva temporal de actividad de HRP.

Con base en la Ecuación 1, se determinó que la actividad enzimática específica de la HRP es de 184.06 U/mg de enzima.

## 5.2. PRODUCTOS DE OXIDACIÓN DE LA TBHQ

Como se explicó con anterioridad, el fin de caracterizar a la oxidación de la TBHQ sirvió para comprender su comportamiento en las condiciones de reacción, el resultado de un “blanco” (mezcla de reacción sin agavina) fue un sólido de color púrpureo insoluble en agua. Dicho sólido fue caracterizado por RMN protónica (Figura 17) y  $^{13}\text{C}$  (Figura 18). Tanto el RMN- $^1\text{H}$  como el  $^{13}\text{C}$  demuestran la existencia de TBHQ junto con el producto de oxidación, en el caso de la resonancia protónica las señales a  $\delta$  1.27, 6.35 y 6.50 ppm,

son propias del TBHQ no oxidado (Figura 14), así como lo son las  $\delta$  29.26, 34.46, 112.89, 113.90, 116.92, 148.56 y 149.86 ppm en el RMN- $^{13}\text{C}$ .

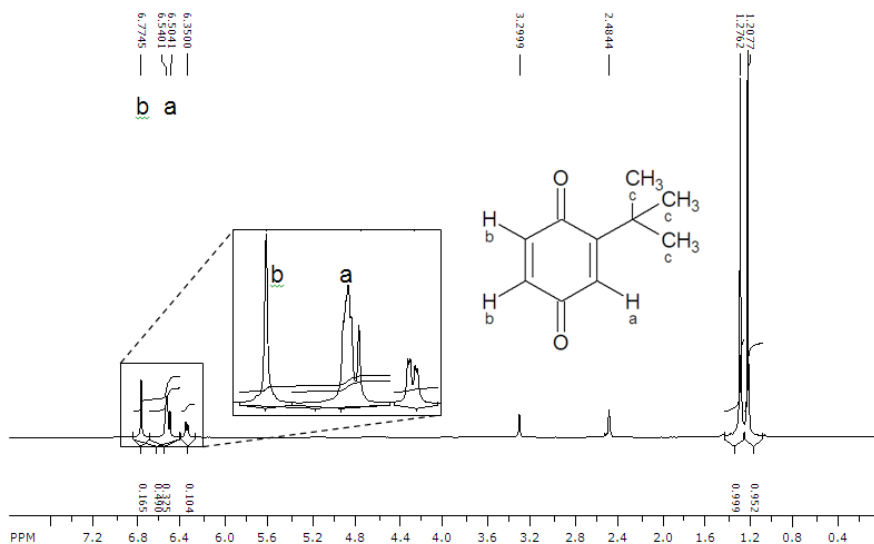


Figura 17. Espectro RMN- $^1\text{H}$  de producto de oxidación de TBHQ.

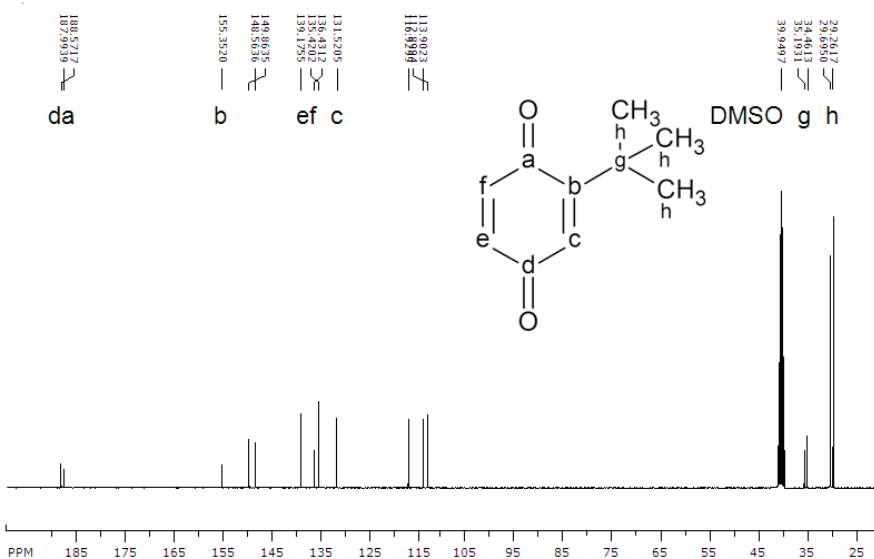


Figura 18. Espectro RMN- $^{13}\text{C}$  de producto de oxidación de TBHQ.

Las señales restantes de estos espectros revelan la formación de 2-tert-butil-p-benzoquinona (Figura 7), esto es notorio en el RMN<sup>-13</sup>C encontrándose 2 señales en  $\delta$  188.57 y 187.99 ppm, dichos desplazamientos químicos son prueba de la existencia de dos grupos carbonilo en forma de cetonas. Otras señales confirmativas de la existencia del producto de reacción en el espectro de Carbono son las  $\delta$  29.69 y 35.19 ppm, encontradas cada una al lado de las señales pertenecientes a los metilos y el Carbono cuaternario de la TBHQ ( $\delta$  29.26 y 34.46 ppm respectivamente), lo cual refleja la existencia de un segundo grupo ter-butil en un ambiente diferente al de la molécula de TBHQ. Los cuatro Carbonos restantes evidencian la presencia de dobles ligaduras como lo es el caso de la señal a  $\delta$  155.35 ppm, la cual es asociada directamente con el Carbono perteneciente del anillo (Cb) que está enlazado al Carbono cuaternario del ter-butil (Cg), con ayuda de tablas se determinó su desplazamiento químico teórico resultando en un  $\delta$  164.5 ppm, el rango de diferencia entre el desplazamiento experimental y teórico (9.15) es aceptable, de esta manera también fueron evaluados otros dos Carbonos resultando en valores teóricos de  $\delta$  141.8 ppm para Ce y Cf, que contrastando con los valores experimentales ( $\delta$  139.17 y 136.43 ppm) no son muy distantes. El espectro protónico también apoya la formación de este producto de oxidación, como se expresó antes, estudios realizados a el proceso de oxidación de la TBHQ arrojan la aparición de la TBQ<sup>28</sup>, una de las evidencias de la formación de dicho compuesto es su RMN<sup>-1</sup>H, que comparado con las señales halladas en el mismo espectro de este trabajo, se puede apreciar perfectamente una señal a  $\delta$  6.77 ppm, el cual según el estudio pertenece a los dos hidrógenos vecinos de la TBQ (Hb), a su vez, una señal a  $\delta$  5.40 ppm que se encuentra traslapada con las señales de hidrógenos aromáticos de la TBHQ que refleja al hidrogeno aislado de la TBQ (Ha), y una vez más las señales hermanas de los metilos del ter-butilo, en este caso son los 9 hidrógenos de cada compuesto (TBHQ y TBQ).

Debido al mismo estudio se sabe de la generación de un segundo producto de oxidación, el 2,2-dimetil-2,3-dihidro-benzo (b) furano (Figura 6), sin embargo en las condiciones de reacción de este trabajo, se demostró



la inexistencia de éste, ya que en ninguno de los espectros de RMN-<sup>1</sup>H se encontró una señal a  $\delta$  2.98 ppm que perteneciese a un metileno (-CH<sub>2</sub>-) de tal especie química.

Como último punto a tratar en esta sección, se puede determinar por integración de las señales hermanas de los hidrógenos metílicos ( $\delta$  1.27 y 1.20 ppm de la Figura 13) el porcentaje de oxidación de la TBHQ a TBQ a través de la Ecuación 5, dando como total un 48.77%, con esto también se define el cuidado que se debe de tener en la síntesis de los modificados de agavina, ya que se puede perder el poder antioxidante en vez de integrarlo al polisacárido.

.....  
Ecuación 5

$$\% \text{ conversión} = \frac{\delta_{1.20}}{(\delta_{1.20} + \delta_{1.27})} * 100$$

### 5.3. SÍNTESIS Y PURIFICACIÓN DE LOS POLÍMEROS

Durante la obtención de los materiales, todos aquellos pertenecientes a la condición C presentaron precipitación.

Por su parte se calcularon los promedios de los rendimientos de masa de todos los materiales (en el caso de la condición C se sumaron las masas de los precipitados a las de los modificados solubles recuperados por liofilización), dichos datos estan expresados en la Tabla 5. Los datos de dicha tabla, demuestran una pérdida significativa, que se puede deber principalmente al TBHQ no enlazado, otras fuentes de pérdida pueden deberse al transvase de las soluciones y la mezcla de reacción.

.....  
**Tabla 5.** Rendimiento de masas de las diferentes reacciones.

<b>Condiciones</b>		<b>Rendimiento (%)</b>
A1	A12.A	75.82±3.73
	A24.A	73.03±1.84
	A48.A	72.22±0.88
A2	A12.B	75.65±2.98
B1	B24.A	62.63±2.47
B2	B24.B	68.50±1.82
C	C24.A	53.46±11.66
	C32.A	70.12±0.49
	C48.A	64.40±3.30

## 5.4. CARACTERIZACIÓN DE LOS MODIFICADOS

### 5.4.1. RMN

En todos los casos de los espectros protónicos, se presentaron las señales típicas de agavina, como en el caso de la Figura 11, no obstante, se generaron nuevas señales a frecuencias más bajas en la zona de  $\delta$  0.86 a 1.55 ppm las cuales indican la unión del antioxidante con el polisacárido, pues estas pertenecen a los hidrógenos metílicos de la TBHQ, a continuación se muestra el RMN<sup>-1</sup>H de la muestra C48.A a modo de ejemplo:

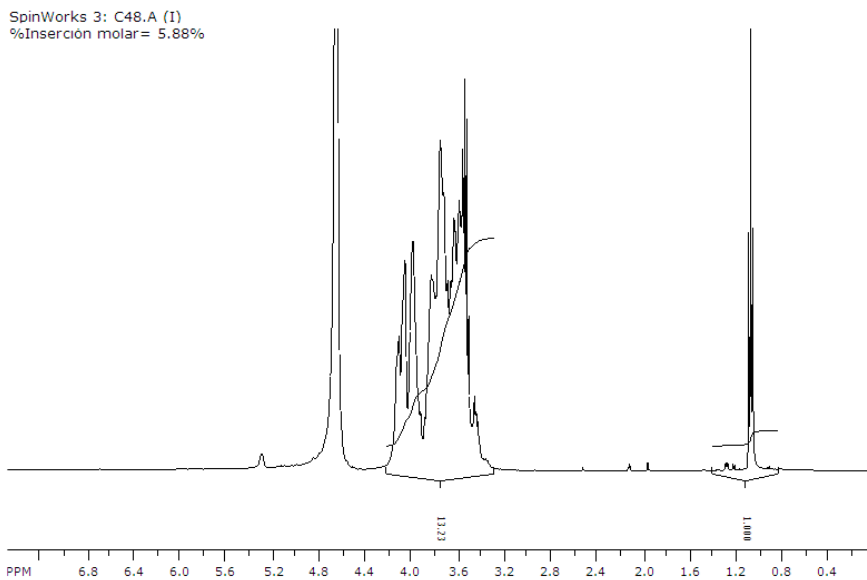


Figura 19. Espectro de RMN<sup>1</sup>H de C48.A

Con el fin de determinar el porcentaje de inserción, se integraron los espectros de RMN<sup>1</sup>H, tomando como referencia a la zona de  $\delta$  0.86 a 1.55 ppm (señales de Ha–Hc) y contrastando con la de  $\delta$  3.25 a 4.15 ppm (pertenecientes a H<sub>1</sub>–H<sub>2</sub>) y así aplicar la Ecuación 2. Los resultados se muestran en la Figura 20.

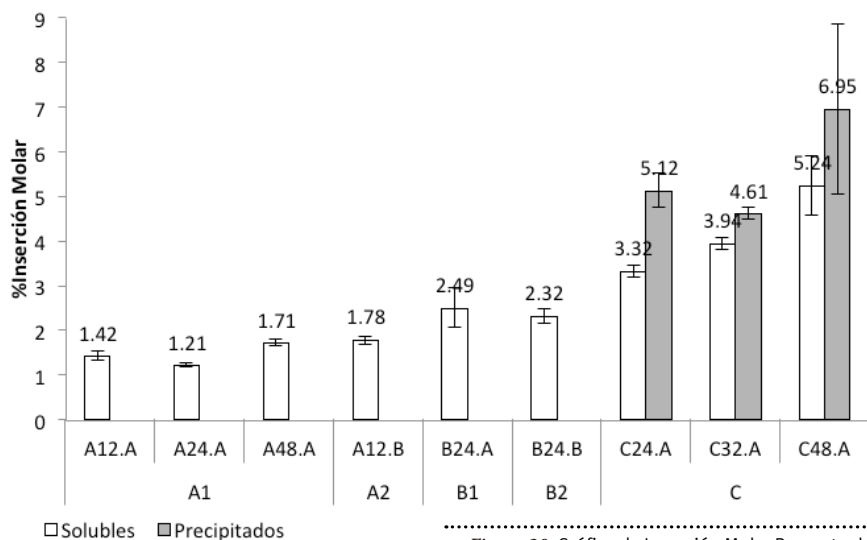


Figura 20. Gráfica de Inserción Molar Porcentual de los modificados.

Con base en los resultados de inserción, se puede denotar que los parámetros de reacción para la condición A1 no son propicias, siendo que todas sus inserciones, aún con diferente concentración de TBHQ, caen en el mismo rango. Además de no existir una correlación entre la concentración de TBHQ agregado en la reacción con el porcentaje de inserción en el modificado, apreciable gracias a las muestras A12.A y A24.A; donde ésta última, a pesar de tener el doble de TBHQ que la primera durante la reacción, presenta menos inserción molar en su modificado.

Para determinar si había un efecto en la inserción del antioxidante al añadir tiempo de agitación después de terminada la reacción se compararon los tratamientos A1 y A2, con las respectivas muestras a la misma concentración de TBHQ (A12.A y A12.B) en las cuales la única variación existente entre los tratamientos eran los 45 minutos de agitación post-reacción del tratamiento A2, así se demostró la existencia de un cambio en la inserción, no obstante, la dispersión de inserción de A12.B ( $\pm 0.36\%$ ) indica que la adición de tiempo de reposo en la reacción puede generar un mejor rendimiento, pero también puede no tener el efecto deseado y obtener una inserción similar a una reacción sin tiempo añadido. El porqué del comportamiento existente en A1 se debe a la cantidad de peróxido usado y al corto tiempo de adición, esto es comprobable gracias a las reacciones de la condición C, si se comparan las reacciones con concentración de 24 mM (A24.A y C24.A), se aprecia una inserción de más del doble en C, en el cual la inserción es de  $1.78 \pm 0.36\%$  en este caso el volumen de peróxido es 30 veces menor al volumen máximo usado en A1. El decaimiento de actividad de la enzima en A1 con respecto a C y la mejora de la inserción con la disminución de enzima y peróxido se debe a que las peroxidasas sufren de un evento conocido como “inactivación suicida por peróxido”, en la cual el peróxido reacciona con los intermediarios del ciclo catalítico de la peroxidasa degenerando su sitio activo y causando pérdida de sensibilidad y eficiencia de la enzima.<sup>38</sup>

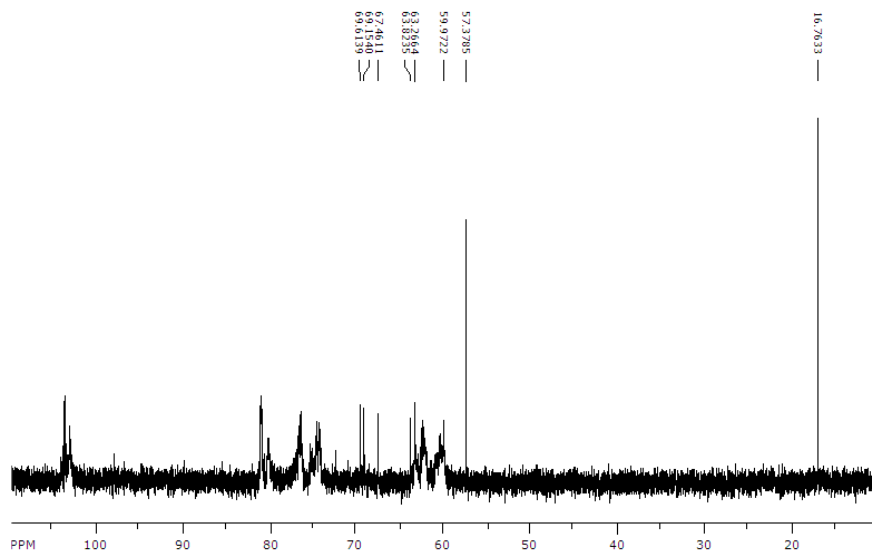
La comparación de los tratamientos A1, B1, B2 y C puede llevarse a cabo a través de las muestras A24.A, B24.A, B24.B y C24.A ya que todas poseen

la misma concentración de TBHQ inicial (24mM), en dichas muestras se puede observar una vez más que A1 posee condiciones poco propicias para la inserción a pesar de poseer una mayor proporción de enzima y catalizador. Por otro lado, B1 y B2 parecen ser similares, sin embargo la dispersión obtenida en las síntesis B24.A es superior a la de B24.B esto se debe a que B24.B usó la mitad de volumen de peróxido, esto es comprobable gracias a la condición C, donde se conservó la misma relación de peróxido de B24.B (B2) y se disminuyó a la mitad la cantidad de enzima, estas variaciones condujeron a la mejor inserción con una concentración de antioxidante de 24 mM ( $3.32 \pm 0.12$ ), llegando a superar el doble de la inserción de su análogo en A1, mientras que si se analizan las muestras A48.A y C48.A, la segunda obtiene una inserción del triple de la primera ( $5.24 \pm 0.65\%$  y  $1.71 \pm 0.08\%$  respectivamente).

Cabe destacar que la condición C demuestra no sólo las mejores condiciones de reacción, adicionalmente muestra un aumento de la inserción de TBHQ conforme aumenta la concentración de éste en la reacción, obteniendo a más alta concentración de TBHQ (48 mM) la inserción más alta de todos los experimentos realizados ( $5.24 \pm 0.65\%$ ).

El espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  de la muestra C48.A (Figura 21) comprueba la existencia de la unión del TBHQ a la inulina, ya que las señales de este se desplazan hacia campos más bajos algunas con 120 ppm de diferencia:  $\delta$  16.76, 57.38, 59.98, 63.27, 63.82, 67.46, 69.15 y 69.6 ppm, es posible deducir que la primera pertenece a los carbonos metílicos del ter-butilo, mientras que la segunda pertenece al carbono cuaternario del mismo grupo, las seis señales restantes pertenecen a los carbonos aromáticos de la TBHQ, el desplazamiento sufrido de estas ocho señales es generado por la unión de uno de los tres carbonos aromáticos hidrogenados con uno de los oxígenos de hidroxilo de la agavina (Figura 8), debido a la existencia de tres de estos carbonos se podría pensar en tener cualquiera de las tres inserciones con agavina, sin embargo por la ausencia de otros grupos de ocho señales se puede inferir la generación predominante de un solo tipo de inserción.

SpinWorks 3: C48.A



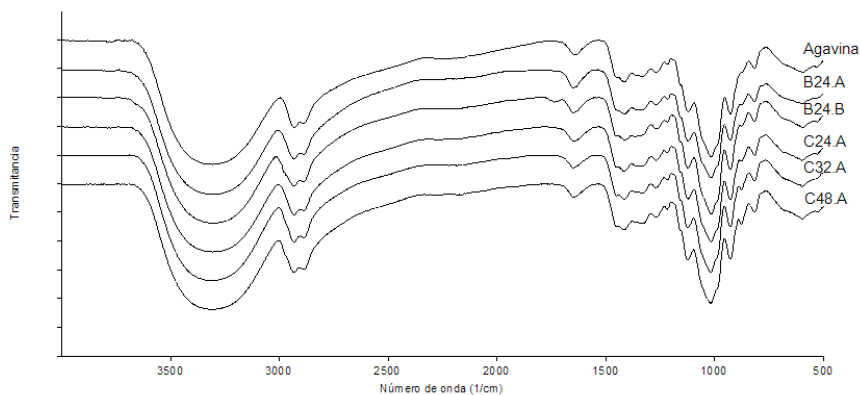
.....  
 Figura 21. RMN-<sup>13</sup>C de modificado C48.A

### 5.4.2. Espectroscopía infrarroja

Profundizando en la caracterización del biopolímero modificado se usó al IR con el fin de comprobar un cambio en la estructura química de la agavina. Estudios previos de la emisión infrarroja de la fructosa y la glucosa,<sup>39</sup> así como de la inulina de la achicoria y la alcachofa,<sup>40</sup> permiten describir cada una de las señales obtenidas por la agavina nativa:

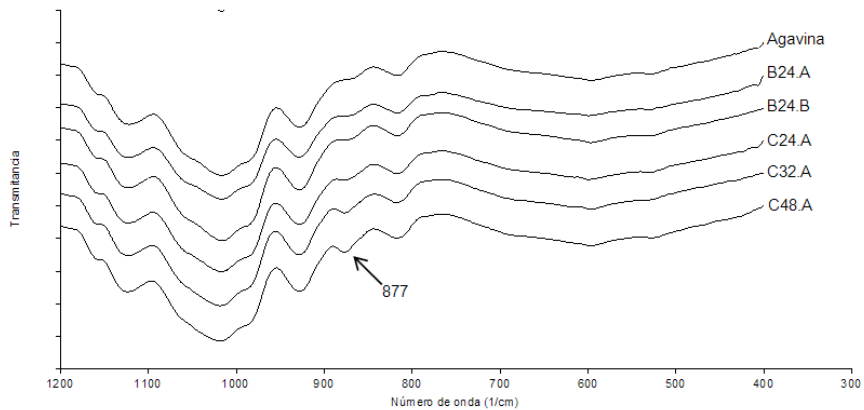
.....  
 Tabla 7. Interpretación de señales típicas de agavina en AFTR-IR.

Numero de onda (1/cm)	Enlace asociado
3360	Vibración H-O de hidroxilo
2932	Vibración simétrica de CH de C-2 de fructosa
2888	Vibración asimétrica de CH de C-1 de fructosa
1648	Torsión de O-H hidroxilo
1450	Torsión asimétrica de CH <sub>2</sub>
1418	Suma de torsiones de enlaces OCH, COH y CCH
1336	Torsión de enlace OCH y CCH
1270	Torsión en plano de OH y torsión de CCO
1210	Torsión en plano de CH y OH pertenecientes a glucosa
1122	Suma de vibraciones CO y CC y de torsión de CCC
1017	Vibración de CO de hidroxilo
928	Suma de vibraciones de CO, CCH y vibración asimétrica de anillo de piranosa
817	Torsión de enlace CH
599	CH <sub>2</sub> y CH

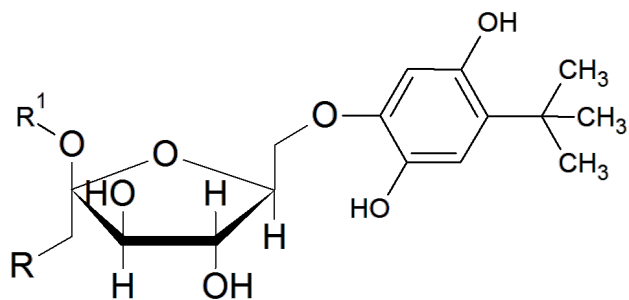


.....  
**Figura 22.** Espectros de transmitancia obtenidos por AFTR-IR

Debido a la estructura de la TBHQ la mayoría de las señales que pueden darse en IR terminan siendo traslapadas por el resto de las señales de inulina, la excepción a la regla ocurre al número de onda de  $877\text{ cm}^{-1}$  (Figura 23), banda perteneciente a un anillo bencénico tetra sustituido en las posiciones 1, 2, 4 y 5,<sup>31</sup> debido a lo anterior, se descarta la idea de que esta señal pertenezca a TBHQ en forma libre ya que ésta posee solo 3 sustituciones en las posiciones 1, 2 y 4, por lo que en realidad corresponde a la TBHQ insertada en la agavina, específicamente, en posición 5 (en *para* con respecto a su grupo ter-butilo) (Figura 24), a su vez se demuestra por la intensidad de la señal la eficiencia de las condiciones de reacción, desembocando en una misma intensidad para las muestras B1 y B2 y mayor para aquella de C a concentración de 24 mM, mientras que ésta aumenta acorde con el aumento de concentración de TBHQ en C, respaldando así a las integraciones realizadas en los espectros de  $\text{RMN}^{-1}\text{H}$ .



.....  
**Figura 23.** Acercamiento de bandas de IR



.....  
**Figura 24.** Estructura de modificado de agavina  
 (enlace O-fructosa en posición para con respecto a  
 ter-butilo de TBHQ)



### 5.4.3. Termogravimetría

Tras la obtención de datos de la termogravimetría, éstos fueron tratados para ser expresados como porcentaje de peso con el fin de observar su caída y poder diferenciar la estabilidad entre ellos y la agavina nativa:

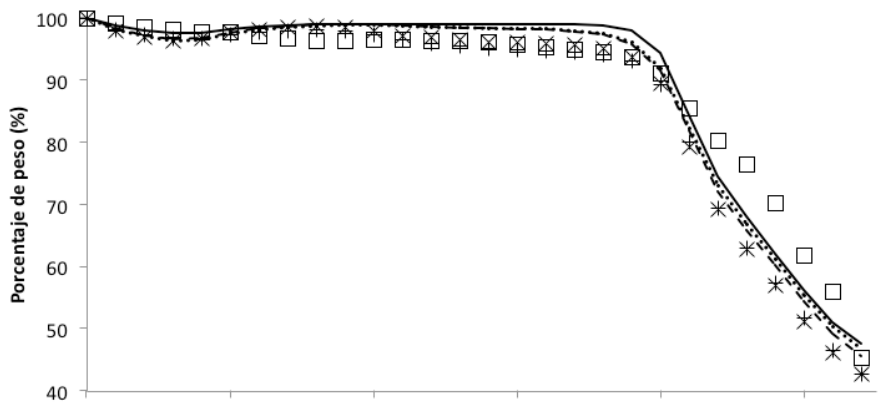


Figura 25. Termogramas porcentuales de polímeros.

Así mismo se puede establecer a la temperatura de descomposición ( $T_d$ ) como aquella en la cual el polímero ha perdido el 5% de su peso (Figura 26). Con esta temperatura se puede observar que B1 y B2 poseen temperaturas de descomposición parecidas al igual que sus inserciones, y que en C se disminuye la temperatura de descomposición conforme avanza el porcentaje de inserción, por tanto se puede aseverar una correlación inversa entre estos dos parámetros (a mayor porcentaje menor temperatura de descomposición), lo que confirma que la variación de esta temperatura es debido a la presencia de TBHQ enlazado y que éste es el que se descompone.

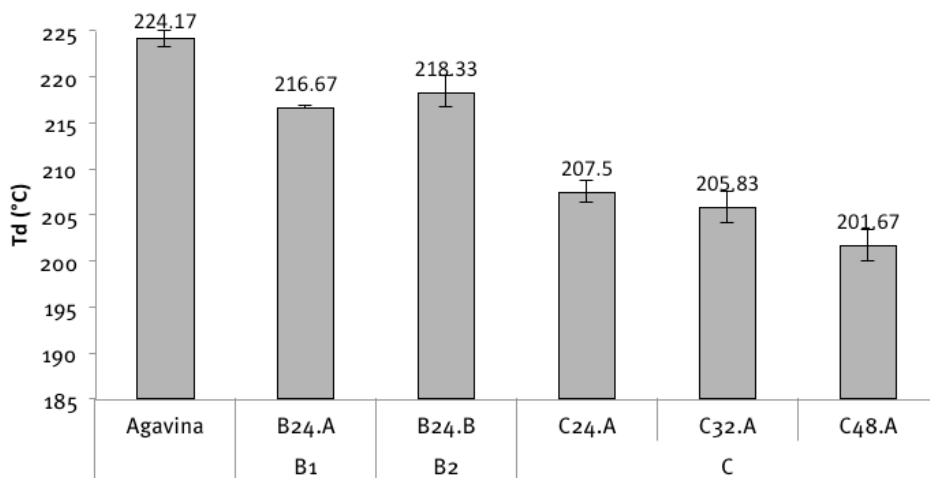
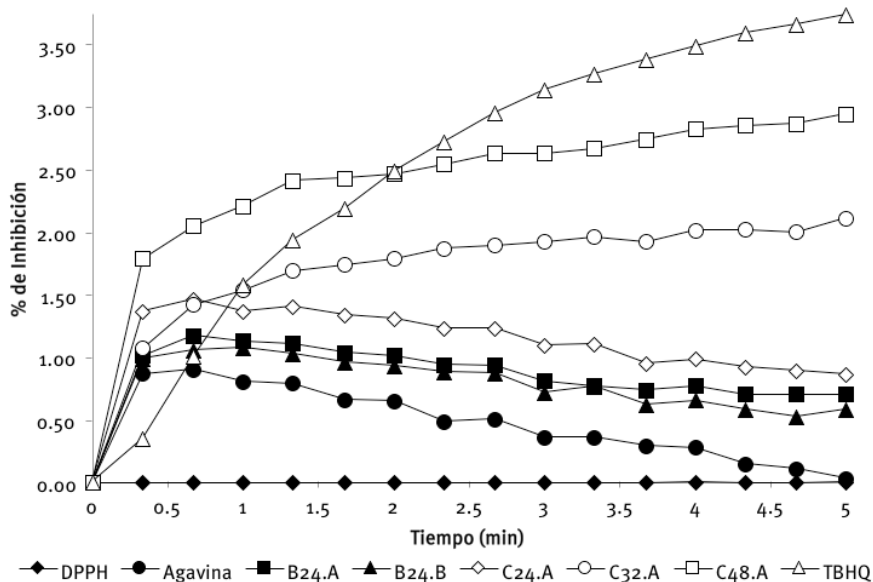


Figura 26. Gráfica de Temperatura de descomposición (Td) para la agavina, y las condiciones B1, B2 y C

La pérdida de masa por parte de la TBHQ se pueden originar por varias posibles reacciones de degradación tales como de-metilación del grupo *ter*-butilo o pérdida total del mismo, conversión a la forma de *para*-qui-nona y la formación de 2,2-dimetil-2,3-dihidro-benzo (b) furano, estos productos de degradación se comienzan a generar en la forma libre de la TBHQ a una temperatura de 185 °C,<sup>41</sup> por lo cual se pueden asociar directamente con la disminución de la Td, aunque debido a la labilidad de este antioxidante, también es posible que la pérdida de masa se genere por la destrucción del enlace O-fructosa o inclusive la destrucción del anillo aromático.

#### 5.4.4. Determinación de poder antioxidante por DPPH

Tras la obtención de las absorbancias a 517 nm, se realizó la conversión de las mismas a porcentaje de inhibición con ayuda de la ecuación 3, los datos fueron expuestos en la gráfica de la siguiente página:



.....  
 Figura 27. Efecto antioxidante de polímeros expresado en Porcentaje de inhibición.

Una vez más se puede observar una correlación entre el porcentaje de inhibición y el porcentaje de inserción, las muestras B24.A y B24.B poseen prácticamente el mismo comportamiento mientras que las muestras de C adquieren mayor grado de inhibición conforme aumenta la concentración de TBHQ en sus condiciones de reacción, estos datos no solo dan un nuevo indicio del logro en la obtención de un modificado de inulina, también demuestran que dicho modificado posee capacidades antioxidantes. Adicionalmente se puede observar que debido a la inserción se pierde el poder antioxidante de la TBHQ, teniendo la forma libre en concentración de 0.025 g/L, se obtiene un porcentaje de inhibición de 4% al minuto 5, mientras que el mejor caso de inserción (C48.A) tiene una inhibición cercana al 3% en el mismo intervalo de tiempo, esta muestra contiene un equivalente a una concentración de 0.115 g/L de TBHQ libre, por tanto se puede decir que se necesita al menos 4.6 veces más concentración de TBHQ insertado para igualar la actividad de la TBHQ libre. La pérdida ocurrida de esta actividad

en los modificados puede adjudicarse a la inexistencia de movilidad de las moléculas de TBHQ por estar unidas covalentemente al polisacárido, por su parte la forma libre tiene la posibilidad de colisionar con mayor facilidad con el DPPH y de esta manera puede inhibir al radical con una mejor eficiencia. No obstante es necesario llevar a cabo este ensayo a concentraciones superiores, ya que a estas concentraciones el error experimental puede ser mayor, también, se debe de realizar un estudio más a fondo de la capacidad antioxidante para dictaminar una diferencia más concluyente entre la forma libre y la forma enlazada a agavina de la TBHQ.

#### 5.4.5. Determinación de Actividad Microbiana

En este ensayo se obtuvo una curva de inhibición para la TBHQ (Figura 28), no así para el caso de la agavina y de el modificado C48.A, esto ocurrió por la cualidad prebiótica de la agavina, que experimentalmente reflejó valores negativos de inhibición, es decir, promovió el crecimiento microbiano, esto es congruente con la literatura si se recuerda que la inulina es prebiótica<sup>2,8</sup>, solo la concentración de 0.05 g/L de agavina, promovió el crecimiento de la *E. coli* 1400 veces, por su parte, el modificado C48.A tuvo un efecto prebiótico atenuado, promoviendo la concentración solo aproximadamente 960 veces, este efecto atenuado es adjudicado a la TBHQ enlazada al polisacárido.

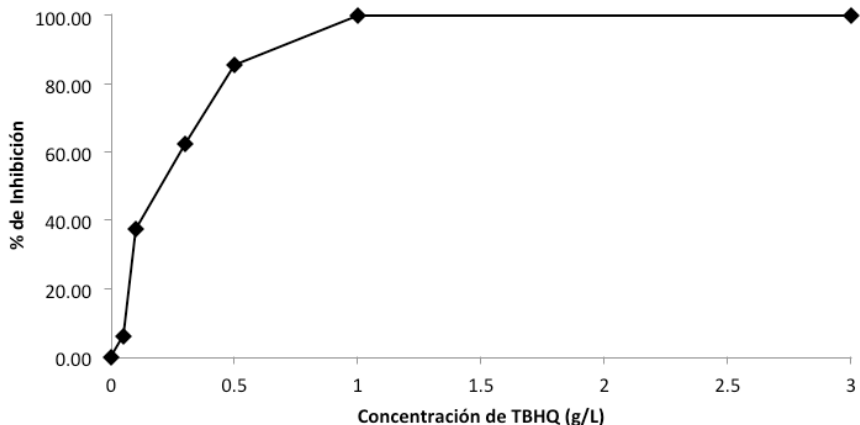


Figura 28. Gráfica de porcentaje de inhibición de la TBHQ.

## 6. CONCLUSIONES

1. Fue posible sintetizar, a través de una vía enzimática, un producto modificado de la de agavina y el antioxidante TBHQ, usando la peroxidasa HRP como catalizador con un máximo de inserción de  $5.24 \pm 0.65\%$ .
2. Dicho cambio químico fue comprobado por:
  - La aparición de señales metílicas de  $\delta$  0.86 a 1.55 acompañadas de las señales típicas de agavina en RMN<sup>-1</sup>H.
  - Señales altamente desplazadas en RMN<sup>-13</sup>C propias de TBHQ acompañadas de las típicas de agavina.
  - Aparición de una señal a  $877 \text{ cm}^{-1}$  en el espectro de IR de los modificados que representa a un anillo aromático tetra-sustituido (TBHQ con un enlace adicional) y un aumento de la misma claramente correlacionado con el porcentaje de inserción obtenido por RMN-H<sup>1</sup>
  - Disminución de la temperatura de descomposición de la agavina modificada con respecto a la nativa e inversamente proporcional al porcentaje de inserción.
  - Las mejores condiciones de modificación encontradas hasta el momento son aquellas en las cuales se usan una relación de 1:500 Enzima: Sustrato total y 0.6:1 Peróxido: Enzima, con una adición de 40  $\mu\text{L}$  cada 3 minutos.
  - El modificado funcional presenta capacidad de inhibición de radicales libre y por tanto poder antioxidante.
  - El modificado funcional presenta las capacidades microbianas de la agavina convirtiéndose en un prebiótico.

## 7. TRABAJO FUTURO

Se planea:

1. Aumentar el porcentaje de inserción en la agavina
2. Implementación de este método de modificación en la inulina de achicoria para la comparación entre ambos modificados.
3. Profundizar en el análisis de la capacidad antioxidante de los modificados a través de diversas pruebas antioxidantes.
4. Establecer la actividad prebiótica de los modificados con ayuda de ensayos con bacterias lácticas.
5. Nuevos estudios de caracterización como el MALDI-TOF-MS.
6. Análisis del comportamiento de los modificados en matrices alimentarias como emulsiones.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. S, K. V., D, B. K. & S, R. S. Natural Polymers – A Comprehensive Review. **3**, 1597–1613 (2012).
2. Barclay, T., Ginic–markovic, M., Cooper, P. & Petrovsky, N. Inulina versatile polysaccharide with multiple pharmaceutical and food chemical uses . **1**, 27–50 (2010).
3. Sousa, F., Guebitz, G. M. & Kokol, V. Antimicrobial and antioxidant properties of chitosan enzymatically functionalized with flavonoids. *Process Biochemistry* **44**, 749–756 (2009).
4. Cho, Y.–S., Kim, S.–K. & Je, J.–Y. Chitosan gallate as potential antioxidant biomaterial. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **21**, 3070–3073 (2011).
5. Vachoud, L., Chen, T., Payne, G. F. & Vazquez–duhalt, R. Peroxidase catalyzed grafting of gallate esters onto the polysaccharide chitosan. **29**, 380–385 (2001).
6. Vargas Vázquez, C. G. Obtención de insumos de interés industrial a partir de las fructanas del agave mezcalero potosino (Agave salmiana). 123 (2009).
7. Spizzirri, U. G. *et al.* Innovative antioxidant thermo–responsive hydrogels by radical grafting of catechin on inulin chain. *Carbohydrate Polymers* **84**, 517–523 (2011).
8. Kaur, N. & Gupta, A. K. Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. *Journal of Biosciences* **27**, 703–714 (2002).
9. Madrigal, L. y Sangronis, E. La inulina y derivados como ingredientes claves en alimentos funcionales. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* **57**, 387–396 (2007).
10. Kiss, A. & Forgo, P. Investigations on inulin–type oligosaccharides with regard to HPLC analysis and prospective food applicability. *Monatshefte für Chemie – Chemical Monthly* **142**, 547–553 (2011).
11. Roc, A., Sim, L. & Hern, J. Aprovechamiento integral del Agave americana L. *TURevista Digi.U@T* **202**, 7 (2011).
12. Lopez, M. G., Mancilla–Margalli, N. a & Mendoza–Diaz, G. Molecular structures of fructans from Agave tequilana Weber var. azul. *Journal of Agricultural and Food*

- Chemistry* **51**, 7835–7840 (2003).
13. Niness, K. R. Nutritional and Health Benefits of Inulin and Oligofructose Inulin and Oligofructose : What Are They ? 1. 1402–1406 (1999).
  14. Rowe, Raymond C. , Sheskey, Paul J., Quinn, M. E. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. 917 (Pharmaceutical Press: London, UK, 2009).
  15. Cummings, J. H., Macfarlane, G. T. & Englyst, H. N. Prebiotic digestion and fermentation. *The American journal of clinical nutrition* **73**, 415S–420S (2001).
  16. Chorawala, M. R., Oza, P. M. & Shah, G. B. Research Journal of Pharmaceutical , Biological and Chemical. **2**, 1101–1111
  17. Stevens, C. V, Meriggi, a & Booten, K. Chemical modification of inulin, a valuable renewable resource, and its industrial applications. *Biomacromolecules* **2**, 1–16 (2001).
  18. Wade, L. G. *Química Orgánica*. 206, 539 (Pearson Education: España, 2004).
  19. McMurry, J. *Química Orgánica*. 1040–1042 (Pearson: México, 2008).
  20. Atkinson, B., Mavituna, F. *Biochemical Engineering & Biotechnology Handbook*. 308–310 (Stock Press: México, 1991).
  21. Morris, R. & Hager, L. P. Chloroperoxidase I. Isolation and Properties of the Crystalline Glycoprotein. *The Journal of Biological Chemistry* **241**, 1763–1768 (1966).
  22. Veitch, N. C. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry* **65**, 249–259 (2004).
  23. Straus, W. Cleavage of Heme From Horseradish Peroxidase By Methanol With Inhibition of Enzymic Activity. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **22**, 908–911 (1974).
  24. Caroch, M. & Ferreira, I. C. F. R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* **51**, 15–25 (2013).
  25. Mandal, S., Yadav, S., Yadav, S. & Nema, R. K. Antioxidants : A Review. **1**, 102–104 (2009).
  26. Pisoschi, A. M. & Negulescu, G. P. Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review. *Biochemistry & Analytical Biochemistry* **01**, 1–10 (2012).
  27. Journal, T. E. Opinion of the Scientific Panel on Food Additives , Flavours , Processing Aids and Materials in Contact with Food on a request from the Commission related to Question number EFSA–Q–2003–141. 1–50 (2004).



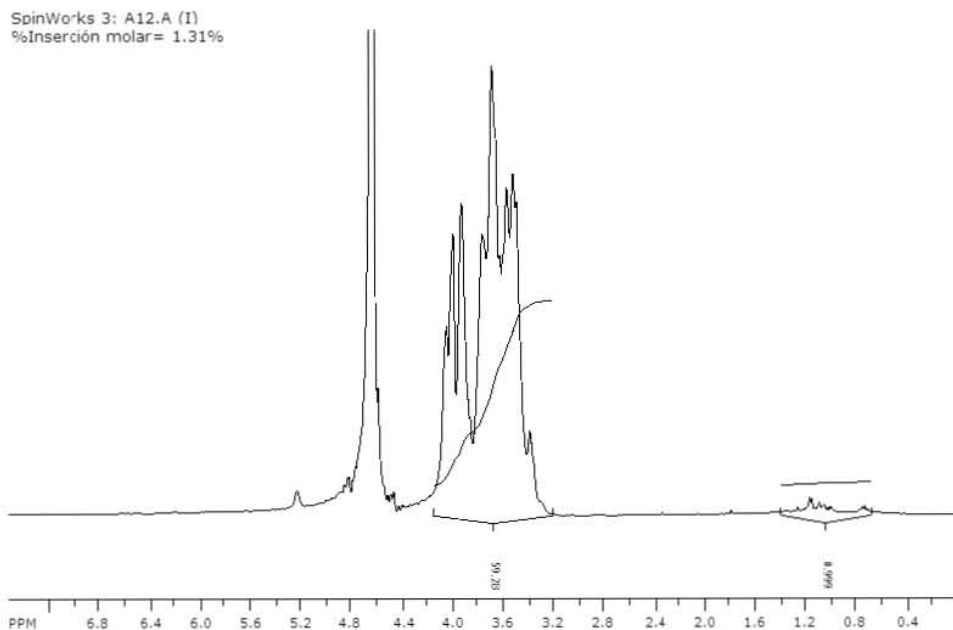
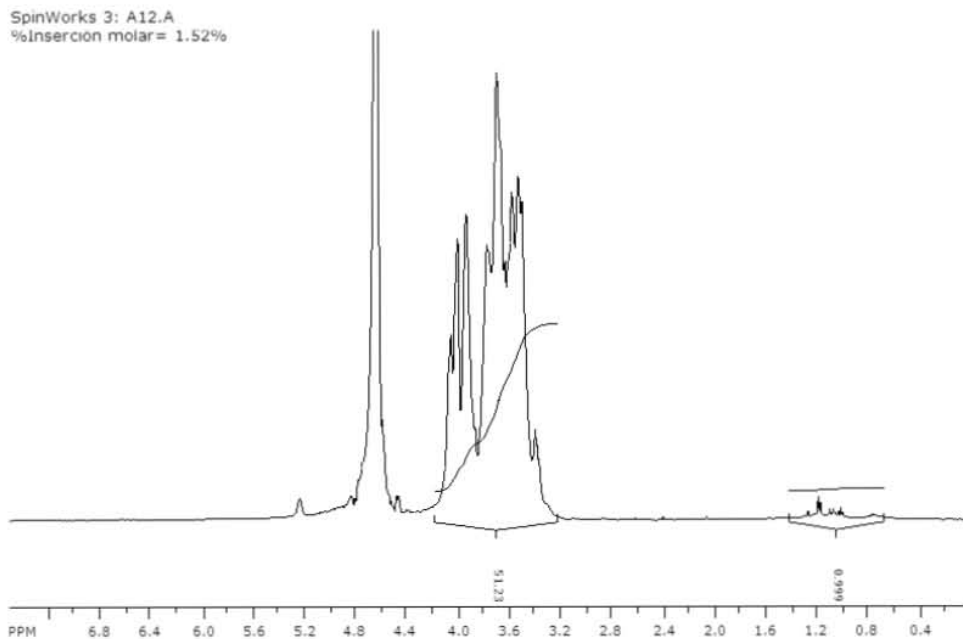
28. Kurechi, T., Aizawa, M., Kunugi, A. & College, T. , Studies on the Antioxidants XVIII : Oxidation Product of Tertiary Butyl Hydroquinone (TBHQ) (I). **1**, 1878–1882 (1878).
29. Seymour, R. B. *Introducción a la Química de los Polímeros*. 98 (Editorial Reverte: España, 2002).
30. Cervera Flores, E. *Colección de Espectros de Resonancia Magnética Protónica para Ejercicios de Interpretación*. 5–7 (Facultad de Química, UNAM: México, D. F., 2005).
31. Cervera Flores, E. *Manual de Espectros de Infrarrojo*. 10–11 (Facultad de Química, UNAM: México, D. F., 2011).
32. Keeler, J. Understanding NMR Spectroscopy. “ Chapter 2: NMR and energy levels”. (2007).at <<http://www.cis.rit.edu/htbooks/nmr/inside.htm>. >
33. Puoci, F. *et al.* Antioxidant Activity of a Mediterranean Food Product: “Fig Syrup”. *Nutrients* **3**, 317–329 (2011).
34. Andrews, J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **48 Suppl 1**, 5–16 (2001).
35. Hayhurst, C. *E. Coli*. 64 (The Rosen Publishing Group: 2003).at <[http://books.google.com.mx/books?id=rYnj-FXH01MC&dq=what+is+e.coli&source=gbs\\_navlinks\\_s](http://books.google.com.mx/books?id=rYnj-FXH01MC&dq=what+is+e.coli&source=gbs_navlinks_s)>
36. [www.microbiologyinpictures.com](http://www.microbiologyinpictures.com) Escherichia coli. *Microbiology un pictures* (2013).at <<http://www.microbiologyinpictures.com/escherichia coli.html>>
37. Molyneux, P. The use of the stable free radical diphenylpicryl– hydrazyl ( DPPH ) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarín J Sci Technol* **50**, 211–219 (2004).
38. Nazari, K. Mahmoudic, A. Khodafarinb, R. Moosavi–Movahedia, A.A. Mohebic, A. Stabilizing and Suicide–Peroxide Protecting Effect of Ni<sup>2+</sup> on Horseradish Peroxidase Fundamentals of Suicide–Peroxide Inactivation of. *Journal of the Iranian Chemical Society* **2**, 232–237 (2005).
39. Ibrahim, M., Alaam, M., El–haes, H., Jalbout, A. F. & Leon, A. De Analysis of the structure and vibrational spectra of glucose and fructose. **31**, 15–22 (2006).
40. López–Molina, D. *et al.* Molecular properties and prebiotic effect of inulin obtained from artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Phytochemistry* **66**, 1476–84 (2005).
41. Hamamat, A. A. & Nawar, W. W. Thermal Decomposition of Some Phenolic Antioxidants. *Jorunal of Agriculture and Food Chemistry* **39**, 1063–1069 (1991).



ANEXO I. ESPECTROS DE RMN  $^1\text{H}$  DE  
LOS MODIFICADOS DE AGAVINA.

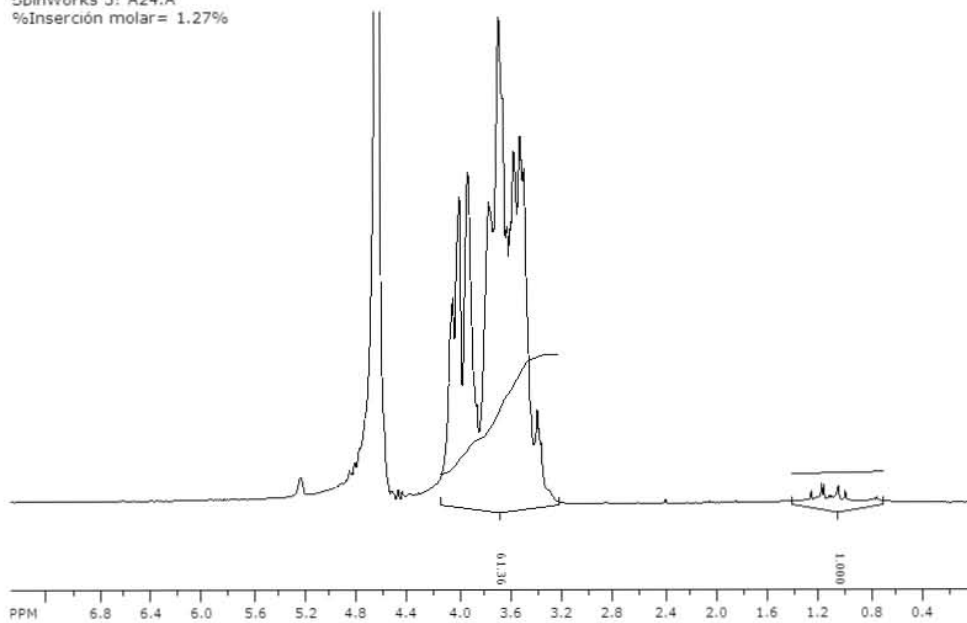


Condición: A1 Concentración de TBHQ: 12 mM Tiempo agregado: 0 min

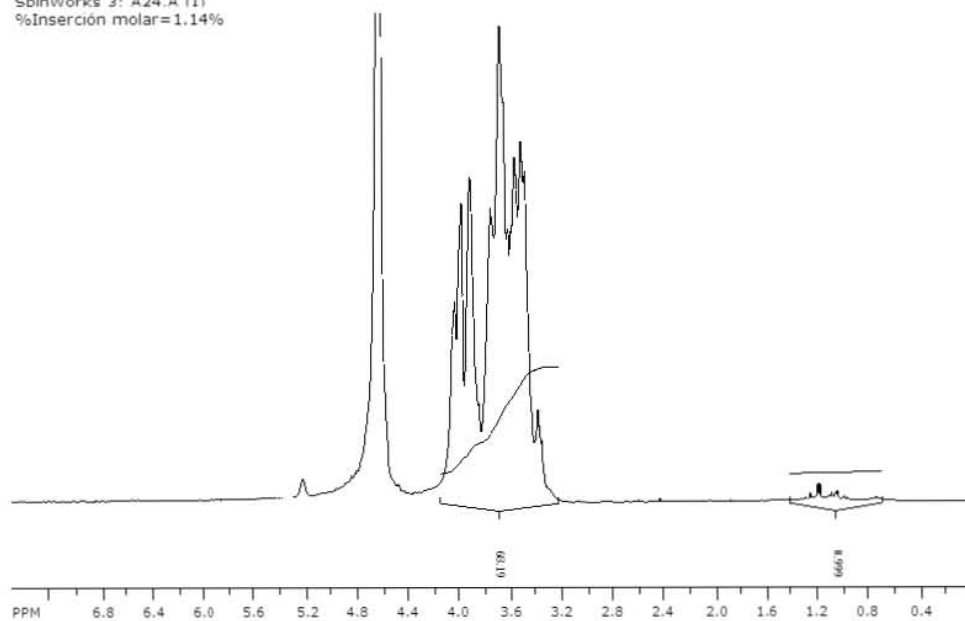


Condición: A1 Concentración de TBHQ: 24 mM Tiempo agregado: 0 min

SpinWorks 3: A24.A  
%Inserción molar= 1.27%

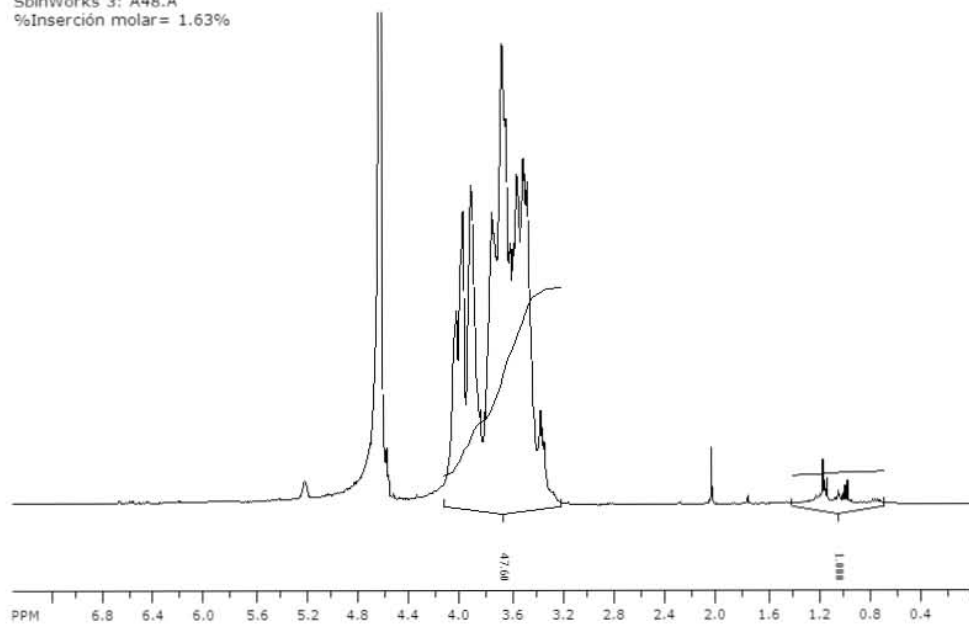


SpinWorks 3: A24.A (I)  
%Inserción molar=1.14%

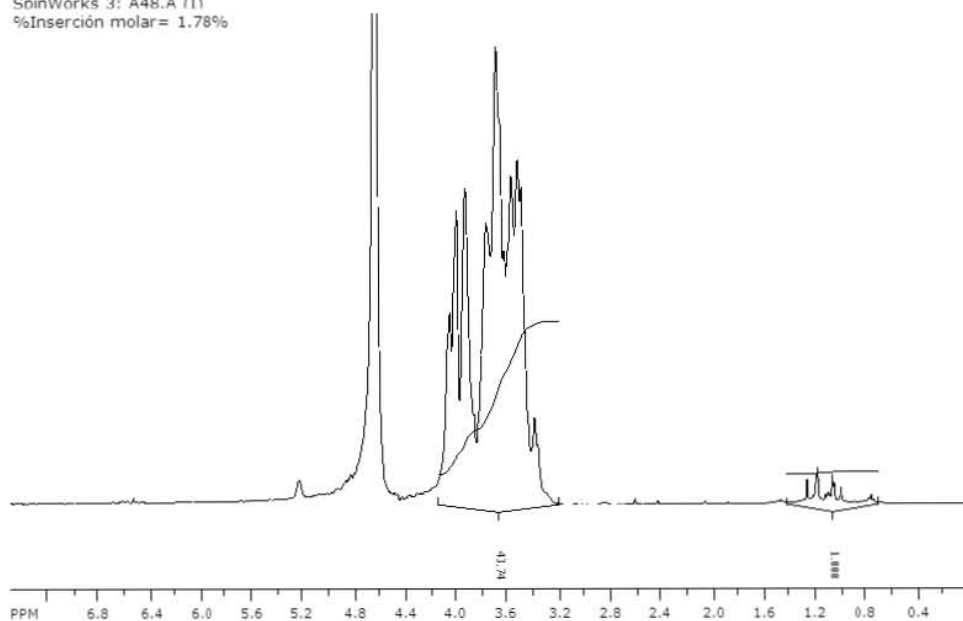


Condición: A1 Concentración de TBHQ: 48 mM Tiempo agregado: 0 min

SoinWorks 3: A48.A  
%Inserción molar= 1.63%

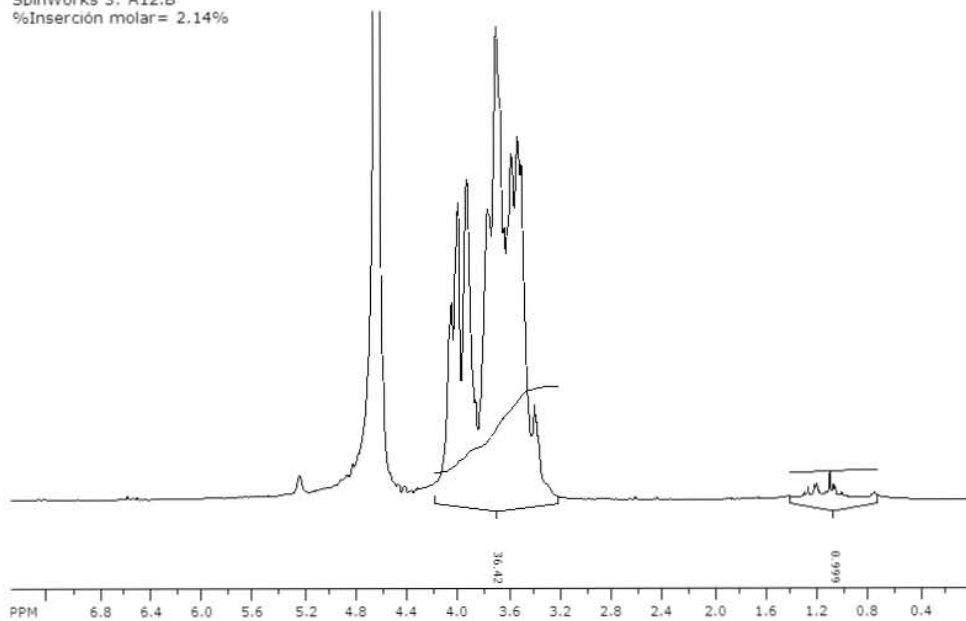


SoinWorks 3: A48.A (1)  
%Inserción molar= 1.78%

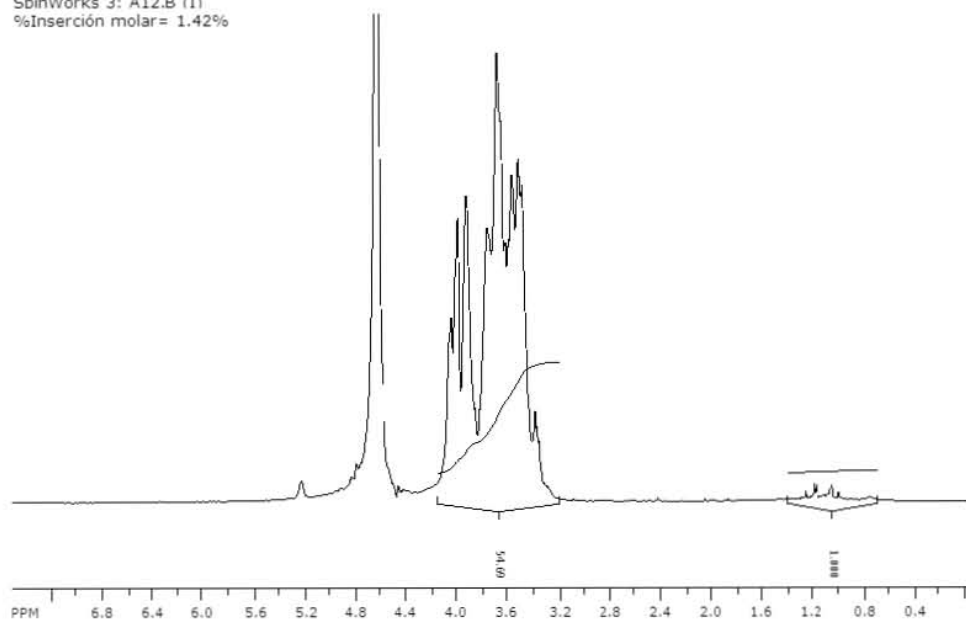


Condición: A2      Concentración de TBHQ: 12 mM      Tiempo agregado: 45 min

SpinWorks 3: A12.B  
%Inserción molar= 2.14%

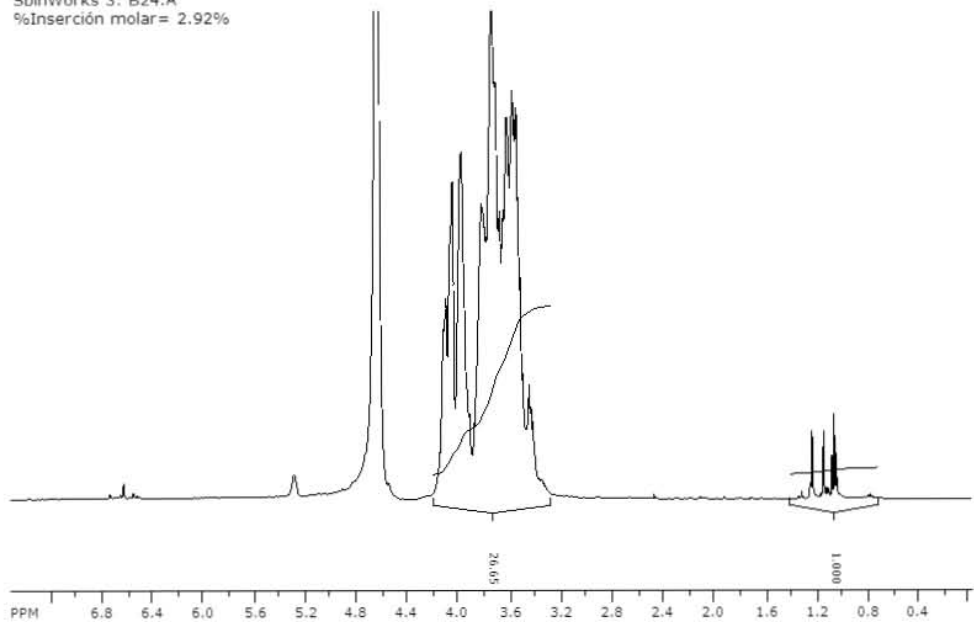


SpinWorks 3: A12.B (I)  
%Inserción molar= 1.42%

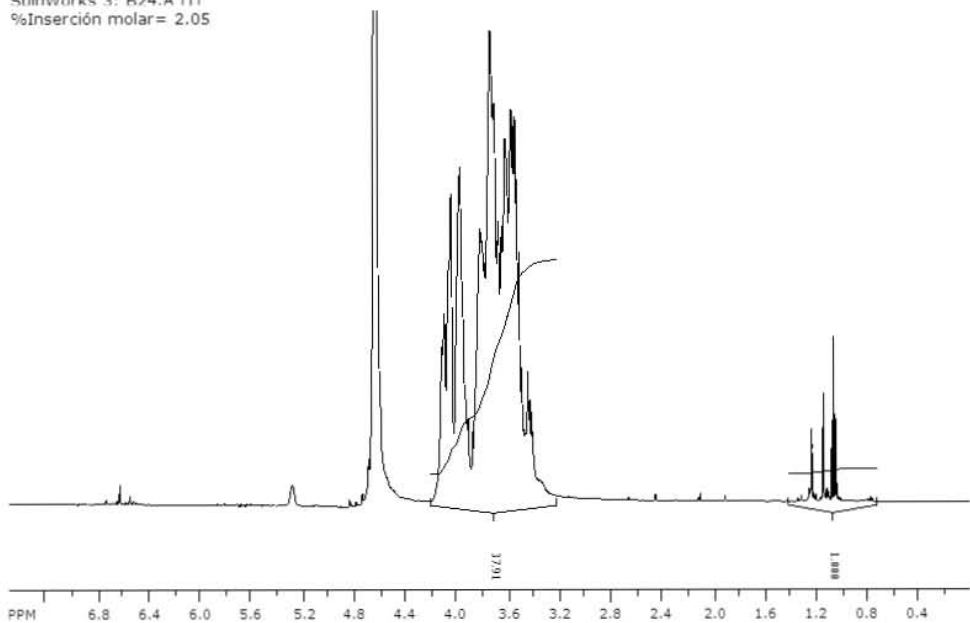


Condición: B1 Concentración de TBHQ: 24 mM Tiempo agregado: 0 min

SoinWorks 3: B24.A  
%Inserción molar= 2.92%

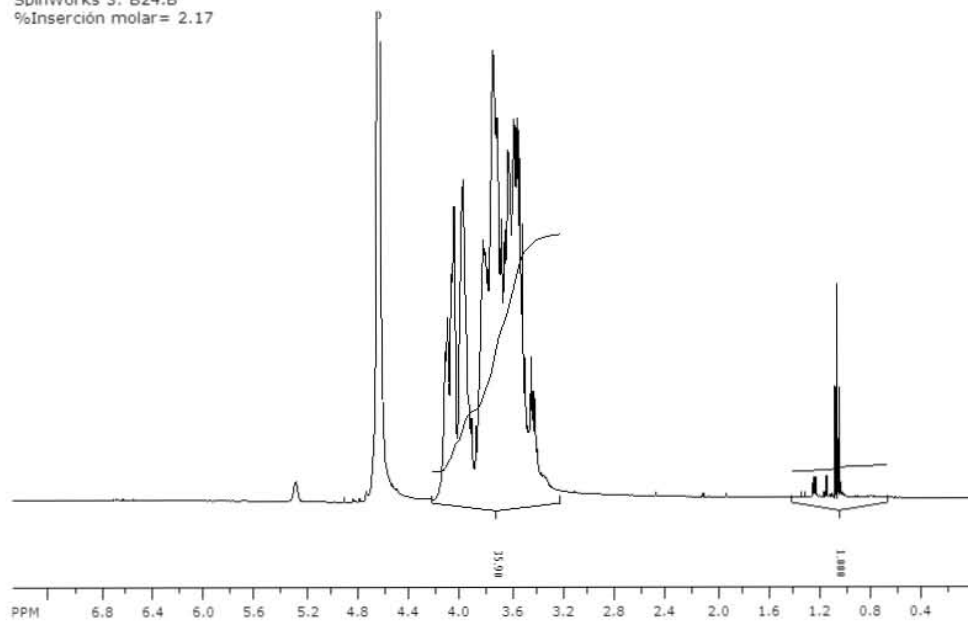


SoinWorks 3: B24.A (1)  
%Inserción molar= 2.05%

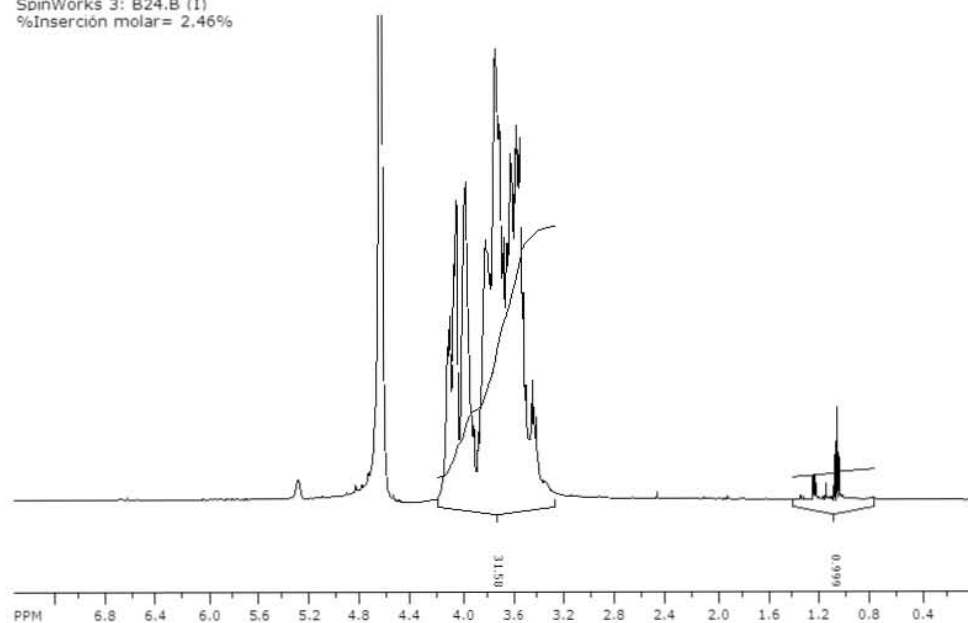


Condición: B2 Concentración de TBHQ: 24 mM Tiempo agregado: 0 min

SpinWorks 3: B24.B  
%Inserción molar= 2.17



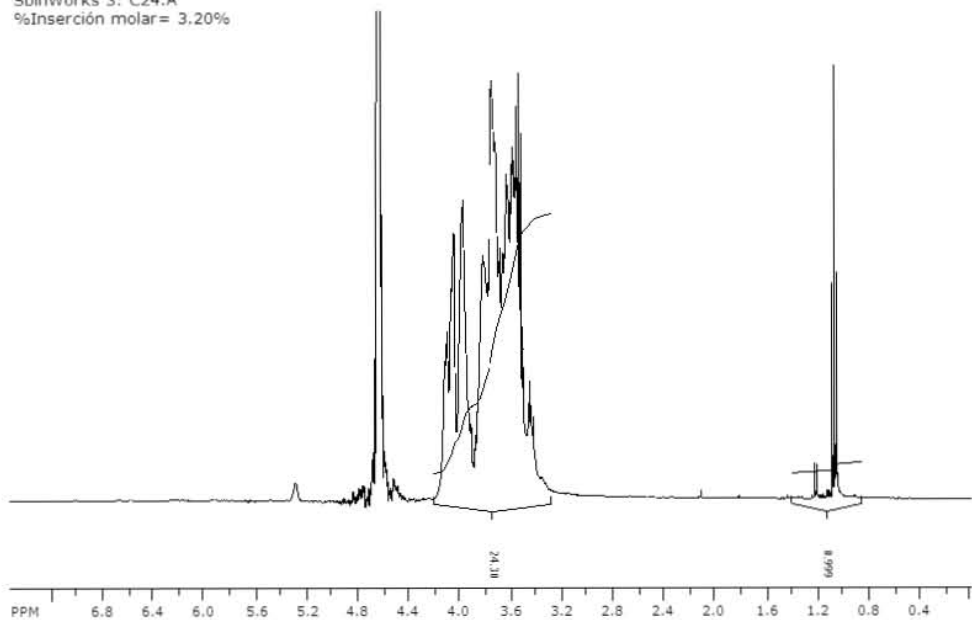
SpinWorks 3: B24.B (1)  
%Inserción molar= 2.46%



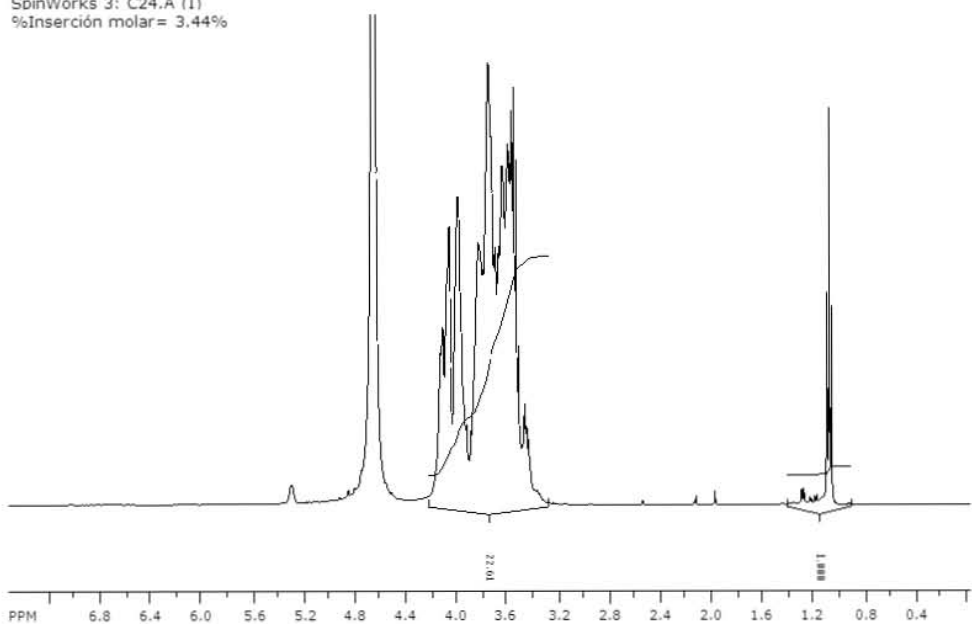


Condición: C Concentración de TBHQ: 24 mM Tiempo agregado: 0 min

SpinWorks 3: C24.A  
%Inserción molar= 3.20%

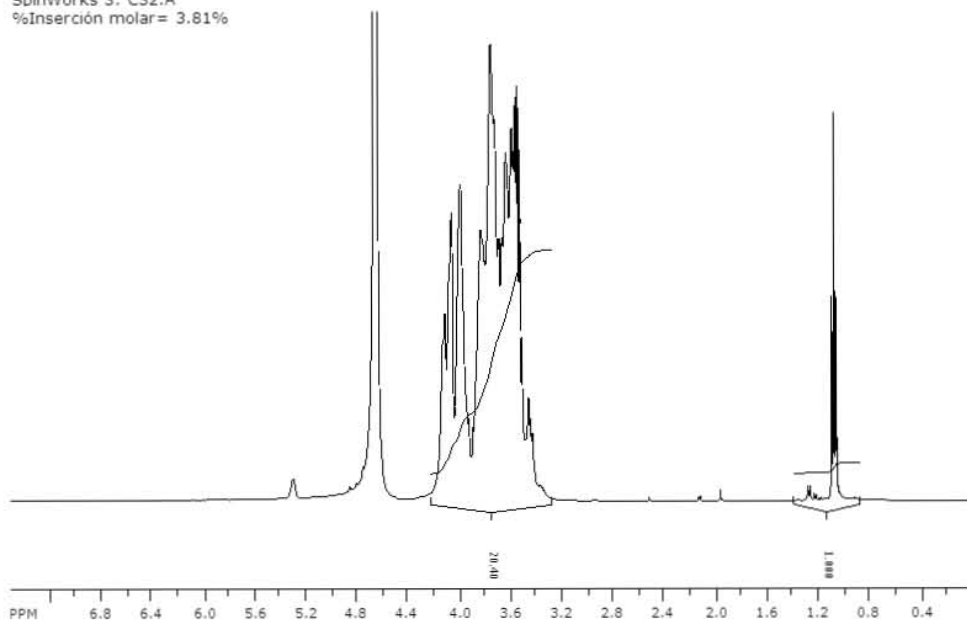


SpinWorks 3: C24.A (I)  
%Inserción molar= 3.44%

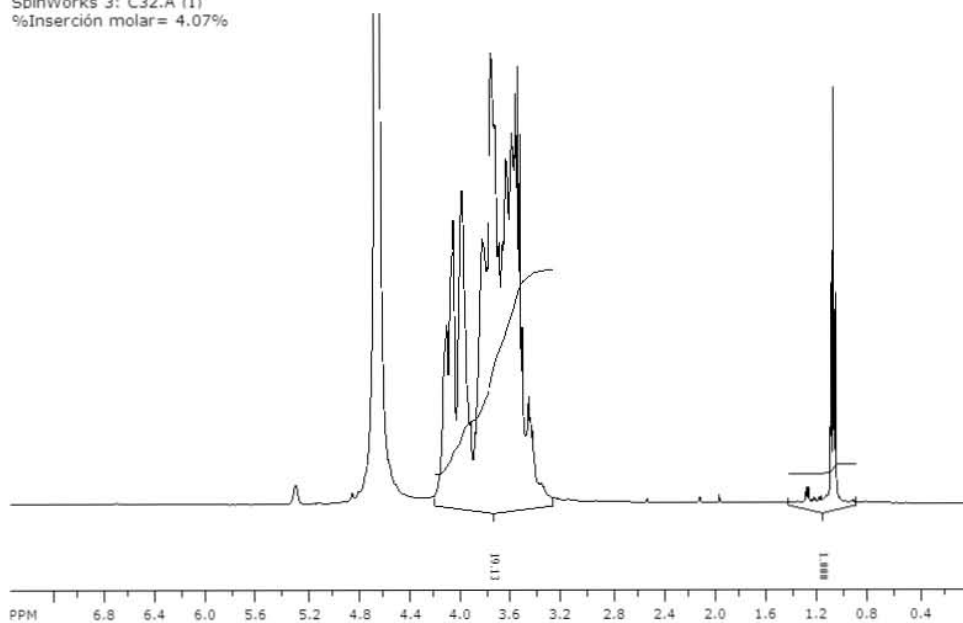


Condición: C Concentración de TBHQ: 32 mM Tiempo agregado: 0 min

SpinWorks 3: C32.A  
%Inserción molar= 3.81%

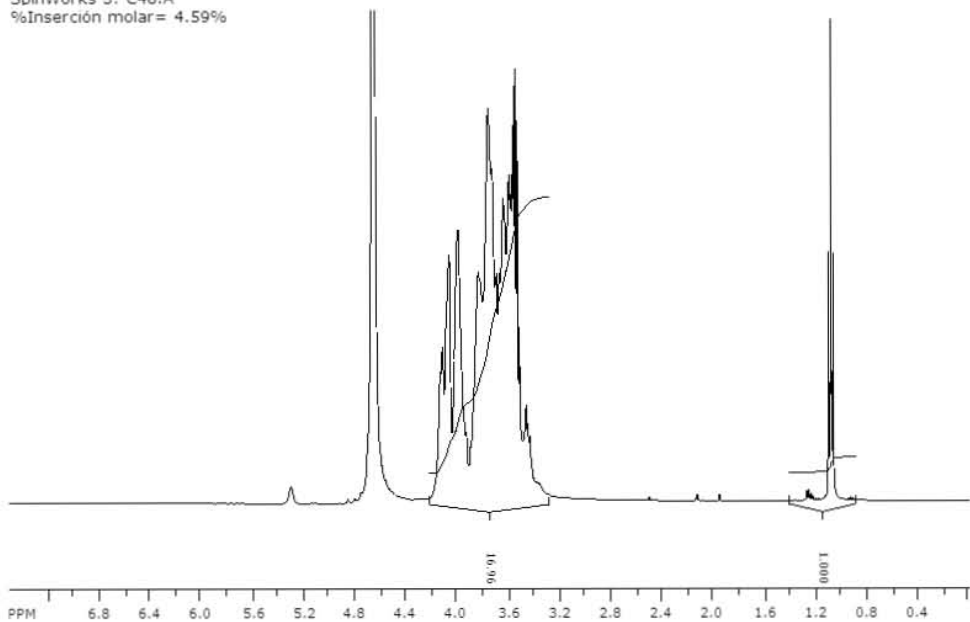


SpinWorks 3: C32.A (1)  
%Inserción molar= 4.07%

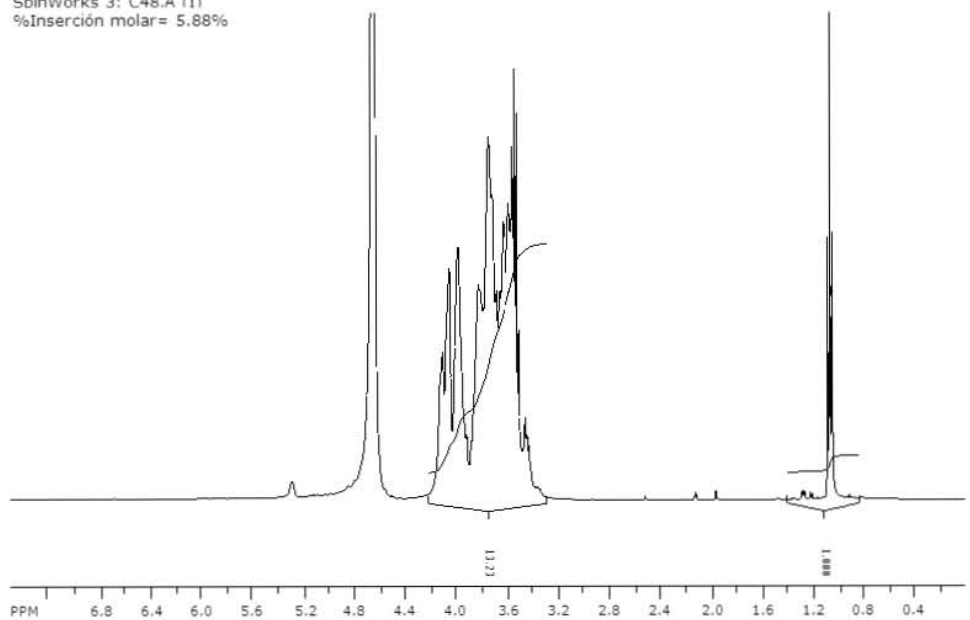


Condición: C Concentración de TBHQ: 48 mM Tiempo agregado: 0 min

SpinWorks 3: C48.A  
%Inserción molar= 4.59%

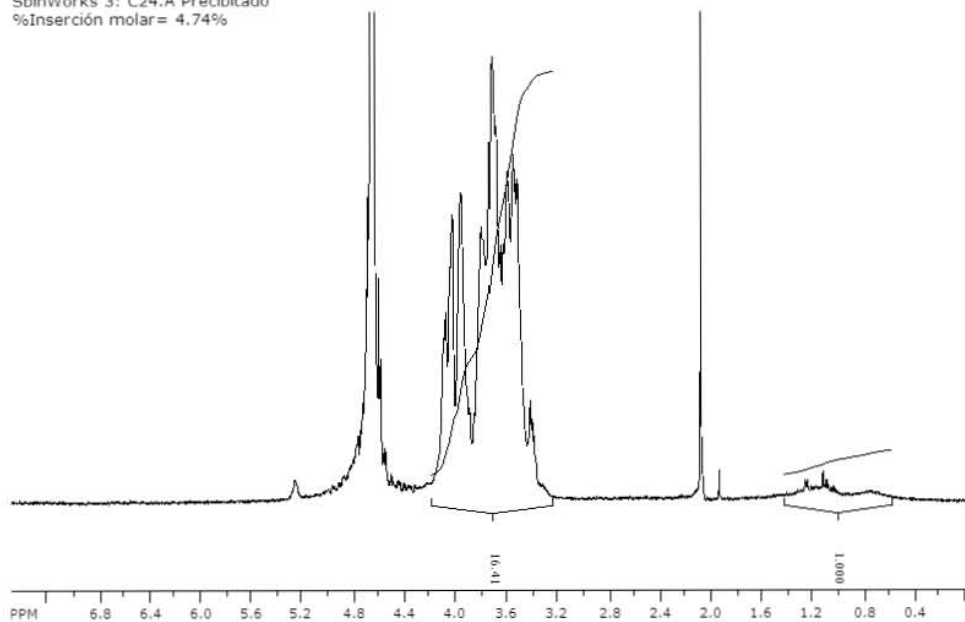


SpinWorks 3: C48.A (1)  
%Inserción molar= 5.88%

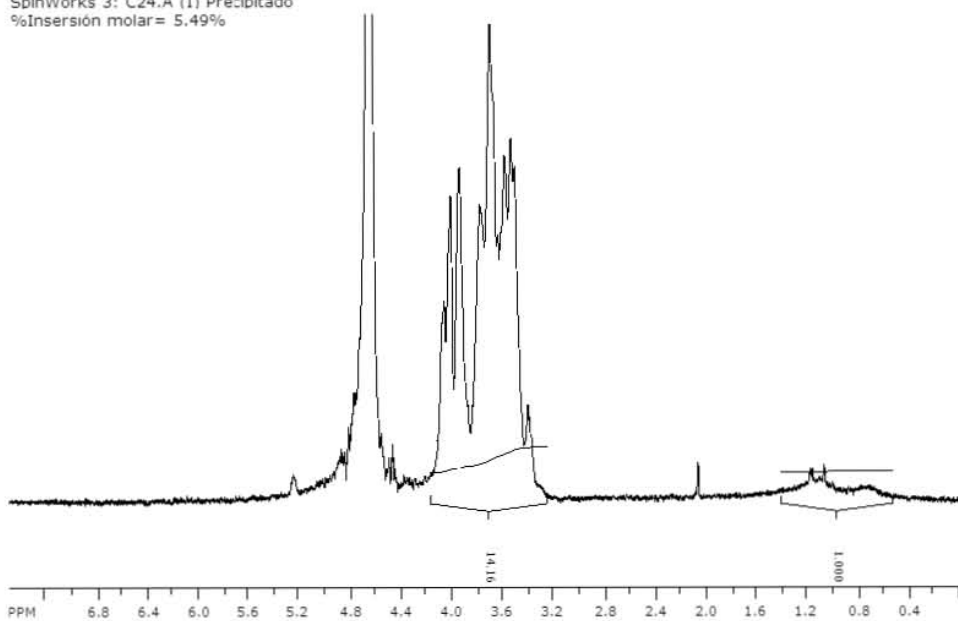


Condición: C (precipitado)      Concentración de TBHQ: 24 mM      Tiempo agregado: 0 min

SpinWorks 3: C24.A Precipitado  
%Inserción molar = 4.74%



SpinWorks 3: C24.A (I) Precipitado  
%Inserción molar = 5.49%

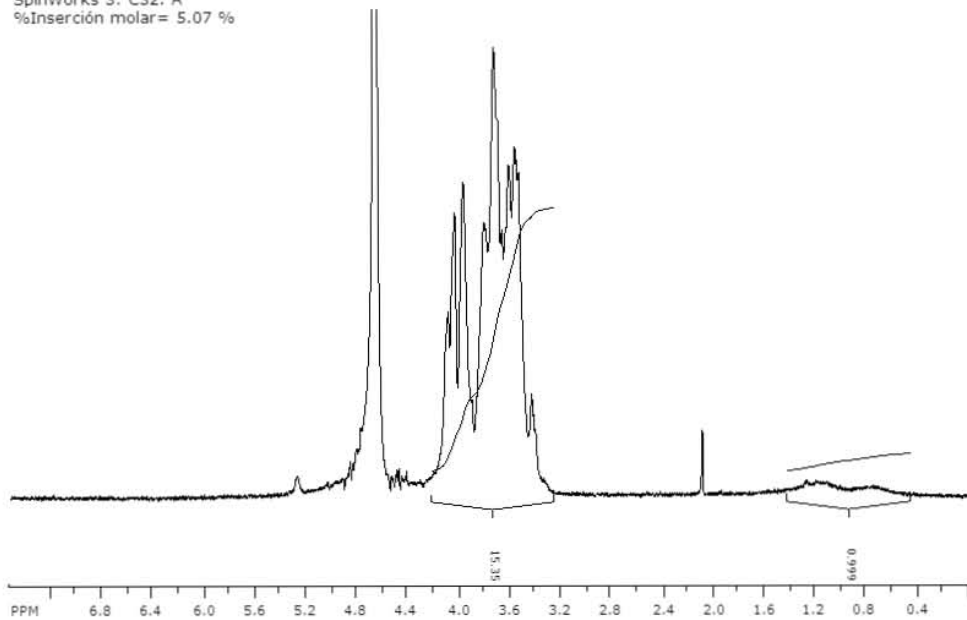


Condición: C (precipitado)

Concentración de TBHQ: 32 mM      Tiempo agregado: 0 min

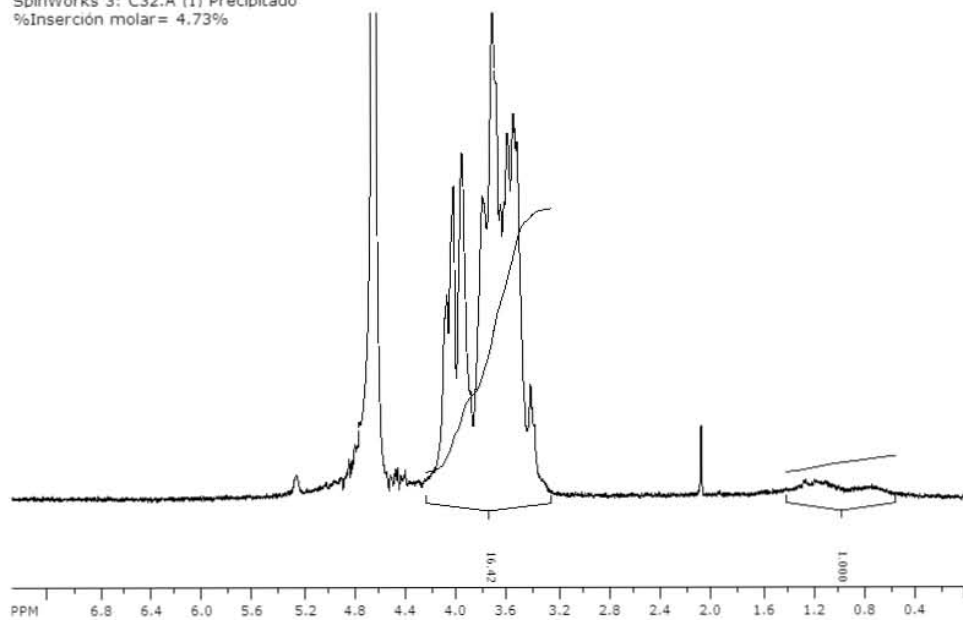
SpinWorks 3: C32. A

%Inserción molar= 5.07 %



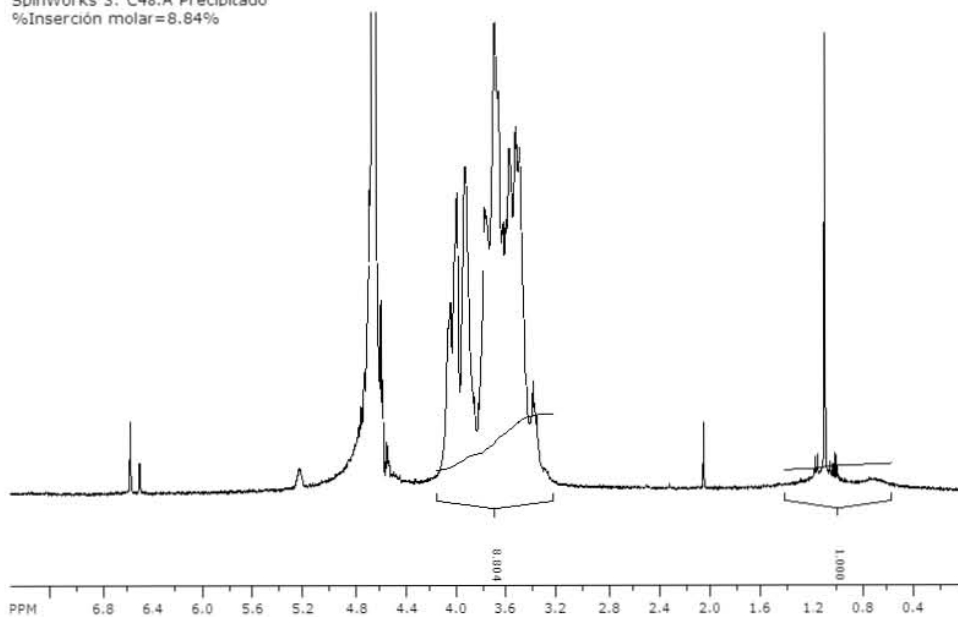
SpinWorks 3: C32.A (I) Precipitado

%Inserción molar= 4.73%



Condición: C (precipitado) Concentración de TBHQ: 48 mM Tiempo agregado: 0 min

SpinWorks 3: C48.A Precipitado  
%Inserción molar=8.84%



SpinWorks 3: C48.A (1) Precipitado  
%Inserción molar= 5.05%

